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

Produktion von *Bacillus cereus* Enterotoxinen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

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

von
Nora Stefanie Krause
aus Frankfurt a. M.

München 2007

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent/en:	Priv. Doz. Dr. Schalch

Tag der Promotion: 25. Mai 2007

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Schrifttum 3

2.1 Allgemeines 3

2.2 Diarrhö-Toxine 5
2.2.1 Hämolysin BL (HBL) 6
2.2.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE) 7

2.3 Kultivierung von *Bacillus cereus* 8
2.3.1 Anzuchtmedien und –bedingungen für *B. cereus* 9
2.3.1.1 Selektivmedien (feste Nährmedien) 9
2.3.1.2 Anreicherungsmedien (flüssige Nährmedien) 10
2.3.2 Techniken zur Simulation gastrointestinaler Anzuchtbedingungen 12
2.3.3 Wachstumskinetik von *B. cereus* unter gastrointestinalen Bedingungen 12

2.4 Kinetik der Enterotoxinproduktion 13
2.4.1 Hämolysin BL (HBL) 16
2.4.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE) 17

2.5 Nachweisverfahren für *Bacillus cereus*-Enterotoxine 18

3 Eigene Untersuchungen 19

3.1 Materialien 19
3.1.1 Chemikalien und Biochemika 19
3.1.2 Mikroorganismen und Zellkultur 20
3.1.2.1 Bakterienstämme 20
3.1.2.2 Zelllinien 21
3.1.3 Nährmedien 21
3.1.3.1 Flüssige Anreicherungsmedien für *B. cereus* 21

3.1.3.2 Feste Nährmedien für *B. cereus* 21
3.1.4 Puffer und Lösungen 21
3.1.4.1 Lösungen für die Zellkultur 22
3.1.4.2 Lösungen für Enzymimmunoassays 22
3.1.4.3 Lösungen für Immunaffinitätschromatographie 22
3.1.5 Immunreagenzien 23
3.1.6 Sonstige Materialien 23
3.1.6.1 Verbrauchsmaterialien 23
3.1.6.2 Geräte 24

3.2 Allgemeine Methodik 26
3.2.1 Erstellen des Sporenlyophilisates 26
3.2.2 Standardanzucht von *B. cereus* in CGY-Bouillon 26
3.2.3 Anzucht im Bioreaktor 27
3.2.3.1 Aerobe Anzucht 27
3.2.3.2 Anaerobe Anzucht 28
3.2.4 Enzymimmunoassays (EIA) 28
3.2.4.1 Hämolysin BL (HBL) 28
3.2.4.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE) 29
3.2.5 Immunaffinitätschromatographie 29
3.2.6 Zytotoxizitätstest für Diarrhö-Toxine 30
3.2.7 Keimzahlbestimmung 30

3.3 Ergebnisse 32
3.3.1 Wachstumskinetik von *B. cereus* 32
3.3.1.1 Adaptationsphase (lag-Phase) 32
3.3.1.2 Exponentielle Wachstumsphase (log-Phase) 35
3.3.1.3 Stationäre Phase 35
3.3.1.4 Absterbephase 36
3.3.2 Verlauf der Enterotoxinproduktion 37
3.3.2.1 Hämolysin BL (HBL) 37
3.3.2.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE) 39
3.3.3 Zytotoxizitätsverlauf 42

3.3.3.1 Zytotoxizitätsverlauf des NHE- und HBL-Produzenten *B. cereus* MHI 163 43
3.3.3.2 Zytotoxizitätsverlauf des NHE-Produzenten *B. cereus* MHI 241 44
3.3.4 Vergleich der Enterotoxinproduktion mit den Wachstumskurven 45
3.3.5 Vergleich der Enterotoxinproduktion mit der zytotoxischen Aktivität 49

4 Diskussion 55

5 Zusammenfassung 62
Summary 63

6 Literaturverzeichnis 64

Abkürzungsverzeichnis

BcET	*Bacillus cereus* Enterotoxin T
BHIG	Brain-Heart-Infusion mit Glucose
bp	Basenpaar
CA	Casaminoacids Medium
CaCo-2-Zellen	Colonadenokarzinom Zellen
CAD	Casaminoacids defined Medium
CGY	Caseinhydrolysat-Glucose-Yeast
CHO cells	Chinese-Hamster-Ovary-cells
CT	Cytotoxicity test
Cyt K	Zytotoxin K
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
Ent FM	Enterotoxin FM
FCS	fetales Kälberserum
GM (JB/milk/chicken/pea)	Gastric-Media (J-Broth/milk/chicken/pea)
HBL	Hämolysin BL
Kb	Kilobasen
KbE	Kolonie bildende Einheit
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAX	Maximalmedium
MIL	Mouse ileal loop test
MIN	Minimalmedium
MLT	Mouse lethality test
MYP	Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin B Agar
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NB	Nutrient Broth
NHE	Non-hemolytic-enterotoxin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-chain-reaction

PEMBA	Polymyxin B-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agar
PlcR	Phospholipase C Regulator
RIL	Rabbit ileal loop test
RP	Redox-Potential
RT-PCR	Real-Time-PCR
SGF	Simulated-gastric-fluid
SIF	Simulated-intestinal-fluid
TMB	Tetramethylbenzidin
TSB	Trypticase Soy Broth
Vero-Zellen	African green mokey kidney cells
VPR	Vascular permeability reaction
WST	Cell Proliferation Reagent WST-1

1 Einleitung

In den letzten Jahrzehnten nahm die Bedeutung von *Bacillus cereus* in der Lebensmittelhygiene stetig zu. Zum einen spielt *B. cereus* aufgrund der ubiquitären Präsenz und proteo- sowie lipolytischen Aktivität eine wichtige Rolle als Verderbniserreger, zum anderen ist *B. cereus* in der Lage, gastrointestinale Erkrankungen zu verursachen. Dabei unterscheidet man eine klassische Lebensmittelintoxikation, die emetische Form, von einer Lebensmittelinfektion, der Diarrhö-Form von *B. cereus*. Die Forschungsschwerpunkte der letzten Jahre lagen auf der Identifizierung und Charakterisierung der für das pathogene Geschehen verantwortlichen Enterotoxine. Für die Diarrhö-Form wurden zwei Enterotoxinkomplexe, das Non-hemolytic-enterotoxin (NHE; LUND & GRANUM, 1996; GRANUM et al., 1999) und das Hämolysin BL (HBL; THOMPSON et al., 1984; BEECHER et al., 1995), als Hauptursache identifiziert.

Weitere Untersuchungen zur Diarrhö-Form von *B. cereus* beschränkten sich auf Analysen der Toxine sowie Einzelkomponenten der Toxinkomplexe unter *in vitro* Bedingungen. Es wurden mehrere Studien unter anaeroben Bedingungen durchgeführt (DUPORT et al., 2004 und 2006; ZIGHA et al 2006), allerdings wählte man als Anzuchttemperatur in keiner dieser Arbeiten 37 °C. Des Weiteren existieren zwar aus den siebziger Jahren Ergebnisse über die biologische Aktivität anaerob kultivierter *B. cereus* Stämme bei verschiedenen Temperaturen, mangels Nachweismethoden zeigen diese allerdings nur das Zusammenspiel aller biologisch aktiven Komponenten des Kulturüberstandes (GLATZ et al., 1974; GLATZ & GOEPFERT, 1976; GLATZ & GOEPFERT, 1977). Durch die Entwicklung auf monoklonalen Antikörpern basierender Enzymimmunoassays (EIA) gegen die Einzelkomponenten der Enterotoxin-komplexe NHE und HBL von DIETRICH et al. (1999 und 2005) ist es nun möglich, die Produktion der einzelnen Toxinkomponenten, die zur biologischen Aktivität beitragen, zu analysieren.

Nach MORAVEK et. al (2006) ist die Quantifizierung der beiden als hauptsächliche Pathogenitätsfaktoren eingestuften Enterotoxinkomplexe NHE und HBL essentiell, um eine Aussage über die Virulenz von *B. cereus* Isolaten treffen zu können. Allerdings ist der alleinige Nachweis von Enterotoxinen nicht ausreichend, da HOA et al. (2000) bei den als apathogen eingestuften *B. cereus* Isolate, die als Probiotika verwendet werden, das Potential zur Produktion von NHE und HBL nachwies. Neben dem enterotoxischen Potential eines

Isolates ist somit auch die Existenz anderer bis dato noch unbekannter Pathogenitätsfaktoren zu vermuten, wie auch Untersuchungen von ANDERSSON et al. (1998), BORGE et al. (2001) sowie RAMARAO & LERECLUS (2006) bestätigen.

Bisher wurden die meisten Untersuchungen zur Toxinproduktion von *B. cereus* unter optimalen *in vitro* Bedingungen durchgeführt, deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit das Verhalten von *B. cereus* unter anaeroben Bedingungen, insbesondere bei 37 °C näher betrachtet werden. Dabei wurde versucht, i) die Produktion der einzelnen Toxinkomponenten abhängig vom Wachstumsverlauf zweier *B. cereus* Isolate unter verschiedenen Anzuchtbedingungen quantitativ zu analysieren, ii) die Zytotoxizität der verschiedenen Kulturen zu betrachten und iii) Hinweise auf das Verhalten von enteropathogenen *B. cereus* Isolaten unter *in vivo* Bedingungen zu erhalten.

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines

Bacillus cereus ist ein gram-positives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes, ubiquitäres Bakterium mit dem Potential zur Bildung von Endosporen. Die Basis für eine taxonomische Einteilung der umfangreichen Gruppe der *Bacillus* spp. erstellten SMITH et al. (1946) aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale. Nach heutigem Stand wird *B. cereus* der morphologischen Gruppe 1A zugerechnet und bildet mit den Spezies *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis* die sogenannte „Cereus-Gruppe“. Anhand der in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien können die Spezies innerhalb dieser Gruppe differenziert werden.

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

Spezies	Kolonie-Morphologie	Hämolyse	Beweglichkeit	Penicillin-Empfindlichkeit	Parasporale Kristalle
B. cereus	weiß	+	+	-	-
B. anthracis	weiß	-	-	+	-
B. thuringiensis	weiß/grau	+	+	-	+
B. mycoides	rhizoid	(+)	-	-	-
B. weihenstephanensis	Abgrenzung von *B. cereus*: Wachstum bei < 7 °C, nicht bei 43 °C; Identifizierung mittels PCR (rRNA, Cold-shock-Protein-A-Gen-*cspA*) (LECHNER et al., 1998)				
B. pseudomycoides	Abgrenzung zu *B. mycoides* nur anhand des Fettsäuremusters und der 16S rRNA-Sequenz				

Aufgrund der hohen Tenazität der Sporen ist *B. cereus* in der Lage in der Lebensmittelindustrie angewandte Wärmebehandlungsverfahren (z.B. Pasteurisierung) zu überleben. Zusätzlich machen die starke proteolytische Aktivität, die zu Lebensmittelverderb (z. B. „bitty cream“ oder Süßgerinnung) führt und das Enterotoxinbildungsvermögen *B. cereus* zu einem „Problemkeim“ im Bereich der Lebensmittelhygiene und –technologie (KOTIRANTA et al., 2000).

Bereits 1906 vermutete LUBENAU einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *B. cereus* in Lebensmitteln und Darmerkrankungen. Nachweislich konnte *B. cereus* als Erreger einer Lebensmittelinfektion erstmals 1948 in Norwegen identifiziert werden. HAUGE

beschreibt 1955 nach Selbstversuchen mit diesem Lebensmittelisolat eine von Diarrhö dominierte gastrointestinale Erkrankung. Anfang der siebziger Jahre trat in England (Public Health Laboratory Service, 1972 und 1973), ebenfalls im Zusammenhang mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmitteln (Reis), ein von Vomitus und Nausea bestimmtes neues Krankheitsbild auf.

Somit lassen sich die beim Menschen von *B. cereus* ausgelösten gastrointestinalen Erkrankungen nach ihren Leitsymptomen in zwei Formen einteilen: die emetische und die Diarrhö-Form. Bei der von Diarrhö dominierten Variante handelt es sich um eine meist selbst limitierende Lebensmittelinfektion, die nach 8-16 Stunden Inkubationszeit zum Ausbruch kommt und nach 12-14 Stunden wieder abklingt. Bislang wurden fünf Enterotoxine bzw. Enterotoxinkomplexe beschrieben (Tab. 2). Es handelt sich dabei um das Hämolysin BL (HBL), das Non-hemolytic-enterotoxin (NHE), das Zytotoxin K (Cyt K) und zwei Enterotoxine fraglicher Relevanz, das *B. cereus* Enterotoxin T (BceT) und das Enterotoxin FM (EntFM). Eine Beteiligung der beiden letztgenannten Toxine, BceT und EntFM, an Lebensmittelinfektionen ist bislang rein hypothetisch und nie nachgewiesen worden (CHOMA & GRANUM, 2002).

Tabelle 2: Übersicht über die Diarrhö-Enterotoxine von *B. cereus,* ihre Molekulargewichte und biologische Aktivität

Referenz	Molekulargewicht (kDa)	Biologische Aktivität
HBL (B, L_1, L_2)		
THOMPSON et al. (1984)	38; 39,5; 43	RIL[1], VPR[2], MLT[3], CT[4]
BEECHER et al. (1995)	37,8; 38,5; 43,2	
BEECHER et al. (2000 a)	38,1; 39,5; 44,8	
NHE (A, B, C)		
LUND & GRANUM (1996)	39; 45; 105	CT[4]
GRANUM et al. (1999)	41; 39,8; 36,5	
Zytotoxin K (Cyt K)		
LUND et al. (2000)	34	CT[4]
***B. cereus* Enterotoxin T (BceT)**		
AGATA et al (1995)	41	MIL[5], VPR[2], CT[4]
Enterotoxin FM (EntFM)		Toxizität rein hypothetisch aufgrund von Sequenzhomologien mit anderen Enterotoxinen
ASANO et al. (1997)	45	

[1] Rabbit ileal loop test, [2] Vascular permeability reaction, [3] Mouse lethality test, [4] Cytotoxicity test, [5] Mouse ileal loop test

Die emetische Form ist eine klassische Lebensmittelintoxikation. Hierbei wird mit der Nahrung präformiertes Toxin, ein hitze- und säurestabiles zyklisches Dodekadepsipeptid (Cereulid), aufgenommen, das innerhalb von 0,5-5 Stunden zu Übelkeit und Erbrechen führt. Die Symptome klingen nach 6-24 Stunden meist ohne bleibende Schäden wieder ab. In den letzten Jahren wurden jedoch auch Intoxikationen mit Cereulid mit letalem Ausgang aufgrund akuter Leberinsuffizienz beschrieben (MAHLER et al., 1997; DIERICK et al., 2005). Die Struktur des emetischen Toxins konnte 1994 von AGATA et al. geklärt werden.

Neben gastrointestinalen Erkrankungen kann *B. cereus* beim Menschen auch als Erreger von systemischen Infektionen wie zum Beispiel Septikämien, Endokarditiden, zentralnervösen Krankheiten sowie von lokalen Infektionen, beispielsweise Wundinfektionen oder Endophtalmitiden, auftreten (DROBNIEWSKI, 1993).

Bei Hunden (LUBENAU, 1906; NIKODÉMUSZ, 1967) und Katzen (NIKODÉMUSZ, 1965; NIKODÉMUSZ & GONDA, 1966) konnten ebenfalls in Fütterungsversuchen gastrointestinale Symptome provoziert werden. Dramatisch verlaufende Mastitiden bei Rindern wurden 1957 von BROWN & SCHERER sowie von TERPLAN (1957) auf *B. cereus* zurückgeführt.

2.2 Diarrhö-Toxine

Von den fünf oben erwähnten Enterotoxinen konnte eine Beteiligung an Lebensmittelinfektionen für BceT und EntFM nie nachgewiesen werden (CHOMA & GRANUM, 2002). Die epidemiologische Bedeutung von Cyt K als Ursache von Lebensmittelinfektionen ist gering, da es bisher nur in einem einzigen Stamm (LUND et al. 2000) gefunden werden konnte. Das enterotoxische Potential von *B. cereus* wird somit von den beiden Enterotoxinkomplexen HBL und NHE dominiert. Während die Enteropathogentität des HBL-Komplexes in Tierversuchen verifiziert werden konnte (THOMPSON et al., 1984; BEECHER et al., 1995), gibt es für das NHE umfangreiche Studien zur Toxizität im Zellkulturtest, die diesem Enterotoxin eine wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor im Krankheitsbild der Diarrhö-Form zuschreiben (LUND & GRANUM, 1996; MORAVEK et al., 2006).

2.2.1 Hämolysin BL (HBL)

Bei dem 1990 von BEECHER & MACMILLAN erstmals beschriebenen hämolytisch aktiven Enterotoxin HBL handelt es sich um einen aus drei Proteinkomponenten bestehenden Komplex. Erst das Zusammenwirken aller drei atoxischen Einzelkomponenten B (Binding), L_1 (Lysis 1) und L_2 (Lysis 2) bewirkt die maximale biologische Aktivität (BEECHER et al., 1995). BEECHER & WONG definierten 2000 (a) die Molekulargewichte der Einzelproteine mit 38.080 Da für die B-Komponente, 39.540 Da für die L_1–Komponente sowie 44.800 Da für die L_2-Komponente (Tab. 2). Alle drei Proteine sind laut HEINRICHS et al. (1993) und RYAN et al. (1997) auf demselben Operon (Abb. 1) codiert und in eine mRNA transkribiert (*hblC* = L_2; *hblD* = L_1; *hblA* = B). Ein weiteres Gen (*hblB* = B'), dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte, befindet sich ebenfalls auf dem Operon (HEINRICHS et al., 1993 und RYAN et al., 1997). Aufgrund einer 73 %igen Homologie mit der HBL-B Komponente wird es als B' bezeichnet, konnte aber bislang nicht aus Kulturüberständen isoliert werden. AGAISSE et al. (1999) identifizierten eine Bindungsstelle für den Regulator PlcR auf dem Operon, der neben weiteren Exoproteinen die HBL-Expression reguliert. Molekularbiologische Studien mittels Polymerase-Chain-Reaktion-Methode (PCR) von PRÜSS et al. (1999), HANSEN & HENDRIKSEN (2001) IN'T VELD et al. (2001), GUINEBRETIÈRE et al. (2002) und MORAVEK et al. (2006) belegen, dass bei 50-60 % der untersuchten *B. cereus* Isolate Gene der drei HBL-Komponenten vorliegen.

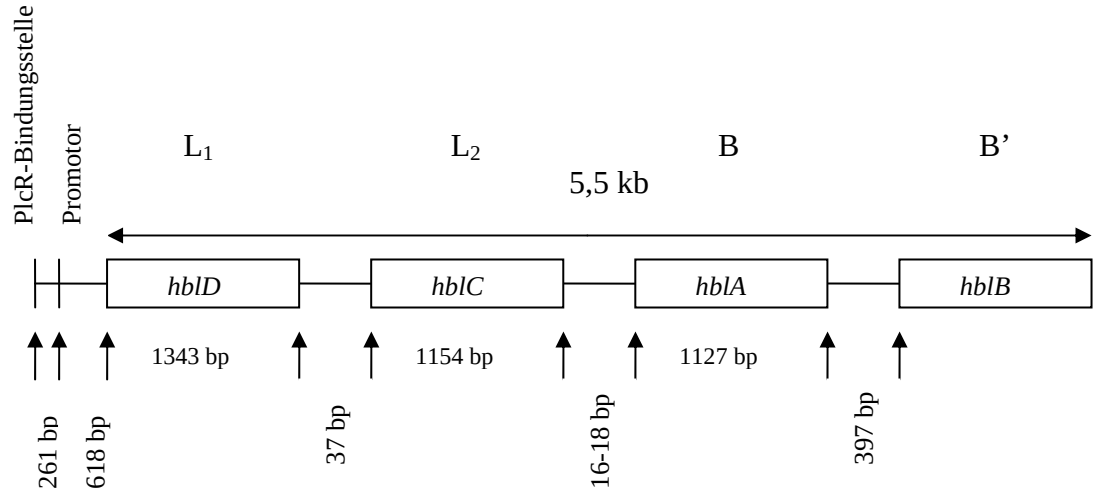


Abbildung 1: Aufbau des *hbl*-Operons nach GRANUM (2001)

Die bei HBL-Produzenten beobachtete diskontinuierliche Hämolyse (BEECHER & MACMILLAN, 1990 und 1991) kann nur bedingt zur phänotypischen Identifizierung herangezogen werden. Dieses paradoxe Zonenphänomen auf Schafblutagar, bei dem die Hämolyse weiter entfernt von der Kolonie beginnt und dann erst unmittelbar um die Kolonie stattfindet, konnte zwar nie bei HBL-negativen Stämmen gefunden werden, fehlte jedoch auch bei ca. 50 % der HBL-positiven Stämme (IN'T VELD et al., 2001). Als Erklärung für die diskontinuierliche Hämolyse vermuteten BEECHER & WONG (2000 b) einen Synergismus bzw. Antagonismus mit den ebenfalls von *B. cereus* produzierten Enzymen Sphingomyelinase und Phospholipase C.

Es existieren zwei Theorien, den Wirkungsmechanismus des HBL-Komplexes auf zellulärer Ebene zu erklären. (1) Nach Bindung der B-Komponente an die Zelloberfläche werden die beiden L-Komponenten in die Zelle geschleust und stören dort den Zellmetabolismus (BEECHER & MACMILLAN, 1991). (2) Die drei Toxinkomponenten binden unabhängig voneinander an die Zelloberfläche und formieren sich zu einem „membrane-attack-complex", der Membranläsionen (Poren, Ø bis zu 1,2 nm) verursacht (BEECHER & WONG, 1997). Der Zelltod erfolgt nach Austreten von Zellmaterial durch den kolloidosmotischen Druck.

2.2.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE)

Nach einer durch *B. cereus* hervorgerufenen Lebensmittelinfektion konnte bei dem involvierten Isolat trotz nachgewiesener zytotoxischer Aktivität kein HBL gefunden werden. LUND & GRANUM konnten 1996 aus diesem Isolat das zelltoxische NHE isolieren und charakterisieren. Es besteht ebenfalls aus drei Proteinkomponenten, die nur in Kombination ihre maximale biologische Aktivität ausbilden. Laut GRANUM et al. (1999) betragen die Molekulargewichte der Einzelkomponenten 39.820 Da (NheB), 41.019 Da (NheA) und 36.481 Da (NheC). So wie beim HBL werden auch hier alle drei Einzelproteine (*nheA* = A, *nheB* = B, *nheC* = C) auf einem Operon codiert (Abb. 2) und durch den PlcR-Regulator kontrolliert (AGAISSE et al., 1999). Strukturelle Ähnlichkeiten konnten LUND & GRANUM (1997 und 1999) zum einen zwischen der NheB-Komponente und der L_1-Komponente des HBL-Komplexes, zum anderen zwischen der NheC-Komponente und der B-Komponente des HBL-Komplexes feststellen. Die Prävalenz der Gene für den NHE-Komplex liegt nach verschiedenen Studien (HANSEN & HENDRIKSSEN, 2001; GUINEBRETIÈRE et al., 2002;

DIETRICH et al., 2005; EHLING-SCHULZ et al., 2005 und MORAVEK et al., 2006) bei 90 % und höher.

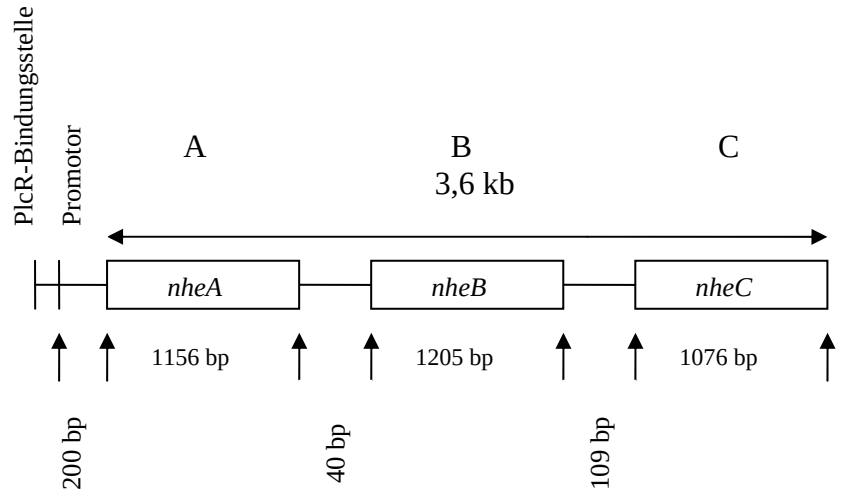


Abbildung 2: Aufbau des *nhe*-Operons nach GRANUM (2001)

Der Wirkungsmechanismus des NHE-Komlexes ist noch weitgehend ungeklärt. Die maximale Zytotoxizität konnte von LINDBÄCK et al. (2004) mit einem Mengenverhältnis 10:10:1 der Komponenten NheA, NheB und NheC erreicht werden. Des Weiteren wurde von LINDBÄCK et al. (2004) und DIETRICH et al. (2005) die NheB Komponente als Bindungskomponente identifiziert.

2.3 Kultivierung von *Bacillus cereus*

Schon zu Beginn der *B. cereus* Forschung wurden Anzuchtmedien und -bedingungen entwickelt, die schnelles Bakterienwachstum und hohe Toxinproduktion ermöglichen sollten. Dies geschah teilweise auch unter Berücksichtigung gastrointestinaler Bedingungen, da man bereits Mitte der siebziger Jahre in Lebensmitteln präformiert vorliegende Diarrhö-Toxine aufgrund deren Instabilität gegenüber Wärmebehandlung, Säuren und Proteasen als Krankheitsursache ausschloss (Tab. 3).

Tabelle 3: Inaktivierung der *B. cereus* Diarrhö-Toxine im Kulturüberstand nach Einwirkung von Hitze und Proteasen in Abhängigkeit von der Einwirkdauer

Inaktivierung	Biologische Aktivität	Referenz
10 min, 56 °C	VPR[2]: 0 %	GLATZ et al. 1974
5 min, 56 °C	VPR[2]: 0 %	SPIRA & GOEPFERT 1975
30 min, 45 °C	VPR[2] und RIL[1]: 100 %	SPIRA & GOEPFERT 1975
60 min, 36 °C; 45 °C; 50 °C	VPR[2]: 100 %; 53 %; 21 %	TURNBULL et al.1979 und
10 min/20 min; 55 °C; 60 °C	VPR[2]: 26 % / 0 %; 10 % / 0 %	SHINAGAWA et al. 1991
10 min/20 min; 55 °C; 60 °C	CT[3]: 0 %	DIETRICH et al. 1997
60 min, Trypsin	RIL[1]: 0 %	GOEPFERT et al. 1973
60 min, 2 mg/ml Trypsin	VPR[2]: 0 %	TURNBULL et al.1979
60 min, 400 µg/ml Trypsin	VPR[2]: 0 %	SHINAGAWA et al. 1991
10 min/20 min, 1 mg/ml Trypsin und Chymotrypsin	VPR[2]: 5 %/1 %	GRANUM et al. 1993

[1] Rabbit ileal loop test, [2] Vascular permeability reaction, [3] Cytotoxicity test

Demnach wird die toxische Dosis der Diarrhö-Enterotoxine erst nach dem Verzehr von *B. cereus* Keimen oder Sporen und der Ansiedlung im Dünndarm produziert (GRANUM, 2001).

Eine Bewertung der Toxinproduktion erfolgte mangels spezifischer Tests nur durch Tierversuche über die toxische Aktivität der Kultur bzw. des Kulturüberstandes. Nach Isolierung und Charakterisierung der Enterotoxinkomplexe ab Mitte der neunziger Jahre war es möglich präzisere und spezifischere *in vitro* Tests zur Ermittlung des toxinogenen Potentials zu gestalten. Daraufhin wurden in den letzten Jahren weitere Studien zur Wachstums- und Toxinbildungskinetik veröffentlicht.

2.3.1 Anzuchtmedien und –bedingungen für *B. cereus*

2.3.1.1 Selektivmedien (feste Nährmedien)

Zur Selektion von *B. cereus* wurden zwei Nährmedien mit Zusätzen von Polymyxin B (5-10 µg/ml), Mannitol und Eigelb, zum einen MYP (**M**annitol-Egg-**Y**olk-**P**olymyxin B,

MOSSEL et al., 1967) und zum anderen PEMBA (**P**olymyxin B-**E**igelb-**M**annitol-**B**romthymolblau-**A**gar, HOLBROOK & ANDERSON, 1980) entwickelt (Tab. 4). Der Zusatz von Polymyxin B hemmt gram-negative Keime, wodurch die Isolation geringer *B. cereus* Keimzahlen bei vergleichsweise hoher Begleitflora (bis 10^6) ermöglicht wird. Durch die von *B. cereus* produzierte Lecithinase (Phospholipase C) wird Lecithin im Eigelb hydrolysiert und ein charakteristischer konzentrischer Eigelb-Präzipitationshof entsteht um die Kolonie. Als weiteres Identifikationsmerkmal dient die fehlende Fermentation von Mannitol durch *B. cereus*, die mittels der pH-Indikatoren Phenolrot (MYP) bzw. Bromthymolblau (PEMBA) angezeigt wird. Die Inkubation erfolgt im Falle von MYP bei 30 °C für 24-48 Stunden und bei PEMBA bei 37 °C über 24 Stunden und bei Bedarf für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur (ISO 21871). Eine Übersicht über *B. cereus* Medien gibt Tab. 4.

2.3.1.2 Anreicherungsmedien (flüssige Nährmedien)

Um *B. cereus* für Studien zu Wachstumskinetik und Enterotoxinproduktion zu kultivieren verwendeten EVANS et al. (1973) ein vitaminfreies Medium (CA-Medium: **C**as**a**minoacids) mit Casaminosäuren, Hefeextrakt und Basissalzen. GLATZ et al. (1974) reicherten *B. cereus* mit vergleichbarem Wachstum und Toxinaktivität in Herz-Hirn-Bouillon mit Zusatz von 0,1 % Glucose an (BHIG – **B**rain-**H**eart-**I**nfusion, **G**lucose).

GLATZ & GOEPFERT verglichen 1976 drei Anzuchtmedien unter Bedingungen eines Bioreaktors: BHIG, CA und mit Glucose supplementiertes CA (CAD-Medium – **C**as**a**minoacid **d**efined Media). Der Anzucht ging eine Voranreicherung in dem auch danach verwendeten Medium über Nacht (10-14 Stunden) voraus. Durch Variation des pH-Wertes, der Glucosekonzentration und der Anzuchttemperatur von 20-42 °C im Bioreaktor und Erlenmeyerkolben definierten sie optimale Anzuchtbedingungen mit CAD Medium bei einem pH-Wert von 8, 1 % Glucosezusatz und einer Temperatur von 32 °C im Bioreaktor. Das Wachstum wurde photometrisch über die optische Dichte bei 560 nm (OD_{560}) bestimmt, da das Zelltrockengewicht und die Absorption bei einer OD_{560} proportional zueinander verliefen. In weiteren Untersuchungen ermittelten GLATZ & GOEPFERT (1977) die Einflüsse von Vitaminen und Variationen in der Aminosäurenzusammensetzung auf das Wachstum und die Toxinproduktion (s.u.).

BEECHER & WONG (1994 a) benutzten ein modifiziertes Medium nach GLATZ & GOEPFERT (1977), das CGY-Medium, aus Casaminosäuren, Glucose, Hefeextrakt und Basissalzen. Eine Voranreicherung wurde 17 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Erreichen der stationären Phase wird die Voranreicherung dann im Verhältnis 1:100 in frisches CGY-Medium überführt. Nach weiteren 5 Stunden Inkubation bei 32 °C im Schüttelwasserbad wird der Toxinüberstand durch Zentrifugation gewonnen, 1 mM EDTA zugesetzt und bis zur weiteren Analyse tief gefroren, um Verluste durch Proteolyse zu verhindern.

Tabelle 4: Medien zu Selektion und Anzucht von *B. cereus*

Medium	Referenz
Selektivmedien (feste Nährmedien)	
Mannitol-Egg-**Y**olk-**P**olymyxin-Agar (MYP)	MOSSEL et al. (1967)
Polymyxin-**E**igelb-**M**annitol-**B**romthymol-blau-**A**gar(PEMBA)	HOLBROOK & ANDERSON (1980)
Anreicherungsmedien (flüssige Nährmedien)	
Cas**a**minoacid (CA)	EVANS et al. (1973)
Brain-**H**eart-**I**nfusion, **G**lukose (BHIG)	GLATZ et al. (1974)
Nutrient **b**roth (NB)	GLATZ et al. (1974)
Trypticase-**s**oy-**b**roth (TSB)	GLATZ et al. (1974)
Cas**a**minoacid **d**efined Media (CAD)	GLATZ & GOEPFERT (1976)
Minimalmedium (MIN)	GLATZ & GOEPFERT (1977)
Minimalmedium mit Aspartat, Glycin, Lysin und Tyrosin (MOD)	GLATZ & GOEPFERT (1977)
Maximalmedium (MAX)	GLATZ & GOEPFERT (1977)
Caseinhydrolysat **G**lucose **Y**east (CGY)	BEECHER & WONG (1994 a)
Simulated-**g**astric-**f**luid (SGF)	ROTARD et al. (1995)
Simulated-**i**ntestinal-**f**luid (SIF)	ROTARD et al. (1995)
J-**b**roth (JB)	CLAUS & BERKELY (1986)
Gastric-**M**edia-**JB** (GMJB)	CLAVEL et al. (2004)
Gastric-**M**edia-**Milk** (GMMilk)	CLAVEL et al. (2004)
Gastric-**M**edia-**Chicken** (GMChicken)	CLAVEL et al. (2004)
Gastric-**M**edia-**Pea** (GMPea)	CLAVEL et al. (2004)

2.3.2 Techniken zur Simulation gastrointestinaler Kulturbedingungen

Zur Simulation gastrointestinaler Kulturbedingungen sind neben dem Anzuchtmedium (siehe Tab. 4) Parameter wie Temperatur, Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert von Interesse.

Die Kultivierung kann nach MENKEL (1992) in einem geschlossenen, diskontinuierlichen System oder in einem offenen kontinuierlichen System erfolgen. Geschlossene Systeme, zu denen auch Batch-Verfahren gehören, zeichnen sich dadurch aus, dass während der Fermentation keine Stoffe zugegeben oder Produkte entnommen werden. Bei kontrollierten diskontinuierlichen Kulturen können Säuren oder Basen zur Erhaltung eines bestimmten pH-Wertes oder Antischaummedien zugegeben werden. Wachstum in geschlossenen Systemen verläuft in fünf Phasen. Der Adaptation der Mikroorganismen, lag-Phase, folgen die kurze Beschleunigungsphase und die exponentielle Wachstumsphase. Nach dem Verbrauch des Substrates geht das System in die stationäre Phase ohne Wachstum über und nach vollständigem Abbau aller Energiereserven beginnt die Absterbephase.
Bei offenen, kontinuierlichen Systemen wird durch ständigen Zufluss von Substrat bei gleichzeitiger Entnahme von Kulturlösung die exponentielle Wachstumsphase künstlich verlängert. Dieses System ist im Gleichgewicht, solange die Anzahl der entnommenen Mikroorganismen den nachgewachsenen entspricht. Feeding- oder Fed-Batch Verfahren sind geschlossene Systeme, denen während der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich oder diskontinuierlich Substrat zugegeben wird, ohne dass Kulturlösung entnommen wird. Limitierender Faktor ist das Kesselvolumen des Bioreaktors.

2.3.3 Wachstumskinetik von *B. cereus* unter gastrointestinalen Bedingungen

WIJNANDS et al. (2006) untersuchten das Wachstumspotential von Sporen verschiedener *B. cereus* Stämme unter simulierten gastrointestinalen Bedingungen. Dabei wurden psychrotrophe und mesophile Stämme untersucht. Die zur Simulation verwendeten Medien, simulated gastric fluid (SGF) und simulated intestinal fluid (SIF) wurden nach ROTARD et al. (1995) hergestellt, wobei das SGF auf pH-Werte von 1; 2,5 und 4,5 eingestellt wurde. Den Ergebnissen sind drei wichtige Aussagen zu entnehmen. (1) Eine Inkubationsdauer von bis zu einer Stunde unter Magenbedingungen bei pH 2,5 und 4,5 zeigt keine signifikante Inaktivierung der Sporen. Lediglich bei pH 1 sinkt die Anzahl der *B. cereus* Sporen, die

Auskeimen können, um eine Zehnerpotenz ab, Wachstum unter Darmbedingungen ist jedoch immer noch möglich. (2) Bei simulierten Darmbedingungen über 4 Stunden ist ein Abfall der Sporenzahl mit gleichzeitigem Anstieg der vegetativen Keime zu beobachten. Dabei zeigen die mesophilen Stämme einen deutlicheren Anstieg als die psychrotrophen. (3) Nach einer Vorinkubation in SGF verläuft die Wachstumskurve in SIF steiler als ohne Vorinkubation, was einen positiven Effekt der Magenpassage auf das Wachstum im Dünndarm vermuten lässt. Diese Untersuchungen wurden bei 37 °C durchgeführt.

Bei gekühlten Produkten, insbesondere Milchprodukten, konnte von ANDERSEN BORGE et al. (2001) gezeigt werden, dass Sporen auch bei Temperaturen von 6 und 7 °C auskeimen und wachsen. Bei allen untersuchten Stämmen konnte über PCR das Vorhandensein eines cold-shock-protein-A (*cspA*) und somit eine Zugehörigkeit zu *B. weihenstephanensis* ausgeschlossen werden. Während der Nahrungsaufnahme kann der pH-Wert des Magens auf 4,5-5 ansteigen, was auch vegetativen Stadien eine Überlebenschance gibt (RUSSEL et al., 1993; DRESSMANN et al., 1990; CLAVEL et al., 2004). Nach CLAVEL et al. (2004) hängt die Überlebensrate vegetativer *Bacillus cereus* nicht nur vom pH-Wert ab sondern auch vom Medium. So konnten vegetative Stadien in Magen-Milch-Medium ohne Probleme über sechs Stunden einem pH-Wert von 4,1 standhalten. In anderen Medien war ein pH-Wert von 4,5-5 notwendig. Diese Versuche wurden bei 34 °C durchgeführt.

2.4 Kinetik der Enterotoxinproduktion

Ein erster quantitativer Vergleich der Toxinaktivität in verschiedenen Nährmedien wurde von GLATZ et al. (1974) mit **n**utrient **b**roth (NB), **T**rypticase **s**oy **b**roth (TSB) und **B**rain-**H**eart-**I**nfusion mit 0,1 % Glucose (BHIG) bei 32°C durchgeführt. Die höchste Toxinaktivität konnte bei Kulturüberständen von BHIG Kulturen beobachtet werden. In TSB Kulturen sank die biologische Aktivität und in NB Kulturen konnte keine biologische Toxinaktivität nachgewiesen werden.

In den Studien von GLATZ & GOEPFERT (1976) über optimale Anzuchtbedingungen und -medien beobachteten sie, dass eine höhere Anzuchttemperatur die Wachstumsrate erhöht, allerdings die Toxinproduktion senkt. Bei pH-Werten unter pH 8 und über pH 8,5 sank die Toxinproduktion; pH-Werte von < 6 führten dazu, dass kein Toxin mehr nachweisbar war.

Reine CA-Kulturen und CAD-Kulturen mit Glucosekonzentrationen bis 5 % wiesen relativ hohe Toxinlevel auf. Bei Zusatz von 25 % Glucose verlangsamte das Wachstum deutlich und es wurde ein geringerer Toxinlevel erreicht. Das Maximum der Toxinaktivität bei 1 % Glucosekonzentration wurde nach 4,5 Stunden Anzuchtdauer festgestellt und blieb bis 9 Stunden auf diesem Niveau. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der Menge des Inoculums und der Toxinproduktion festgestellt werden. Aus der Voranreicherung wurden 0,1 %, 1 % und 10 % in die Kultur überführt. Entsprechend der Startkeimzahl verlief die Wachstumskurve bei größeren Inocula steiler, höhere Toxinlevel wurden jedoch mit geringeren Inocula erzeugt. Aufgrund der Vermutung, dass die Toxinproduktion während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt, führt eine verkürzte exponentielle Phase durch höhere Startkeimzahlen zu einer geringeren Toxinproduktion. Ein Optimum wurde bei 1 % Inoculum gefunden.

GLATZ & GOEPFERT (1977) stellten fest, dass im Gegensatz zu der Aminosäurekombination Zusätze von Vitaminen weder einen Einfluss auf die Toxinproduktion noch auf die Wachstumsrate haben. Durch Variation der Aminosäuren des CA-Mediums konnten die Autoren ein MIN-Medium definieren, bei dem Wachstum und Toxinproduktion stattfanden, wenn auch nur geringe Toxinmengen detektiert wurden. Nach Zugabe aller Aminosäuren (MAX-Medium) konnte die Toxinproduktion um das zwanzigfache gesteigert werden. Die Supplementierung von vier Aminosäuren zum MIN-Medium, nämlich Aspartat, Glycin, Lysin sowie Tyrosin (MOD-Medium), führte zu sechsfach höheren Toxinwerten. Mit Vitaminzusätzen zu den Medien (MIN, MOD und MAX) konnte keine weitere Steigerung in der Wachstumsrate und der Toxinsynthese erreicht werden. Diese Versuche wurden alle bei 32 °C durchgeführt.

Die oben beschriebenen Studien zur Enterotoxinproduktion konnten aufgrund nicht vorhandener Nachweisverfahren nur unspezifische Angaben zum toxischen Potential der getesteten *B. cereus*- Stämme machen. Durch die Entwicklung von spezifischen und semi-quantitativen Testkits konnte in neueren Studien eine Differenzierung bezüglich der beiden Enterotoxinkomplexe (HBL und NHE) und deren Kinetik angefertigt werden.

BEATTIE & WILLIAMS (2002) analysierten mesophile und psychrotrophe *B. cereus* Isolate aus Lebensmitteln und Vergiftungsfällen in unkontrollierten, diskontinuierlichen Kulturen im Erlenmeyerkolben sowie in kontrollierten, diskontinuierlichen und kontinuierlichen Kulturen

im Bioreaktor. Zur Analyse der Toxinproduktion wurden zwei kommerziell erhältliche Tests herangezogen, BCET-RPLA (Oxoid) zum Nachweis der HBL-L_2-Komponente und ein ELISA-System (Tecra) zum Nachweis einer der NheB-Komponente. Die biologische Aktivität der Toxine wurde über einen Zytotoxizitätstest mit Chinese-hamster-ovary-cells (CHO) bestimmt. Bei der Auswertung der biologischen Aktivität wurde allerdings nicht weiter auf die einzelnen Toxinkomplexe eingegangen. Es konnte festgestellt werden, dass *B. cereus* in einem pH-Bereich von 5-9 wächst, die höchsten Toxinlevel allerdings bei den pH-Werten 7 und 8 erreicht wurden. Der pH-Wert gilt als wichtiger Toxin-Faktor, da beim pH-Wert 5 Enterotoxin in nur geringen Mengen nachgewiesen werden konnte. Vermutlich werden die Einzelkomponenten durch extreme pH-Werte inaktiviert.

Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen untersucht. Der Stickstoff wurde als limitierender Wachstums- und Toxinproduktionsfaktor definiert, da Zusätze von Stärke und Glucose in pH-kontrollierten Kulturen keine Änderungen in Wachstum und Enterotoxinpräsenz bewirkten. Früher beobachtete Zusammenhänge der Glucose- bzw. Stärkezusammensetzung des Nährmediums und des Wachstums- und Toxinbildungsvermögens (GARCIA-ARRIBAS & KRAMER, 1990; SUTHERLAND & LIMOND, 1993) wurden mit der durch Abbauprodukte bedingten pH-Wert Entwicklung in Verbindung gebracht.

Außerdem wurde beobachtet, dass die Toxinproduktion von der Wachstumsphase, jedoch nicht von der Wachstumsrate abhängig ist. Zugabe von Glucose führte zu einer verlängerten exponentiellen Wachstumsphase und korrespondierend zur Verlängerung der Toxinproduktionsperiode, wodurch indirekt die Toxinmenge gesteigert wurde. Weiterhin wurden verschiedene Stickstoffquellen in Zusammenhang mit der Enterotoxinproduktion analysiert. Intakte Milchproteine, wie z. B. Molke, führten zu höheren Enterotoxinlevel verglichen mit hydrolysierten Proteinen oder Casein. Auch die Konzentration der Proteine hatte einen Einfluss auf die produzierte Toxinmenge, da mit steigender Molkekonzentration von 0,1-1 % auf 4 % die Toxinkonzentration anstieg.

Der Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf Vermehrung und Toxinbildung wurde ebenfalls bewertet. Obwohl *B. cereus* fakultativ anaerob ist, konnte in dem vorliegenden Versuchsaufbau ohne Sauerstoff kein Wachstum und keine Toxinproduktion erreicht werden. Bei Sauserstoffgehalten von 25-75 % wurden höchste Toxin- und Keimzahllevels erzielt, ab

90 % Sauerstoffgehalt hingegen wurde ein signifikanter Abfall beider Parameter beobachtet. Demnach ist der Sauerstoffpartialdruck der Umgebung ein weiterer Regulationsfaktor von Wachstum und Toxinbildung.

2.4.1 Hämolysin BL (HBL)

In dem von BEECHER & WONG (1994 a) entwickelten CGY-Medium zeigte *B. cereus* unter aeroben Bedingungen schnelles Wachstum und ähnliche HBL-Produktion wie in BHIG und war durch den geringeren Farbstoffgehalt für eine säulenchromatographische Aufreinigung besser geeignet. Die gemessene Toxinmenge war bei 32 °C höher als bei 37 °C, was die Autoren auf eine vermehrte Proteaseaktivität bei 37 °C zurückführten.

Das Maximum der HBL Produktion konnten DUPORT et al. (2004) unter aeroben Bedingungen in kontrollierten Batchkulturen nicht bei höchster Zelldichte gegen Ende der exponentiellen Phase feststellen, sondern beim Übergang von der lag-Phase zur exponentiellen Phase. Es verschob sich mit sinkender Sauerstoffkonzentration zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase. Unter Anaerobiosis lag eine maximale Toxinproduktion bei höchster Zelldichte vor. Weiterhin konnte in der Studie gezeigt werden, dass entgegen vorheriger Studien (BEATTIE & WILLIAMS, 2002; CHRISTIANSSON et al., 1989), in denen eine höhere Toxinproduktion unter Sauerstoffatmosphäre vorlag, unter anaeroben Bedingungen eine höhere HBL-Toxinproduktion stattfand. Die Wachstumsrate war unter Anaerobiosis wesentlich geringer, so dass ein Zusammenhang zwischen Wachstumsrate und Toxinproduktion vermutet und in weiteren Versuchen bestätigt wurde. Dazu wurden kontinuierliche anaerobe Kulturen mit unterschiedlichen Wachstumsraten verglichen. Bei der niedrigsten Wachstumsrate wurde eine siebenfache höhere Toxinproduktion gegenüber aeroben Bedingungen festgestellt.

Es konnte in der Studie von DUPORT et al. (2004) auch ein Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration und der Toxinproduktion festgestellt werden. Mit steigender Glukosekonzentration von 10 mM auf 300 mM wurde die HBL Toxinproduktion um das zehnfache gesenkt. Über semi-quantitative RT-PCR konnte die gesenkte Toxinproduktion auf gesenkte mRNA Transkription zurückgeführt werden. Die Autoren vermuten, dass Glucose Metaboliten die HBL-Expressions- Regulatoren wie zum Beispiel PlcR kontrollieren.

Im Darm herrscht laut MORIARTY-CRAIGE & JONES (2004) ein stark reduzierendes Milieu mit einem Redox-Potential (RP) von -150 mV. ZIGHA et al. (2006) untersuchten daraufhin, wie *B. cereus* sich an anaerobe Bedingungen mit niedrigem extrazellulären RP anpasst. Weiterhin verglichen sie die Produktion von HBL und NHE unter anaeroben Bedingungen mit hohem und niedrigem RP in MOD-Medium. Durch Stickstoffdurchfluss erzeugte Anaerobiosis in MOD-Medium weist ein RP von + 45 mV auf. Ein niedriges RP wird mit Wasserstoff erzeugt (-148 mV). Wasserstoff wurde außerdem zur Herstellung eines sauerstofffreien Milieus verwendet, da er nicht selektiv und nicht toxisch wirkt und in geringen Mengen im Dünndarm vorkommt (LAURITANO et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Glucose als einzige Kohlenstoffquelle bei anaerobem Wachstum dient, da *B. cereus* in MOD-Medium ohne Glucose nicht wächst. Analysen des Glucoseabbaus, der Nebenprodukte und der Biomasse zeigten, dass bei niedrigem RP unter anaeroben Bedingungen mehr intra- und extrazelluläre Proteine produziert werden. Dies spiegelte sich auch in einer höheren Toxinsynthese wieder. Nach 7,5 bzw. 9,5 Stunden Kulturdauer, also in der frühen stationären Phase, konnte die maximale HBL-Konzentration bestimmt werden. Mit niedrigem RP konnte eine achtfach höhere Konzentration von HBL-Toxin ausgemacht werden als bei hohem RP. Hier scheint das Zusammenspiel zwischen niedrigem RP und Eintritt in die stationäre Phase der Auslöser für die HBL-Synthese zu sein. Die höhere Produktionsrate von HBL erfolgt nicht aufgrund einer gesteigerten mRNA Transkription, was durch semiquantitative RT-PCR bestätigt wurde. Hieraus folgt, dass die Synthese von HBL-Enterotoxin bei niedrigem RP wahrscheinlich auf posttranskriptionaler Ebene reguliert wird.

2.4.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE)

In der Studie zum Verhalten von *B. cereus* Enterotoxinen bei hohem und niedrigem Redox-Potential (RP) unter anaeroben Bedingungen von ZIGHA et al. (2006) wurde auch die NHE-Toxinsynthese untersucht. Es konnte ein Maximum der NHE- Produktionsrate unabhängig vom RP in der exponentiellen Wachstumsphase nach 4,5 Stunden festgestellt werden. Als erstes wurde demnach NHE- Enterotoxin produziert und danach HBL. Ebenso wie beim HBL förderte ein niedriges RP die Toxinsynthese. Der positive Effekt des RP war auf die NHE Produktion mit einer 2,5 fachen Steigerung nicht so deutlich wie beim HBL. Für das NHE konnte die gesteigerte Toxinproduktion direkt auf mRNA Ebene nachvollzogen werden durch vermehrte mRNA Transkription.

2.5 Nachweisverfahren für *Bacillus cereus*- Enterotoxine

Zu Beginn der *B. cereus* Forschung wurden Tierversuche zur Pathogenitätsbestimmung der Isolate herangezogen: Darmschlingen-Ligationstest (rabbit ileal loop = RIL; SPIRA & GOEPFERT, 1972), Mäuseletalitätstest (MLT; GLATZ & GOEPFERT, 1973) und Gefäßpermeabilitäts-Reaktion (vascular permeability reaction = VPR; GLATZ et al., 1974). Diese wurden durch die Etablierung von Bioassays, bei denen die biologische Aktivität mittels Vero- (SEIDEL et al., 1996) oder CaCo–2-Zellen (DIETRICH et al., 1997) getestet wird, abgelöst. Mit diesen biologischen Verfahren kann allerdings nur die Gesamttoxizität nachgewiesen werden, da sie nicht spezifisch für *B. cereus* Enterotoxine sind.

Nach der vollständigen Sequenzierung der Enterotoxin-Gene werden häufig molekularbiologische Verfahren auf Basis der Polymerase-chain-reaction (PCR) zum Nachweis von *hbl* und *nhe* in *Bacillus cereus*- Isolaten verwendet (HEINRICHS et al., 1993; RYAN et al., 1997; GRANUM et al., 1999; LUND et al., 2000).

Zum spezifischen Nachweis von *B. cereus* Enterotoxinen sind derzeit zwei immunchemische Nachweisverfahren, die auf polyklonalen Antikörpern basieren, kommerziell erhältlich. Im BCET-RPLA Toxin Assay (Oxoid), einem reversen Latexagglutinationstest, wird die L_2-Komponente des Hämolysin-BL Komplexes (BEECHER & WONG, 1994 b) nachgewiesen. Mit dem Tecra-BDE, einem Sandwich-EIA, kann die 45 kDa Komponente (NheA) des NHE Komplexes nachgewiesen werden (BEECHER & WONG, 1994 b; LUND & GRANUM, 1996). Eine wesentliche Verbesserung der Spezifität solcher immunchemischer Verfahren gelangen DIETRICH et al. (1999 und 2005) durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen alle drei Komponenten des Hämolysin-BL bzw. gegen zwei der drei NHE-Komponenten (NheA und NheB). Zum Nachweis der NheC-Komponente wurde ein spezifisches polyklonales Kaninchenserum gewonnen (DIETRICH et al., 2005).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien

Für die Untersuchungen wurden nachfolgende Materialien, Biochemika, Mikroorganismen und Zellkulturen, Nährmedien, Puffer und Lösungen, Immunreagenzien sowie sonstige Materialien verwendet:

3.1.1 Chemikalien und Biochemika

Aceton (Riedel de Haën, 32201)
Ammoniumsulfat (Riedel de Haën, 31119)
AneroGen ™ Atmospere Generation System (Oxoid Ltd., AN0025A)
Antifoam O-30 (Sigma-Aldrich GmbH, A 8082)
Casein (Sigma-Aldrich GmbH, C-8654)
Caseinhydrolysat (Fluka, 22090)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, 11 644 807 001)
Citronensäure Monohydrat (Fluka, 27490)
CNBr aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, 17-0430-01)
D(+)-Glukose Monohydrat (Riedel de Haën, 16301)
Dikaliumhydrogenphosphat (Riedel de Haën, 04248)
EDTA (Sigma-Aldrich GmbH, E-1644)
Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom KG, S 0115)
Glycin (Riedel de Haën, 33226)
Hefeextrakt (Oxoid Ltd., LP0021)
Kalilauge (Riedel de Haën, 35113)
Kaliumdihydrogenphosphat (Riedel de Haën, 30407)
Magermilchpulver (Oxoid Ltd., LP0031)
Magnesiumsulfat (Fluka, 63138)
MEM-EARLE (1x) Zellkulturmedium (Biochrom AG, FG 0325)
Methanol (Sigma-Aldrich GmbH, 34860)
Natriumacetat (Merck, 1.06268.)
Natriumcarbonat (Riedel de Haën, 31432)

Natriumchlorid (Riedel de Haën, 31434)
Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, 1.06448.)
Natriumhydrogencarbonat (Merck, 1.06329.)
Natriumphosphat, diabasisch (Riedel de Haën, 30427)
Natriumpyruvat-Lösung, 100 mmol/l (Biochrom AG, L 0473)
Penicillin/Streptomycin, 10 000 U/ml (Biochrom AG, A 2212)
Ringerlösung-Tabletten (Oxoid Ltd., BR 0052 G)
Salzsäure (Merck, 1.09911.)
Schwefelsäure (Fluka, 84720)
Standard-I-Nähragar (Merck, 1.07881.)
Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich GmbH, T 2885)
Trizmabase minimum 99,9 % Titration (Sigma-Aldrich GmbH, T-1503)
Trypsin-EDTA-Lösung (1x) (Sigma-Aldrich GmbH, T 3924)
Tween 20 (Riedel de Haën, 63158)
Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, 1.08597.)

3.1.2 Mikroorganismen und Zellkultur

3.1.2.1 Bakterienstämme

- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig:
  - DSM 4384 (HBL-Referenzstamm)

  Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, München MHI 163
- GRANUM et al. (1996):
  - NHV 0075/95 (NHE-Referenzstamm)

  Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch, München MHI 241

3.1.2.2 Zelllinien

African green monkey kidney cells:
Vero-Zellen (Bio Whittaker, 76-108B) Passagerate 206-243

3.1.3 Nährmedien

3.1.3.1 Flüssige Anreicherungsmedien für *B. cereus*

Caseinhydrolysat-Hefeextrakt-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

3.1.3.2 Feste Nährmedien für *B. cereus*

Columbia Agar mit Schafblut (Oxoid Ltd., PB 5039 A)

PEMBA-Agar (Oxoid Ltd., PO 5048A)

Standard-I-Nähragar mit Zusatz von 0,1 % (g/v) Magermilchpulver

3.1.4 Puffer und Lösungen

- Ringerlösung:
  2 Tabletten ad 1000 ml Aqua dest.

3.1.4.1 Lösungen für die Zellkultur

- MEM-EARLE (1x) Zellkulturmedium
  mit Zusatz von 1 % Fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Natriumpyruvat-Lösung (100 mmol/l) und 0,4 % Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)

3.1.4.2 Lösungen für Enzymimmunoassays

- 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)
- 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

3.1.4.3 Lösungen für Immunaffinitätschromatographie

- Kopplungspuffer:
  0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat mit Zusatz von 0,5 mol/l Natriumchlorid
- Blockierungspuffer:
  0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8,0)
- Waschpuffer 1:
  0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8,0) mit Zusatz von 0,5 mol/l Natriumchlorid

- Waschpuffer 2:
  0,1 mol/l Natriumacetatpuffer (pH 4,0) mit Zusatz von 0,5 mol/l Natriumchlorid
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): siehe 3.1.4.2
- Glycin/HCl-Puffer, pH 2,5

3.1.5 Immunreagenzien

Zum Nachweis der *B. cereus* Enterotoxin-Komponenten standen folgende monoklonale Antikörper (Tab. 5) zur Verfügung, die alle im Laufe der letzten Jahre am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch hergestellt wurden (DIETRICH et al., 1999 und 2005):

Tabelle 5: Monoklonale Antikörper

Toxinkomplex	Antigen	monoklonaler Antikörper
Hämolysin BL (HBL)	L_2-Komponente	1A12 bzw. 8B12
Non-hemolytic-enterotoxin (NHE)	NheB-Komponente	2B11 bzw. 1E11

3.1.6 Sonstige Materialien

3.1.6.1 Verbrauchsmaterialien

Centricon Centrifugal Filter Devices, Ultracel YM 30, Amicon® Bioseparations (Millipore Corporation, 4209)
Cryo-Tubes, 1,8 ml (Nunc GmbH, 375418)
Drigalskispatel (VWR, 231-2183)
Einmalspritzen 2-teilig, 10 ml (Braun, 4606108V)
Einmalspritzen 2-teilig, 20 ml (Braun, 4606205V)
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Eppendorf, 3810)
Greiner Probenröhrchen 50 ml (Greiner bio-one GmbH, 227261)
Injektionsflasche 6R – klar Glasart 1 (Dedecke GmbH, 127576)
Kunststoff-Petrischalen mit Nocken, steril (Greiner bio-one GmbH, 633102)

Mikrotiterplatten, 96 Loch, steril, Flachboden (Nunc GmbH, 167008)

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc GmbH, 439454)

Nunclon Surface, Zellkulturflaschen aus Kunststoff, 80 cm^2 (Nunc GmbH, 178905)

Pasteur-Pipetten, Glas 150 mm (Brand, 7477 15)

Pasteur-Pipetten, Glas 230 mm (Brand, 7477 20)

Pipettenspitzen 0,5 - 20 µl (Brand, 702565)

Pipettenspitzen 2 - 200 µl (Brand 702556)

Pipettenspitzen 50 - 1000 µl (Brand 702561)

Safe Lock Tubes, 1,5 ml (Eppendorf, 0030120.086)

Safe Lock Tubes, 0,5 ml (Eppendorf, 0030121.023)

Sterilfilter Acrodisc® Syringe Filter, 0,8/0,2 µm Supor® Membrane (Pall, 4658)

Zählkammer nach Thoma (Brand)

3.1.6.2 Geräte

Accu-jet pro, Akku-Pipettierhilfe (Brand)

AneroJar™, Volumen 2,5 l (Oxoid Ltd., AG0025A)

Brutschrank, aerob (Memmert)

Brutschrank, CO_2-Atmosphäre, 37 °C (Heraeus)

Dispenser mit 0,6 ml Spitzen (LKB Instrument GmbH, Bromma)

Heizplatte/Magnetrührer M23001 (Heidolph)

Herasafe, Sterilbench (Heraeus)

Kühlzentrifuge Multifuge 1SR (Heraeus)

Kühlzentrifuge Suprafuge 22 (Heraeus)

Lyovac GT 2, Lyophilisator (Finn Aqua)

Minifors, Bioreaktor (Infors HT®)

- InPro® 6800, Sauerstoffsonde (Mettler Toledo)
- Electrode 405-DPAS-SL-K85/225, pH-Sonde (Mettler Toledo)
- Multi fermenter control system – Iris V5, Software (Infors HT®)

pH-Messgerät, pH 537 (Indolab WTW GmbH)

Polymax 1040, Taumelgerät (Heidolph GmbH)

Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil® (Hellma®, 104-QS)

Reax top, Vortex (Heidolph)

Schüttelwasserbad, GFL 1083 (Ges. für Labortechnik)

Sunrise Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan)

Thermomixer comfort, Heizblock (Eppendorf)

Technomat Nährmedienabfülleinheit (biomedis Laborservice GmbH)

UV – visibile Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1602)

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)

Varioklav, Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH))

Waage (Sartorius Excellence)

3.2. Allgemeine Methodik

Im Folgenden werden die zur Durchführung der Versuche und Analysen verwendeten Methoden beschrieben.

3.2.1 Erstellen des Sporenlyophilisates

Die *B. cereus* Stämme MHI 241 (NHE-Referenzstamm) und MHI 163 (HBL-Referenzstamm) wurden auf Columbia-Schafblutagar überimpft und 24 Stunden bei 32 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden jeweils in 1 ml CGY-Bouillon suspendiert, 0,1 ml der Suspension auf PEMBA ausplattiert und 24 Stunden bei 32 °C angezüchtet. Nach weiteren 24 Stunden Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C wurde der Bakterienrasen mittels 5 ml CGY-Bouillon und sterilem Drigalskispatel durch sanftes Reiben vom Agar gelöst. Je 1 ml der Bakteriensuspension wurde unter sterilen Bedingungen in 1,5 ml Eppendorf Safe Lock Tubes pipettiert und zum Abtöten der vegetativen Zellen für 10 min unter Schütteln auf 80 °C erhitzt. Des Weiteren wurden die Sporen mit 50 ml CGY auf eine Gesamtkeimzahl von ca. 5×10^8 / ml verdünnt und je 5 ml in Glasfläschchen abgefüllt. Diese wurden 2 Stunden bei -80 °C tief gefroren und für 5 Tage im Lyophilisator gefriergetrocknet.

Zur Kontrolle der Keimzahl und der Fähigkeit zur Toxinproduktion wurde ein Lyophilisat mit 5 ml sterilem Aqua dest. gelöst und sowohl die Keimzahl mittels Oberflächenverfahren als auch die Toxinproduktion nach Standardanzucht und Gewinnung des Toxinüberstandes mittels EIA und Zytotoxizitätstest bestimmt.

3.2.2 Standardanzucht von *B. cereus* in CGY-Bouillon

Die Standardanzucht erfolgte modifiziert nach BEECHER & WONG (1994). Der entsprechende Referenzstamm wurde auf Columbia-Schafblutagar ausgestrichen und 24 Stunden bei 32 °C bebrütet. Zuerst wurde eine Voranreicherung hergestellt, indem eine Einzelkolonie in 20 ml CGY-Bouillon überimpft und 17 Stunden bei 32 °C im Schüttelwasserbad inkubiert wurde. Dann wurde die Voranreicherung im Verhältnis 1:100 in 20 ml CGY-Bouillon überführt und für weitere 5 Stunden bei 32 °C inkubiert. Der

Kulturüberstand wurde anschließend durch Zentrifugation und Sterilfiltration gewonnen, in Cryo-Tubes abgefüllt, mit 1 mmol/l EDTA supplementiert und bei – 20 °C tief gefroren.

3.2.3 Anzucht im Bioreaktor

Der Bioreaktor wurde mit 1,4 l CGY-Bouillon (ohne Glucose) beschickt, 0,01 % Antifoam O-30 zugesetzt und 30 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde die Sauerstoffsonde für mindestens 6 Stunden polarisiert. Vor Anzuchtstart wurde 1 % steril filtrierte Glucose zugesetzt, das Medium auf 32 °C bzw. 37 °C erwärmt, der Rührer auf 150 U/min beschleunigt, 100 ml Medium für die Leerwertmessung und zum Nachspülen entnommen und die Sauerstoffsonde kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte mit Druckluftbegasung als Referenz für den 100 % Wert und purem Stickstoff als Referenz für den 0 % Kalibrierungspunkt. Die Anzucht erfolgte als diskontinuierliche Kultur.
Nach der Probenentnahme wurde die Absorption im Spektralphotometer bei 600 nm gemessen, die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten mittels Oberflächenspatelverfahren bestimmt sowie Kulturüberstand für EIA und Zytotoxizitätstest durch Sterilfiltration gewonnen. Der Überstand wurde mit 1 mmol/l EDTA supplementiert und in Cryo-Tubes bei – 20 °C tief gefroren.

Alle Versuche, aerob bei 32 °C sowie anaerob bei 32 °C und 37 °C wurden dreimal durchgeführt. Die Abbildungen im Ergebnisteil beziehen sich immer auf den Mittelwert aller drei Versuchsdurchläufe.

3.2.3.1 Aerobe Anzucht

Der Bioreaktor wurde nach der Kalibrierung der Sauerstoffsonde unter Druckluft Dauerbegasung auf einen relativen Sauerstoffgehalt von 100 % eingestellt. Dann wurden 2 ml des gelösten Lyophilisates über das Probenahmesystem steril zugegeben und mit Medium nachgespült. Dies entsprach einem Keimgehalt von 10^5 KbE/ml. Direkt danach wurde die erste Probe (0 h) entnommen.
Die Probenentnahme erfolgte mittels steriler 10 ml Einwegspritze. Die ersten 10 ml Probe wurden verworfen, um Rückstände aus dem Probenahmerohr zu vermeiden.

3.2.3.2 Anaerobe Anzucht

Für die anaerobe Anzucht wurde der Bioreaktor mit reinem Stickstoff begast bis der Sauerstoffgehalt auf annähernd 0 % gesunken war und die Begasungsrate so eingestellt, dass der Sauerstoffgehalt auf diesem Niveau blieb. Die Beimpfung und Probenentnahme erfolgte wie bei der aeroben Anzucht beschrieben.

3.2.4 Enzymimmunoassays (EIA)

Zur Bestimmung der Diarrhö-Toxinproduktion wurde die B-Komponente des NHE-Enterotoxinkomplexes bzw. die L_2-Komponente des HBL-Enterotoxinkomplexes mittels Sandwich-Enzymimmunoassay detektiert. Die Ergebnisse des EIA wurden mittels eines Standards mit bekannter Toxinkonzentration (siehe 3.2.5) in die jeweilige Toxinkonzentrationen umgerechnet.

3.2.4.1 Hämolysin BL (L_2- Komponente)

Der Nachweis der L_2-Komponente des HBL wurde mit Hilfe eines Sandwich-EIA`s durchgeführt (FELLA, 1999).
Hierbei wurden Mikrotiterplatten mit dem spezifischen monoklonalen Maus Antikörper 1A12 in Bikarbonatpuffer über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Der mAK 1A12 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml Bikarbonat vorgelegt. Nach Ausschlagen der Mikrotiterplatten wurden die noch freien Bindungsstellen mit 3 % Casein/PBS (150 µl/ Kavität) 45 Minuten lang bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Mikrotiterplatten gewaschen und trocken geschlagen. Daraufhin wurde der Kulturüberstand abhängig von der der Anzuchtdauer in Primärverdünnungen von 1:1 oder 1:5 in 0,5 % Tween 20/PBS aufgetragen (100 µl/Kavität) und eine 1:2 Verdünnungsreihe angefertigt. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Antigen nach 1 h Inkubationszeit abgesaugt sowie die Mikrotiterplatten erneut gewaschen und ausgeschlagen. Es folgte die Zugabe des peroxidasemarkierten spezifischen mAK 8B12-Enzymkonjugates in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % Casein/ PBS. Eine weitere Stunde später wurden die Mikrotiterplatten gewaschen, trocken geschlagen und das Substrat (TMB) in Wasserstoffperoxid-/Citratpuffer

im Verhältnis 1:20 aufgetragen (100 µl/Kavität). Nach 20 min wurde die Farbreaktion mit Schwefelsäure (1 mol/l) gestoppt und die Absorption bei 450 nm im ELISA Reader gemessen.

3.2.4.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NheB-Komponente)

Das Prinzip des Sandwich EIA zum Nachweis des HBL-L_2 Toxinkomplexes wurde für den Sandwich EIA zum Nachweis des NheB-Komplexes übernommen. Anstelle des mAK 1A12 zur Beschichtung wurde für den NheB Nachweis der spezifische monoklonale Maus Antikörper 2B11 in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS verwendet. Die Antigene wurden abhängig von der Anzuchtdauer in Primärverdünnungen von 1:1, 1:5, 1:10 oder 1:20 ebenfalls in 0,5 % Tween 20/PBS aufgetragen. Anstatt dem spezifischen mAK 8B12-Enzymkonjugat wurde für das NheB das spezifische mAK 1E11-Enzymkonjugat in einem Verhältnis von 1:4000 in 1 % Casein/PBS verwendet.

3.2.5 Immunaffinitätschromatographie

Die monoklonalen Antikörper (siehe Tab. 5) zum Nachweis der Enterotoxinkomponenten HBL- L_2 und NheB wurden wie bei STRICH (1999) beschrieben an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt.

Der steril filtrierte Kulturüberstand wurde mit gleichen Teilen PBS verdünnt und langsam über die Sepharose gegeben, damit die Toxinkomponenten an den gekoppelten Antikörper reversibel binden können. Anschließend wurde mit 10 ml PBS nachgespült, um den kompletten Kulturüberstand von der Sepharose zu waschen. Durch pH-Wert Senkung mittels 5 ml Glycin/HCl-Lösung (pH 2,5) werden die reversibel gebundenen Toxinkomponenten wieder eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen, durch Zentrifugation bei 4000 U/min für 20 min auf ein Volumen von 1 ml konzentriert und die Absorption bei 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Nach dem Eluieren wurde die Sepharose erneut mit 20 ml PBS gespült, um den pH-Wert wieder auszugleichen und abschließend mit 5 ml 0,05 %igem PBS/NaN_3 bis zum nächsten Gebrauch konserviert.

3.2.6 Zytotoxizitätstest für Diarrhö-Enterotoxine

Zuerst wurden die Vero-Zellen in 40 ml MEM-Earle Medium unter Zusatz von 1 % (v/v) fetalem Kälberserum, 1 % (v/v) Natriumpyruvat (100 mmol/l) und 0,2 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml) bei 37 °C und 7 % CO_2-Atmosphäre kultiviert bis sich ein dichter Zellrasen ausgebildet hatte. Zum Lösen der an der Zellkulturflasche haftenden Zellen wurde nach Verwerfen des Mediums und Waschen mit 20 ml PBS die Zellbindung mit 5 ml Trypsin-EDTA lysiert. Die Reaktion wurde nach 10 min mit gleichen Teilen MEM-Earle Medium inhibiert und anschließend die Zellen in 20 ml MEM-Earle Medium bei 135 x g, 32 °C für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit 5 ml MEM-Earle Medium resuspendiert und die Zellzahl mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt.
Parallel dazu wurden die Kulturüberstände der einzelnen Messungen in einer 1:10 Verdünnung als Doppelansatz mit MEM-Earle Medium auf eine 96-Loch Zellkulturplatte aufgetragen und eine 1:2 Verdünnungsreihe angelegt (100 µl/Kavität). Die Spalten 11 und 12 blieben als Kontrollleerwerte frei von Probenmaterial sowie die oberste und unterste Reihe aufgrund des Randzonenphänomens. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf 1 x 10^5 Vero-Zellen/ml eingestellt und in jede Kavität 100 µl pipettiert, so dass 1 x 10^4 Zellen/Kavität vorlagen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C unter 7 % Kohlendioxid-Atmosphäre wurde die Zytotoxizität über die Stoffwechselaktivität lebender Zellen bestimmt. Dazu wurden 100 µl Medium aus jeder Kavität durch 10 µl WST-Reagenz ersetzt. Das WST-Reagenz wird in den Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen in den Farbstoff Formazan umgesetzt, der im ELISA-Autoreader bei 450 nm gemessen wird. 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.

3.2.7 Keimzahlbestimmung

Zur Keimzahlbestimmung wurden Platten aus Standard-I-Nähragar mit Zusatz von 0,1 % Magermilchpulver hergestellt.
Nach Probennahme wurde eine Verdünnungsreihe in Ringerlösung hergestellt. Dies wurde bis zur gewünschten Verdünnungsstufe wiederholt, maximal bis zur 7. Stufe. Es wurden 0,1 ml von drei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen mit sterilem Drigalskispatel ausplattiert. Die Verdünnungsreihe wurde im Doppelansatz hergestellt. Die Bebrütung erfolgte für 24 h

bei 32 °C. Es wurden alle Platten mit 10-300 Kolonien ausgewertet und die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten ermittelt.

3.3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Diarrhö-Toxinproduktion (HBL und NHE) von *B. cereus* bei verschiedenen Anzuchttemperaturen unter aeroben und anaeroben Bedingungen erstmals quantitativ zu bestimmen. Für diesen Zweck wurden zwei Isolate gewählt, die für Lebensmittelinfektionen verantwortlich waren und somit ein gesichertes enterotoxisches Potential besitzen. Dabei handelt es sich um einen reinen NHE-Produzenten (MHI 241) und einen Stamm (MHI 163) der in der Lage ist, HBL und NHE zu produzieren. Als Medium wurde in allen Versuchen CGY verwendet, da in mehreren Studien bei 32 °C damit die höchsten Toxinmengen produziert werden konnten (BEECHER & WONG, 1994 und STRICH, 1999). Des Weiteren wurde unter anaeroben Bedingungen 37 °C als zweite Anzuchttemperatur gewählt, um Hinweise auf die Veränderung der Toxinproduktion von *B. cereus* Stämmen unter annähernd gastrointestinalen Bedingungen gewinnen zu können.

3.3.1 Wachstumskinetik von *B. cereus*

In Vorversuchen wurde ermittelt, in welchem Verhältnis das Sporenlyophilisat zugegeben werden muss, um eine Startkeimzahl von 10^5 KbE/ml zu erreichen, da GRANUM (2001) diese als minimale infektiöse Dosis beschreibt. Der Zeitpunkt der Beimpfung wurde mit Stunde 0 gleichgesetzt.

3.3.1.1 Adaptationsphase (lag-Phase)

Unter aeroben Bedingungen bei 32 °C verläuft die Adaptationsphase beider untersuchter *B. cereus* Stämme annähernd gleich und geht nach 4 (MHI 241) bzw. 4,5 Stunden (MHI 163) nach der Beimpfung in die exponentielle Wachstumsphase über (Abb. 3). Entzieht man dem System durch permanente Stickstoffbegasung den Sauerstoff verlängert sich die Phase der Adaption bei beiden Stämmen um 2 Stunden (Abb. 4). Eine höhere Inkubationstemperatur von 37 °C verkürzt die lag-Phase wiederum, wobei die Adaptation von Stamm MHI 241 mit 5,5 Stunden schneller als unter anaeroben Bedingungen bei 32 °C, jedoch langsamer als unter Sauerstoffeinfluss erfolgt. Sporen des Stammes MHI 163 können sich bei 37 °C mit 4 Stunden lag-Phase schneller an anaerobe Bedingungen adaptieren als an aerobe Bedingungen bei 32 °C (Abb. 5).

Abbildung 3: Wachstumsverlauf unter aeroben Bedingungen bei 32 °C, 0-12 Stunden
MHI 163 und MHI 241

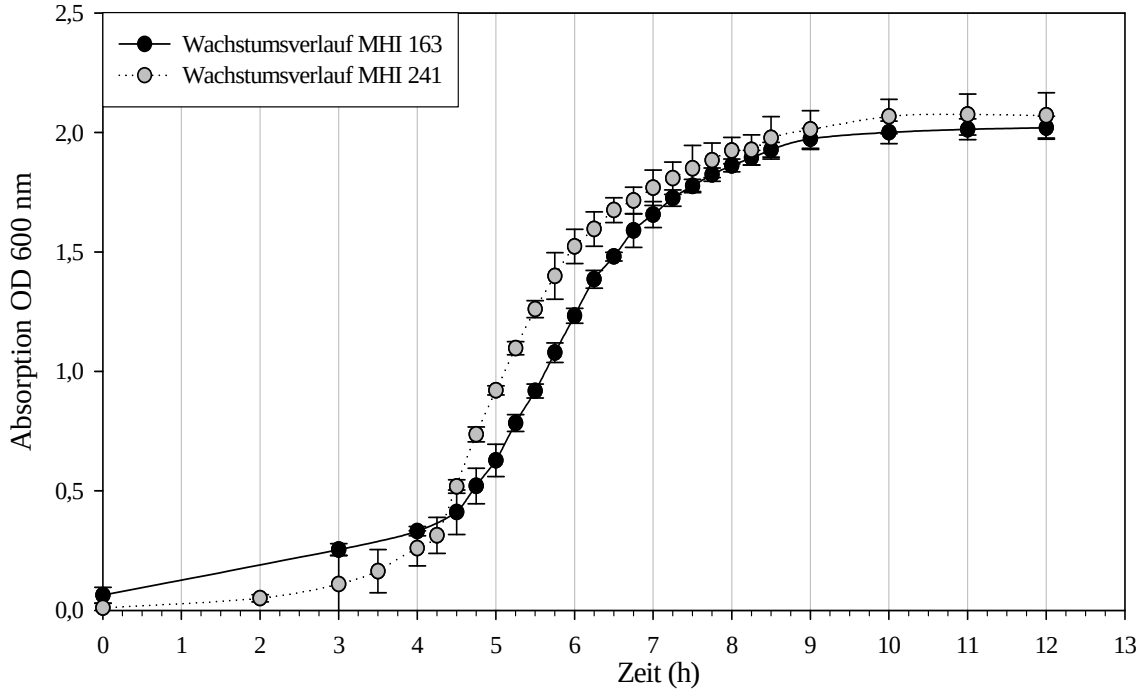


Abbildung 4: Wachstumsverlauf unter anaeroben Bedingungen bei 32 °C, 0-12 Stunden
MHI 163 und MHI 241

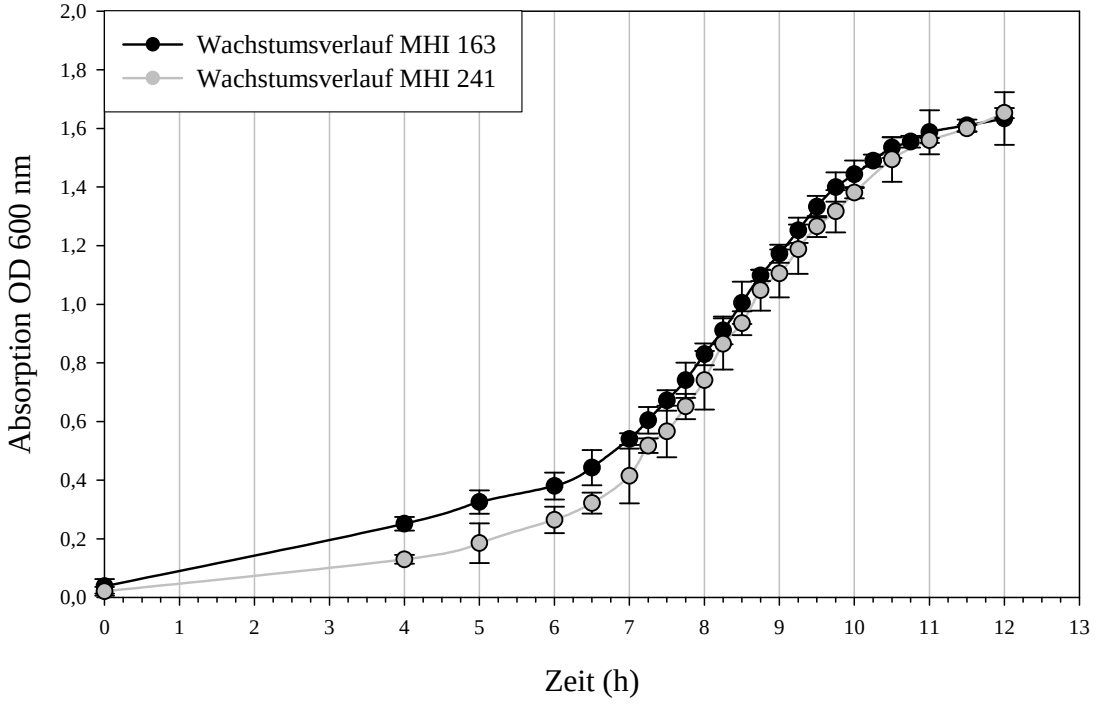


Abbildung 5: Wachstumsverlauf unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C, 0-12 Stunden MHI 163 und MHI 241

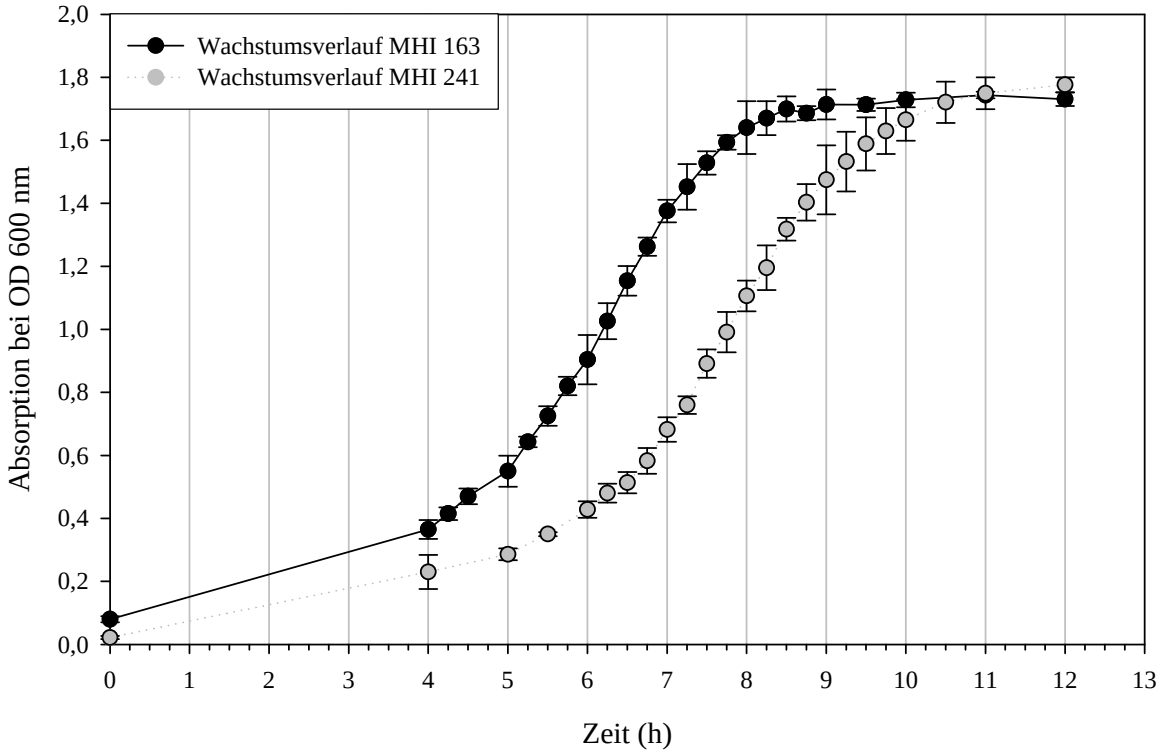
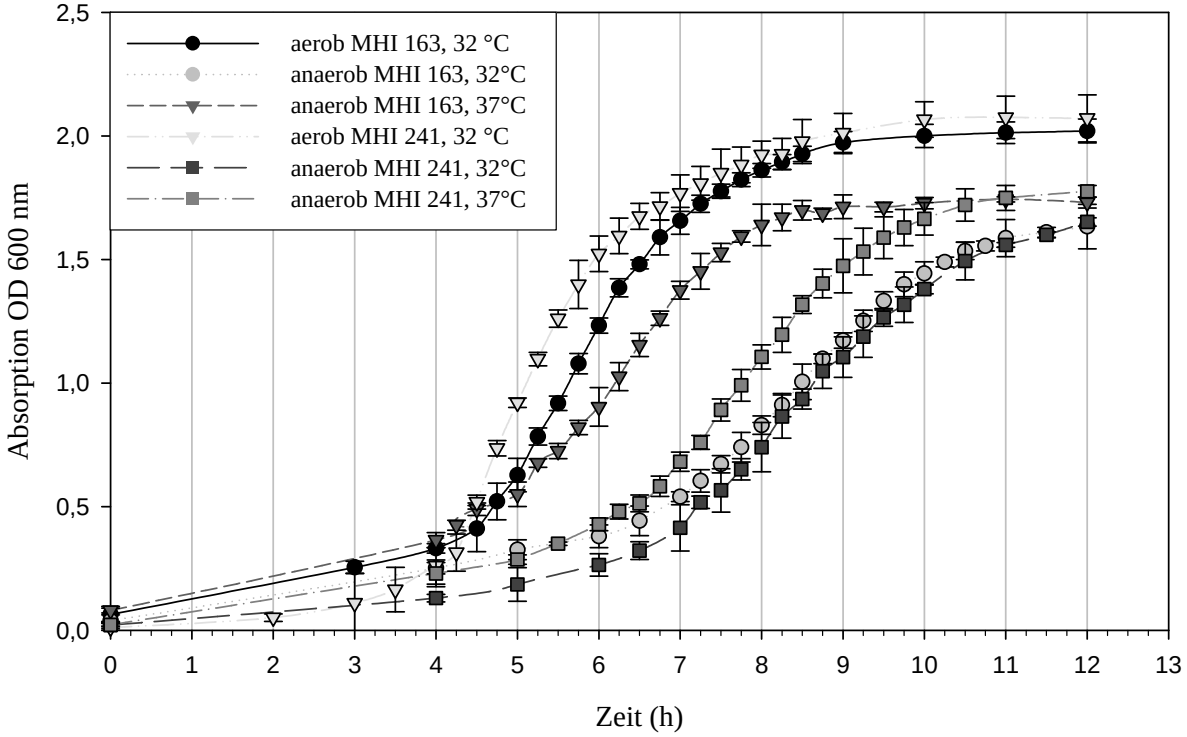


Abbildung 6: Wachstumsverlauf unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 32 °C und 37 °C 0-12 Stunden, MHI 241 und MHI 163



3.3.1.2 Exponentielle Wachstumsphase (log-Phase)

Die Gernerationszeit g von *B. cereus* zur Charakterisierung des Vermehrungszyklus wurde während der log-Phase unter Anwendung der Formel $g = \frac{t_2 - t_1}{\log_2 N_2 - \log_2 N_1}$ bestimmt. Dabei steht *N* für die Zellzahl zum Zeitpunkt *t* (KAYSER et al., 2001). Es konnten in der exponentiellen Phase die in Tabelle 6 aufgeführten Generationszeiten berechnet werden.

Tabelle 6: Generationszeiten g der verschiedenen Versuchsaufbauten

Versuchsaufbau	Generationszeit g		Standardabweichung s	
	MHI 163	MHI 241	MHI 163	MHI 241
aerobe Anzucht 32 °C	22 min	20 min	3,4	3,0
anaerobe Anzucht 32 °C	45 min	54 min	11,0	8,9
anaerobe Anzucht 37 °C	29 min	45 min	4,7	8,9

Erwartungsgemäß verlängerten sich die Generationszeiten der beiden Stämme bei Entzug des Sauerstoffes deutlich (23 bzw. 34 min). Ebenso konnte davon ausgegangen werden, dass erhöhte Anzuchttemperaturen (37 °C) durch vermehrte Stoffwechselaktivität zu schnelleren Vermehrungszyklen führte. Allerdings war diese Verkürzung der Generationszeit sehr unterschiedlich ausgeprägt, wobei der NHE und HBL produzierende Stamm beinahe die Zeiten der aeroben Anzucht erreichte (Tab. 6).

Unter den gewählten Bedingungen verblieben die Isolate bei allen anaeroben Anzuchten 3,5 Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies war nur geringfügig länger als bei den aeroben Anzuchten mit 3 Stunden (Abb. 3-5). In Abbildung 6 wurden alle Anzuchten zur besseren Vergleichbarkeit gemeinsam dargestellt.

3.3.1.3 Stationäre Phase

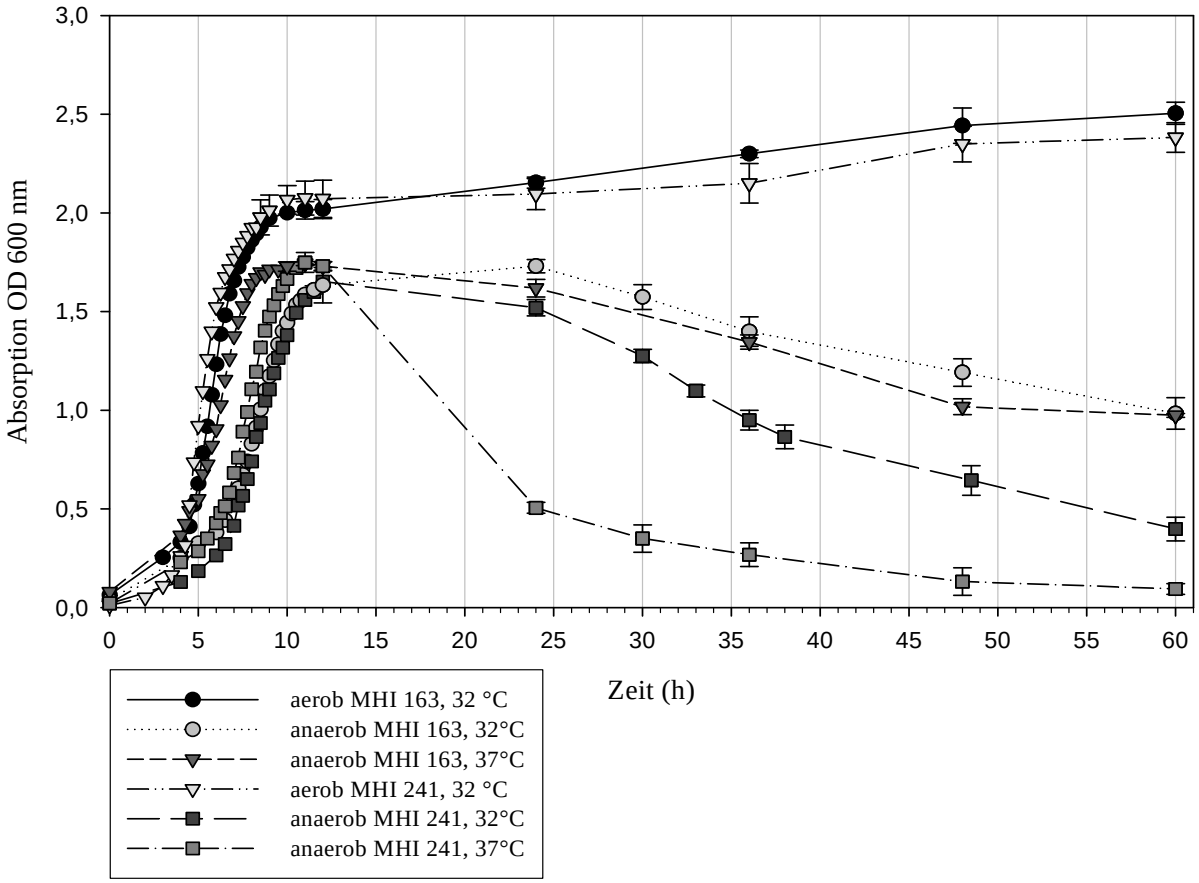
Während der stationären Phase wurde bei beiden *B. cereus* Stämmen ohne Sauerstoffeinfluss unabhängig von der Temperatur eine maximale Keimzahl von 8×10^8 bis 1×10^9 KbE/ml erreicht. Eine höhere maximale Keimzahl von 2×10^9 KbE/ml war bei beiden Isolaten in der aeroben Kultur zu finden. In allen Abbildungen zum Wachstumsverhalten wurden die

Absorptionen der OD_{600} verwendet, da die photometrischen Absorptionen gut mit den Keimzahlen korrelierten.

3.3.1.4 Absterbephase

Unter anaeroben Bedingungen gingen die Kulturen beider *B. cereus* Stämme nach 12-24 Stunden von der stationären Phase in die Absterbephase über (Abb. 7), die unter aeroben Bedingungen bis 60 Stunden Inkubationszeit nicht eintrat (Abb. 7). Davon war der reine NHE-Produzent MHI 241 stärker betroffen, als der HBL- und NHE-Produzent MHI 163. Die Umgebungstemperatur hatte dabei Einfluss auf die Absterberate, die mit höheren Temperaturen für *B. cereus* MHI 241 von 10^3 KbE Endkeimzahl auf 10^2 KbE stieg, jedoch für *B. cereus* MHI 163 von 10^4 KbE Endkeimzahl auf 10^5 KbE sank (Abb. 7).

Abbildung 7: Wachstumsverlauf unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 32 °C und 37 °C bis 60 Stunden, MHI 163 und MHI 241



3.3.2 Verlauf der Enterotoxinproduktion

3.3.2.1 Hämolysin BL (HBL)

Unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C begann die HBL-Produktion nach 4,5 Stunden mit einer Keimzahl von 1,78 x 10^7 KbE/ml deutlich früher als unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen bei 32 °C mit 5,5 Stunden und einer Keimzahl von 8,39 x 10^7 KbE/ml bzw. 6,5 Stunden bei 3,83 x 10^7 KbE/ml. Während der aeroben Kultur stieg die Toxinkonzentration im weiteren Verlauf kontinuierlich bis zum Maximum an. Die Toxinkonzentration der beiden anaeroben Kulturen begann unabhängig von der Temperatur erst eine Stunde nach der ersten positiven Reaktion zu steigen, bis sie ihr Maximum erreichten(Abb. 8).

Die maximale Toxinkonzentration war bei der anaeroben Anzucht bei 37 °C wesentlich geringer, sie betrug mit 519 ng/ml nur ein Fünftel bzw. die Hälfte derer unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen bei 32 °C mit 2464 ng/ml bzw. 1005 ng/ml (Abb. 8). Bei Erreichen des Maximums betrugen die Keimzahlen der anaerob bei 37 °C kultivierten Proben 8,52 x 10^8 KbE/ml, der anaeroben Proben bei 32 °C 7,23 x 10^8 KbE/ml und der aeroben Proben 1,13 x 10^9 KbE/ml. Ein Plateau der Toxinkonzentration war bei allen drei Versuchsaufbauten zu sehen, bei 32 °C dauerte es sowohl aerob als auch anaerob nur 1,75 bzw. 2 Stunden, bei 37 °C hielt es sich jedoch über 15,5 Stunden aufrecht (Abb.9).

Bei den anaeroben Versuchen wiesen die Proben unabhängig von der Temperatur auch nach Ablauf der Versuchsdauer noch eine geringe Toxinkonzentration auf, die Proben der aeroben Versuchsreihe waren hingegen nach 48 Stunden Inkubationszeit bis Versuchende negativ im Enzymimmunoassay.

Abbildung 8: Vergleichende Darstellung der HBL-L2-Konzentration von MHI 163
aerobe Kultur, 32 °C; anaerobe Kultur, 32 °C; anaerobe Kultur, 37 °C

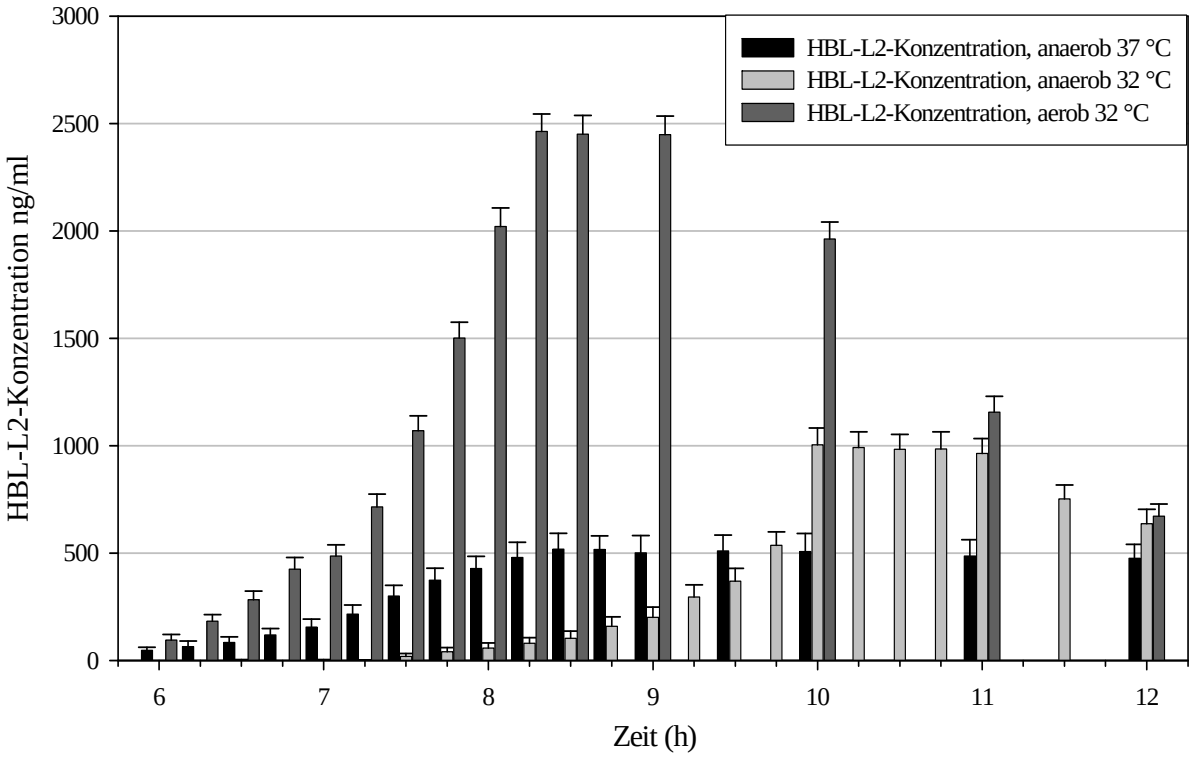
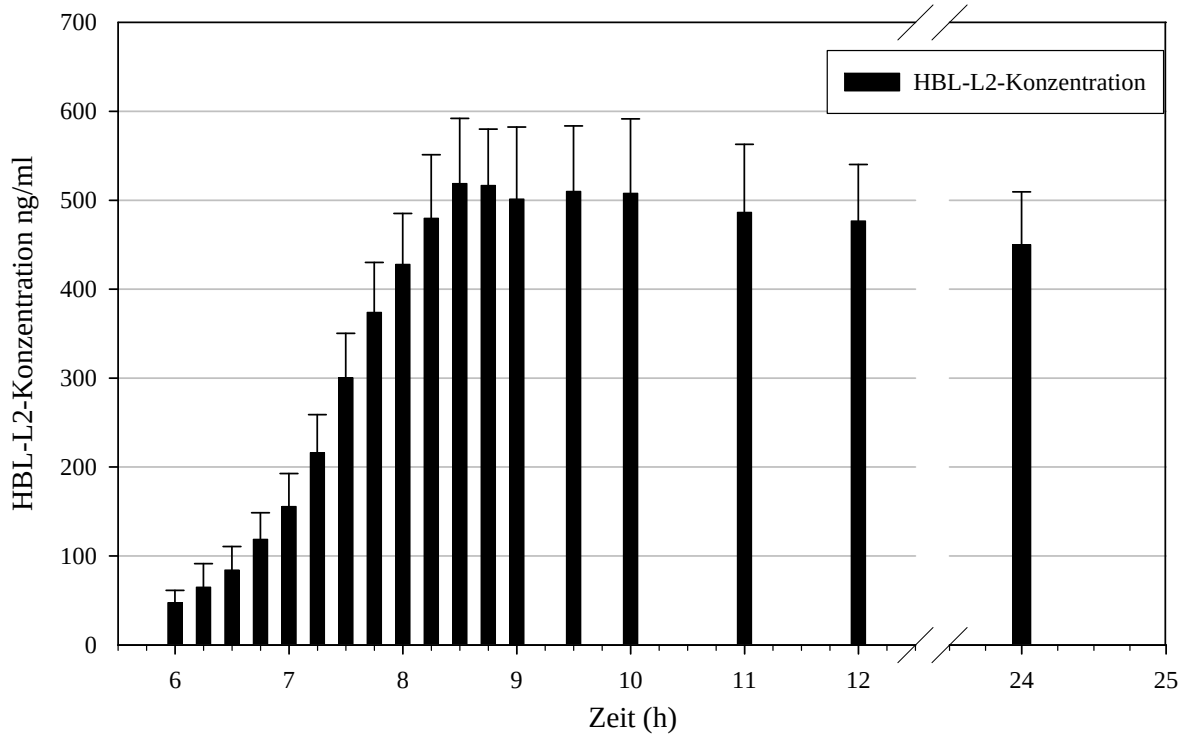


Abbildung 9: HBL-L2-Konzentration von MHI 163
bis 24 Stunden Anzuchtdauer, anaerobe Anzucht, 37 °C



3.3.2.2 Non-hemolytic-enterotoxin (NHE)

Die nachweisbare Enterotoxinproduktion von Stamm MHI 241 begann nach 4 Stunden unter allen Anzuchtbedingungen. Unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C konnten zu diesem Zeitpunkt mit Keimzahlen von 1,06 x 10^7 KbE/ml schon Toxinkonzentrationen von 2,9 ng/ml nachgewiesen werden, während unter aeroben und anaeroben Bedingungen bei 32 °C mit Keimzahlen von 2,54 x 10^7 KbE/ml bzw. 7,48 x 10^6 KbE/ml eine schwach positive Reaktion im EIA analysiert werden konnte. Isolat MHI 163 setzte mit der Toxinproduktion 0,5-1 Stunde später ein, aber auch hier zeigten sich die ersten Toxinkonzentrationen unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C mit Keimzahlen von 1,78 x 10^7 KbE/ml. Im Folgenden steigt die Toxinkonzentration kontinuierlich bis zum Maximum an. Unter anaeroben Bedingungen bei 32 °C beginnt der Anstieg der Toxinkonzentration beider *B. cereus* Isolate erst nach 0,5 Stunden Pause.

Die maximale Toxinkonzentration war bei MHI 241 unter aeroben Bedingungen mit 2831 ng/ml und anaeroben Bedingungen bei 32 °C mit 1705 ng/ml höher als bei MHI 163 mit 1654 ng/ml unter aeroben Bedingungen und 962 ng/ml unter anaeroben Bedingungen, aber gleichhoch bei 37 °C und Anaerobiosis mit je 451 ng/ml (Abb. 10 - Abb. 12). Die Keimzahlen von Isolat MHI 241 lagen dabei bei der aeroben Kultur bei 1,13 x 10^9 KbE/ml, bei der anaeroben Kultur bei 32 °C auf einem Level von 7,78 x 10^8 KbE/ml und bei 37 °C bei 5,9 x 10^8 KbE/ml. Stamm MHI 163 wies zum Zeitpunkt des Toxinmaximums Keimzahlen von 1,06 x 10^9 KbE/ml unter aeroben Bedingungen auf sowie unter anaeroben Bedingungen 3,24 x 10^8 KbE/ml bei 32 °C und 8,7 x 10^8 KbE/ml bei 37 °C. Das Maximum wurde unter Sauerstoffatmosphäre schneller erreicht als ohne Sauerstoff und von MHI 241 vor MHI 163. In sauerstofffreiem Medium wurde das Maximum bei 37 °C Anzuchttemperatur eher erreicht als bei 32 °C, wobei in beiden Fällen MHI 163 1,5 Stunden vor MHI 241 lag. Es war für beide Isolate ein deutlicher Abfall in der Toxinkonzentration von der aeroben Anzucht über die anaerobe Kultur bei 32 °C bis zum anaeroben Versuch bei 37 °C zu erkennen. In allen drei Versuchsaufbauten hielt sich die höchste Toxinkonzentration des Stammes MHI 163 1-2 Stunden. Kein Plateau konnte bei MHI 241 unter Aerobiosis beobachtet werden, da in der Probe direkt nach dem Maximum die Toxinkonzentration um die Hälfte sank (Abb. 10). Die maximale Toxinkonzentration von MHI 241 wurde unter Anaerobiosis bei 37 °C fast doppelt so lange aufrechterhalten als bei 32 °C.

Abbildung 10: NheB-Konzentration von MHI 163 und MHI 241
aerobe Anzucht, 32 °C

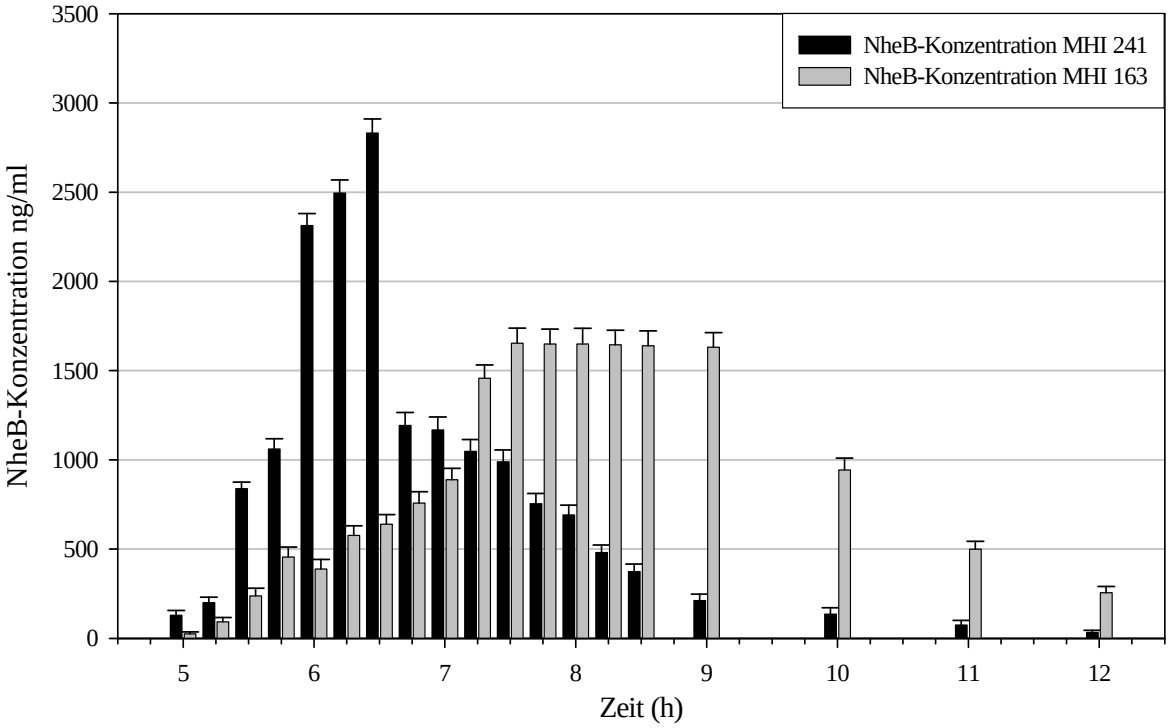


Abbildung 11: NheB-Konzentration von MHI 163 und MHI 241
anaerobe Anzucht, 32 °C

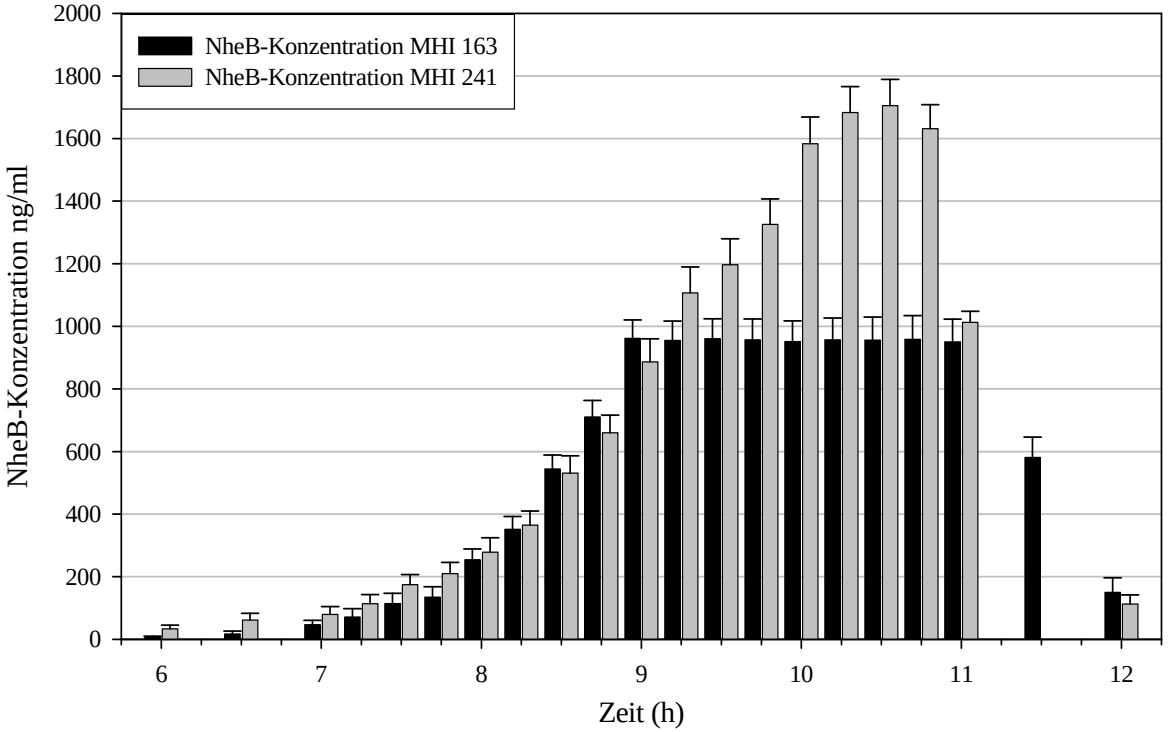
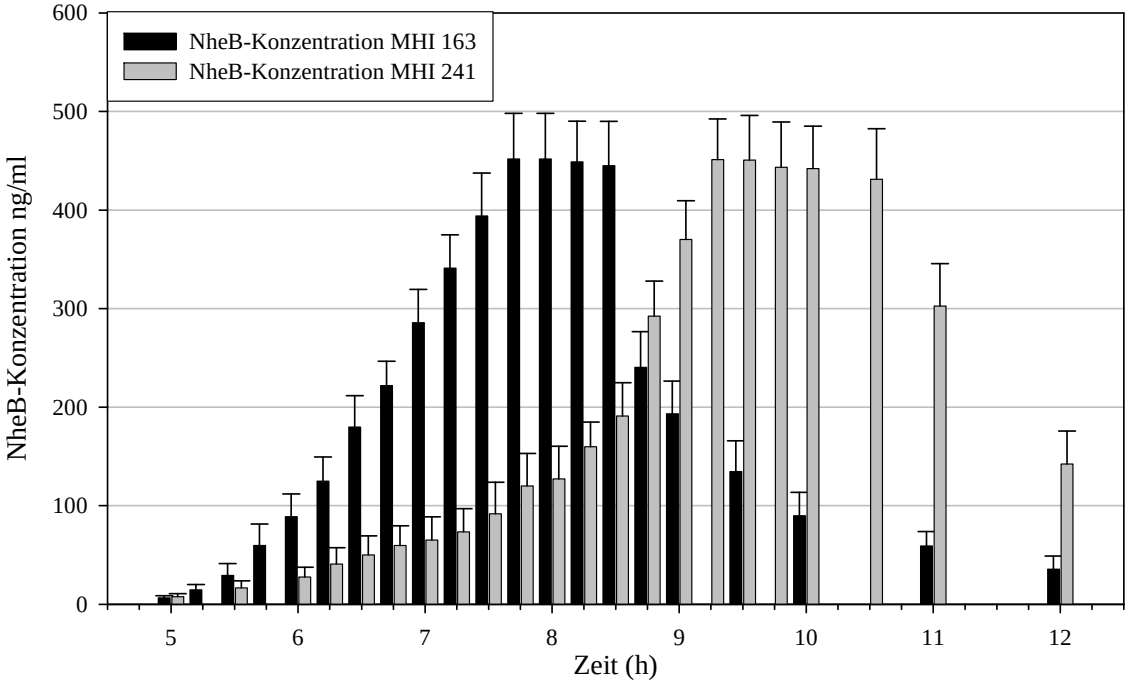


Abbildung 12: NheB-Konzentration von MHI 163 und MHI 241
anaerobe Anzucht, 37 °C



Die NheB-Konzentrationen der drei Versuchsaufbauten von MHI 163 wurden in Abbildung 13 vergleichend dargestellt, die von MHI 241 in Abbildung 14.

Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der NheB-Konzentration von MHI 163
aerobe Anzucht, 32 °C; anaerobe Anzucht, 32 °C und anaerobe Anzucht, 37 °C

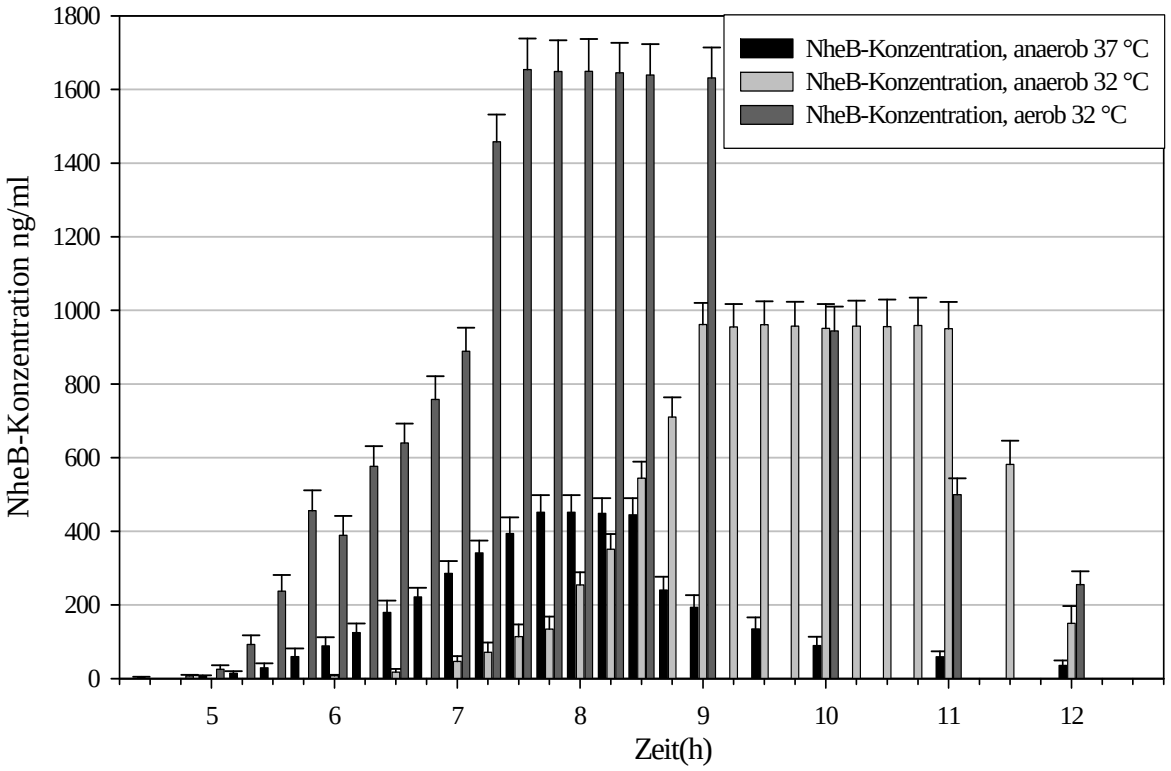
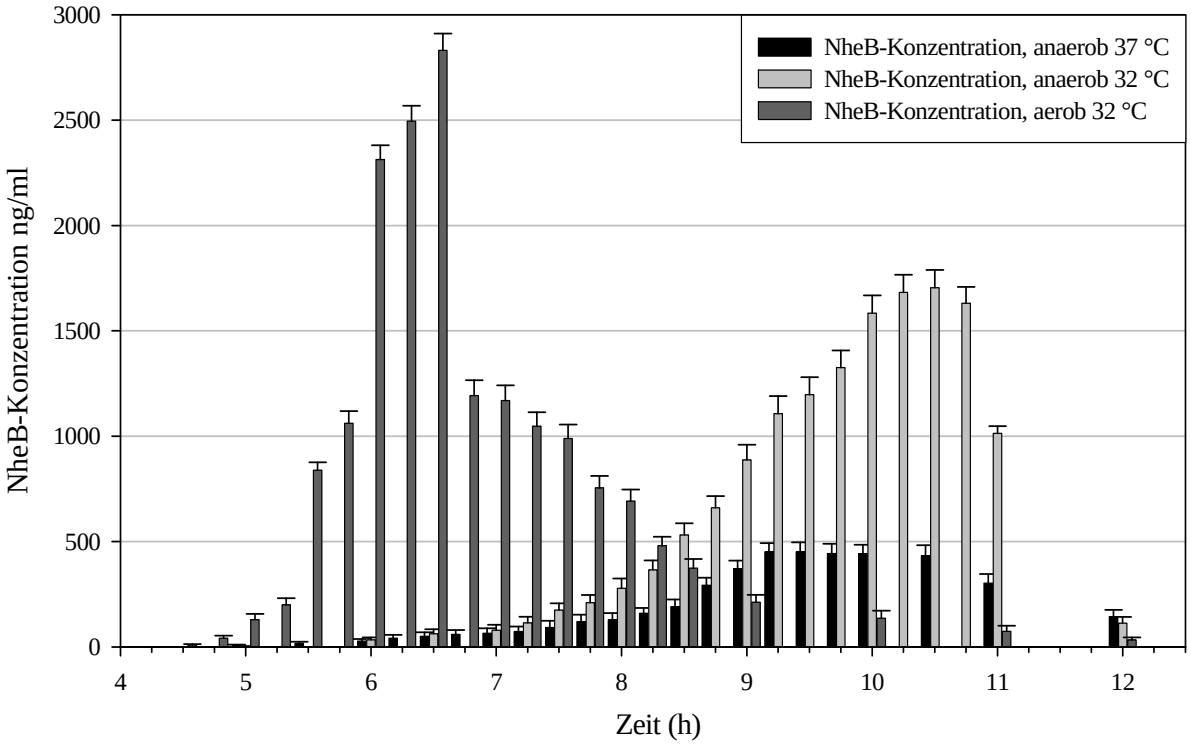


Abbildung 14: Vergleichende darstellung der NheB-Konzentration von MHI 241
aerobe Anzucht, 32 °C; anaerobe Anzucht, 32 °C und anaerobe Anzucht, 37 °C



Unter anaeroben Bedingungen waren die Proben nach 60 Stunden bei beiden Stämmen noch positiv, MHI 163 hatte bei 32 °C noch einen NheB-Konzentration von 1 ng/ml. Unter aeroben Bedingungen war Stamm MHI 163 nach 48 Stunden Versuchsdauer positiv und zu Versuchende negativ, jedoch wies MHI 241 zu Versuchende eine Konzentration von 5,2 ng/ml auf.

3.3.3 Zytotoxizitätsverlauf

Mit Hilfe eines Zellkulturtests (Vero-Zellen) wurde die biologische Aktivität der exprimierten Enterotoxine gemessen. Eine Beurteilung der Zytotoxizität erfolgt über den reziproken Titer derjenigen Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Zellen durch Toxineinwirkung zerstört oder im Stoffwechsel inhibiert sind.

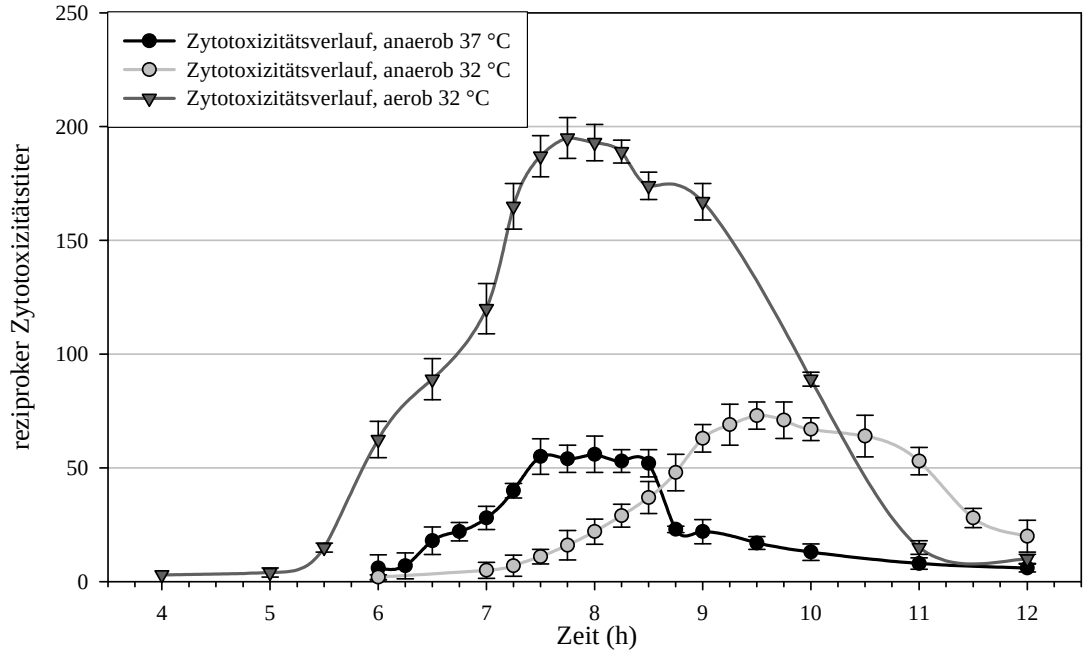
3.3.3.1 Zytotoxizitätsverlauf des NHE- und HBL Produzenten *B. cereus* MHI 163

Erste zelltoxische Reaktionen traten im aeroben Versuchsaufbau nach 4 Stunden Inkubationszeit auf. Wurde der Sauerstoff aus dem System entfernt dauerte es unabhängig von der Temperatur 6 Stunden bis der Zytotoxizitätstest positiv reagierte.

Im weiteren Versuchsverlauf stieg die biologische Aktivität kontinuierlich an, bis sie im Falle der aeroben Anzucht nach 7,75 Stunden ihr Maximum mit einem reziproken Zytotoxizitätstiter von 1:195 erreichte. Die maximalen zytotoxischen Aktivitäten der anaeroben Kulturen wurden bei 32 °C nach 10,5 Stunden Versuchsdauer mit einem reziproken Titer von 1:73, bei 37 °C jedoch bereits nach 7,5 Stunden mit einem Titer von 1:56, erzielt. Dies entspricht nur einem Drittel bzw. einem Viertel der zytotoxischen Reaktion unter aeroben Bedingungen. In allen Versuchen wurde das Maximum der Zytotoxizität über 1-1,5 Stunden konstant gehalten (Abb. 15).

Die Proben der Versuche bei 32 °C Anzuchttemperatur wiesen nach 12 Stunden Inkubationszeit noch einen geringen Titer von 1:10 unter aeroben Bedingungen sowie 1:15 unter anaeroben Bedingungen auf. Atoxisch reagierten die bei 37 °C kultivierten Proben nach 12 Stunden. Weitere 12 Stunden später waren auch die Proben der aeroben und anaeroben Anzuchten bei 32 °C negativ.

Abbildung 15: Vergleichende Darstellung des Zytotoxizitätsverlaufs von MHI 163
aerobe Anzucht 32 °C, anaerobe Anzucht 32 °C, anaerobe Anzucht 37 °C



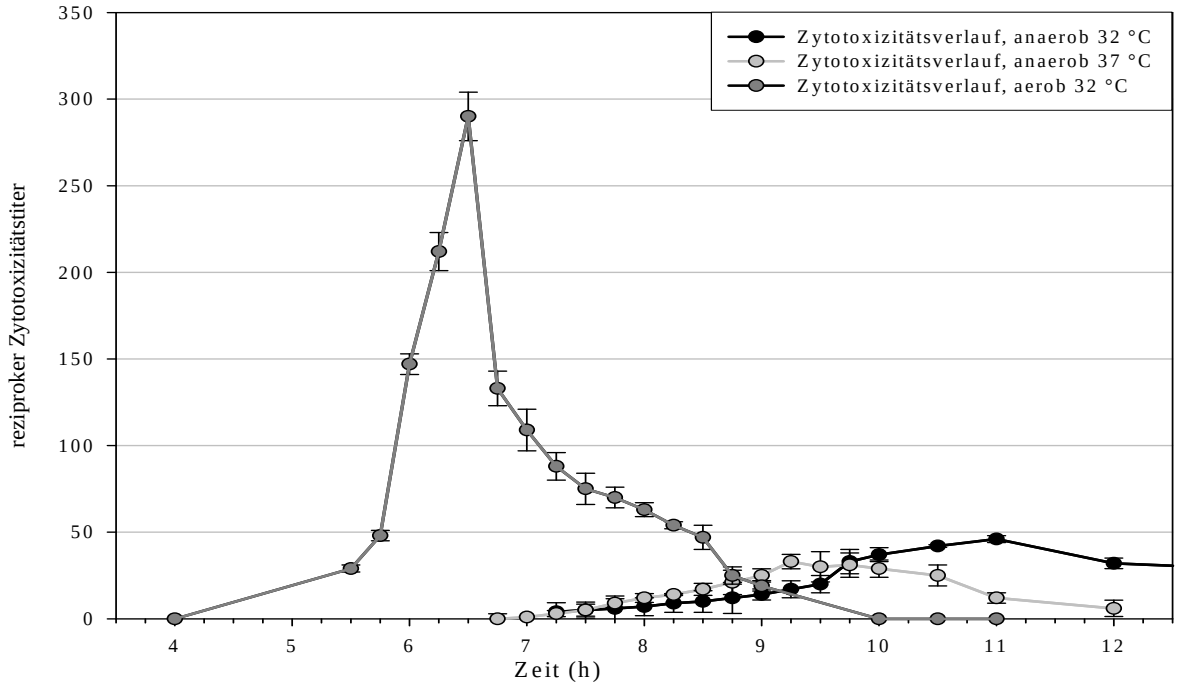
3.3.3.2 Zytotoxizitätsverlauf des NHE-Produzenten *B. cereus* MHI 241

Der NHE-Produzent MHI 241 zeigte unter aeroben Bedingungen nach 5,5 Stunden Kulturdauer eine zytotoxische Reaktion. Entzog man dem System den Sauerstoff verlängerte sich die Zeitspanne bis Zytotoxizität auftrat auf 7,25 Stunden bei 32 °C und 6,75 Stunden bei 37 °C.

Des Weiteren wurde die maximale zytotoxische Aktivität unter Sauerstoffeinfluss nach 6,5 Stunden Inkubationszeit mit einem reziproken Zytotoxizitätstiter von 1:290 erreicht. In den direkt folgenden Proben sank die Zytotoxizität deutlich ab, so dass kein Plateau beobachtet werden konnte. Die anaerob kultivierten Proben zeigten ihr zytotoxisches Maximum bei 32 °C nach 11 Stunden mit einem Titer von 1:46 und bei 37 °C schon nach 9,25 Stunden Versuchsdauer mit einem Zytotoxizitätstiter von 1:33. Die Maxima der sauerstofffreien Kulturen erreichten nur ein Siebtel bzw. ein Neuntel des unter Sauerstoffeinfluss erreichten Wertes. Im Gegensatz zur aeroben Anzucht blieb das Maximum der anaeroben Versuche über 1,25-2 Stunden konstant (Abb. 16).

Der schnelle Abfall der Zytotoxizität der aeroben Anzucht führte dazu, dass die Proben bereits nach 10 Stunden Versuchsdauer atoxisch waren. Die anaeroben Anzuchten zeigten nach 12 Stunden bei 32 °C noch Zytotoxizitätstiter von 1:32 sowie bei 37 °C einen Titer von 1:6. Nach 24 Stunden Kulturdauer waren auch die anaeroben Versuche atoxisch.

Abbildung 16: Vergleichende Darstellung des Zytotoxizitätsverlaufs von MHI 241 aerobe Anzucht 32 °C, anaerobe Anzucht 32 °C und anaerobe Anzucht 37 °C



3.3.4 Vergleich der Enterotoxinproduktion mit den Wachstumskurven

Nachdem im oberen Teil lediglich auf die Entwicklung der untersuchten Parameter in Abhängigkeit von der Zeit eingegangen wurde, folgt eine vergleichende Betrachtung der Parameter untereinander.

Alle kultivierten Proben, sowohl aerob als auch anaerob begannen mit der NheB-Produktion am Ende der Adaptationsphase, beim Übergang ins exponentielle Wachstum. Die NheB-Konzentration stieg parallel zur Wachstumskurve bis, mit zwei Ausnahmen und geringen Abweichungen, das Toxinmaximum während des Übertritts von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre Phase erreicht wurde. Des Weiteren folgte eine Plateauphase die zwischen 1 und 2 Stunden dauerte und dann fiel die Enterotoxin-konzentration rascher wieder ab, als die Keimzahl der anaeroben Anzuchten (Abb. 17 - Abb. 20).

Abbildung 17: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinkonzentration von MHI 241, anaerobe Anzucht, 32 °C

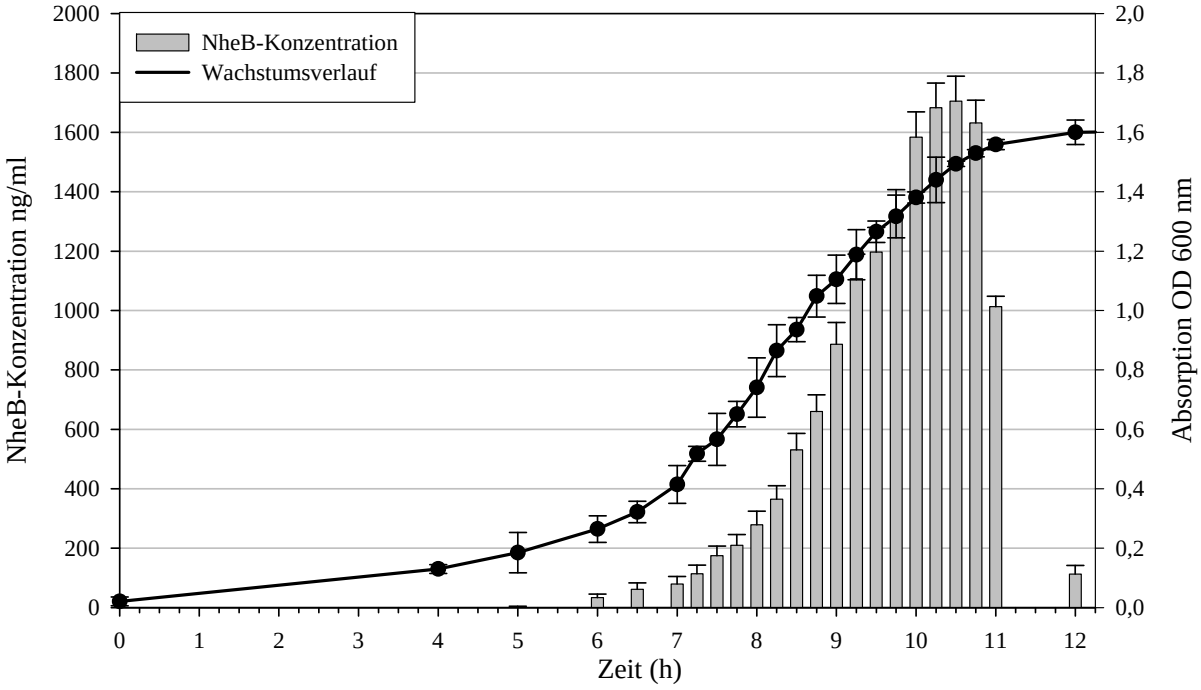


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinproduktion von MHI 241, anaerobe Anzucht , 37 °C

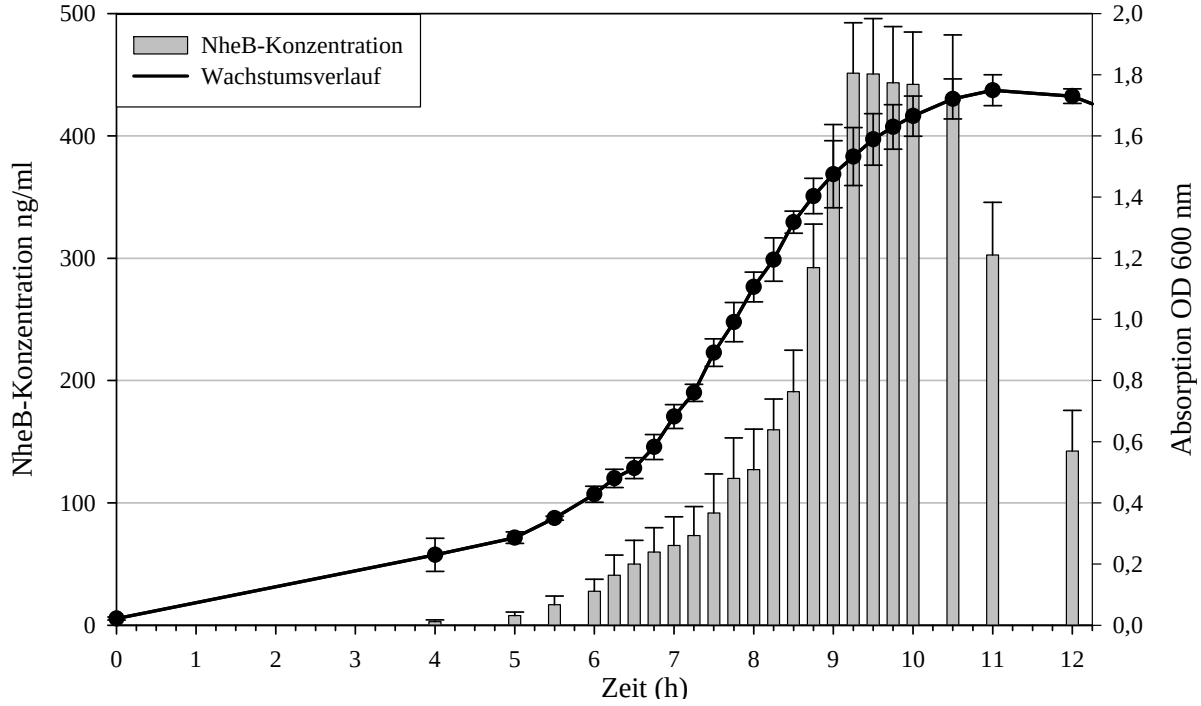


Abbildung 19: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinkonzentration von MHI 163, aerobe Anzucht, 32 °C

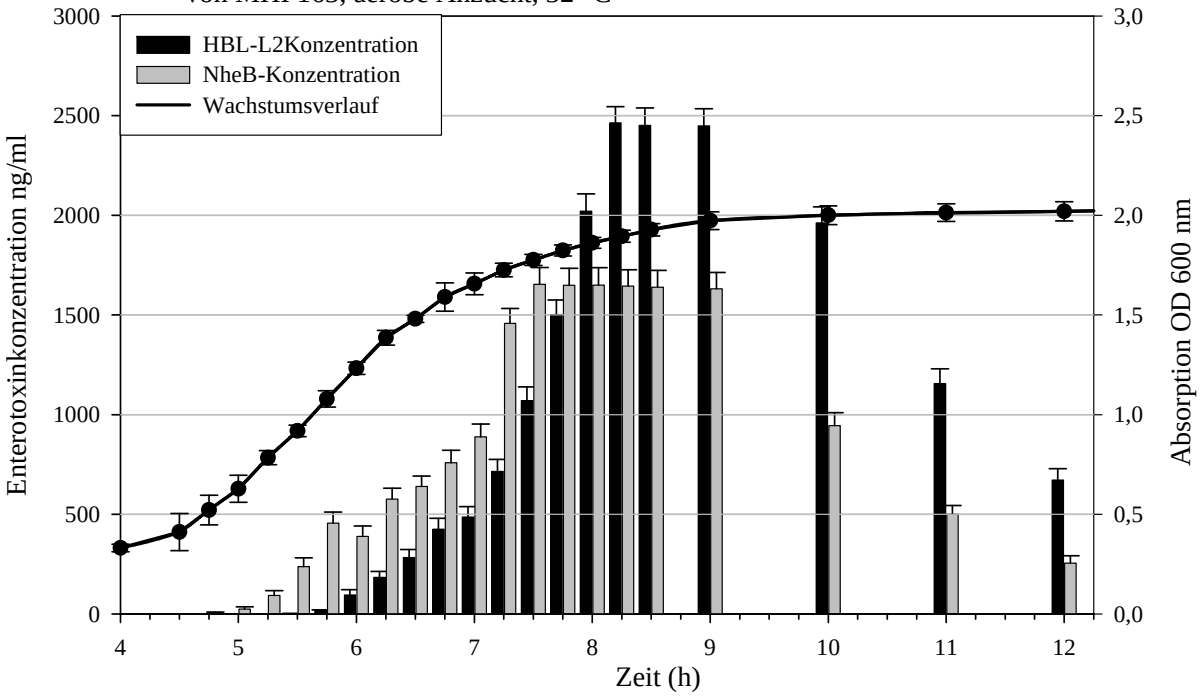
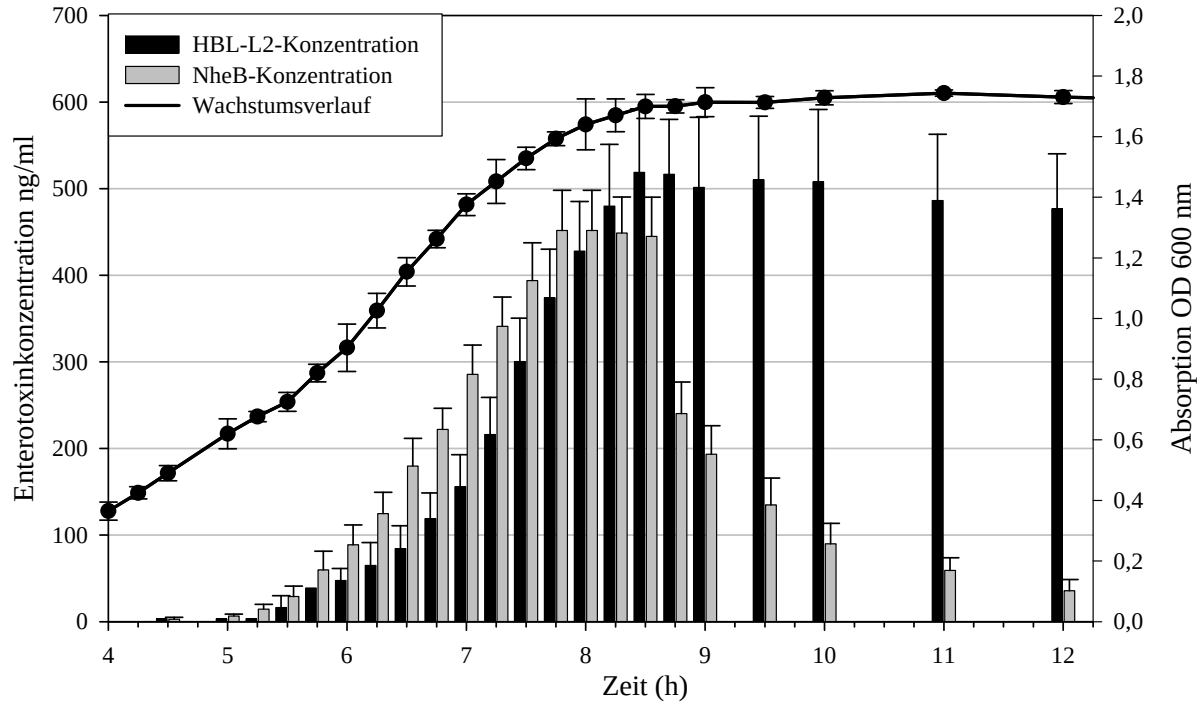


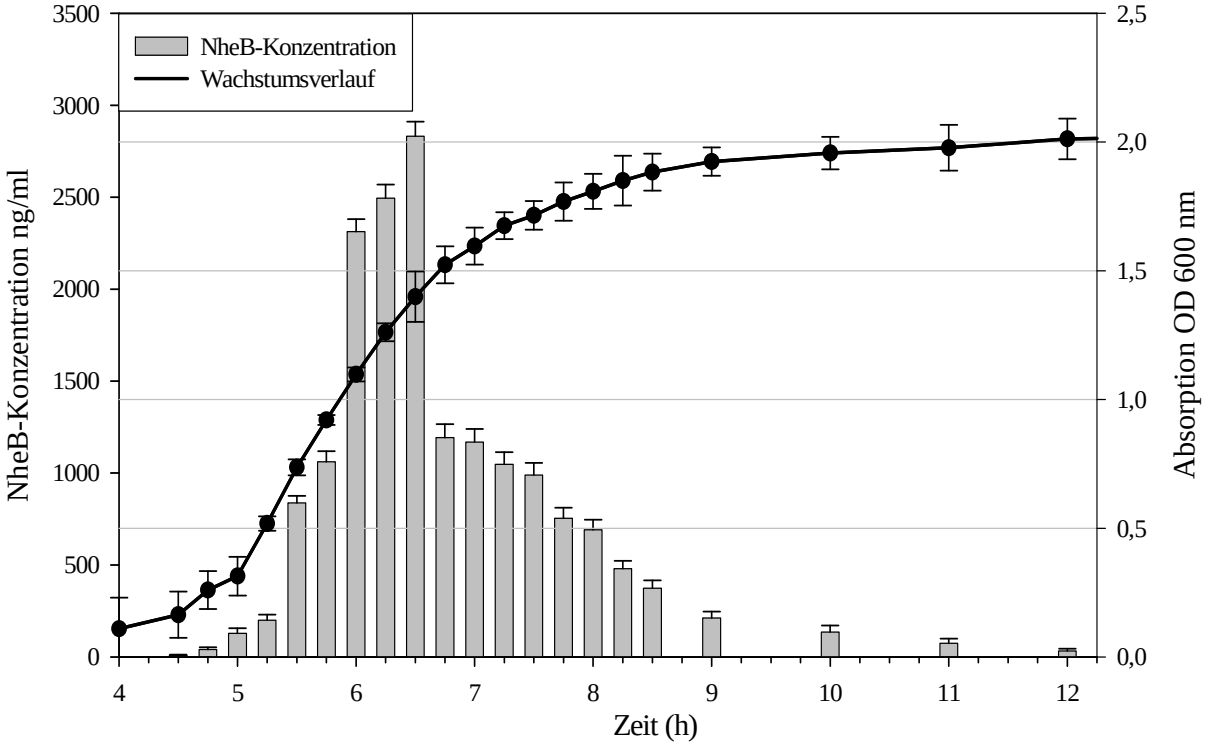
Abbildung 20: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinkonzentration von MHI 163, anaerobe Anzucht, 37 °C



Eine Ausnahme bildet die aerobe Kultur bei 32 °C von Stamm MHI 241, die schon zum zweiten Drittel der exponentiellen Wachstumsphase ihr Toxinmaximum produzierte. Im weiteren Verlauf sinken die Toxinkonzentrationen sehr rasch ab, so dass beim Übergang in

die stationäre Wachstumsphase nur noch geringe Mengen an NheB-Enterotoxin zu finden waren (Abb. 21).

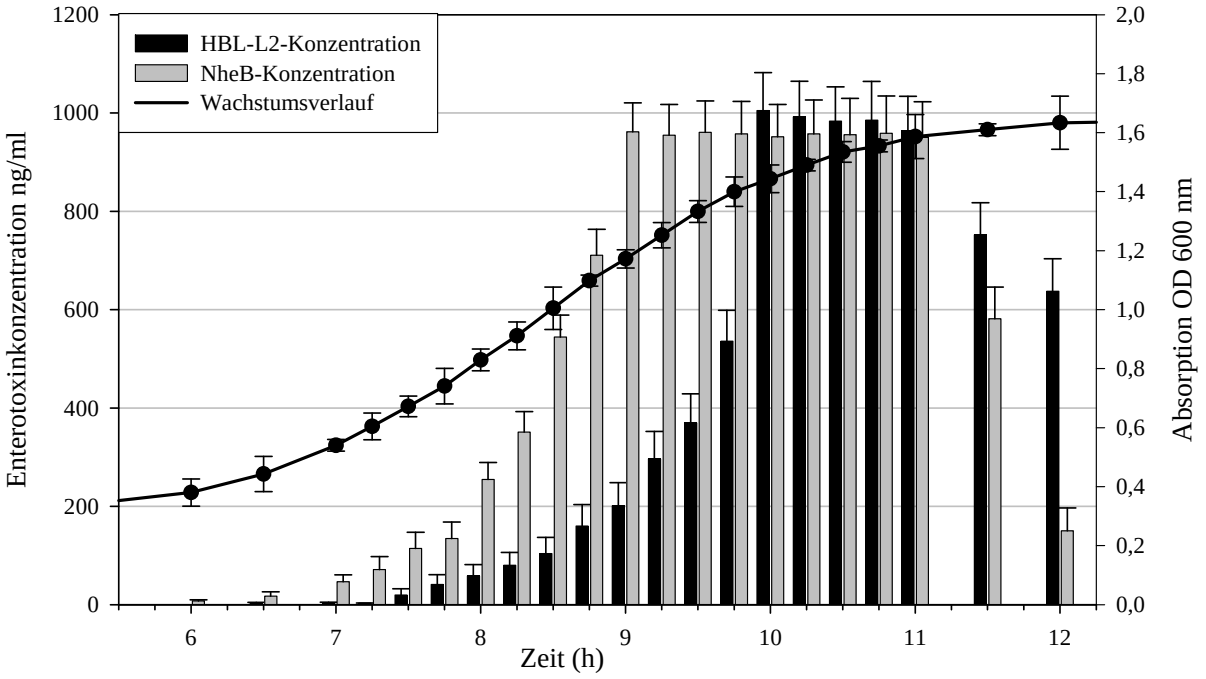
Abbildung 21: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinkonzentration von MHI 241, aerobe Anzucht, 32 °C



Eine weitere Ausnahme stellte die anaerobe Anzucht von Stamm MHI 163 bei 32 °C dar, die ihr Maximum ebenfalls während des zweiten Drittels des exponentiellen Wachstums hatte. Die auf das Maximum folgende Plateauphase war mit über 2 Stunden ausgeprägter als bei den anderen Kulturen (Abb. 22).

Die HBL- L_2-Enterotoxinproduktion verlief ebenfalls annähernd parallel zur Wachstumsurve, setzte jedoch verzögert gegenüber dem NheB-Toxin ein. Die maximale Konzentration trat entsprechend verzögert auf. Die aerob kultivierten Proben stiegen dabei mit der Konzentration über die NheB-Konzentration hinaus (Abb.19), in den anaeroben Anzuchten lag die HBL-L_2-Konzentration auf dem Niveau des NheB-Toxins (Abb. 20 und Abb. 22).

Abbildung 22: Vergleichende Darstellung des Wachstumsverlaufs mit der Enterotoxinkonzentration von MHI 163, anaerobe Anzucht, 32 °C



3.3.5 Vergleich der Enterotoxinproduktion mit der zytotoxischen Aktivität

Betrachtet man den Beginn der zytotoxischen Aktivität des NHE- und HBL-Produzenten *B. cereus* MHI 163 fällt auf, dass nur geringe NheB-Konzentrationen von 10 ng/ml vorlagen und noch kein HBL-L_2 produziert wurde. Beim reinen NHE-Produzenten *B. cereus* MHI 241 waren höhere NheB-Konzentrationen von ca. 100 ng/ml für erste toxische Reaktionen nötig.

Im weiteren Verlauf stiegen die Enterotoxinkonzentrationen wie auch die Zytotoxizitätstiter kontinuierlich an. Das zytotoxische Maximum wurde von Stamm MHI 163 kurz vor der maximalen NheB-Konzentration und deutlich vor der maximalen HBL-L_2-Konzentration erreicht. Bei Stamm MHI 241 fielen die maximale Zytotoxizität und die höchste NheB-Konzentration zusammen. Des Weiteren sanken die Zytotoxizitätstiter abhängig von der NheB-Konzentration wieder ab. So fiel bei der aeroben Kultur von MHI 241 bei 32 °C die NheB-Konzentration direkt nach dem Maximum deutlich ab und auch die Zytotoxizität sank ohne Plateauphase wieder (Abb. 23). Die zytotoxische Aktivität der anaerob kultivierten Proben von MHI 241 bei 32 °C und 37 °C blieb auf dem maximalen Niveau parallel zum NheB-Enterotoxin und sank mit Abfallen der Enterotoxinkonzentration wieder (Abb. 24 und Abb. 25).

Abbildung 23: Vergleichende Darstellung der NheB-Konzentration und des Zytotoxizitätstiters
MHI 241, aerobe Anzucht, 32 °C

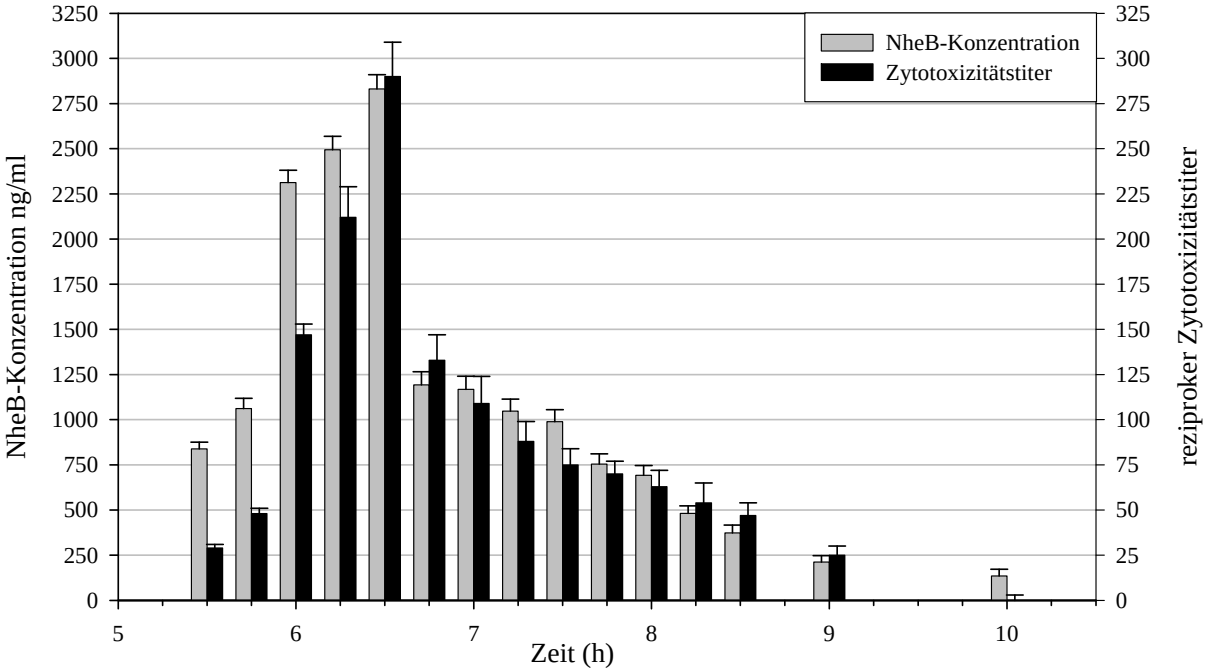


Abbildung 24: Vergleichende Darstellung der NheB-Konzentration und des Zytotoxizitätstiters
MHI 241, anaerob 32 °C

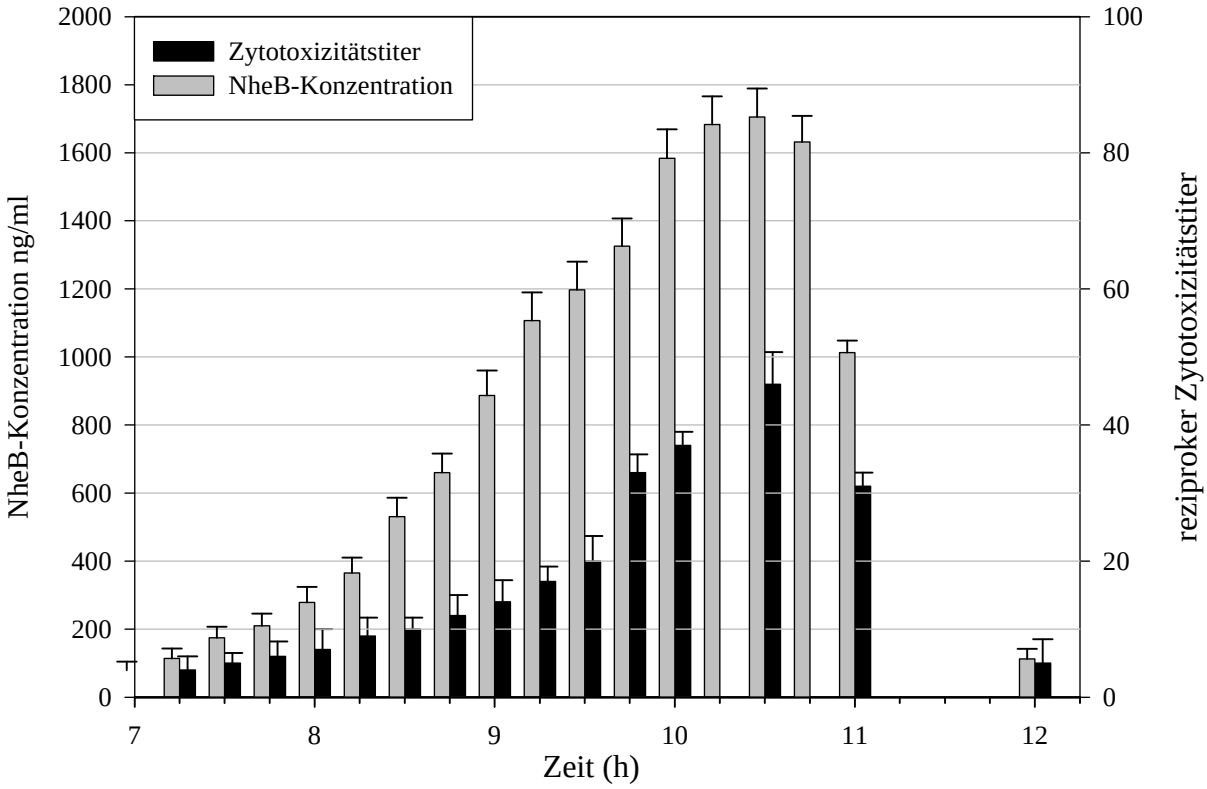
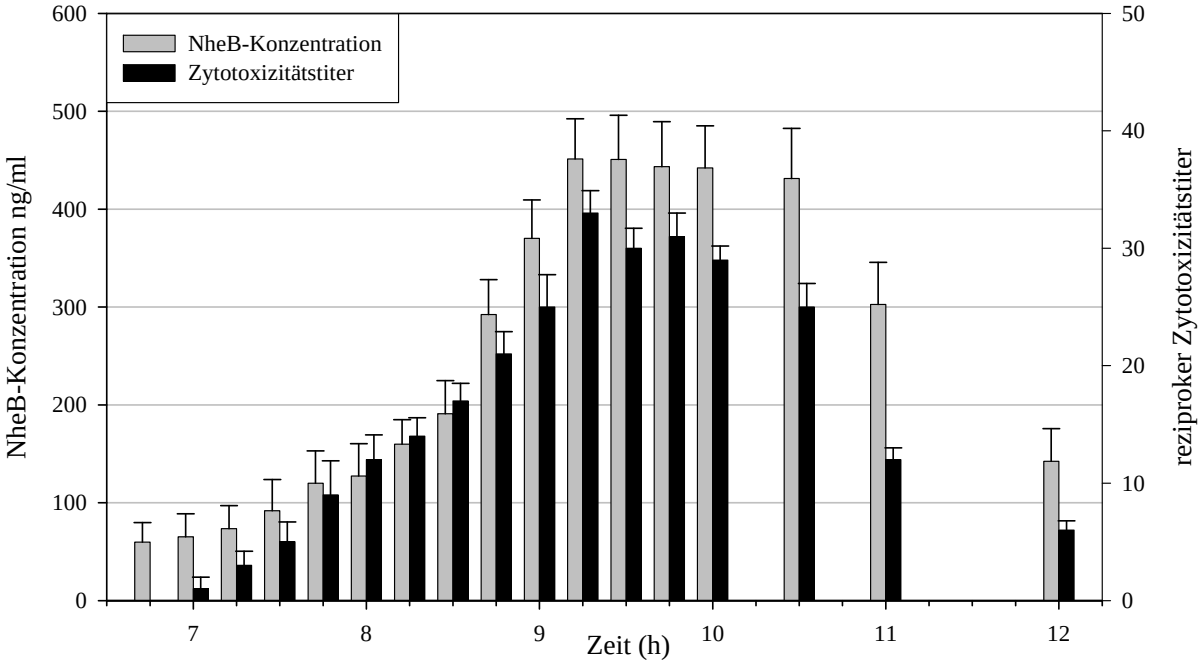


Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der NheB-Konzentration und des Zytotoxizitätstiters MHI 241, anaerob 37 °C



Ebenso wie bei Stamm MHI 241 verliefen die Zytotoxizitätstiter des Stammes MHI 163 parallel zur Enterotoxinkonzentration. Auffälligerweise spielte die HBL-Konzentration nur eine untergeordnete Rolle, da mit dem Abfall der NheB-Konzentration auch der Zytotoxizitätstiter sank, trotz weiterhin hohen L_2-Konzentrationen (Abb. 26 und Abb. 27). Besonders deutlich war dies bei der anaeroben Anzucht bei 37 °C zu sehen (Abb. 28).

Abbildung 26: Vergleichende Darstellung des Zytotoxizitätstiters mit der Enterotoxinkonzentration MHI 163 aerobe Anzucht, 32 °C

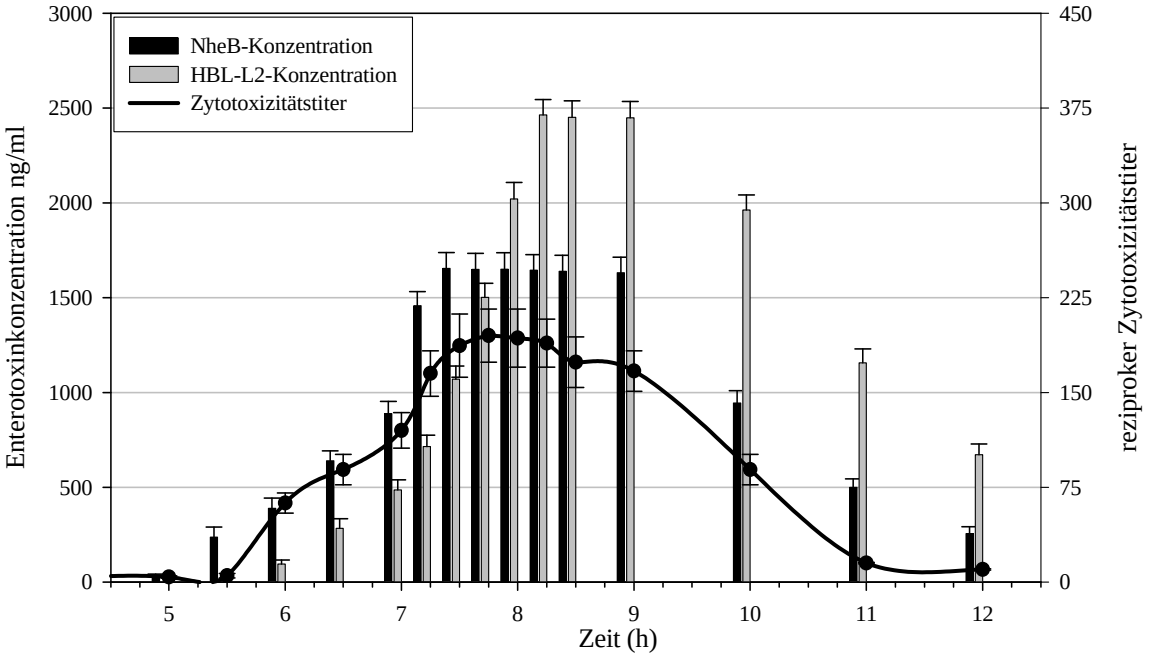


Abbildung 27: Vergleichende Darstellung des Zytotoxizitätstiters mit der Enterotoxinkonzentration anaerobe Anzucht, 32 °C

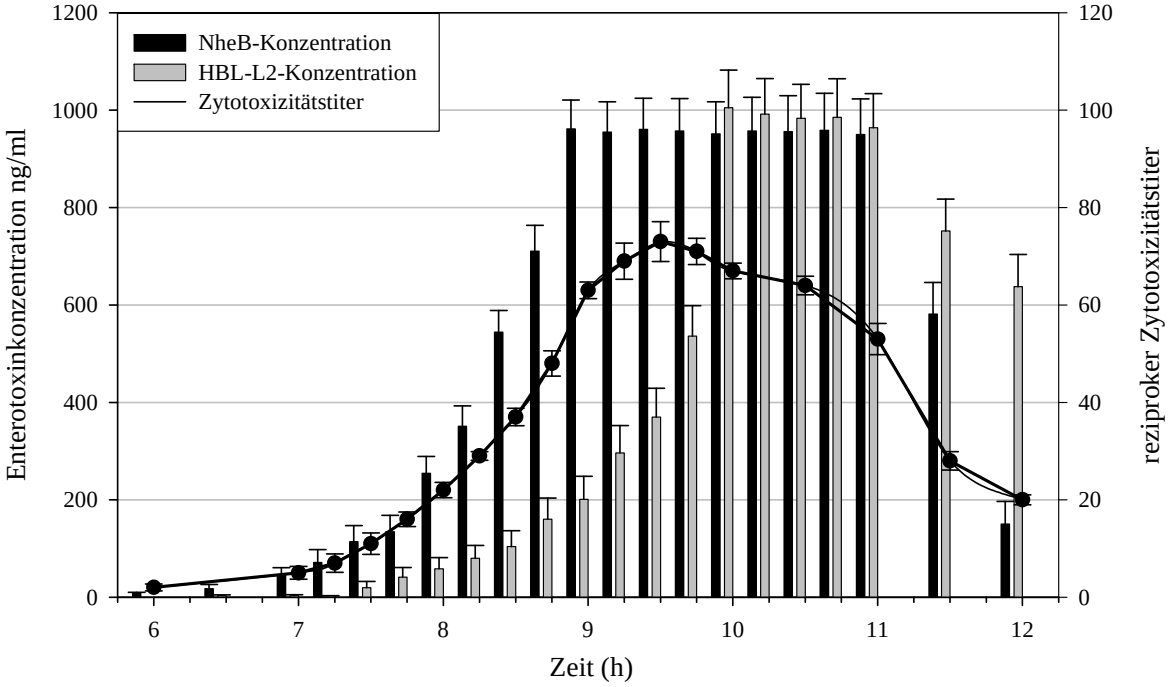
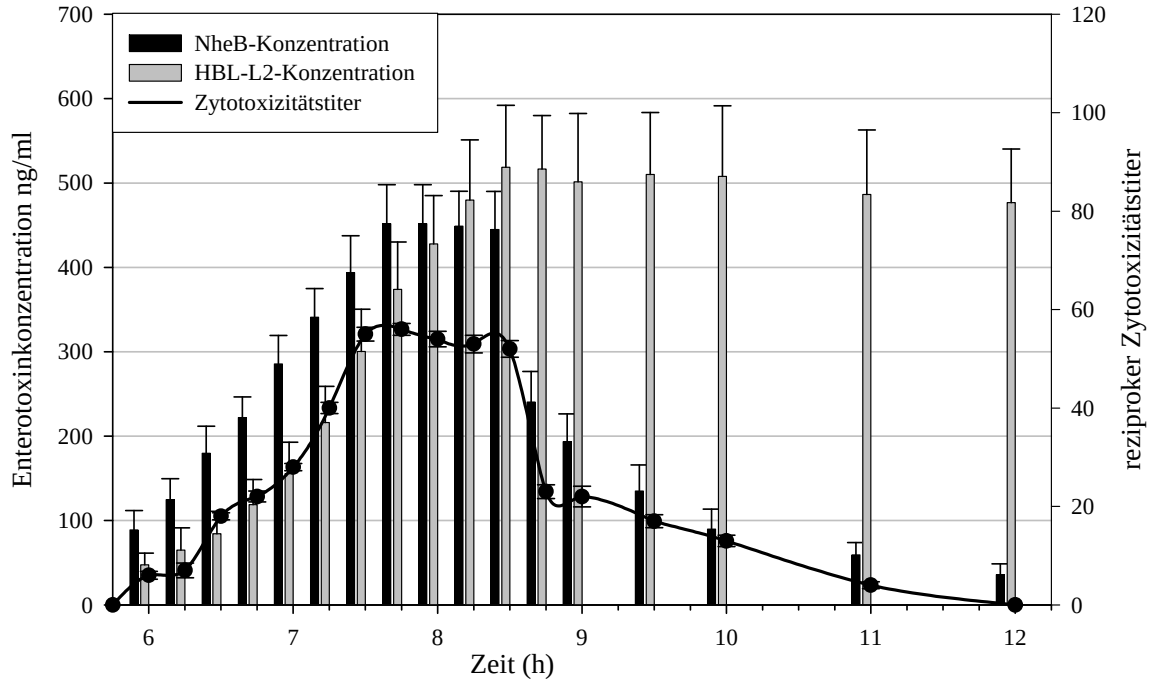


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung des Zytotoxizitätstiters mit der Enterotoxinkonzentration MHI 163 anaerobe Anzucht, 37 °C



Vergleicht man die Korrelation zwischen der Konzentration der einzelnen Enterotoxinkomponenten und dem zugehörigen reziproken Zytotoxizitätstiter wird dies noch besser veranschaulicht (Abb. 29 und Abb. 30). Die Korrelation der NheB-Konzentration mit dem Zytotoxizitätstiter beträgt unter aeroben Bedingungen r^2 = 0,85 und unter anaeroben

Bedingungen r^2 = 0,79 (Abb. 29). Diejenige der HBL-L_2-Konzentration mit dem Zytotoxizitätstiter ist mit r^2 = 0,45 für die aerob kultivierten Proben und r^2 = 0,11 für die anaeroben Proben sehr gering und wenig aussagekräftig (Abb. 30).

Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der Korrelation zwischen Zytotoxizitätstiter und NheB-Konzentration von MHI 241 und MHI163 aerob (grau, r = 0,85) und anaerob (schwarz, r = 0,79)

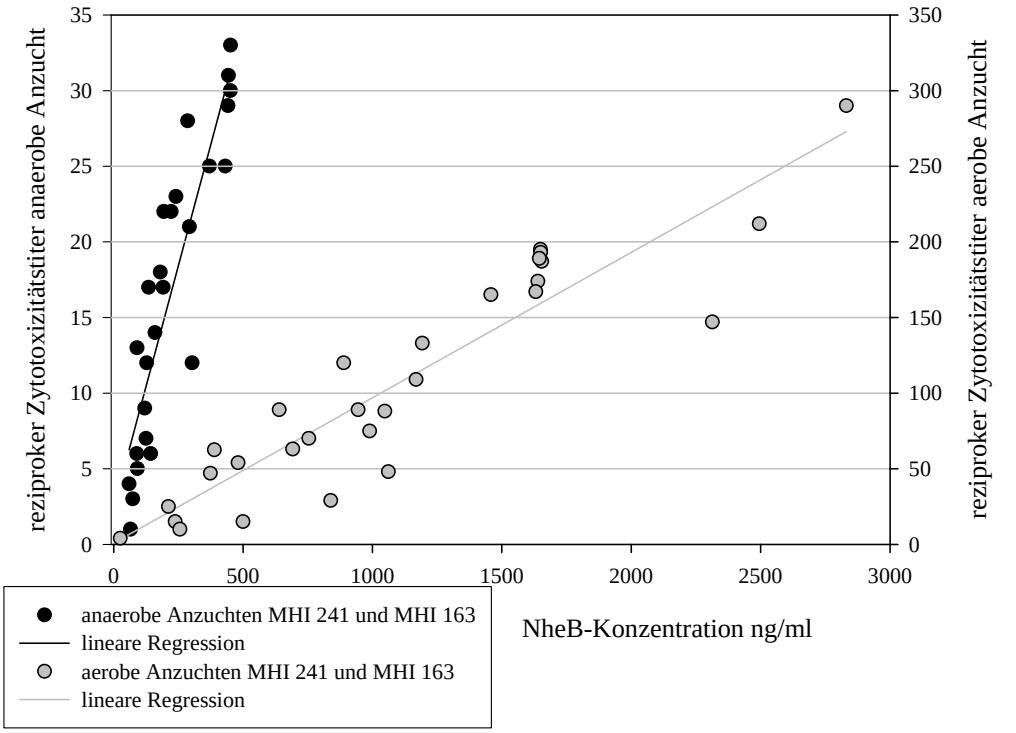
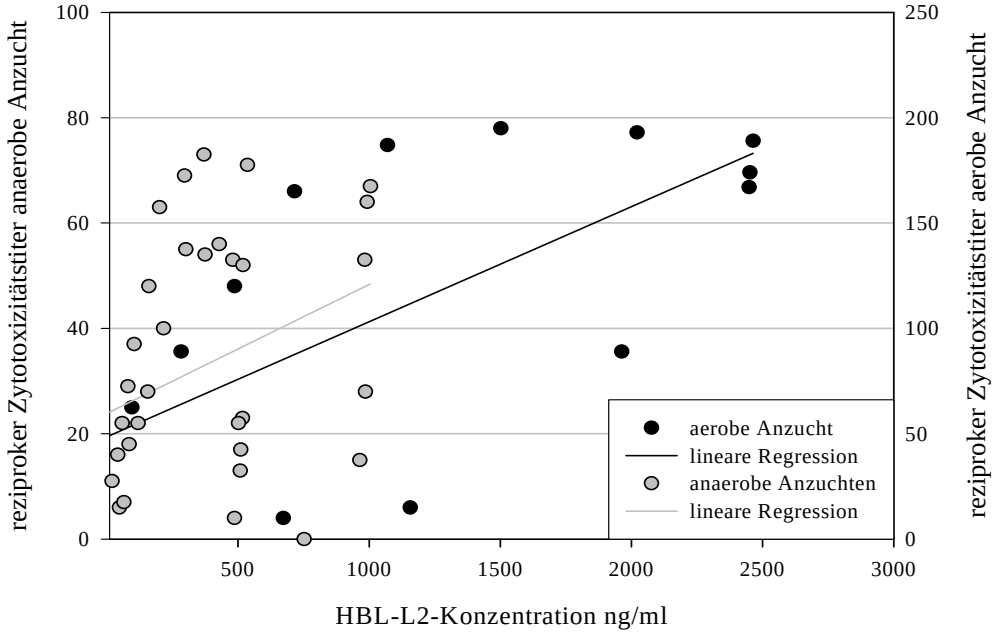


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der Korrelation zwischen Zytotoxizitätstiter und HBL-L2-Konzentration von MHI 163 aerobe Anzucht (schwarz, r = 0,45) und anaerobe Anzucht (grau, r = 0,11)



Obwohl die NheB-Konzentration von MHI 241 bei 32 °C unter anaeroben Bedingungen höher lag als die von MHI 163 waren die reziproken Zytotoxizitätstiter von MHI 163 höher als die von MHI 241. Auch bei der anaeroben Kultur bei 37 °C waren die Proben von MHI 163 zytotoxischer als die von MHI 241, wenngleich die NheB-Konzentration gleichhoch war. Lediglich die aerob kultivierten Proben von MHI 241 zeigten mit höheren NheB-Konzentrationen auch höhere zytotoxische Aktivität gegenüber dem Stamm MHI 163.

4 Diskussion

Der Schwerpunkt der *B. cereus* Forschung lag in den letzten Jahrzehnten auf der Identifizierung und Charakterisierung der für Lebensmittelvergiftungen verantwortlichen Pathogenitätsfaktoren. Für die Diarrhö-Form der Erkrankung konnten zwei zelltoxische Enterotoxinkomplexe (HBL und NHE) als wichtige Faktoren erkannt werden (BEECHER & MACMILLAN, 1990; LUND & GRANUM, 1996). In mehreren Studien (PRÜSS et al., 1999; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; IN'T VELD et al., 2001; GUINEBRETIÈRE et al., 2002; EHLING-SCHULZ et al., 2005; MORAVEK et al., 2006) zur Prävalenz der beiden Enterotoxine konnte gezeigt werden, dass nahezu alle *B. cereus* Stämme in der Lage sind mindestens einen dieser Toxin-Komplexe zu produzieren. Des Weiteren konzentrierten sich Studien auf die Charakterisierung der Wirkungsmechanismen der Enterotoxine (BEECHER & MACMILLAN, 1991; BEECHER & WONG, 1997; LINDBÄCK et al., 2004). Nach der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen die Komponenten von HBL und NHE am Lehrstuhl (DIETRICH et al., 1999 und 2005) wurde versucht mittels quantitativer Analyse der Diarrhö-Toxinproduktion Rückschlüsse auf das enterotoxische Potential zu gewinnen (MORAVEK et al., 2006). Allerdings wurden alle oben genannten Studien *in vitro* durchgeführt und quantitative Daten über die Toxinproduktion unter *in vivo* Bedingungen fehlen bisher weitgehend.

Bei den ersten Studien zum Wachstum und zur Toxinbildung von *B. cereus* unter anaeroben Bedingungen konnte mangels spezifischer Nachweisverfahren nur die Gesamtheit aller biologisch aktiven Komponenten im Tierversuch gemessen werden (GLATZ et al., 1974; GLATZ & GOEPFERT, 1976 und 1977). In der Studie von BEATTIE & WILLIAMS (2002) zur Produktivität der Diarrhö-Toxine unter verschiedenen Anzuchtbedingungen wurden kommerziell erhältliche semiquantitative, immunchemische Nachweissysteme verwendet, deren Ergebnisse aufgrund unspezifischer Reaktionen mit weiteren Exoproteinen (GRANUM et al., 1993; BEECHER & WONG, 1994 b) mit Vorsicht zu interpretieren sind. DUPORT et al. (2004 und 2006) und ZIGHA et al. (2006) untersuchten Wachstum und Toxinproduktion von *B. cereus* unter anaeroben Bedingungen bei 34 °C mit Schwerpunkt auf den Glucosestoffwechselwegen und Regulationsmechanismen auf mRNA Ebene.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Enterotoxinproduktion zweier an Lebensmittelinfektionen beteiligten *B. cereus* Isolate mit gesichertem enterotoxischen

Potential, unter verschiedenen Anzuchtbedingungen quantitativ untersucht werden. Auf diese Weise sollten Hinweise auf die Diarrhö-Toxinbildung im Magen-Darmtrakt im Vergleich zu optimierten „*in vitro*“Anzuchtbedingungen erhalten werden.

Die Kultivierung der Proben erfolgte im Bioreaktor unter ständiger Kontrolle und Dokumentation der Parameter. Aus methodischen Gründen musste dem Medium eine Antischaumlösung (Antifoam O-30) zugesetzt werden, um das durch den Gasdurchfluss und Rühren in Zusammenhang mit der Exoproteinsynthese auftretende Aufschäumen des Mediums zu verhindern, eine gängige Methode in der Bioreaktortechnik (MENKEL, 1992). In Vorversuchen wurde die Wirkung der Antischaumlösung auf das Bakterienwachstum und die Enterotoxinproduktion analysiert und mit Standardanzuchten ohne Zusatz von Antischaumlösung verglichen. Das Bakterienwachstum wurde durch die Zusätze nicht beeinflusst. Die Ergebnisse des Enzymimmunoassay (EIA) und des Zytotoxizitätstests zeigten, dass die absoluten Toxinkonzentrationen durch Zugabe von Antifoam O-30 reduziert wurden, die relativen Toxingehalte und somit die Aussagekraft der Versuchsergebnisse nicht beeinflusst wurde.

In weiteren Vorversuchen wurde untersucht, ob mit einer Beimpfung des Bioreaktors mit vegetativen Keimen reproduzierbare Anfangskeimgehalte (10^5 KbE) erreicht werden können. Allerdings variierte die Adaptationszeit der Kulturen bei gleicher Startkeimzahl von 4 bis 36 Stunden. Trotz mehrerer Ansätze zur Kalkulation des Verdünnungsverhältnisses, um eine Startkeimzahl von 10^5 KbE/ml zu erhalten, strikter Einhaltung des Zeitplanes und Kontrolle der Startkeimzahl durch Oberflächenverfahren, konnte keine einheitliche lag-Phase innerhalb eines Versuchsaufbaus erreicht werden.

Bei Verwendung einer Sporensuspension zur Beimpfung des Bioreaktors wurden dann einheitliche Adaptationszeiten bei allen drei Ansätzen pro Versuchsaufbau beobachtet. Aus diesem Grund wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche mit einer Sporensuspension gestartet. Somit war es möglich, jeden Versuch mit der nach GRANUM (2001) infektiösen Dosis von 10^5 Keimen /ml zu beginnen.

Betrachtet man den Wachstumsverlauf der beiden verwendeten Stämme bei 32 °C, kann eine deutliche Verlängerung der Adaptationsphase bei anaerober Anzucht gegenüber aerober

Anzucht beobachtet werden (Abb. 6), wie dies für den als aeroben Sporenbildner charakterisierten *B. cereus* zu erwarten war.

Bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C unter anaeroben Bedingungen verkürzt sich die lag-Phase bei beiden verwendeten Stämmen. Speziell bei dem NHE- und HBL-Produzenten MHI 163 beginnt das exponentielle Wachstum sogar schon früher als bei 32 °C unter Sauerstoffzufuhr. Es handelt sich möglicherweise bei dieser erhöhten Anpassungsfähigkeit an gastrointestinale Bedingungen, neben dem Toxinbildungspotential eines Isolates, um einen weiteren wichtigen Pathogenitätsfaktor. Der alleinige Nachweis von Diarrhö-Toxinen dürfte nicht ausreichen, um die Enteropathogenität eines *B. cereus* Isolates zu beweisen. So gibt es keine Berichte über Erkrankungsfälle durch *B. cereus* Sporen eines als Probiotikum verwendeten humanen Präparates, obwohl von HOA et al. (2000) HBL und NHE nachgewiesen werden konnten. Auch Studien von ANDERSSON et al. (1998), BORGE et al. (2001) sowie RAMARAO & LERECLUS (2006) bestätigen die Existenz zusätzlicher noch unbekannter Pathogenitätsfaktoren.

Die Generationszeiten der verschiedenen Anzuchten dieser Arbeit betrugen unter aeroben Bedingungen 22 Minuten für den NHE- und HBL-Produzenten und 20 Minuten für den reinen NHE-Produzenten (Tab. 6). Ähnliche Generationszeiten beobachteten auch DUPORT et al. (2004) unter optimalen Kulturbedingungen.

Bei den anaerob kultivierten Proben bei 32 °C verdoppelte (MHI 163) bzw. verdreifachte (MHI 241) sich die Generationszeit gegenüber den aeroben Versuchen (Tab. 6). Eine Anzuchttemperatur von 37 °C führte insbesondere beim NHE und HBL produzierenden Stamm zu einer Verkürzung der Generationszeiten, wodurch eine bessere Adaptationsfähigkeit dieses Stammes an *in vivo* Bedingungen vermutet werden kann.

Die anaeroben Proben mit längerer Generationszeit wiesen höhere maximale Toxinkonzentrationen auf. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die log-Phase und die damit verbundene Toxinbildungszeit länger andauerten. Höhere Toxinkonzentrationen wurden bei längeren Generationszeiten auch von DUPORT et al. (2004) und BEATTIE & WILLIAMS (2002) gefunden. Dies wurde von BEATTIE & WILLIAMS (2002) mit den gleichen Argumenten begründet.

Bei der Analyse der zeitlichen Reihenfolge des Auftretens der beiden Enterotoxinkomplexe vom NHE- und HBL-Produzenten MHI 163 fiel auf, dass die NheB-Produktion ca. eine Stunde vor der HBL-L_2-Produktion begann und ebenfalls ca. eine Stunde früher die maximale Konzentration erreichte (Abb. 19, Abb. 20, Abb. 22). Dieses Phänomen, dass NHE zuerst vor allem während des exponentiellen Wachstums gebildet wird und HBL als zweites Enterotoxin hauptsächlich in der stationären Phase, ist auch von ZIGHA et al. (2006) beobachtet worden.
Da die HBL-Produktionsrate bei niedrigem Redox-Potential (RP) unter anaeroben Bedingungen erst beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase ansteigt, vermuten ZIGHA et al. (2006), dass der Eintritt in die stationäre Phase Auslöser für die verstärkte HBL-Produktion sein könnte.
ZIGHA et al. (2006) stellten auch fest, dass die Produktionsrate des NHE-Toxins direkt mit der Transkription der *nhe* mRNA zusammenhängt. Die Produktionsrate des HBL-Komplexes während der stationären Phase hingegen wird kaum von mRNA Level beeinträchtigt und ist wahrscheinlich posttranskriptional reguliert.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Diskrepanz im unterschiedlichen Beginn der Enterotoxinproduktion könnte z. T. auch methodisch bedingt sein. Die Enzymimmuno-assay (EIA) weisen eine unterschiedliche Sensibilität für die beiden Enterotoxinkomponenten auf, da der verwendete Test zum Nachweis der NheB-Toxinkomponente sensibler reagierte, als das System zur Detektion der HBL-L_2-Komponente.

Vergleicht man den Wachstumsverlauf mit der Toxinproduktion, sieht man beim reinen NHE-Produzenten (MHI 241), dass das Maximum des NHE-Enterotoxins unter aeroben Bedingungen während der exponentiellen Phase produziert wurde (Abb. 21). Entfernte man den Sauerstoff aus dem System, verschob sich das Maximum bei 32 °C in die frühe stationäre Phase, bei 37 °C lediglich in die späte exponentielle Phase (Abb. 17 und Abb. 18). Die maximale Toxinkonzentration des NHE- und HBL-Produzenten war Wachstumsphasen unabhängig und lag bei allen drei Versuchsaufbauten in der späten exponentiellen Phase für das NHE und während des Übergangs von der exponentiellen in die stationäre Phase für das HBL.

Entgegen den Ergebnissen dieser Arbeit stellten DUPORT et al. (2004) bezüglich des HBL-Komplexes fest, dass dessen Maximum sich abhängig vom Sauerstoffgehalt über die Wachstumsphasen verschoben hatte. In den Versuchen von DUPORT et al. (2004) lag die

maximale HBL-Konzentration im Medium mit 50 % Sauerstoffgehalt beim Übergang der lag-Phase in die exponentielle Wachstumsphase, bei 10 % Sauerstoffgehalt während der exponentiellen Phase und unter anaeroben Bedingungen beim Übergang vom exponentiellen Wachstum in die stationäre Phase. Mit steigendem Sauerstoffgehalt nahm bei DUPORT et al. (2004) die HBL-Toxinkonzentration, entgegen den Ergebnissen aus Untersuchungen von BEATTIE & WILLIAMS (2002) und der vorliegenden Arbeit, ab. DUPORT et al. (2004) führen die Differenz auf unterschiedliche Kulturbedingungen (Temperatur, Medium, pH-Wert), sowie auf isolatabhängige Variationen zurück. Da der von DUPORT et al. (2004) verwendete Stamm F4430/73 mit dem für diese Arbeit herangezogenen NHE- und HBL-Produzenten (Stamm MHI 163) identisch ist, müssen andere Mechanismen als isolat abhängige Variationen für den Unterschied in der Toxinkonzentration bei verschiedenen Sauerstoffgehalten und dem unterschiedlichen Produktionsablauf während der Wachstumsphasen verantwortlich sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch die Zytotoxizität mittels Vero-Zellen getestet und der Toxinkonzentration gegenübergestellt. Die unter Sauerstoffeinfluss kultivierten Proben des NHE-Produzenten MHI 241 wiesen, wie auch die Standardanzuchten im Erlenmeyerkolben nach BEECHER & WONG (1994 a), einen höheren Zytotoxizitätstiter auf, als die des NHE- und HBL-Produzenten MHI 163.
Interessanterweise kehrte sich dieses Verhältnis nach Entfernen des Sauerstoffs aus dem System um, so dass die Proben von MHI 163 zytotoxischer reagierten. Dies weist auf eine bessere Adaptationsfähigkeit des NHE- und HBL-Produzenten auf anaerobe Umwelteinflüsse hin. Bei der Analyse der Zytotoxizität von Stamm MHI 163 im Kontext mit der Enterotoxinkonzentration scheint die biologische Aktivität des Kulturüberstandes von der NHE-Konzentration dominiert zu werden, da in den Abbildungen 26-28 trotz hoher L_2-Konzentration die Zytotoxizität mit den sinkenden NheB-Konzentrationen korreliert.

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die L_2-Komponente im EIA bestimmt wurde, könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein, dass eine andere Komponente des HBL-Toxins, HBL-B oder HBL-L_1, proteolytisch abgebaut und somit der Gesamtkomplex trotz Anwesenheit der L_2-Komponente inaktiviert wurde. Außerdem wirkt der für das HBL-L_2 verwendete monoklonale Antikörper (mAK) nicht neutralisierend (DIETRICH et al. 1999), somit ist es auch möglich, dass die biologisch aktive Struktur des HBL-L_2 proteolytisch verändert wurde und somit die zytotoxische Eigenschaft einbüßte, im EIA aber noch

nachweisbar war. Die im EIA verwendeten mAK zum Nachweis der NheB-Komponente sind dagegen neutralisierend, so dass ein in diesem System gemessener Abfall der NheB-Konzentration erwartungsgemäß mit einem Absinken des Zytotoxizitätstiters einhergeht.
Auch bei MORAVEK et al. (2006) ist eine geringere Korrelation zwischen der Zytotoxizität und der HBL-L_2-Konzentration, als zwischen der Zytotoxizität und der NheB-Konzentration beschrieben. Diese Versuche wurden ebenfalls nur unter Berücksichtigung der NheB- und HBL-L_2-Komponente angefertigt.
Die Darstellungen der vorliegenden Arbeit (Abb. 29 und Abb. 30) zur Korrelation zwischen Toxinkonzentration und Zytotoxizitätstiter müssen demnach unter Berücksichtigung dieser Verhältnisse bewertet werden. Die stärkere zytotoxische Reaktion des NHE- und HBL-Produzenten gegenüber dem reinen NHE-Produzenten unter anaeroben Bedingungen lässt sogar im Gegensatz zu früheren Untersuchungen größere Bedeutung des HBL-Komplexes *in vivo* vermuten.

Des Weiteren ist die zytotoxische Wirkung der Enterotoxinkomplexe auf die Darmepithelzellen von großem Interesse. In zahlreichen Studien wurde bereits die Empfindlichkeit der Diarrhö-Enterotoxine gegenüber Temperatur und verschiedenen Proteasen untersucht (Tab. 3). Im Dünndarm, insbesondere im Duodenum, liegen physiologisch hohe Konzentrationen an proteolytischen Enzymen vor, welche die von *B. cereus* produzierten Enterotoxine sehr schnell inaktivieren könnten. Schon geringe Mengen Trypsin oder Chymotrypsin konnten bei *in vitro* Versuchen die biologische Aktivität der Toxine innerhalb kürzester Zeit auf 5 % und weniger verringern (Tab. 3). Da laut GRANUM (2001) die Diarrhö-Form der *B. cereus* Erkrankungen nicht durch präformiert vorliegende Enterotoxine verursacht wird, müssen die zu Durchfall führenden Toxine im Darm synthetisiert und sezerniert werden. Eine Möglichkeit, das Durchfallgeschehen trotz hoher Präsenz von Proteasen zu erklären, könnte die räumliche Nähe von Enterotoxinproduktion und Wirkungsort sein. Es ist nach CLAVEL et al. (2004) bewiesen, dass Sporen von *B. cereus* im geeigneten Medium (Nahrung) problemlos Magen-Darm Bedingungen überstehen können und anschließend in der Lage sind auszukeimen. WIJNANDS et al. (2006) zeigten, dass die Säurepassage im Magen Sporen von mesophilen *B. cereus* zur Vermehrung im Darm anzuregen scheint.
In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass *B. cereus* in der Lage ist, bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen Enterotoxine zu produzieren. Die Sporen könnten sich folglich im Dünndarm an Epithelzellen anheften, auskeimen und Enterotoxine synthetisieren. Die

Toxinkomplexe könnten daraufhin an in direkter Nachbarschaft liegende Darmzellen mit ihren Bindungskomponenten binden und die Zellen zerstören, bevor den Proteasen die Gelegenheit zur Inaktivierung gegeben wäre. Zusätzlich sollte in die Bewertung des proteolytischen Potentials der Verdauungsenzyme im Dünndarm auf *B. cereus* Toxine die Nahrungssituation im Darm berücksichtigt werden, da die Sporen mit der zu verdauenden Nahrung aufgenommen werden. Demnach wäre, besonders bei proteinreicher Nahrung, ein Schutzeffekt vorstellbar, der die biologische Aktivität der Enterotoxine länger erhalten könnte.

Abschließend kann festgestellt werden, dass unter anaeroben Bedingungen, verglichen mit aeroben, geringere Mengen Enterotoxin produziert wurden, die daraus folgend im *in vitro* Zellkulturtest weniger zytotoxisch reagierten. Es ist fraglich, ob unter *in vivo*-Bedingungen die biologische Aktivität aufgrund der räumlichen Nähe von Toxinsynthese und Wirkungsort an Bedeutung gewinnt. Außerdem können aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen Vermutungen über weitere Pathogenitätsfaktoren neben dem enterotoxischen Potential hergeleitet werden. So war die Adaptationsfähigkeit, des NHE- und HBL-Produzenten, Stamm MHI 163, an eine anaerobe Kultur bei 37 °C erheblich besser als bei 32 °C und auch besser als bei dem reinen NHE-Produzenten MHI 241.
Dies war sowohl am Wachstumsverlauf als auch an der HBL-L_2-Produktion erkennbar. Zusätzlich reagierten die Proben des Stammes, der das Potential zur Produktion beider Enterotoxine besaß, nach anaerober Anzucht zytotoxischer, als der reine NHE-Produzent, was eine höhere Bedeutung des HBL-Komplexes unter anaeroben Bedingungen am enteropathogenen Geschehen nahe legt.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass die Pathogenitätsfaktoren, die zur Diarrhö-Form von *B. cereus* führen, vielfältig und z. T. noch unbekannt sind. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind weitere Untersuchungen unter gastrointestinalen Bedingungen zur Abklärung und Bestimmung der enteropathogenen Eigenschaft von *B. cereus* nötig. Insbesondere die Bedeutung der Adaptationsfähigkeit als Pathogenitätsfaktor, die Beteiligung des HBL-Komplexes an der biologischen Aktivität nach anaerober Kultivierung und die proteolytischen Abläufe im Darm nach Nahrungsaufnahme und Toxinsynthese sollten im Mittelpunkt weiterführender Untersuchungen stehen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden das Wachstum, die Enterotoxinproduktion (HBL und NHE) und die biologische Aktivität zweier B*acillus cereus* Isolate mit gesichertem enterotoxischen Potential unter verschiedenen Anzuchtbedingungen untersucht. In Hinblick auf die Toxinbildung im Magen-Darmtrakt wurden neben für *B. cereus* optimale auch simulierte gastrointestinale Bedingungen gewählt.

Erwartungsgemäß verlängerte sich die Adaptationsphase der anaerob kultivierten Proben, dabei zeigten die bei 37 °C kultivierten Proben jedoch eine kürzere lag-Phase als die bei 32 °C inkubierten Proben. Des Weiteren war bei 37 °C ein deutlicher Unterschied zwischen dem NHE- und HBL-Produzenten, dessen lag-Phase der aeroben Anzucht glich, und dem reinen NHE-Produzenten, der sich nicht so gut an die erhöhte Umgebungstemperatur anpasste, zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass neben dem Toxinbildungspotential auch die Adaptationsfähigkeit eines Stammes an gastrointestinale Bedingungen einen nicht zu vernachlässigenden Pathogenitätsfaktor darstellen könnte.

Beide untersuchten Isolate waren in der Lage, in anaerober Atmosphäre Toxin zu produzieren, auch wenn die maximale HBL-L_2-Konzentration bei 37 °C nur 25 % der unter aeroben Bedingungen erreichten Konzentration entsprach. Die NheB-Konzentration war beim reinen NHE-Produzenten gegenüber der aeroben Anzucht auf 15 % reduziert, die des NHE- und HBL-Produzenten lediglich auf 25 %. Betrachtete man die Toxinproduktion zusammen mit dem Wachstumsverlauf, konnte beim reinen NHE-Produzenten eine Verschiebung des Produktionszeitpunktes über die Wachstumsphasen festgestellt werden, die beim NHE- und HBL-Produzenten nicht stattfand. Des Weiteren war auffällig, dass die aeroben Anzuchten des reinen NHE-Produzenten zytotoxischer reagierten, als die des NHE- und HBL-Produzenten, unter anaeroben Bedingungen dieses Verhältnis jedoch umgekehrt war. Das lässt vermuten, dass dem HBL unter anaeroben Bedingungen eine größere Bedeutung zukommt als unter aeroben Umständen.

Somit konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass große Unterschiede in der Wachstumskinetik, Toxinproduktion und Zytotoxizität zwischen simulierten gastrointestinalen Bedingungen und optimierten Anzuchtbedingungen bestehen.

Summary

Production of *Bacillus cereus* enterotoxins under different growth conditions

Subject of this thesis is growth, production of enterotoxins (HBL and NHE) and the biological activity of two *Bacillus cereus* isolates with verified enterotoxic potential under different growth conditions. In order to investigate the enterotoxic potential in the human body, in addition to optimal growth conditions for *B. cereus*, also simulated gastrointestinal conditions have been selected.

As expected, the adaptation phase of the samples cultivated under anaerobic conditions was prolonged, although the samples cultivated at 37 °C showed a shorter lag-phase than those cultivated at 32 °C. Furthermore, at 37 °C, a significant difference was visible between the NHE- and HBL-producer, whose lag-phase was similar to the aerobic culture, and the pure NHE-producer, which did not adapt as well to the higher environmental temperature. From these results it is evident, that besides the potential to produce toxin, the adaptation ability of a strain to gastrointestinal conditions could represent an important factor of pathogenicity.

Both isolates, selected for the investigations, were capable to produce toxin under anaerobic conditions, even though the maximal HBL-L_2-concentration at 37 °C was only 25 % of the concentration achieved under aerobic conditions. The NheB-concentration of the pure NHE-producer was reduced to 15 % compared to the aerobic growth whereas the concentration of the NHE- and HBL-producer was only reduced to 25 %. Comparison of the toxin production with the developing of the growth showed a shift of the production period over the growth phases at the pure NHE-producer which did not occur with the NHE- and HBL-producer. In addition the aerobic cultures of the pure NHE-producer showed significantly more cytotoxicity than the NHE- and HBL-producer, but under anaerobic conditions this relation was inversed. This leads to the assumption that HBL plays a more important role under anaerobic conditions than under aerobic ones.

So it was proven, that there are large differences in growth kinetics, toxin production and cytotoxicity between simulated gastrointestinal conditions and optimized growth conditions.

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 & M. ISOBE (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 (1995):
The *bceT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein
Microbiol. 141, 983-988

ANDERSSON, A., P. E. GRANUM & U. RÖNNER (1998):
The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism
Int. J. Food Microbiol. 63, 93-99

ANDERSEN BORGE, G. I., M. SKEIE, T. SØRHAUG, T. LANGSRUD & P. E. GRANUM (2001):
Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources
Int. J. Food Microbiol. 69, 237-246

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

BEATTIE, S. H. & A. G. WILLIAMS (2002):
Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* in vitro in controlled fermentations and in situ in food products and a model food system
Food Microbiol. 19, 329-340

BEECHER, D. J. & J. D. MACMILLAN (1990):
A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 59, 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 a):
Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 62, 980-986

BEECHER, D. J. & A. C. L. WONG (1994 b):
Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits
Appl. Environ. Microbiol. 60, 4614-4616

BEECHER, D. J., J. L. SCHOENI & A. C. L. WONG (1995):
Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 63, 4423-4428

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

BORGE, G. I. A., M. SKEIE, T. SØRHAUG, T. LANGSRUD & P. E. GRANUM (2001):
Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources
Int. J. Food. Microbiol. 69, 237–246

BROWN, R. W. & R. K. SCHERER (1957):
A report on two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*
Cornell Vet. 47, 226-240

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

CHRISTIANSSON A., A. S. NAIDU, I. NILSSON, T. WADSTROM & H. E. PETTERSSON (1989):
Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures
Appl. Environ. Microbiol. 55, 2595-2600

CLAUS, D. & R. C. W. BERKELEY (1986):
Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174
In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1105-1139
Baltimore: Williams & Wilkins

CLAVEL, T., F. CARLIN, D. LAIRON, C. NGUYEN-THE & P. SCHMITT (2004):
Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach
J. Appl. Microbiol. 97, 214-219

DIERICK, K., E.V. 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. Microb. 43, 4277-4279

DIETRICH, R., K. MAUERSBERGER & E. MÄRTLBAUER (1997):
Zur Anwendbarkeit des MTT-Zytotoxizitätstests zum Nachweis von *B. cereus* Enterotoxin
Arch. für Lebensmittelhyg. 48,73-96

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

DRESSMAN, J. B., R. R. BERARDI, L. C. DERMENTZOGLOU, T. L. RUSSELL, S. P. SCHMALTZ, J. L. BARNETT & K. M. JARVENPAA (1990):
Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women
Pham. Res. 7(7), 756-761

DROBNIEWSKI, F. A. (1993):
Bacillus cereus and related species
Clin. Microbiol. Rev. 6, 324-338

DUPORT, C., S. THOMASSIN, G. BOUREL & P. SCHMITT (2004):
Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73
Arch. Microbiol. 182, 90-95

DUPORT, C.; A. ZIGHA, E. ROSENFELD & P. SCHMITT (2006):
Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System
J. Bacteriol. 188, 6640-6651

EHLING-SCHULZ, M., B. SVENSSON, M. H. GUINEBRETIÈRE, T. LINDBÄCK, M. ANDERSSON, A. SCHULZ, M. FRICKER, A. CHRISTIANSSON, P. E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER, C. NGUYEN-THE, M. SALKINOJA-SALONEN & S. SCHERER (2005):
Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains
Microbiology 151, 183-197

EVANS, D. J., D. G. EVANS & S. L. GORBACH (1973):
Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man
Infect. Immunity 8, 725-730

FELLA, C. (1999):
Nachweis von *Bacillus cereus* Enterotoxinen mittels monoklonaler Antikörper
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

GALLATI, H. & I. PRACHT (1985):
Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substanzen H_2O_2 und 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 453-460

GARCIA-ARRIBAS, M. L. & J. M. KRAMER (1990):
The effect of glucose, starch and pH on growth, enterotoxin and hemolysin production by strains of *Bacillus cereus* associated with food poisoning and non-gastrointestinal infection
Int. J. Food Microbiol. 11, 21-34

GLATZ, B. A. & J. M. GOEPFERT (1973):
Extracellular factor synthesized by *Bacillus cereus* which evokes a dermal reaction in guinea pigs
Infect. Immun. 8, 25-29

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

GLATZ, B. A. & J. M. GOEPFERT (1976):
Defined Conditions for Synthesis of *Bacillus cereus* Enterotoxin by Fermenter-Grown Cultures
Appl. Envir. Microbiol. 32 (3), 400-404

GLATZ, B. A. & J. M. GOEPFERT (1977):
Production of *Bacillus cereus* Enterotoxin in Defined Media in Fermenter-Grown Cultures
J. Food Prot. 40 (7), 472-474

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., S. BRYNESTAD, K. O'SULLIVAN & H. NISSEN (1993):
Enterotoxin from *Bacillus cereus*: Production and biochemical characterization
IDF Bull. 278, 38-41

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 *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 2nd Ed.*, pp. 373-381
ASM Press, Washington, D.C.

GUINEBRETIÈRE, 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

HANSEN, B. M. & N. B. HENDRIKSEN (2001):
Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis
Appl. Environ. Microbiol. 67, 185-189

HAUGE, S. (1955):
Food poisoning caused by aerobic spore-forming Bacilli
J. Appl. Bacteriol. 18, 591-595

HEINRICHS, 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. Bacteriol. 175, 6760-6766

HOA, N. T., L. BACCIGALUPI, A. HUXHAM, A. SMERTENKO, P. H. VAN, S. AMMENDOLA, E. RICCA & S. M. CUTTING (2000):
Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders
Appl. Environ. Microbiol. 66, 5241-5247

HOLBROOK, R. & J. M. ANDERSON (1980):
An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods
Can. J. Microbiol. 26 (7), 753-759

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

ISO 21871:2006, Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zur Bestimmung niedriger Zahlen von präsumtivem *Bacillus cereus* – Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN) und Nachweisverfahren

KAYSER, F. H., K. A. BIENZ, J. ECKERT & R. M. ZINKERNAGEL (2001):
Wachstum und Kultur der Bakterien
In *Medizinische Mikrobiologie 10. Auflage*, pp. 173-175
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

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

LAURITANO E. C., M. GABRIELLI, A. LUPASCU, A. SANTOLIQUIDO, G. NUCERA, E. SCARPELLINI, F. VINCENTI, G. CAMMAROTA, R. FLORE, P. POLA, G. GASBARRINI & A. GASBARRINI (2005):
Rifaximin dose-finding study for the treatment of small intestinal bacterial overgrowth
Aliment. Pharmacol. Ther. 22, 31-35

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

LINDBÄCK, T., A. FAGERLUND, M.S. RODLAND & P.E. GRANUM (2004):
Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin
Microbiology 150, 3959-3967

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. SCHULTE, A. C. SCOGING, W. BAER & S. KRAEHENBUEHL (1997):
Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*
N. Engl. J. Med. 336, 1143-1148

MENKEL, F. (1992):
Wachstumskinetik
In *Einführung in die Technik von Bioreaktoren,* pp. 18-40, 58, 92
München Wien, R. Oldenbourg Verlag

MORAVEK, M., R. DIETRICH, C. BUERK, V. BROUSSOLLE, M. H. GUINEBRETIÈRE, P.E. GRANUM, C. NGUYEN-THE & E. MÄRTLBAUER (2006):
Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses
FEMS Microbiol. Lett. 257, 293-298

MORIARTY-CRAIGE, S. E. & D. P. JONES (2004):
Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism
Annu. Rev. Nutr. 24, 481-509

MOSSEL, D. A. A., M. J. KOOPMAN & E. JONGERIUS (1967):
Enumeration of *Bacillus cereus* in foods
Appl. Microbiol. 15, 650-653

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

NIKODÉMUSZ, I. & G. GONDA (1966):
Die Wirkung langfristiger Verabreichung von *B. cereus* verunreinigten Lebensmitteln bei Katzen
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 199, 64-67

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

PRÜSS, B. M., 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

Public Health Laboratory Service-PHLS (1972):
Food poisoning associated with *Bacillus cereus*
Br. Med. J. 1, 189

Public Health Laboratory Service-PHLS (1973):
Bacillus cereus food poisoning
Br. Med. J. 3, 647

RAMARAO, N. & D. LERECLUS (2006):
Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively
Micr. Inf. 8, 1483-1491

ROTARD, W., W. CHRISTMANN, W. KNOTH & W. MAILAHN (1995):
Bestimmung der resorptionsverfügbaren PCDD/PCDF aus Kieselrot
Zeitschr. Umweltchem. Ökotox. 7, 3-9

RUSSELL, T. L., R. R. BERARDI, J. L. BARNETT, L. C. DERMENTZOGLOU, K. M. JARVENPAA, S. P. SCHMALTZ, & J. P. DRESSMAN (1993):
Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women
Pharm. Res. 10 (2), 187-196

RYAN, P. A., J. D. MACMILLAN & B. ZILINSKAS (1997):
Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L_1 and L_2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*
J. Bacteriol. 179, 2551-2556

SEIDEL, K. E., C. PFISTERER, S. HÖRMANSDORFER & J. BAUER (1996):
Zum Nachweis toxinogener *Bacillus cereus* - Stämme
J. Vet. Med. 43, 421-428

SHINAGAWA, K., S. UENO, N. MATSUSAKA & S. SUGII (1991):
In vitro stability in biological activity and antigenicity of the vascular permeability factor produced by *Bacillus cereus*
J. Vet. Med. Sci. 53, 317-319

SMITH, N.R., R. E. GORDON & F. E. CLARK (1946):
Aerobic mesophilic sporeforming bacteria
United States Department of Agriculture. Agric. Monogr. 16

SPIRA, W. M. & J. M. GOEPFERT (1972):
Bacillus cereus induced fluid accumulation in rabbit ileal loops
Appl. Microbiol. 24, 341-438

SPIRA, W. M. & J. M. GOEPFERT (1975):
Biological charakteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*
Can. J. Microbiol. 21, 1236-1246

STRICH, S. (1999):
Untersuchungen zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von *Bacillus cereus*-Exoproteinen
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

SUTHERLAND, A. D. & A. M. LIMOND (1993):
Influence of pH and sugars on growth and production of diarrhoeagenic toxin by *Bacillus cereus*
J. Dairy Res.60, 575-580

THOMPSON, N. E., M. J. KETTERHAGEN, M. S. BERGDOLL & E. J. SCHANTZ (1984):
Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*
Infect. Immun. 43, 887-894

TERPLAN, G. (1957):
Saprophyten als Mastitiserreger
Arch. Lebensmittelhyg. 8, 37-38

TURNBULL, P. C. B., J. M. KRAMER, K. JORGENSEN, R. J. GILBERT & J. MELLING (1979):
Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*
Am. J. Clin. Nutr. 32, 219-228

WEGSCHEIDER, M. (2004):
Untersuchungen zu *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexen auf zellulärer Ebene
Inaugural-Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

WIJNANDS, L. M., J. B. DUFRENNE, M. H. ZWIETERING & F. M. VAN LEUSDEN (2006):
Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains
Int. J. Food Microbiol. 112, 120-128

ZIGHA, A., E. ROSENFELD, P. SCHMITT & C. DUPORT (2006):
Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression
Arch. Microbiol. 185, 222-233

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die hervorragende stets freundliche Unterstützung.

Herrn Dr. R. Dietrich und Herrn Dr. M. Moravek danke ich herzlich für die herausragende Betreuung, die zahlreichen Anregungen sowie die sorgfältige Durchsicht der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau J. März, Frau D. Herrmann, Frau B. Minich und Frau C. Ehlich für die jederzeit gewährte Hilfe und Unterstützung in allen technischen Fragen bedanken.

Des Weiteren danke ich allen ehemaligen und aktuellen Doktoranden für das angenehme Arbeitsklima und ihre Freundschaft, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern und Sebastian für ihre Motivationen zum Durchhalten und Vollenden der Arbeit sowie ihre unerschöpfliche Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Name:	Nora Stefanie KRAUSE
Geburtsdatum:	09.10.1978
Geburtsort:	Frankfurt a. M.
Eltern:	Dr. Olaf KRAUSE Jutta KRAUSE, geb. SCHÖNBACH
Schulbildung:	1984-1988 Lahntalschule Limburg, Grund-/Haupt- und Realschule 1988-1997 Marienschule Limburg 1997 Abitur
Studium:	1997-2004 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Staatsexamen:	22. Januar 2004
Approbation:	04. März 2004
Promotionsstudium:	seit März 2004 am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München