

Arch Lebensmittelhyg 62,
205–211 (2011)
DOI 10.2376/0003-925X-62-205

© M. & H. Schaper GmbH & Co.
ISSN 0003-925X

Korrespondenzadresse:
biserka.becker@mri.bund.de

Zusammenfassung

Summary

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel,
Haid-und-Neu-Str. 9, D-76131 Karlsruhe

Vorkommen von Bazillen in pasteurisierten verpackten Lebensmitteln und Bestimmung der Hitzeresistenz vegetativer Zellen und Sporen ausgewählter *Bacillus*-Isolate

Presence of bacilli in pasteurized packaged foods and determination of heat resistance of vegetative cells and spores of selected Bacillus isolates

B. Becker, U. Schillinger, B. Böhringer, T. Untucht, N. Izykowski, C. M. A. P. Franz

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die mikrobiologische Qualität von acht verschiedenen verpackten Lebensmitteln vor und nach der Pasteurisierung zu ermitteln. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das Vorkommen von Bazillen gelegt. Die gewonnenen Isolate wurden biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert und identifiziert. Aus einem Produkt wurde nach der Pasteurisierung *Bacillus cereus* isoliert, aus vier anderen Produkten die Spezies *B. pumilus*, *B. licheniformis* und *Paenibacillus amylolyticus*. Hitzeinaktivierungstests zweier *B. pumilus*- und zweier *B. cereus*-Isolate wurden mit vegetativen Zellen bei 50 °C, 60 °C und 65 °C durchgeführt. Dabei wurden für *B. cereus* bei 50 °C dezimale Reduktionszeiten von 3,7 min für Stamm 2N5S1A1 und 6,67 min für Stamm 2N5MY1A1 bestimmt. Beide *B. pumilus*-Isolate zeigten bei dieser Temperatur eine höhere Hitzeresistenz ($D_{50\text{ °C}} > 48$ min). Bei 60 °C und 65 °C wurden für alle *Bacillus*-Stämme D-Werte $\leq 0,23$ min ermittelt. Die thermische Inaktivierung der Sporen von zwei *B. pumilus*-Stämmen wurde bei 90 °C und 95 °C mit Hilfe von zwei Methoden (Miniautoklav und doppelwandiges Glasgefäß) untersucht. Es ergaben sich für die Sporen beider *B. pumilus*-Isolate D-Werte zwischen 4,14 und 5,04 min bei 90 °C und Werte zwischen 2,01 und 2,37 min bei 95 °C.

Schlüsselwörter: *B. cereus*, *B. pumilus*, Hitzeresistenz, Pasteurisierung, dezimale Reduktionszeiten

The aim of the investigation was to determine the microbiological quality of eight different packaged foods before and after pasteurization. Special attention was paid to the presence of bacilli. The recovered isolates were biochemically and genetically characterized and identified. *Bacillus cereus* was isolated from one product, while, *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *Paenibacillus amylolyticus* were isolated from four other products after pasteurization. Heat inactivation of two *B. pumilus* and two *B. cereus* isolates was carried out at 50 °C, 60 °C and 65 °C using vegetative cells. For *B. cereus* isolates, decimal reduction times at 50 °C were 3.7 for strain 2N5S1A1 and 6.67 min for strain 2N5MY1A1. Both *B. pumilus* isolates showed a higher heat resistance at this temperature ($D_{50\text{ °C}} > 48$ min). For all *Bacillus* strains, decimal reduction times at 60 °C and 65 °C were ≤ 0.23 min. Two different methods (a mini autoclave and a heated glass vessel with a double wall) were used for the thermal inactivation of spores of two *B. pumilus* strains at 90 °C and 95 °C. The D-values of spores from both *B. pumilus* isolates were between 4.14 and 5.04 min at 90 °C and between 2.01 and 2.37 min at 95 °C.

Keywords: *B. cereus*, *B. pumilus*, heat resistance, pasteurization, decimal reduction times

Einleitung

Lebensmittel werden häufig durch Erhitzen haltbar und distributionsfähig gemacht. Die Erhitzung von abgepackten Lebensmitteln in Metalldosen, Gläsern, Kunststoffschalen und -bechern oder Folienbeuteln erfolgt meist in Wasserbädern und in Dampf- oder wasserbeheizten Autoklaven. Durch Erhitzungstemperaturen von über 70 °C werden vegetative Bakterienzellen abgetötet, Sporen dagegen können überleben. Deshalb muss bei der Hitze-resistenz von sporenbildenden Mikroorganismen wie z. B. den Bazillen zwischen vegetativen Zellen und Sporen unterschieden werden. Sporen sind viel resistenter gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen wie hohe Temperaturen, pH-Wert, a_w -Wert und Druck.

Die Hitzeresistenz von Sporen ist in der Lebensmittelindustrie von größerer Bedeutung als die der vegetativen Zellen, da es Mikroorganismen gibt, deren Sporen sogar Sterilisationsprozesse und die UHT-Milchbehandlung überleben (Hammer et al., 2000, Montanari et al., 2004). Bakterien-sporen der Gattung *Bacillus* stellen bei der Entkeimung von Lebensmitteln die resistertesten Keime dar. Dies trifft unter anderem für *B. licheniformis* zu (Beard et al., 1999). Überleben Sporen Temperaturen von 100 °C bis 130 °C, besteht die Gefahr, dass diese bei günstigeren Umweltbedingungen (Temperaturoptimum, ausreichendes Nährstoffangebot) anfangen auszukeimen und sich zu vermehren. Abhängig von der Anzahl der Sporen bzw. der vegetativen Zellen im Lebensmittel, kann es zum Verderb der Nahrung oder im schlimmsten Fall zu Lebensmittelintoxikationen kommen (Fricker et al., 2007, McIntyre et al., 2008, Kamba Wambo et al., 2011). Durch die Bildung verschiedener Enzyme, wie Proteasen, Pectinasen, Lipasen und Amylasen tragen Bazillen zum Verderb von Lebensmitteln bei, zum Beispiel von Reis und Pudding, die infolge des Stärkeabbaus durch Amylasen verflüssigt werden (Baumgart, 2006). Zudem gibt es *Bacillus*-Arten, z. B. *Bacillus coagulans*, die zum „flat sour“ Verderb, das heißt Säuerung durch Gasbildung, führen, insbesondere bei Gemüseprodukten, Ketchup, Saucen auf Ketchupgrundlage und Fruchtkonserven (Tien Meng and Schaffner, 1997, Baumgart, 2004).

Am besten bekannt sind Erkrankungen und Vergiftungen durch die Art *B. cereus* (Anonymus, 2005). Bei Keimzahlen von über 10⁶ KbE/g Lebensmittel können *B. cereus*-Stämme mehrere für Lebensmittelvergiftungen verantwortliche Toxine bilden. Es handelt sich um hitze- und säureempfindliche Diarrhöe-Toxine [z. B. Hämolysin BL (HBL) und das nicht-hemolytische Enterotoxin (Nhe)], welche 8–16 h nach Aufnahme wässrige Durchfälle verursachen, die nach 12–24 h wieder abklingen (Rahmati and Labbe, 2008), sowie um das gegenüber Hitze und Säure stabile emetische Toxin (Cereulid), welches 0,5–6 h nach Aufnahme Übelkeit und Erbrechen, seltener Bauchkrämpfe und Durchfälle verursacht (Rau et al., 2009). Aber auch andere *Bacillus*-Arten, z. B. *B. subtilis*, *B. licheniformis* und *B. pumilus* können zu Lebensmittelvergiftungen führen, weil manche Stämme auch hitzestabile Toxine bilden (Granum and Baird-Parker, 2000; Mikkola et al., 2000; Suominen et al., 2001; Mikkola et al., 2004). So wurden z. B. Lichenysin-bildende Stämme von *B. licheniformis* aus Rohmilch, industriell hergestellter Babynahrung und Gemüse isoliert (Salkinoja-Salonen et al., 1999). Die Sporen von diesen Spezies sind häufig resistent gegenüber Wasserstoffperoxid und können viele Reinigungs- und Herstellungsprozesse überleben.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war die Isolierung von *Bacillus*-Stämmen, die eine gewisse Resistenz gegenüber den bei den Lebensmitteln angewandten Pasteurisationstemperaturen wie z. B. den Bereich von 90 °C bis 95 °C aufweisen. Diese thermotoleranten Stämme sollten in sogenannten „Challenge-Tests“ eingesetzt werden, um deren Inaktivierung durch herkömmliche Pasteurisierung und ein neu entwickeltes Hochfrequenz-Erheizungs-Verfahren vergleichen zu können.

Von den 8 identifizierten *Bacillus*-Isolaten wurden die beiden *B. cereus*- und zwei aus verschiedenen Produkten isolierte *Bacillus pumilus*-Stämme zur genaueren Charakterisierung ihrer Hitzeresistenz ausgewählt. Es wurde das Überleben der vegetativen Zellen bei Temperaturen von 50 °C, 60 °C und 65 °C getestet. Für die Bestimmung der thermischen Resistenz der Sporen bei 90 °C und 95 °C wurden die beiden *B. pumilus*-Stämme eingesetzt, da bei den „Challenge-Tests“ in der Technikumshalle nur der Einsatz von nicht pathogenen und nicht toxinbildenden Stämmen möglich war.

Material und Methoden

Mikrobiologische Untersuchung von pasteurisierten Produkten

Innerhalb eines vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie finanzierten Projektes wurden insgesamt 8 verschiedene, in Folien oder Glas verpackte Produkte (Tofu natur, Krautschupfnudeln, Brühwurst, Bratwurst fein, Grüne Bandnudeln, Steinpilz-Tortelli, Gewürzgurken, Sauerkirschen) mikrobiologisch untersucht. Es wurden Proben von 5 verschiedenen Chargen des jeweiligen Lebensmittels vor und nach Pasteurisierung auf die Gesamtkeimzahl und auf das Vorkommen von Bazillen untersucht. Die mikrobiologischen Analysen erfolgten in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (Anonymus, 2009).

Charakterisierung ausgewählter *Bacillus*-Isolate

Die *Bacillus*-Kolonien wurden von den Standard-I-Merck, Darmstadt) und Mannitol-Eigelb-Polymyxin (MYP)-Agarplatten (Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim) entnommen, danach mikroskopiert und auf Gramverhalten und Oxidase-, Katalase- und Lecithinase-Aktivität untersucht, sowie biochemisch mittels der Testsysteme Biolog GP2 Micro Plate (Biolog, Inc.; Hayward, USA) und API 50 CHB (bioMérieux, Nürtingen) charakterisiert. Eine Reihe von zusätzlichen Testverfahren, wie Duopath Cereus-Enterotoxin (Merck, Darmstadt) und mehrere PCR-Techniken wurden zur weiteren Charakterisierung angewandt (siehe unten). Zum Vergleich wurden zusätzlich zu den 8 *Bacillus*-Isolaten (1N7S1B1, 1N6S1B2, 2N5MY1A1, 2N5S1A1, 2X1PE2B1, 4HaS1B2, 6N1S1B1, 8N7S1A1) aus Lebensmitteln, authentische *B. cereus*-Stämme (DSM 2301, DSM 4312, DSM 4384, ATCC 10987), sowie weitere Referenzstämme, wie z. B. *B. coagulans* DSM 1, *B. subtilis* ssp. *subtilis* DSM 10 und *B. licheniformis* DSM 13 eingesetzt.

Bei den molekularen Verfahren handelte es sich um eine PCR mit einem für die *B. cereus*-Gruppe spezifischen Marker (SG-749 Fragment) (Daffonchio et al., 1999), eine weitere PCR zum Nachweis von Phospholipase C und Sphingomyelinase codierende Sequenzen (Schraft and Griffiths, 1995) und eine Multiplex-PCR zum Nachweis der für die hämolytische und nicht-hämolytische Toxin, Cyto-

toxin K und Cereulid verantwortlichen Gene (Ehling-Schulz et al., 2006). Die DNA-Isolierung erfolgte nach der von Pitcher et al. (1989) beschriebenen und von Björkroth und Korkeala (1996) für Gram-positive Bakterien modifizierten Methode. Es wurden die in den jeweiligen Originalarbeiten angegebenen Primer und PCR-Bedingungen verwendet.

Zur eindeutigen Identifizierung der vier *Bacillus*-Isolate 1N6S1B2, 6N1S1B1, 4HaS1B2 und 1N7S1B1 wurde zusätzlich die 16S rDNA dieser Stämme mittels etablierten Methoden amplifiziert (Kostinek et al., 2005) und von GATC Biotech (Konstanz) in beiden Richtungen sequenziert. Zum Nachweis der Lichenysin-Synthetase-Gene wurde die von Nieminen et al. (2007) vorgeschlagenen Primer-Paare verwendet.

Herstellung der Sporensuspension

Für die Inaktivierungsversuche mit *Bacillus*-Sporen wurde eine Sporensuspension vorbereitet. Dafür wurde ein modifiziertes Standard-I-Nährmedium verwendet, dem 44 mg/l Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) und 125 mg/l Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) zugesetzt wurden. Aus den Bakterien-Subkulturen, die nicht älter als 24 h waren, wurden 100 µl entnommen und auf fünf Platten des Sporulierungsmediums aufgetragen und fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Die Biomasse wurde mit 2 ml sterilem Wasser abgeschwemmt und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 15 min bei 75 °C erhitzt, um die vegetativen Zellen abzutöten. Die fertige Sporensuspension wurde bei 4 °C gelagert.

Thermische Inaktivierung von *Bacillus*-Isolaten

Für die thermische Inaktivierung wurden zwei Methoden entwickelt und angewendet. Zur Bestimmung der Hitze-resistenz der vegetativen Zellen (*Bacillus*-Isolate 2N5MY1A1, 4HaS1B2, 2N5S1A1 und 6N1S1B1) wurden 50 °C, 60 °C und 65 °C als Inaktivierungstemperaturen ausgewählt. Bei der Inaktivierung von Sporen hingegen wurden die Temperaturen 90 °C und 95 °C verwendet. Alle Versuche wurden zweimal durchgeführt.

Methode mit doppelwandiger Zelle

Das doppelwandige Glasgefäß (Abb. 1, links) wurde mit 100 ml steriler St-I-Bouillon befüllt und mit Hilfe eines zirkulierenden Systems mit dem Wasserbad auf die entsprechenden Inaktivierungstemperaturen erhitzt. Das erhitzte Wasser lief durch die äußere Wand der Zelle, ohne eine Verbindung mit dem Medium zu haben. Zur Temperaturmessung wurde ein Temperaturfühler verwendet, der durch die Silikondichtung im Schraubverschluss in das Medium geführt wurde. Eine gleichmäßige Verteilung des Mediums in der Zelle wurde durch einen Magnetrührer erreicht. Sobald das Medium die vorgegebene Temperatur erreicht hatte, wurden 100 µl aus der Subkultur oder Sporensuspension eines Bakterienstammes in die Zelle injiziert. Nach den entsprechenden Zeiten wurde jeweils 1 ml Suspension direkt aus der Zelle mit Hilfe einer sterilen Spritze entnommen

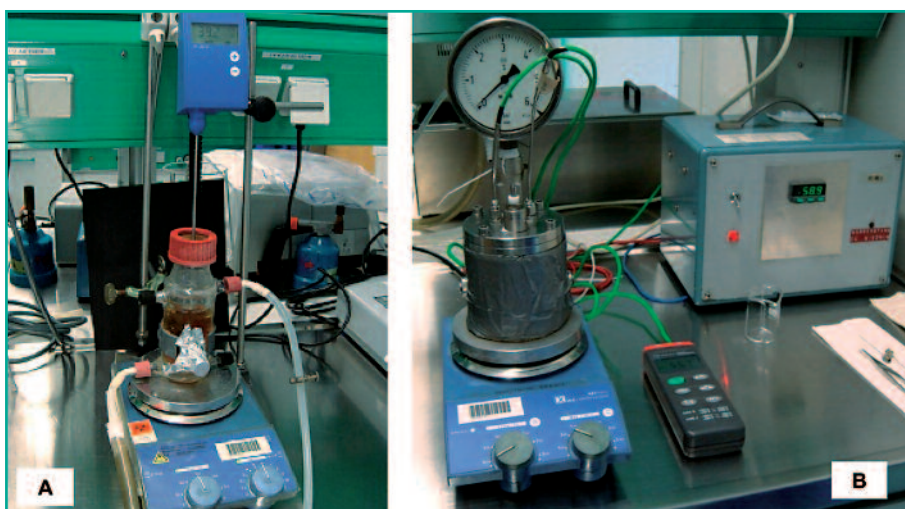


ABBILDUNG 1: Geräte zur thermischen Inaktivierung: doppelwandige Zelle (A) und Miniautoklav (B).

und in die auf Eis gekühlten leeren, sterilen Eppendorf-Gefäße pipettiert. Von den entnommenen Bakterien/Sporensuspensionen wurde die Keimzahl im Doppelansatz auf St-I-Agar mit dem Spatelverfahren bestimmt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C für 24–48 h.

Methode mit Miniautoklav

Als eine weitere Methode für die thermische Inaktivierung der ausgewählten Stämme wurde ein Miniautoklav verwendet, der am Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung in Freising für die Hitzebehandlung von Mikroorganismen entwickelt wurde. Der Miniautoklav (Abb. 1, rechts) ist ein Edelstahlbehälter mit einem Fassungsvermögen von 300 ml und einem Deckel, der mit einer Flanschverbindung von vier Schrauben verschlossen wird. Zu Beginn des Versuchs wurde der Miniautoklav mit 200 ml St-I-Bouillon befüllt und verschlossen. Nach der Sterilisierung des Mediums bei 121 °C für 20 min wurde die gewünschte Inaktivierungstemperatur mit Hilfe des Temperaturreglers eingestellt. Nach dem Erreichen der Versuchstemperatur wurden 200 µl der Subkultur oder Sporensuspension des Bakterienstammes mittels einer sterilen Spritze durch den Einspritzstutzen in das Autoklaveninnere injiziert. Nach den entsprechenden Zeiten wurde eine Probe von 1,5–2 ml aus dem Miniautoklav über einen Entnahmestutzen herausgenommen und in die auf Eis gekühlten Eppendorf-Gefäße gegeben. Die Zahl der überlebenden Keime/Sporen wurde im Doppelansatz mit dem Spatelverfahren auf St-I-Agar bestimmt.

Die Abtötung von Mikroorganismen kann durch den D-Wert charakterisiert werden. Der D-Wert ist die Zeit in Minuten, die benötigt wird, um eine Bakterienpopulation bei einer definierten Temperatur um 90 % (eine Zehnerpotenz) abzutöten (Pardey et al., 2005). Die D-Werte (dezimale Reduktionszeiten) wurden mittels der Gleichung: eins geteilt durch die Steigung der linearen Regressionsgerade von der Abtötungs-Zeit-Kurve (Excel Programm) und direkt aus den Anfangs- und Endkeimzahlen berechnet:

$$D = \frac{t}{(\log N_0 - \log N_t)} \quad [\text{Schuchmann und Schuchmann, 2005}]$$

t = Hitzebehandlungszeit in Minuten;
 N_0 = Anfangskeimzahl; N_t = Endkeimgehalt

Ergebnisse und Diskussion

Mikrobiologische Untersuchung von pasteurisierten Produkten

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung der Produkte vor und nach Pasteurisierung als Keimzahlen in $\log_{10}$ KbE/g dargestellt. Bei den meisten Produkten war die Keimzahl nach der thermischen Behandlung unterhalb der Nachweisgrenze von 100 KbE/g (Tab. 1). Die Krautschupfnudeln wurden im Herstellungsprozess nur kurz angebraten und nicht pasteurisiert; trotzdem wurden niedrige Gesamtkeimzahlen von $3,2 \times 10^2$ KbE/g nachgewiesen. Somit wurden bei allen Produkten die nationalen Kriterien hinsichtlich Hygiene und mikrobiologischer Sicherheit von Lebensmitteln, wie z. B. DGHM Richt- und Warnwerte (Anonymus, 2010) eingehalten. In einzelnen Fällen waren geringe Zahlen von Sporen von Bazillen nachweisbar. Aus den Steinpilz-Tortelli wurde nach der Pasteurisierung der toxinbildende Risikokeim *Bacillus cereus* isoliert (Tab. 1). Aus Gewürzgurken, Bratwurst und grünen Bandnudeln wurden auch andere Bazillen (*B. pumilus*, *B. licheniformis* und *Paenibacillus amylolyticus*) isoliert, die nicht zur *B. cereus*-Gruppe gehören. Zwischen den einzelnen Produkten und Produktchargen gab es große Unterschiede. Bei Tofu, Brühwurst,

Krautschupfnudeln und Sauerkirschen lag die Bazillen-Keimzahl nach der Pasteurisierung unter der Nachweisgrenze. Es wurden aber Bazillen bei den grünen Bandnudeln in 4, bei den Tortelli und Gewürzgurken in 3 und bei Bratwurst in 2 von jeweils 5 Chargen nachgewiesen.

Charakterisierung ausgewählter *Bacillus*-Isolate

Die kommerziellen Identifizierungssysteme API und BIOLOG lieferten nur in wenigen Fällen ein eindeutiges und übereinstimmendes Ergebnis (Tab. 2). Sogar mehrere in die Untersuchung miteinbezogene Referenzstämmen wurden durch die Systeme falsch identifiziert. So wurde z. B. *B. cereus* DSM 4384 durch das API-System mit der höchsten Wahrscheinlichkeit als *B. mycoides* klassifiziert, während das BIOLOG-System *B. coagulans* DSM 1 der Spezies *B. subtilis* zuordnete. Die Stämme 2N5MY1A1 und 2N5S1A1, die eine positive Hämolysereaktion gezeigt hatten, ließen sich zumindest durch das BIOLOG-System der *Bacillus cereus*-Gruppe zuordnen. Da bei den meisten Stämmen auf biochemischer Ebene eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war, wurden zusätzliche molekulare PCR-basierte Charakterisierungstechniken durchgeführt.

Durch die Ergebnisse dieser PCR-Verfahren und des Duopath-Tests wurde die Zugehörigkeit der Stämme 2N5MY1A1 und 2N5S1A1 zu der toxinbildenden Spezies *B. cereus* bestätigt. Es wurde zunächst eine PCR zum Nachweis eines für die *B. cereus*-Gruppe spezifischen Markers (Fragment SG-749) eingesetzt. Als Ergebnis dieser PCR-Methode wurde bei beiden Isolaten 2N5MY1A1 und 2N5S1A1 und erwartungsgemäß bei den Referenzstämmen *B. cereus* DSM 2301, DSM 4312, DSM 4384 sowie ATCC 10987 auf dem Gel jeweils eine Bande von 749 bp beobachtet. Alle übrigen getesteten Isolate und Stämme der Spezies *B. licheniformis*, *B. alvei* und *B. subtilis* reagierten negativ.

Eine weitere Bestätigung erbrachte eine PCR, die auf dem Nachweis der DNA-Sequenz für Cereolysin AB basiert, einer Determinante, die die für Phospholipase C (*cerA*) und Sphingomyelinase (*cerB*) kodierenden Gene umfasst. Bei den *B. cereus*-Stämmen DSM 4384, DSM 2301 und DSM 4312 wie auch den Isolaten 2N5MY1A1 und 2N5S1A1 war das erwartete PCR-Produkt nachzuweisen.

Die Multiplex PCR, die den Nachweis der für die Bildung der vier verschiedenen bekannten Toxine verantwortlichen Gene ermöglicht, zeigte, dass die beiden Isolate 2N5MY1A1 und 2N5S1A1 das für

TABELLE 1: Mikrobiologischer Status von acht pasteurisierten Produkten vor und nach den konventionellen Pasteurisierungsverfahren: Erfassung von Gesamtkeimzahl (in $\log_{10}$ KbE/g) und qualitativer Nachweis von Bazillen.

	Gesamtkeimzahl ($\log_{10}$ KbE/g)		Nachweis von Bazillen#
	vor	nach	
Grüne Bandnudeln	6,32 ± 0,49	3,57 ± 0,32	+
Steinpilz-Tortelli	4,60 ± 1,34	2,26 ± 0,21	+ (<i>B. cereus</i>)
Tofu natur	5,4 ± 0,56	u. N.	-
Brühwurst	5,32 ± 0,55	u. N.	-
Krautschupfnudeln	n. b.	2,50 ± 0,30*	-
Gewürzgurken	3,14 ± 0,34	u. N.	+
Sauerkirschen	4,08 ± 0,67	u. N.	-
Bratwurst fein	4,04 ± 0,98	u. N.	+

vor/nach: Keimzahl vor bzw. nach Pasteurisierungsverfahren; ± x: Standardabweichung von gewogenem arithmetisches Mittel; u. N.: unter der Nachweisgrenze von 100 KbE/g; n. b.: nicht bestimmt; *: nur angebraten, keine Pasteurisation; #: Nachweis durch biochemische und molekulare Methoden (s. Abschnitt Material und Methoden)

TABELLE 2: Charakterisierung und Identifizierung von *Bacillus*-Isolaten.

Stamm Nr.	Herkunft	API	Biolog	PCR auf Toxingene	16S rDNA-Sequenzierung	Toxin-Test Duopath	Hämolyse/Lecithinase
1N7S1B1	Grüne Bandnudeln	<i>B. alvei</i>	<i>B. subtilis</i>	-	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	-	-/-
1N6S1B2	Grüne Bandnudeln	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	-	<i>B. pumilus</i>	-	-/-
2N5MY1A1	Steinpilz-Tortelli	<i>B. mycoides</i>	<i>B. cereus</i> / <i>thuringiensis</i>	Nhe +	-	Nhe +	+ / +
2N5S1A1	Steinpilz-Tortelli	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> / <i>thuringiensis</i>	Nhe +	-	Nhe +	+ / +
2X1PE2B1	Steinpilz-Tortelli	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-/-
4HaS1B2	Brühwurst	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-	<i>B. pumilus</i>	-	-/-
6N1S1B1	Gewürzgurken	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	-	<i>B. pumilus</i>	-	-/-
8N7S1A1	Bratwürstchen	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-/-

Nhe = nicht hämolytisches Enterotoxin

die Bildung des nicht-hämolytischen Enterotoxins verantwortliche Gen aufweisen (Spuren 2 und 9 in Abb. 2). Das Cereulid-Gen wurde nur bei *B. cereus* DSM 4312 und das Cytotoxin K-Gen bei 2 der authentischen *B. cereus*-Stämme nachgewiesen.

Die PCR Ergebnisse stimmten mit den Resultaten des auf dem direkten Nachweis der Toxine beruhenden Duopath-Testkits gut überein. Das nicht-hämolytische Toxin (Nhe) ließ sich in diesem System bei den beiden Stämmen 2N5MY1A1 und 2N5S1A1 nachweisen (Tab. 2). Außerdem erwiesen sich drei weitere Referenzstämme von *B. cereus* (ATCC 10987, DSM 2301 und DSM 4312) als Nhe-positiv.

Das Vorhandensein der für die Bildung des Toxins Lichenysin verantwortlichen Gene konnte durch die Ergebnisse der entsprechenden PCR bei allen Isolaten ausgeschlossen werden. Nur bei Referenzstamm *B. licheniformis* DSM 13 ließ sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nieminen et al. (2007) ein PCR-Produkt mit der zu erwartenden Größe nachweisen.

Vier *Bacillus*-Isolate, die nicht zur *B. cereus*-Gruppe gehörten und durch die kommerziellen Identifizierungssysteme nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden zusätzlich mit Hilfe der 16S rDNA-Sequenzierung klassifiziert. Aufgrund der Sequenzvergleiche erwiesen sich die Stämme 1N6S1B2, 6N1S1B1 und 4HaS1B2 als *B. pumilus* und Stamm 1N7S1B1 als *Paenibacillus amylolyticus*. Der Typstamm von *B. pumilus* (NCDO 1766) zeigte eine Sequenzidentität von 99,85 % mit den Stämmen 1N6S1B2 und 6N1S1B1 und 99,51 %-ige Sequenzidentität mit Stamm 4HaS1B2. Für Stamm 1N7S1B1 wurde eine Sequenzidentität von 99,38 % mit dem Typstamm *Paenibacillus amylolyticus* JCM 9906 ermittelt.

Thermische Inaktivierung von vegetativen Zellen von *Bacillus*-Isolaten

Es wurden bereits einige Untersuchungen zur Hitzeempfindlichkeit von Mikroorganismen, besonders von lebensmittelrelevanten sporenbildenden Bakterien wie z. B. *B. cereus* durchgeführt (Feig and Sersky, 1981, Byrne et al., 2006, Gonzales et al., 2008, Müller und Dederer, 2008). Für die von uns untersuchte Spezies *B. pumilus* existieren jedoch nur wenige Angaben zur Hitzeresistenz (Shehata and Collins, 1972, Ruiz et al., 2002, Couvert et al., 2005). Da die veröffentlichten Werte außerdem stark von der Versuchsmethode abhängig sind und zudem erhebliche Abweichungen zwischen den Stämmen der gleichen Spezies bestehen können, war die Ermittlung von Inaktivierungsparametern der von uns ausgewählten Stämme eine wichtige Projektaufgabe.

Für die Inaktivierungsversuche von vegetativen Zellen von Bazillen wurde die Methode mit dem doppelwandigen Glasgefäß verwendet. Die *Bacillus*-Isolate 2N5MY1A1, 4HaS1B2, 2N5S1A1 und 6N1S1B1 wurden bei den Temperaturen 50 °C, 60 °C und 65 °C thermisch behandelt.

Im ersten Versuch wurden die Keimzahlen der vegetativen Zellen beider *B. pumilus* Stämme durch das Erhitzen

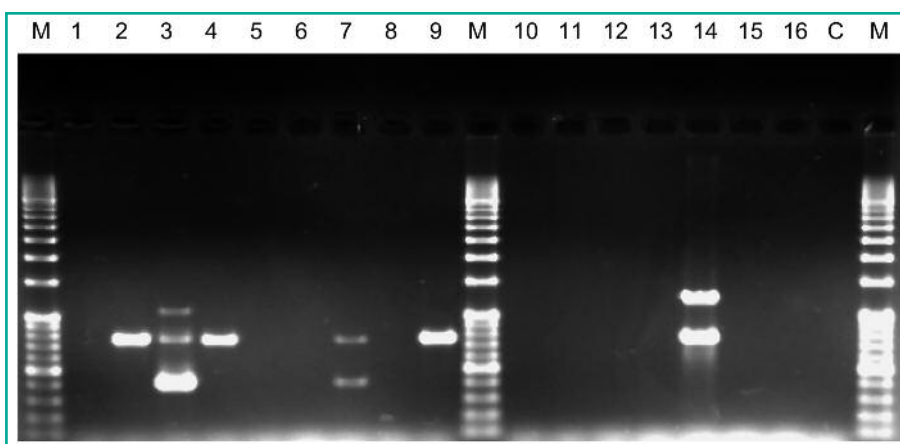


ABBILDUNG 2: Multiplex-PCR zum Nachweis der Toxin-Gene von *B. cereus* (M = Molekulargewichtsmarker (Bio-Rad Laboratories, München), C = Kontrolle ohne Primer, 1 = *B. pumilus* 1N6S1B2, 2 = *B. cereus* 2N5MY1A1, 3 = *B. cereus* DSM 4384, 4 = *B. cereus* DSM 2301, 5 = *B. licheniformis* DSM 13, 6 = *B. licheniformis* 8N7S1A1, 7 = *B. cereus* ATCC 10987, 8 = *Paenibacillus amylolyticus* 1N7S1B1, 9 = *B. cereus* 2N5S1A1, 10 = *B. subtilis* DSM 10, 11 = *B. coagulans* DSM 1, 12 = *B. pumilus* 4HaS1B2, 13 = *B. licheniformis* 2X1PE2B1, 14 = *B. cereus* DSM 4312, 15 = *B. pumilus* 6N1S1B1, 16 = *B. subtilis* DSM 1092).

auf 50 °C von 7×10^6 KbE/ml nach 20 min um nur etwa 50 % reduziert. Das Erhitzen auf 60 °C und 65 °C führte zu einer deutlichen Reduktion um ca. vier Zehnerpotenzen, aber zu keiner vollständigen Abtötung. Die *B. pumilus*-Stämme waren auch noch nach 5 min, mit Keimzahlen von 10^2 bis 10^3 KbE/ml nachweisbar. Diese Keimzahlen waren offenbar das Resultat der Auskeimung von Sporen, die in der Bakteriensuspension verblieben waren und nicht abgetötet wurden. Für den *B. cereus*-Stamm 2N5S1A1 wurde der $D_{50\text{ °C}}$ -Wert von 3,7 min berechnet und für Stamm 2N5MY1A1 ergab sich ein Wert von 6,67 min. Diese dezimalen Reduktionszeiten waren somit viel niedriger als die für die hitzeresistenteren *B. pumilus*-Stämme ermittelten Werte von 48 bzw. 49 min. Bei *B. cereus* wurden die vegetativen Zellen bei 60 °C und 65 °C bereits nach 30 sec vollständig abgetötet.

Um die hohen $D_{50\text{ °C}}$ -Werte der *B. pumilus*-Stämme zu überprüfen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit den vegetativen Zellen dieser Stämme in der doppelwandigen Zelle durchgeführt. Der zweite Versuch bestätigten die Ergebnisse des ersten Versuchs, und es war deutlich, dass sich beide *B. pumilus*-Stämme in ihrem Verhalten während der thermischen Inaktivierung bei 50 °C, 60 °C und 65 °C ähnelten. Das zeigen auch die für beide Stämme fast identischen D-Werte (bei 50 °C: 48,08–49,26 min, bei 60 °C: 0,129–0,133 min und bei 65 °C: 0,06–0,07 min).

Thermische Inaktivierung von *Bacillus*-Sporen

Zur Hitzeinaktivierung von Sporen der *B. pumilus*-Stämme 4HaS1B2 und 6N1S1B1 wurden die oben beschriebenen Inaktivierungsmethoden mit doppelwandiger Zelle und Miniautoklav verglichen. Es wurden Sporenzahlen von $5,4 \times 10^6$ bis $5,3 \times 10^7$ pro ml eingesetzt. Die dezimalen Reduktionszeiten (D-Werte) bei 90 °C und 95 °C wurden aus den Inaktivierungskurven mit Hilfe der Gleichung der Abtötungs-Zeit-Kurve und aus den Anfangs- und Endkeimzahlen berechnet.

Die Sporen der beiden *B. pumilus*-Stämme wurden bei 90 °C mit beiden Methoden nach einer Behandlungszeit von 10 min um zwei Log-Stufen reduziert (Abb. 3). Bei

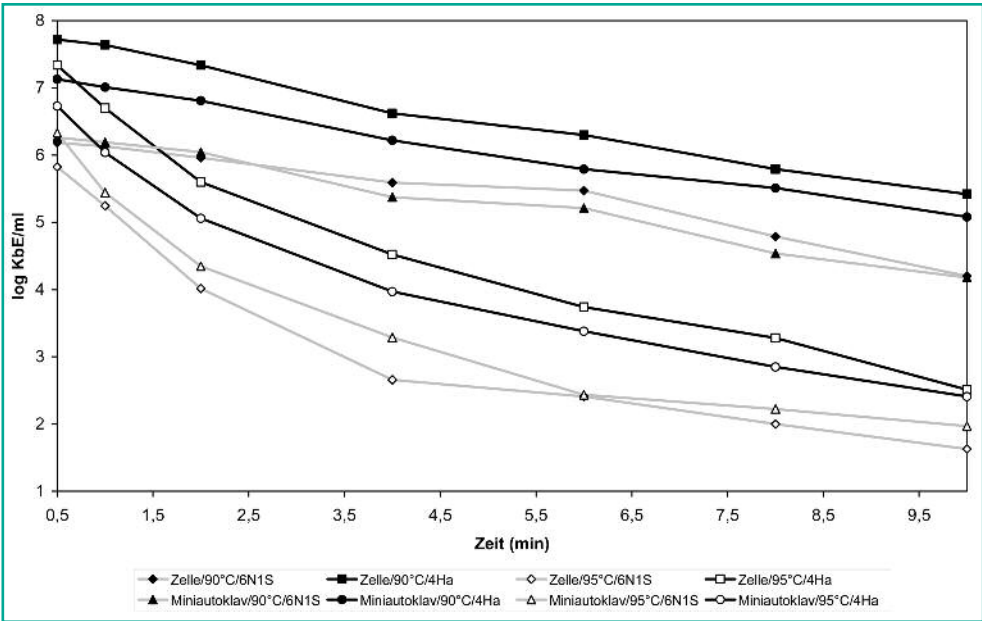


ABBILDUNG 3: *Hitzeinaktivierung der Sporen von B. pumilus 4HaS1B2 und 6N1S1B1 bei 90 °C und 95 °C mit Hilfe von zwei Methoden: in der doppelwandigen Zelle und im Miniautoklav.*

95 °C wurde eine Reduktion um mehr als vier Log-Stufen erreicht. Wie bei den vegetativen Zellen ähnelten sich die beiden *B. pumilus*-Stämme auch in der Inaktivierungskinetik ihrer Sporen (Abb. 3). In Tabelle 3 sind die mit den zwei Inaktivierungsmethoden ermittelten D-Werte der *B. pumilus*-Stämme für die Temperaturen 90 °C und 95 °C gegenübergestellt. Um 90 % der Sporen des Stammes 4HaS1B2 bei einer Temperatur von 90 °C abzutöten, waren, abhängig von der Inaktivierungsmethode, 4,03 bzw. 4,8 min erforderlich. Der Stamm 6N1S1B1 benötigte für die Sporenreduktion um eine Log-Stufe je nach Methode 4,48 bzw. 5,04 min. Durch Erhöhung der Temperatur von 90 °C auf 95 °C wurde etwa eine Halbierung der D-Werte erreicht. Die mit den zwei verschiedenen Inaktivierungsmethoden ermittelten dezimalen Reduktionszeiten stimmten gut überein. Ähnliche D-Werte wurden für *B. pumilus* auch von Shehata und Collins (1972) berichtet.

Nach der thermischen Behandlung zeigten alle acht in dieser Studie untersuchten verpackten Produkte eine zufriedenstellende mikrobiologische Qualität. In den pasteurisierten Produkten konnten lediglich die sporenbildenden Bakterienspezies *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* und *Paenibacillus amylolyticus* detektiert werden, aber nur vereinzelt und in sehr niedrigen Keimzahlen (unter 10 KbE/g).

TABELLE 3: *D-Werte (min) aus den Hitzeinaktivierungsversuchen mit Sporen von B. pumilus 4HaS1B2 und 6N1S1B1 – Vergleich von 2 Methoden.*

<i>B. pumilus</i>	Miniautoklav		Doppelwandige Zelle	
	90 °C	95 °C	90 °C	95 °C
6N1S1B1	4,48 (Gl)	2,27 (Gl)	5,04 (Gl)	2,37 (Gl)
	4,61 (m)	2,19 (m)	4,80 (m)	2,28 (m)
4HaS1B2	4,80 (Gl)	2,33 (Gl)	4,03 (Gl)	2,12 (Gl)
	4,86 (m)	2,21 (m)	4,14 (m)	2,01 (m)

Gl = Berechnung von D-Wert mit der Gleichung: eins geteilt durch die Steigung der linearen Regressionsgerade von der Abtötungs-Zeit-Kurve; m = Berechnung von D-Wert mit den Keimzahlen (AnfangKZ und EndKZ)

Die mit Hilfe der beiden Testsysteme ermittelten Hitzeresistenzen von *B. pumilus* bei 90 °C und 95 °C deuten darauf hin, dass die Sporen dieser Spezies für Challenge-Tests zur Bestimmung der Vergleichbarkeit neuer Pasteurisierungsverfahren mit herkömmlichen, diesen Temperaturbereich nutzenden Verfahren geeignet sein könnten. Aufgrund der relativ hohen D₉₀- und D₉₅-Werte beider *B. pumilus*-Stämme ist erst nach längerer Einwirkung dieser Temperaturen mit einer vollständigen Inaktivierung im Lebensmittel zu rechnen.

Aus den von uns ermittelten D-Werten ist deutlich zu erkennen, dass beide Methoden bei der Verwendung von gleichen Medien vergleichbare Ergebnisse geliefert

haben. Die von uns eingesetzten Temperaturen haben in Abhängigkeit von den gewählten Temperatur/Zeit-Bedingungen nur zur teilweisen Inaktivierung von vegetativen Zellen und Sporen geführt. Demnach wäre bei Produkten, die möglicherweise hitzeresistente *B. pumilus*-Sporen enthalten, im Herstellungsprozess eine Erhitzung auf Temperaturen von über 95 °C anzustreben, um die Gefährdung der Verbraucher durch den Verzehr dieser Produkte zu minimieren.

Förderhinweis

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie unter dem Förderkennzeichen 16INO484 gefördert.

Literatur

Anonymus (2005): Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums für Biologische Gefahren über „*Bacillus cereus* und andere *Bacillus* spp. in Lebensmitteln“. The EFSA Journal 175, 1–48.
Anonymus (2009): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs. 1 LFGB, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Herausgeber), Beuth Verlag GmbH, Berlin, 24. 7. 2009
Anonymus (2010): Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln, http://www.dghm.org/texte/Richt_und_Warnw_final%20August%202010.pdf
Baumgart J (2004): Mikrobiologie von Feinkosterzeugnissen, in: Mikrobiologie der Lebensmittel Fleisch-Fisch-Feinkost, Herausgeber Weber H, Behr's Verlag GmbH & Co.Kg., Hamburg, 501–526.
Baumgart J (2006): Bazillen, in: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, Herausgeber Baumgart J, Becker B, Behr's Verlag GmbH & Co.Kg., Hamburg, III.1

- Beard BM, Sheldon BW and Foegeding PM (1999):** Thermal Resistance of Bacterial Spores in Milk-Based Beverages Supplemented with Nisin. *J. Food Prot.* 62 (5): 484–491.
- Byrne B, Dunne G, and Bolton DJ (2006):** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *J. Food Microbiol.* 23: 803–808.
- Björkroth J and Korkeala H (1996):** Evaluation of *Lactobacillus sake* contamination in vacuum-packaged sliced cooked meat products by ribotyping. *J. Food Prot.* 59: 2854–2858.
- Daffonchio D, Borin S, Frova G, Gallo R, Mori E, Fani R and Sorlini C (1999):** A randomly amplified polymorphic DNA marker specific for the *Bacillus cereus* group is diagnostic for *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1298–1303.
- Ehling-Schulz M, Guinebreteiere MH, Monthan A, Berge O, Fricker M and Svensson B (2006):** Toxin gene profiling of enterotoxigenic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 232–240.
- Feig S and Stersky AK (1981):** Characterization of a heat-resistant strain of *Bacillus coagulans* isolated from cream style canned corn. *J. Food Science* 46: 135–137.
- Fricker M, Messelhäusser U, Busch U, Scherer S, Ehling-Schulz M (2007):** Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl Environ Microbiol.* 73(6):1892–1898.
- Gonzales I, Lopez M, Fernandez A and Bernardo A (2008):** Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed in media with different mineral contents. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 59: 34–38.
- Granum PE and Baird-Parker TC (2000):** *Bacillus* species, in: The microbiological safety and quality of food, ed. by Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, Aspen Publ. Gaithersburg, Maryland, USA, 1029–1039.
- Hammer P, Lembke F, Suhren G and Heeschen W (2000):** Characterisation of heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting the quality of UHT-milk. *Bulletin of the Int. Dairy Federation* 357, 9–16.
- Kamga Wambo GO, Burckhardt F, Frank C, Hiller P, Wichmann-Schauer H, Zuschneid I, Hentschke J, Hitzbleck T, Contzen M, Suckau M, Stark K (2011):** The proof of the pudding is in the eating: an outbreak of emetic syndrome after a kindergarten excursion, Berlin, Germany, December 2007. *Euro Surveill.* 16(15): 19839.
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH and Franz CMAP (2005):** Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of gari, a traditional African food. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 527–540.
- McIntyre L, Bernard K, Beniac D, Isaac-Renton JL, Naseby DC (2008):** Identification of *Bacillus cereus* group species associated with food poisoning outbreaks in British Columbia, Canada. *Appl Environ Microbiol.* 74(23): 7451–7453.
- Mikkola R, Kolari M, Andersson MA, Helin J, Salkinoja-Salonen MS (2000):** Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.* 267: 4068–4074.
- Mikkola R, Andersson MA, Grigoriev P, Teplova VV, Saris NE, Rainey FA, Salkinoja-Salonen MS (2004):** *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture-damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells. *Arch. Microbiol.* 181: 314–323.
- Montanari G, Borsari A, Chiavari C, Ferri G, Zambonelli C, Grazia L (2004):** Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. *J. Appl. Microbiol.* 97(4): 802–809.
- Müller WD und Dederer I (2008):** Sporeinaktivierung in Brühwurst, Fleischwirtschaft 2: 99–102.
- Nieminen T, Rintaluoma N, Andersson M, Taimisto AM, Ali-Vehmas T, Seppälä A, Priha O and Salkinoja-Salonen M (2007):** Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* 124: 329–338.
- Pardey KK, Schuchmann HP und Schubert H (2005):** Modellierung der thermischen Inaktivierung vegetativer Mikroorganismen, *Chemie Ingenieur Technik* 77: 841–852.
- Pitcher DG, Saunders NA and Owen RJ (1989):** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with the guanidinium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 151–156.
- Rahmati T and Labbe R (2008):** Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood. *J. Food Prot.* 71: 1178–1185.
- Rau J, Perz R, Klittich G, Contzen M (2009):** Cereulidbildende präsumtive *Bacillus cereus* aus Lebensmitteln – Differenzierende Untersuchungen mittels kultureller Methoden, LC-MS/MS, PCR und Infrarotspektroskopie unter Berücksichtigung thermotoleranter Vertreter, *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 122(1–2), 25–36.
- Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kämpfer P, Andersson MC, Honkanen-Buzalski T and Scoging AC (1999):** Toxinogenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4637–4645.
- Schraft H and Griffiths MW (1995):** Specific oligonucleotide primers for detection of lecithinase-positive *Bacillus* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 98–102.
- Schuchmann HP and Schuchmann H (2005):** Lebensmittelverfälschungstechnik. Rohstoffe, Prozesse, Produkte. Weinheim. Wiley-VHC Verlag GmbH & Co.KGaA.
- Shehata TE and Collins EB (1972):** Sporulation and heat resistance of psychrophilic strains of *Bacillus*. *J. Dairy Sci.* 55: 1405–1409.
- Suominen I, Andersson MA, Andersson MC, Hallaksela AM, Kämpfer P, Rainey FA and Salkinoja-Salonen M (2001):** Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 267–276.
- Tien Meng NG, Schaffner DW (1997):** Mathematical Models for the Effects of pH, Temperature, and Sodium Chloride on the Growth of *Bacillus stearothermophilus* in Salty Carrots. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1237–1243.

Korrespondenzadresse:

Biserka Becker
 Max Rubner-Institut – Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel, Institut für Sicherheit und Qualität bei Obst und Gemüse
 Haid-und-Neu-Str. 9
 D-76131 Karlsruhe
 Deutschland
 biserka.becker@mri.bund.de