



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Entomophagie: Mikrobiologische Untersuchung
von Mehlwürmern als Lebensmittel**

Bachelorarbeit
im Studiengang Ökotoxikologie

vorgelegt von
Natalja Langolf
Matrikelnummer 2096038

Hamburg
am 20.05.2016

Betreuende Prüferin: Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn (HAW Hamburg)
Zweite Prüferin: Tierärztin Lisa Walter (HAW Hamburg)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Tierärztin Lisa Walter für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchung sowie für die angenehme, konstruktive Betreuung und Zusammenarbeit.

Ganz herzlich danke ich Frau Prof. Dr. med. vet. Katharina Riehn für das Ermöglichen dieses Themas sowie die stets freundliche und jederzeit gewährte Unterstützung.

Ich danke Anton Letzer für das Beisteuern zusätzlicher Anregungen und für seine Geduld bei den zahlreichen konstruktiven Diskussionen.

Innigen Dank möchte ich meiner Familie zukommen lassen, die mich während der gesamten Studienzeit unterstützt und mir das Studium ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Mehlwürmer als Lebensmittel	3
2.1 Zoologie des Mehlwurms	3
2.2 Aspekte der Entomophagie	5
3. Rechtliche Grundlagen	8
4. Untersuchte Mikroorganismen	10
4.1 Gesamtkeimzahl	11
4.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	11
4.3 <i>Salmonella spp.</i>	12
4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
4.5 Hefen und Schimmelpilze.....	13
5. Material und Methoden	15
5.1 Material	15
5.1.1 Probenmaterial.....	15
5.1.2 Nährmedien und Reagenzien	15
5.2 Methoden	16
5.2.1 Probenvorbereitung	17
5.2.2 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl	17
5.2.3 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von <i>Enterobacteriaceae</i>	19
5.2.4 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von <i>Salmonella spp.</i>	20
5.2.5 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von <i>Staphylococcus aureus</i>	22
5.2.6 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen.....	24

6. Ergebnisse.....	26
7. Diskussion	32
7.1 Diskussion der Methoden.....	32
7.2 Diskussion der Ergebnisse.....	35
8. Zusammenfassung und Ausblick	41
Kurzfassung.....	42
Abstract	43
Literaturverzeichnis	44
Rechtsquellenverzeichnis	48
Anhang	49
Eidesstattliche Erklärung	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines ausgewachsenen Mehlwurms	4
Abbildung 2: Verdünnungsreihe nach DIN EN ISO 6887-1:1999.....	17
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Anlehnung an DIN EN ISO 4833-2:2013	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bestimmung von <i>Enterobacteriaceae</i> in Anlehnung an die Methode L 00.00-133/2 und gemäß der Methode L 00.00-123 nach ASU § 64 LFGB.....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bestimmung von <i>Salmonella spp.</i> in Anlehnung an die Methode L 00.00-20 nach ASU § 64 LFGB.....	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bestimmung von <i>Staphylococcus aureus</i> in Anlehnung an die Methode L 00.00-55 und gemäß der Methode L 00.00-123 nach ASU § 64 LFGB.....	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen	24
Abbildung 8: Bestimmung der Gesamtkeimzahl	26
Abbildung 9: Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen	28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung des Protein- und Fettgehaltes von Rind und Mehlwurm in Trockenmasse	6
Tabelle 2: Richt- und Warnwerte von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene zur Beurteilung des mikrobiologischen Status gefriergetrockneter Mehlwürmer	30
Tabelle 3: Minimale a_w -Werte für das Wachstum der untersuchten und weiteren Mikroorganismen	36
Tabelle 4: Gegenüberstellung des Keimgehaltes von unverarbeiteten, lebenden und gefriergetrockneten Mehlwürmern unterschiedlicher Bezugsquellen	38
Tabelle A 1: Untersuchungsmenge.....	50
Tabelle A 2: Quantitative Auswertung des PC-Agars.....	50
Tabelle B 1: Qualitative Auswertung des VRBG-Agars.....	51
Tabelle C 1: Untersuchungsmenge <i>Salmonella spp.</i>	52
Tabelle C 2: Qualitative Auswertung des XLD-Agars.....	52
Tabelle C 3: Qualitative Auswertung des BGA-Agars	55
Tabelle C 4: Ergebnisse der biochemischen Tests	57
Tabelle C 5: Ergebnisse des EnteroPluri-Tests	57
Tabelle D 1: Qualitative Auswertung des BP-Agars.....	58
Tabelle E 1: Quantitative Auswertung des Malzextrakt-Agars	59
Tabelle F 1: Geräte.....	60
Tabelle F 2: Kleinmaterialien	61
Tabelle G 1: Nährmedien und Reagenzien.....	63

Abkürzungsverzeichnis

ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
a_w -Wert	Wasseraktivität
BGA-Agar	Brilliantgrün-Agar
BP-Agar	Baird-Parker-Agar
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
k.A.	keine Angabe
KbE	koloniebildende Einheit
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
n.n.	nicht nachweisbar
PC-Agar	Plate-Count-Agar
RVS-Bouillon	Rappaport-Vassiliadis-Bouillon
S.	<i>Salmonella</i>
Selenit-C-Bouillon	Selenite-Cystine-Bouillon
<i>spp.</i>	Spezies
subsp.	Subspezies
VO	Verordnung
VPA	Voges-Proskauer-A-Reagenz
VPB	Voges Proskauer-B-Reagenz
VRBD-Agar	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar
XLD-Agar	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

1. Einleitung

Der Verzehr von Insekten durch den Menschen wird als Entomophagie bezeichnet und ist durchweg ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung. Laut der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (van Huis et al., 2013, S. 1) werden Insekten weltweit von über zwei Milliarden Menschen verzehrt. Insbesondere in Afrika, Asien und Lateinamerika sind Insekten aufgrund ihres Nährwertes ein wichtiger und fester Bestandteil der lokalen Essgewohnheit und werden nicht, wie fälschlicherweise angenommen, ausschließlich in Zeiten der Lebensmittelknappheit verzehrt. Insekten stellen eine alternative Proteinquelle zu konventionellen Tierprodukten dar. Zudem werden einige Insekten als Delikatesse angesehen. Die geschmacklichen Präferenzen zwischen den Ländern und Regionen sind dabei oft unterschiedlich (Rempe, 2014, S. 198; van Huis et al., 2013, S. 76). In den westlichen Ländern hingegen ist die Entomophagie weitgehend negativ konnotiert. Insekten gelten als unappetitlich, unhygienisch und werden größtenteils mit Schädlingen assoziiert (FAO, 2010, S. 65f.). Die Abscheu gegenüber Insekten ist laut der FAO (van Huis et al., 2013, S. 5) größtenteils nicht begründet, da lediglich 5.000 der weltweit eine Millionen gelisteten Insektenarten als schädlich zu erachten sind. Hierbei wird zwischen Schädigung der Landwirtschaft, der Viehzucht und der menschlichen Gesundheit differenziert. Trotz des negativen Meinungsbildes besteht die Notwendigkeit Insekten als potenzielles Lebensmittel und relevante Proteinquelle zu berücksichtigen (FAO, 2010, S. 115). In Anbetracht der wachsenden Bevölkerung und zunehmender Urbanisierung werden der Bedarf an Nahrungsmitteln und insbesondere die Nachfrage an hochwertigen Proteinen zwangsweise steigen. Die Produktion von tierischen Lebensmitteln, welche infolgedessen ansteigen wird, hat negative Auswirkungen auf die Emission von Treibhausgasen, auf die Nutzung von Land und Wasser, sowie auf die menschliche Gesundheit. Zudem stellt Mangelernährung, die überwiegend in Form von Protein- und/ oder Energiedefizit verbreitet ist, insbesondere in Entwicklungsländern ein bedeutsames Problem dar (Klunder et al., 2012, S. 628; Steinfeld et al., 2006, S. 268-273).

Angesichts der weltweiten Ressourcenknappheit und der Suche nach Alternativen zur Sicherstellung der globalen Lebensmittelversorgung ist es daher nicht sinnvoll, die Viehzucht unter Aufwendung von pflanzlichen Lebensmitteln zu fördern (FAO, 2010,

S. 115). Die Nutzung von Insekten bietet im Vergleich zu traditionell eingesetzten Futtermitteln und tierischen Lebensmitteln viele gesundheitliche, umweltbedingte sowie soziale Vorteile (van Huis et al., 2013, S. 2).

Trotz der weit verbreiteten Entomophagie ist über die Sicherheit von Insekten als Lebensmittel kaum fundiertes Wissen zu finden. Insekten sind reich an Nährstoffen und weisen einen mit Fleischprodukten vergleichbaren Wassergehalt auf. Dadurch werden optimale Bedingungen geschaffen, die das Wachstum und Überleben von Mikroorganismen begünstigen. Je nach kulturellen Gewohnheiten werden Insekten mitsamt ihrer Darmflora verzehrt. Unabhängig vom Zubereitungsverfahren erfordert der Verzehr des Insektes im Ganzen somit eine hohe mikrobiologische Qualität. Um das potentielle mikrobiologische Risiko besser erfassen zu können, bedarf es weiterer Forschung in diesem Bereich (Klunder et al., 2012, S. 629; van Huis et al., 2013, S. 65).

Das Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit ist die Erhebung des mikrobiologischen Status essbarer Insekten. Bevorzugt werden Insekten im Larven- oder Puppenstadium konsumiert. Käfer stellen die weltweit am häufigsten verzehrte Insektengruppe dar (FAO, 2010, S. 5; van Huis et al., 2013, S. 10). Aufgrund dessen wird der Mehlwurm als repräsentatives Beispiel essbarer Käfer für diese mikrobiologische Untersuchung herangezogen. Hierfür werden zehn Proben gefriergetrockneter Mehlwürmer näher analysiert. Mittels qualitativer und quantitativer Methoden werden ausgewählte Mikroorganismen nachgewiesen und der mikrobiologische Status der Mehlwürmer bestimmt. Anhand der Ergebnisse wird das mikrobiologische Risiko erfasst, respektive die gesundheitliche Unbedenklichkeit bestätigt und die Eignung des Mehlwurms als sicheres Lebensmittel beurteilt.

Da Insekten in einigen Kulturen bereits als vollwertiges Nahrungsmittel etabliert sind, wird im zweiten Kapitel auf die Aspekte der Entomophagie am Beispiel des Mehlwurms und auf seine Zoologie näher eingegangen. Die rechtlichen Grundlagen in Bezug auf das Inverkehrbringen essbarer Insekten werden im dritten Kapitel thematisiert. Im Anschluss daran wird im vierten Kapitel das Spektrum der untersuchten Mikroorganismen aufgelistet und erläutert. Das fünfte Kapitel bezieht sich auf die Methoden der mikrobiologischen Untersuchung. Im sechsten Kapitel erfolgt die Präsentation der Untersuchungsergebnisse, die im siebten Kapitel diskutiert werden. Abschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse zusammenfasst und in einem Ausblick weiter erörtert.

2. Mehlwürmer als Lebensmittel

Obwohl die Entomophagie das Interesse der Medien, Forschungsinstitute, Lebensmittelindustrie, Gesetzgeber und der Lebensmittel- und Futtermittelbehörden erst kürzlich geweckt hat, können bereits erste Erfolge in der Verarbeitung und Kommerzialisierung von Insekten in Europa vermerkt werden. In den Niederlanden werden Mehlwürmer, welche speziell für den menschlichen Verzehr gezüchtet und verarbeitet werden, in Fachgeschäften zum Verkauf angeboten (Halloran et al., 2013, S. 1; van Huis et al., 2013, S. 118). Des Weiteren werden Mehlwürmer in Europa aufgrund der einfachen Zucht und der schnellen Vermehrung als Futtermittel für Haustiere wie Reptilien, Fische und Vögel eingesetzt (Günther et al., 1968, S. 251; van Huis et al., 2013, S. 11). Im Tierfachgeschäft können die Mehlwürmer lebend, getrocknet und gefriergetrocknet erworben werden (Veldkamp et al., 2012, S. 8). Der Einsatz von Mehlwürmern als Futtermittelalternative in der konventionellen Tierzucht wird ebenfalls verstärkt diskutiert, ist jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

2.1 Zoologie des Mehlwurms

In der Systematik der Insekten werden Insektenarten in Abhängigkeit von bestimmten Merkmalen zu Gattungen, Familien und Ordnungen zusammengefasst (Chinery, 1979, S. 43). Der Mehlwurm ist die Larve des *Tenebrio molitor*, des sogenannten Mehlkäfers. Dieser wird der Familie *Tenebrionidae* (Schwarzkäfer) innerhalb der Ordnung *Coleoptera* (Käfer) zugeordnet (Weidner et al., 2003, S. 195; Chinery, 1979, S. 347). Die Familie *Tenebrionidae* umfasst etwa 20.000 Arten, die vorwiegend in Trockensteppen und Wüstengebieten Südeuropas, Asiens, Afrikas und Südamerikas anzutreffen sind. In Deutschland sind lediglich 55 Arten vertreten. Zur Anpassung an die extrem trockenen Lebensbedingungen und zum Schutz vor Verdunstung von Wasser sind der Käfer und der Mehlwurm mit einem festen und dicken Chitinpanzer ausgestattet (Günther et al., 1968, S. 250).

Ein ausgewachsener Mehlkäfer erreicht eine Länge von 14 bis 23 mm (Bellmann et al., 2007, S. 614). Seine Rückseite weist eine dunkelbraune bis schwarze Färbung auf, wohingegen die Bauchseite rotbraun gefärbt ist (Weidner und Sellenschlo, 2003, S. 146). Die Lebensdauer des Mehlkäfers beträgt vier bis sechs Wochen, wobei unter

optimalen Bedingungen eine Lebensdauer von bis zu drei Monaten erreicht werden kann (Friederich et al., 1981, S. 105; Wyniger, 1974, S. 195). Der weibliche Mehlkäfer legt im Laufe seines Lebens durchschnittlich 400 bis 500 Eier (Ghaly und Alkoaik, 2009, S. 321). Aus den weißen Eiern schlüpfen nach ungefähr einer Woche kleine, gelblich gefärbte Mehlwürmer. Während des Larvenwachstums findet eine Verfärbung der Mehlwürmer statt. Der ausgewachsene, gelbbraun gefärbte Mehlwurm erreicht eine Länge von 25 bis 28 mm (Friederich und Volland, 1981, S. 104f.).

Wie der Abbildung 1 zu entnehmen ist, wird der Mehlwurm in einzelne Körperringe gegliedert und verfügt über sechs Beine, die paarweise am Vorderleib angeordnet sind. Der letzte, breit abgerundete Hinterleibsring ist mit einer Spitze versehen und zeichnet sich durch zwei nach oben gerichtete Dornen aus, die von kurzen Borsten umgeben sind (Weidner und Sellenschlo, 2003, S. 195f.).

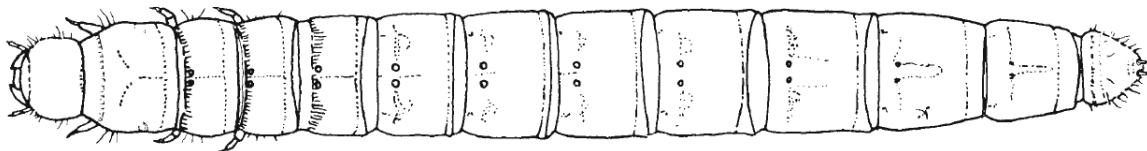


Abbildung 1: Darstellung eines ausgewachsenen Mehlwurms

Quelle: Weidner und Sellenschlo, 2003, S. 196.

Unter optimalen Bedingungen, einer Temperatur von 26 °C und einer relativen Luftfeuchte von 65 %, umfasst die Larvenentwicklung vier bis sechs Monate. Die Dauer der Embryonalentwicklung beträgt sechs Tage, die der Puppenruhe sechs bis acht Tage und die der Präovipositionsperiode etwa sechs Tage (Wyniger, 1974, S. 195). In der Literatur sind abweichende Angaben zu den jeweiligen Entwicklungszeiten vorzufinden. Diese lassen sich anhand der jeweils geschaffenen Wachstumsbedingungen und der zur Verfügung gestellten Nahrungszusammensetzung erklären (Friederich und Volland, 1981, S. 105f.).

In der Natur ernähren sich die Larven und der Mehlkäfer von überwiegend pflanzlichen Stoffen wie Getreide und Getreideprodukten, wobei auch tierische Produkte verzehrt werden (Weidner und Sellenschlo, 2003, S. 146). Da der Mehlwurm im trockenen Mehl zu Wachstum und Vermehrung fähig ist, stellt er einen Getreideschädling dar (Günther et al., 1968, S. 251).

2.2 Aspekte der Entomophagie

Laut der FAO (van Huis et al., 2013, S. 2) bietet die Verwendung von Insekten als Lebensmittel viele umweltbedingte, gesundheitliche und soziale Vorteile.

Der umweltbedingte Nutzen lässt sich unter anderem aufgrund der guten Futtermittelverwertungseffizienz begründen. Insekten sind Kaltblüter und nutzen keine Energie um die eigene Körperwärme aufrecht zu halten. Um eine Gewichtszunahme von 1 kg zu erzielen, beanspruchen einige Insektenarten eine Futtermenge von etwa 1,7 kg, wohingegen Hühner 2,5 kg, Schweine 5 kg und Rinder 10 kg Futter benötigen. Des Weiteren ist für die Aufzucht der Insekten kein gesondertes Futtermittel erforderlich. Der Mehlwurm kann, wie einige andere Insektenarten auch, organische Abfälle verarbeiten und Lebensmittelabfälle und Kompost als Nahrung nutzen (ebd., S. 59ff.). Die Verwendung von Insekten, die auf organischen Abfällen gezüchtet werden, ist als mögliche Quelle von pathogenen Keimen noch Gegenstand der Forschung (ebd., S. 119). Zudem sind Mehlwürmer wesentlich dürreresistenter als Rinder, sodass der Wasserverbrauch während der Zucht deutlich geringer ist als in der konventionellen Tierhaltung. Ferner kann der umweltbedingte Nutzen anhand der vergleichsweise günstigen Ökobilanz während der Erzeugung belegt werden. Hierbei wurden neben dem Wasserverbrauch, die Treibhausgasemission und die erforderliche Anbaufläche bestimmt und mit der konventionellen Tierhaltung verglichen (ebd., S. 64).

Aus ernährungsphysiologischer Sicht werden Insekten im Allgemeinen aufgrund ihres hohen Gehaltes an Proteinen und Fetten sowie der Vielzahl an Vitaminen und Mineralstoffen als wertvoll angesehen (Rumpold und Schlüter, 2013, S. 802). Der ernährungsphysiologische Nutzen ist angesichts der großen Insektenvielfalt variabel. Zudem ist der Nährwert vom morphologischen Stadium, vom Lebensraum und der Ernährung der Insekten abhängig und kann durch Zubereitungsverfahren wie Trocknen, Kochen und Braten beeinflusst werden (van Huis et al., 2013, S. 67). Infolgedessen wird zur Beurteilung des ernährungsphysiologischen Nutzens einzig die Nährstoffzusammensetzung des Mehlwurms betrachtet. Diese wird mit den Nährwerten des Rindes als repräsentatives Beispiel für die konventionelle Viehzucht und tierische Proteinquelle verglichen.

Für die Gegenüberstellung werden die von der FAO (van Huis et al., 2013, S. 74ff.) publizierten Referenzwerte des Rindes und des Mehlwurms in Trockenmasse herangezogen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gegenüberstellung des Protein- und Fettgehaltes von Rind und Mehlwurm in Trockenmasse

	Mehlwurm	Rind
Protein in %	49,1	55,0
Fett in %	35,2	41,0

Quelle: van Huis et al., 2013, S. 75.

Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, ergeben sich deutliche Parallelen in der Gegenüberstellung der Nährstoffzusammensetzung vom Mehlwurm zum Rind. Das Protein ist mit 49,1 % der Hauptbestandteil des Mehlwurms. Fett ist mit einem Anteil von 35,2 % im Mehlwurm enthalten. Der Kohlenhydratanteil ist gering und wird in der weiteren Analyse nicht näher betrachtet.

Proteine setzen sich aus einzelnen Aminosäuren zusammen. Eine relevante Gruppe der Aminosäuren bilden die essenziellen Aminosäuren. Diese werden vom Körper nicht eigenständig synthetisiert und müssen über die Nahrung von außen zugeführt werden. Die Menge an essentiellen Aminosäuren im Lebensmittel und deren Verhältnis zu den nicht essentiellen Aminosäuren werden zur Beurteilung der Proteinqualität herangezogen (Elmadfa, 2015, S. 88-93). Im Mehlwurm sind alle essentiellen Aminosäuren enthalten, welche mit denen des Rindes vergleichbar sind. Die Menge der essentiellen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin ist höher, wohingegen Lysin, Methionin, Phenylalanin und Threonin einen geringeren Wert aufweisen.

Für die Beurteilung des Fettgehaltes werden die mehrfach ungesättigten essentiellen Fettsäuren Linolsäure und α -Linolensäure näher betrachtet, da diese vom Körper nicht synthetisiert werden können (Elmadfa, 2015, S. 100). Mehlwürmer sind reich an essentiellen Fettsäuren. Wie auch das Rind verfügen sie über einen ähnlich hohen Anteil an α -Linolensäure und einen deutlich höheren Gehalt an Linolsäure. Laut Rumpold und Schlüter (2013, S. 814) ist die Zusammensetzung der Fettsäuren konform mit dem des Fisches. Mehlwürmer könnten daher in Regionen mit schlechtem Zugang zu Fischressourcen einen entscheidenden Beitrag zur Aufnahme der essentiellen Fettsäuren beisteuern (van Huis et al., 2013, S. 71).

Im Mehlwurm sind die Mineralstoffe Kupfer, Natrium, Kalium, Eisen, Zink und Selen in vergleichbaren Mengen vorzufinden wie im Rind, wohingegen der Gehalt der meisten Vitamine im Mehlwurm größer ist (ebd., S. 75).

Aus sozialer Sicht bieten die Zucht und das Sammeln von Insekten, insbesondere für Menschen in Entwicklungsländern die Möglichkeit, die eigenen Lebensbedingungen zu verbessern. Im Vergleich zur traditionellen Tierzucht kann die Zucht und Ernte von Insekten bereits mit geringem Kapital und einer minimalen technischen Ausstattung betrieben werden. Zudem können Frauen und Grundbesitzlose in unteren Gesellschaftsschichten in die Zucht, Ernte, Verarbeitung und den Verkauf involviert werden. Durch die Insektenzucht kann die eigene Nahrungssicherheit verbessert und durch den Verkauf der überschüssigen Produktion ein Einkommen erwirtschaftet werden. Im Gegensatz zur Landwirtschaft und zum Fisch- und Wildfang ist die Insektenzucht von der Saison unabhängig, sodass die Verfügbarkeit relevanter Nährstoffe für die Bevölkerung nicht beschränkt wird (van Huis et al., 2013, S. 125f.).

3. Rechtliche Grundlagen

Für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln auf dem deutschen Markt müssen die europäischen Regelungen sowie die nationalen gesetzlichen Bestimmungen erfüllt werden.

Im Folgenden wird die Verordnung (EU) Nr. 2015/2283 des europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015, auch bekannt als Novel Food Verordnung, näher betrachtet. Gegenstand der Novel Food Verordnung ist die Regelung des Inverkehrbringens neuartiger Lebensmittel. Als neuartiges Lebensmittel werden Tiere oder Tierbestandteile sowie aus diesen isolierte oder erzeugte Lebensmittel, die vor dem 15. Mai 1997 nicht im nennenswerten Umfang in der Europäischen Union für den menschlichen Verzehr verwendet wurden, bezeichnet (Art. 3 Abs. 2 VO (EU) Nr. 2015/2283). Zudem werden Lebensmittel, die in Drittstaaten bereits seit langem Bestandteil der traditionellen Ernährung sind und das Inverkehrbringen in der Europäischen Union beabsichtigen, als neuartiges Lebensmittel deklariert (Art. 14. VO (EU) Nr. 2015/2283). Demnach werden Insekten in den Neuregelungen der Novel Food Verordnung erfasst und der Gruppe der neuartigen Lebensmittel zugeordnet. Für die Genehmigung des Inverkehrbringens neuartiger Lebensmittel muss gemäß der Novel Food Verordnung zunächst ein Zulassungsverfahren durchlaufen werden. Nur zugelassene und in der Liste der neuartigen Lebensmittel, auch als Unionsliste bezeichnet, aufgeführte Lebensmittel dürfen in den Verkehr gebracht werden. Dabei ist im Besonderen der Nachweis zu erbringen, dass ein Sicherheitsrisiko für die menschliche Gesundheit auszuschließen ist. Ein Zulassungsverfahren für das Inverkehrbringen traditioneller Lebensmittel aus Drittländern ist nicht zwingend erforderlich, sofern die Lebensmittelsicherheit des Produktes garantiert und die in Art. 14 der VO (EU) 2015/2283 erfassten Angaben erbracht werden (Art. 10 VO (EU) Nr. 2015/2283; Art. 14 VO (EU) Nr. 2015/2283).

Die Novel Food Verordnung tritt ab dem 01. Januar 2018 in Kraft und löst die derzeit geltende Verordnung (EG) Nr. 258/97 ab. Im Ganzen zum Verzehr angebotene Insekten fallen nicht in den Anwendungsbereich der Verordnung (EG) Nr. 258/97. Demnach liegt bis zum Inkrafttreten der Novel Food Verordnung keine eindeutige Rechtslage hinsichtlich des Inverkehrbringens von Insekten als Lebensmittel in Deutschland vor. Inwiefern essbare Insekten unter den Begriff des Lebensmittels gemäß Art. 2 der VO (EG) 178/2002 fallen, ist umstritten. Trotz der unklaren Gesetzeslage werden Insekten und

Insektenprodukte, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind, bereits national vertrieben.

Gemäß Art. 14 der VO (EG) 178/2002 ist grundsätzlich die Sicherheit von Lebensmitteln, die in den Verkehr gebracht werden, zu gewährleisten. Als nicht sicher gelten Lebensmittel, wenn sie gesundheitsschädlich oder für den menschlichen Verzehr ungeeignet sind. Eine Gesundheitsschädigung liegt vor, sofern der Verzehr des Lebensmittels eine sofortige, kurzfristige und/ oder langfristige Auswirkung auf die Gesundheit des Verbrauchers oder auf die nachfolgende Generation ausübt. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit einer kumulativen toxischen Auswirkung abzuwägen. Ein Lebensmittel gilt als ungeeignet, wenn der Verzehr durch den Menschen aufgrund von Fremdstoffen oder weiteren Kontaminationen, beispielsweise durch Fäulnis, Verderb oder Zersetzung, als inakzeptabel zu erachten ist (Art. 14 VO (EG) Nr. 178/200).

Ein mögliches, von Insekten ausgehendes Risiko stellen Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze dar. Im Vergleich zu konventionellen Nutztieren sind Insekten taxonomisch weiter vom Menschen entfernt, sodass Zoonosen ein vergleichsweise geringeres Risiko aufweisen (van Huis et al., 2013, S. 119). Dennoch sind weitere Untersuchungen in diesem Bereich, zur Sicherstellung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit, notwendig, da diese gemäß der Novel Food Verordnung und der Verordnung (EG) 178/2002 sicherzustellen ist.

4. Untersuchte Mikroorganismen

Jedes Insekt weist eine charakteristische Mikroflora auf. Diese ist sowohl von der Art des Insektes, als auch von den Zucht- und Verarbeitungsbedingungen abhängig. Insbesondere im Intestinaltrakt des Insektes sind verschiedene Arten von Mikroorganismen enthalten. Sie tragen wesentlich zur Steuerung des Verhaltens, der Stoffwechselprozesse und zum Überleben des Insektes bei (EFSA Scientific Committee, 2015, S. 17). In den Niederlanden zum Verzehr angebotene Mehlwürmer, werden vor der Verarbeitung einem eintägigen Fasten unterzogen. Dies soll das Entleeren des Intestinaltraktes sicherstellen (van Huis et al., 2013, S. 118). Trotz der Darmentleerung besteht weiterhin die Möglichkeit, dass Fäkalreste verbleiben, welche das Insekt als Lebensmittel kontaminieren (EFSA Scientific Committee, 2015, S. 17).

Nicht jeder Mikroorganismus stellt eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar, deshalb ist zwischen pathogenen und nicht pathogenen Mikroorganismen zu unterscheiden. Im Lebensmittel enthaltene pathogene Keime oder deren Toxine können, abhängig von diversen Faktoren, eine Lebensmittelinfektion sowie -intoxikation hervorrufen. Wichtige Faktoren sind zum einen die Fähigkeit im Lebensmittel infektiös zu bleiben, in das menschliche Gewebe einzudringen und sich auszubreiten, zum anderen eine ausreichend vorliegende Infektionsdosis sowie die Immunabwehr des Menschen. Um eine Lebensmittelintoxikation hervorzurufen, bedarf es spezifischer Pathogenitätsfaktoren wie die der Toxinbildung. Einige nicht pathogene Keime können den Verderb des Lebensmittels begünstigen. Die sogenannten mikrobiellen Verderbniserreger beeinflussen das Lebensmittel negativ, indem sie zu Fäulnis, Säuerung und Gärung sowie zum Ranzigwerden des Lebensmittels beitragen (Krämer, 2011, S. 31; Zschaler et al., 2015, S. 89).

Aufgrund der Diversität an Mikroorganismen ist es nicht möglich die Mehlwürmer auf sämtliche Keime zu untersuchen. Angesichts dessen wird im Vorfeld eine Auswahl von zu untersuchenden Mikroorganismen getroffen. Zur Orientierung dienen die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Die Gruppe der Insekten wird in den Empfehlungen der DGHM nicht erfasst, sodass stellvertretend auf die Lebensmittelgruppe der Fleischerzeugnisse und insbesondere des Hackfleisches zurückgegriffen

wird. Gestützt wird die Auswahl der Mikroorganismen durch bereits durchgeführte mikrobiologische Untersuchungen (Grabowski et al., 2014, S. 48; Klunder et al., 2012, S. 629f.).

4.1 Gesamtkeimzahl

Die Gesamtkeimzahl gibt Auskunft über die Summe an Bakterien und /Pilzen, die unter aeroben Bedingungen im mesophilen Bereich wachsen und auf einem nährstoffreichen Labormedium Kolonien bilden (Holzapfel et al., 2004, S. 121). Der Begriff aerob impliziert die notwendige Anwesenheit von Sauerstoff bei der Zellatmung von Mikroorganismen (Keweloh, 2009, S. 119). Mesophil beschreibt das Temperaturverhalten der Keime. Mesophile Mikroorganismen wachsen optimalerweise in einem Temperaturbereich von 25 bis 40 °C, sind aber bereits in einem Bereich von 5 bis 45 °C zu Wachstum fähig (ebd., S. 104). Mit der Bestimmung der Gesamtkeimzahl können die lebensfähigen Mikroorganismen ohne eine konkrete Differenzierung der einzelnen Arten in einer definierten Probenmenge nachgewiesen und zur Beurteilung der mikrobiologischen hygienischen Qualität eines Lebensmittels herangezogen werden. Angesichts der begrenzten Aussagekraft der Gesamtkeimzahl ist ein hoher Gehalt an mesophilen aeroben Keimen nicht zwangsläufig als Gefahr zu betrachten, sodass weitere Untersuchungsverfahren notwendig sind (Prändel et al., 1988, S. 723; Zschaler et al., 2015, S. 89).

4.2 *Enterobacteriaceae*

Die Familie der *Enterobacteriaceae* setzt sich aus gramnegativen, fakultativ anaeroben, stäbchenförmigen Bakterien zusammen, die in obligat pathogene Gattungen und Spezies wie z.B. *Salmonella* und fakultativ pathogene Gattungen wie z.B. *Enterobacter* unterteilt werden. *Enterobacteriaceae* sind ubiquitär vorhanden und kommen im Erdboden, im Wasser, auf Pflanzen und im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren vor (Krämer, 2011, S. 36). Für die Beurteilung des Lebensmittels spielen die physiologisch im Darm vorkommenden Keime eine besondere Rolle und werden als Index- und Indi-

kator-Organismus verwendet (Weber, 2010, S. 48). Indexkeime können auf die Anwesenheit von pathogenen Keimen, Verderbniserregern sowie auf Kontamination menschlichen oder fäkalen Ursprungs und einer Rekontamination nach dem Herstellungsprozess hinweisen. Indikatorkeime werden zur Bewertung von Lebensmittelherstellungsprozessen herangezogen (Zschaler und Heeschen, 2015, S. 94).

4.3 *Salmonella* spp.

Salmonellen sind gramnegative, fakultativ anaerobe, mesophile Stäbchen. Sie sind Katalase-positiv sowie Oxidase-negativ und gehören zu der Gruppe der *Enterobacteriaceae* (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 491ff.). Die Gattung *Salmonella* (*S.*) umfasst die zwei Spezies *S. enterica* und *S. bongori*. Die Spezies *S. enterica* wird in sechs weitere Subspezies (subsp.) unterteilt (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 492). Die meisten durch *Salmonella* verursachten Erkrankungen, auch Salmonellosen genannt, werden durch *S. enterica* subsp. *enterica* ausgelöst, die wiederum in 2.500 Serovare gegliedert wird. Die humanpathogenen Salmonellen der Subspezies *S. enterica* subsp. *enterica* werden im Folgenden ausschließlich durch die Gattung und dem dazugehörigen Serovar angegeben wie etwa *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Die Salmonellose lässt sich in zwei Krankheitsbilder unterteilen. Die Salmonellen-Gastroenteritis wird von den Enteritis erregenden Salmonellen (2.500 Serovare) hervorgerufen, wohingegen die Salmonellen der Typhus-Paratyphus-Gruppe (*S. Typhi* und *S. Paratyphi*) eine Allgemeininfektion verursachen (Krämer, 2011, S. 36-41). *Salmonella* ist neben *Campylobacter* der weltweit bedeutendste Lebensmittelinfektionserreger (Stephan et al., 2014, S. 21). Die am häufigsten an Lebensmittelinfektionen beteiligten Erreger sind *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*. Da sie über eine geringe Wirtsspezifität verfügen, können sie von Tiere auf den Menschen übertragen werden (Weber, 2010, S. 241ff.). Ein wichtiges Reservoir der Enteritis erregenden Salmonellen ist der Intestinaltrakt von Tieren, weshalb insbesondere tierische Lebensmittel wie Fleischprodukte und Rohei enthaltende Nahrungsmittel eine wichtige Infektionsquelle darstellen (Krämer, 2011, S. 41). Neben den Warmblütern sind Salmonellen auch im Intestinaltrakt von Kaltblütern wie Insekten vorhanden, sodass sie für die mikrobiologische Untersuchung von hoher Relevanz sind (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 496). Salmonellen gelten als pathogen und sind in Anh. I Kap. 1 der VO (EG) Nr. 2073/2005

als Lebensmittelsicherheitskriterium definiert. Für Hackfleisch und weitere Lebensmittelgruppen, die in den Verkehr gebracht werden, ist eine Nulltoleranz vorgeschrieben. Bei einem Nachweis von Salmonellen gilt das Lebensmittel als nicht verkehrsfähig.

4.4 *Staphylococcus aureus*

Die Spezies *Staphylococcus aureus* gehört zur Gattung *Staphylococcus* und umfasst grampositive, fakultativ anaerobe, mesophile Kokken (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 357f.). Im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie werden Staphylokokken in Koagulase-negative und Koagulase-positive Spezies unterteilt. Die überwiegende Zahl der Staphylokokken ist Koagulase-negativ. *Staphylococcus aureus* bildet das Protein Koagulase und wird demgemäß der Gruppe der Koagulase-positiven Spezies zugeordnet (ebd., S. 613). Ein wichtiges Habitat von *Staphylococcus aureus* stellt der Mensch dar. Bei 30 bis 40 % der gesunden Menschen kann der Erreger im Stuhl, auf der Kopfhaut sowie auf den Schleimhäuten des Nasenrachenraumes festgestellt werden. Neben einer möglichen Infektion können einige *Staphylococcus aureus* Stämme, durch die Bildung von hitzeresistenten Enterotoxinen, eine Intoxikation bei Menschen verursachen. Eine Kontamination von Lebensmitteln mit *Staphylococcus aureus* erfolgt vorwiegend durch den Menschen. Häufige Kontaminationsquellen stellen Tröpfcheninfektionen, mit Fäkalien verunreinigte Hände und unzureichend abgedeckten eiternden Wunden dar (Krämer, 2011, S. 78ff.). In Lebensmitteln stellt *Staphylococcus aureus* somit einen relevanten pathogenen Keim dar, welcher in dieser Untersuchung zudem als Indikator für manuellen Kontakt sowie mangelhafte Hygiene verwendet wird.

4.5 Hefen und Schimmelpilze

Hefen sind aerobe, zum Teil fakultativ anaerobe, einzellige Pilze. Eine Vermehrung ist bei Temperaturen von 0 bis über 45 °C, mit einem Optimum bei 10 bis 30 °C, möglich. Dabei wird ein saures Milieu bevorzugt. Bei Temperaturen von über 60 °C werden die meisten Hefen abgetötet, wobei einige Hefen hitzeresistente Sporen bilden (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 167-170). Die Vermehrung der meisten Hefen erfolgt durch Sprossung oder Knospung, dabei findet eine Abschnürung der Tochterzelle von

der Mutterzelle statt (Krämer, 2011, S. 20). Zur Energiegewinnung werden Kohlenhydrate in Form von wasserlöslichen Mono- und Disacchariden benötigt, sodass Hefen vorzugsweise auf zuckerreichen Früchten und Säften vorhanden sind (Keweloh, 2009, S. 53). Unter aeroben Bedingungen wird der Zucker verstoffwechselt und Wasser sowie Kohlenstoffdioxid gebildet. Unter anaeroben Bedingungen findet der Prozess der Gärung statt. Darüber hinaus bauen einige Hefen Eiweißprodukte ab und bilden Ammoniak, welches zur Fäulnis eines Lebensmittels beitragen kann (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 167-170).

Schimmelpilze gehören zu der Gruppe der Joch- und Schlauchpilze (Keweloh, 2009, S. 51). Die meisten Schimmelpilze wachsen unter aeroben Bedingungen im Temperaturbereich von 0 bis über 55° C. Im Gegensatz zu Bakterien und Hefen ist eine Vermehrung auf Nährsubstraten mit niedrigem Wassergehalt möglich (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 175f.). Schimmelpilze verfügen über einen Vegetationskörper, auch Myzel genannt, der sich aus verzweigten Fäden, den sogenannten Hyphen zusammensetzt. Die Vermehrung erfolgt überwiegend durch die Bildung von Sporen, wobei die Entstehung eines Wachstumskörpers aus Myzelbruchstücken ebenfalls möglich ist (Krämer, 2011, S. 17). Sporen sind sehr temperaturresistent und können bei tiefen und hohen Temperaturen sowie bei Trockenheit lange Zeit überdauern. Zudem gewährleisten Sporen eine schnelle Verbreitung, die über den Luftweg möglich ist. Auf dem Nährsubstrat bilden Schimmelpilze weiße oder farbige Kolonien. Diese können ein wolliges, flockiges, samtartiges bis drahtartiges Erscheinungsbild aufzeigen. Neben einem unappetitlichen Aussehen begünstigen Schimmelpilze die Säuerung, Gärung, Fäulnis und das Ranzigwerden von Lebensmitteln (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 175ff.). Darüber hinaus rufen einige Schimmelpilze durch die Bildung von Mykotoxinen Lebensmittelvergiftungen hervor. Das Schimmelwachstum und die Mykotoxinbildung werden durch extrinsische Faktoren wie eine zu hohe Luftfeuchtigkeit und zu hohe Temperaturen gefördert. Zudem können pflanzliche Rohstoffe, die als Tierfutter eingesetzt werden, mit Mykotoxinen belastet sein (Keweloh, 2009, S. 227-231).

Grundsätzlich weisen Hefen und Schimmelpilze breite Toleranzbereiche auf und zeigen trotz Absenkung der Temperatur, des pH-Wertes und des Wassergehaltes ein Wachstum auf (Krämer, 2011, S. 19). Neben der Eigenschaft der Toxinbildung kommt ihnen im Lebensmittelbereich insbesondere als Verderbniserreger eine große Bedeutung zu, sodass sie im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls in der mikrobiologischen Untersuchung berücksichtigt werden.

5. Material und Methoden

In der mikrobiologischen Untersuchung wurden die Gesamtkeimzahl der aeroben mesophilen Keime sowie die Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen quantitativ bestimmt. Der Nachweis von *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* und *Staphylococcus aureus* erfolgte qualitativ.

5.1 Material

Im Folgenden werden das untersuchte Probenmaterial sowie die verwendeten Nährmedien und Reagenzien aufgeführt. Die Auflistung der Arbeitsgeräte und Kleinmaterialien kann dem Anhang F entnommen werden.

5.1.1 Probenmaterial

Es wurden zehn unterschiedliche Proben von Mehlwürmern des gleichen Herstellers untersucht. Die Proben wurden bei einem Händler online erworben, der speziell für den menschlichen Verzehr gezüchtete und verarbeitete Mehlwürmer vertreibt. Jede Probe bestand aus 50 g gefriergetrockneten Mehlwürmern, die in einem verschlossenen Blockbodenbeutel aus Papier verpackt waren. Die Proben waren mit dem Mindesthaltbarkeitsdatum 01. Dezember 2016 versehen. Bis zur mikrobiologischen Untersuchung, wurden die Proben fünf Tage trocken und bei einer Zimmertemperatur von 19,5 °C gelagert.

5.1.2 Nährmedien und Reagenzien

Für die Bestimmung der jeweiligen Mikroorganismen wurde im Vorfeld eine Verdünnungsreihe mittels gepuffertem Peptonwasser hergestellt. Zur quantitativen Bestimmung der Gesamtkeimzahl kam ein nicht selektiver Plate-Count-Agar (PC-Agar) zum Einsatz. Der Nachweis von *Enterobacteriaceae* erfolgte auf einem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBG-Agar), der von *Staphylococcus aureus* auf einem Baird-Parker-Agar (BP-Agar). Zur qualitativen Bestimmung von *Salmonella spp.* wurde

als Voranreicherungslösung gepuffertes Peptonwasser verwendet. Der selektiven Anreicherung dienten eine Rappaport-Vassiliadis-Bouillon (RVS-Bouillon) und eine Selenite-Cystine-Bouillon (Selenit-C-Bouillon). Als Selektivnährmedien wurden Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) und Brilliantgrün-Agar (BGA-Agar) eingesetzt. Zur Identifizierung der gewachsenen Kolonien wurden biochemische Untersuchungen wie der Katalase- und Oxidase-Test, die Gramfärbung sowie der EnteroPluri-Test durchgeführt. Für die Gramfärbung und die Mikroskopie kamen demineralisiertes Wasser, Karbol-Gentianaviolett-Lösung, Lugolsche-Lösung, Fuchsin-Lösung sowie Immersionsöl zum Einsatz. Die Katalase- und Oxidase-Tests wurden anhand von Wasserstoffperoxid sowie speziellen Teststreifen durchgeführt. Für den Einsatz des EnteroPluri-Tests wurde sowohl Kovacs-Indolreagenz als auch Voges-Proskauer-A-Reagenz (VPA) und Voges-Proskauer-B-Reagenz (VPB) verwendet. Die quantitative Bestimmung von Hefen und Schimmelpilzen erfolgte auf einem Malzextrakt-Agar.

Die jeweiligen Nährmedien und Reagenzien wurden gebrauchsfertig in den dafür vorgesehenen Gefäßen geliefert. Der Durchmesser der Petrischalen betrug 90 mm. Eine Auflistung der Nährmedien und Reagenzien mit entsprechenden Herstellerangaben und Artikelnummern kann dem Anhang G entnommen werden.

5.2 Methoden

Die mikrobiologische Untersuchung wurde in Anlehnung an die Methoden der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren (ASU) nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuchs (LFGB) sowie in Anlehnung an entsprechende ISO Normen durchgeführt. Abweichungen in der Vorgehensweise zu den oben genannten Vorschriften waren vorhanden und lassen sich zum einen durch die labortechnischen Möglichkeiten begründen, zum anderen wurde die Vorgehensweise den Versuchszielen angepasst. Die Abweichungen werden in den Einzelversuchen benannt.

Im Folgenden werden die einzelnen Untersuchungsverfahren beschrieben. Zum besseren Verständnis wird dabei ausschließlich auf eine Probe Bezug genommen. Mit den weiteren neun Proben wurde identisch zu dieser Beschreibung verfahren.

5.2.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung sowie die Herstellung verschiedener Verdünnungsstufen wurden nach DIN EN ISO 6887-1:1999 durchgeführt. Die Herstellung der Verdünnungsreihe ist in der Abbildung 2 schematisch dargestellt

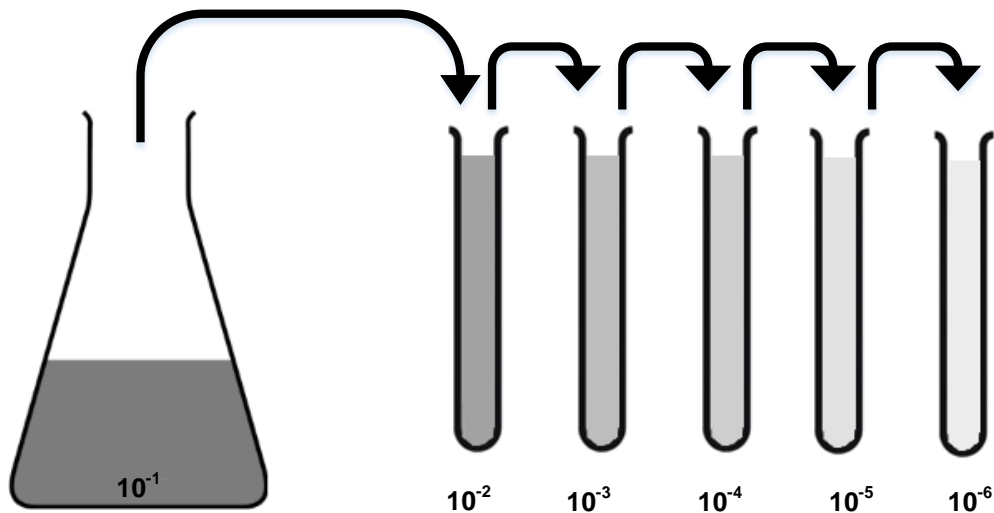


Abbildung 2: Verdünnungsreihe nach DIN EN ISO 6887-1:1999

Die Probe wurde bei einer Umgebungstemperatur von 19,5 °C gelagert. Daraus folgt eine vergleichbare Temperatur bei der Probenahme. Für die mikrobiologische Untersuchung wurden je $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ des Probenmaterials in einen sterilen Stomacherbeutel mit integriertem Filterrohr eingewogen. Für die Herstellung der Erstverdünnung wurden der abgewogenen Probe 90 ml gepufferte Peptonlösung zugegeben. Die Probe wurde für wenige Minuten in der Erstverdünnung eingeweicht und anschließend in einem Stomacher homogenisiert. Aus der so entstandenen Erstverdünnung wurden weitere Dezimalverdünnungen hergestellt. Hierfür wurde 1 ml der Erstverdünnung in 9 ml Peptonlösung überführt und mit Hilfe eines Reagenzschüttlers hinreichend durchgemischt. Aus der hergestellten Dezimalverdünnung wurde erneut 1 ml entnommen und in 9 ml Peptonlösung überführt. Der Verdünnungsprozess wurde bis zur gewünschten Dezimalverdünnung mit dem Verhältnis 1:1.000.000 wiederholt (Abbildung 2).

5.2.2 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde das Verfahren nach DIN EN ISO 4833-2:2013 eingesetzt. Die Probenvorbereitung und Herstellung der Verdünnungsreihe

kann dem Kapitel 5.2.1 entnommen werden. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl kam das Spatelverfahren zur Anwendung. Hierbei wurde im Doppelansatz je 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufen auf einen PC-Agar überführt. Mit einem Drigalskispatel wurde das Inokulum gleichmäßig und kreisförmig auf der Agaroberfläche ausgestrichen. Die Agarplatten wurden zum Trocknen auf eine kühle Oberfläche platziert und anschließend für 48 h bei 37 °C in einem Brutschrank bebrütet. Die Temperatur und Bebrütungsdauer wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt und wichen von der DIN EN ISO 4833-2:2013 ab. Aufgrund mehrerer, mit Schimmel kontaminierter PC-Agarplatten war eine Doppelbestimmung ab der achten Probe nicht mehr möglich. Deshalb erfolgte eine Einfachbestimmung der Proben acht, neun und zehn.

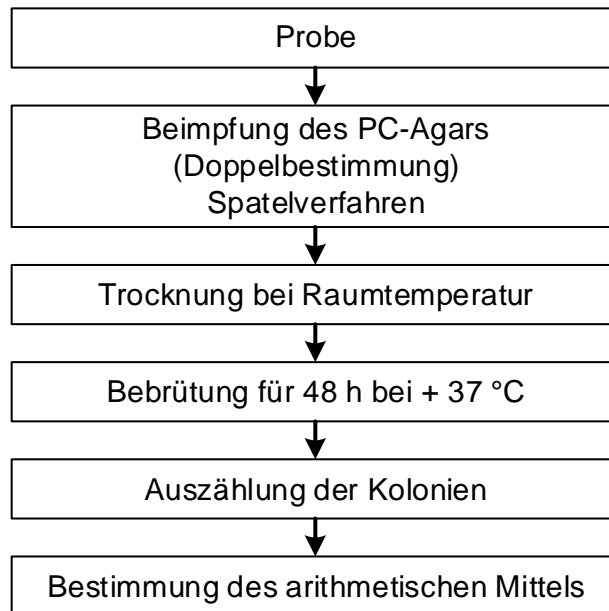


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Anlehnung an DIN EN ISO 4833-2:2013

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde die Formel zur Berechnung des gewogenen arithmetischen Mittelwertes herangezogen (siehe Formel 1). Dabei wurde die Summe der ausgezählten Kolonien bestimmt ($\sum C$) und durch die Summe der untersuchten Substratmenge ($n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1$) dividiert. Anschließend wurde der ermittelte Wert mit dem Faktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe ($\frac{1}{d}$) multipliziert.

Die Bestimmungsgrenze wurde auf 5 bis 300 auszählbare Kolonien festgelegt. Die Menge des aufgetragenen Inokulums betrug 0,1 ml, sodass der berechnete Wert abschließend mit dem Faktor 10 multipliziert wurde. Das Ergebnis wurde in koloniebildende Einheit pro Gramm (KbE/g) angegeben.

Formel 1:
$$\bar{C} = \frac{\sum C}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times \frac{1}{d}$$

\bar{C} gewogener arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen

$\sum C$ Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden; niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe

n_1 Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 Anzahl der Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe

d Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

5.2.3 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von *Enterobacteriaceae*

In Rahmen dieser Arbeit erfolgte ausschließlich ein qualitativer Nachweis von *Enterobacteriaceae*, der sich an der Methode L 00.00-133/2 nach ASU § 64 LFGB orientiert. Statt des Gussplattenverfahrens wurde eine Oberflächenbeimpfung mittels Spatelverfahren gemäß der Methode L 00.00-123 nach ASU § 64 LFGB durchgeführt. Das Untersuchungsverfahren zur Bestimmung von *Enterobacteriaceae* ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Die Probenvorbereitung und Anfertigung der Erstverdünnung erfolgte analog zum Verfahren, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Anschließend wurde der VRBD-Agar mit 0,1 ml der Erstverdünnung beimpft. Mit einem sterilen Drigalskispatel wurde die Impfmenge kreisförmig und gleichmäßig auf dem Agar verteilt. Nach der Trocknung des Inokulums wurde die Agarplatte für 24 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Auf die Durchführung einer Doppelbestimmung wurde verzichtet.

Für *Enterobacteriaceae* charakteristische Kolonien weisen eine rosa bis rote oder purpurrote Färbung auf und können über einen Präzipitationshof verfügen (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 215). Sofern das Wachstum solcher Kolonien zu erkennen war, wurde das Bakterium anhand eines biochemischen Testverfahrens identifiziert. Hierfür wurde ein EnteroPluri-Test verwendet. Dabei handelt es sich um ein ge-

brauchsfertiges Testsystem, welches zur schnellen Identifizierung von *Enterobacteriaceae* eingesetzt wird. Der EnteroPluri-Test verfügte über zwölf Kammern mit verschiedenen Spezialmedien. Die Beimpfung der Kammern wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Bebrütung des EnteroPluri-Tests erfolgte im Brutschrank für 24 h bei 37 °C. Abschließend wurden zwei Kammern eingestochen und mit vier Tropfen Kovacs-Indolreagenz respektive drei Tropfen VPA und VPB versehen. Nach 20 Minuten konnte der EnteroPluri-Test ausgewertet und die Codenummer notiert werden. Durch das Nachschlagen im entsprechenden Codebuch wurde der Keim identifiziert.

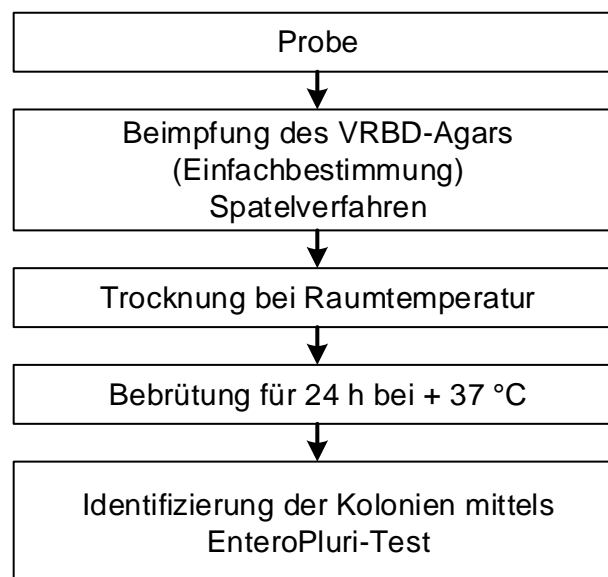


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Anlehnung an die Methode L 00.00-133/2 und gemäß der Methode L 00.00-123 nach ASU § 64 LFGB

5.2.4 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von *Salmonella spp.*

Die qualitative Bestimmung von *Salmonella spp.* wurde in Anlehnung an die Methode L 00.00-20 nach ASU § 64 LFGB durchgeführt und ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Bei der Probenahme wurden $25 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ der Probe in einen sterilen Stomacherbeutel mit integriertem Filterrohr eingewogen. Für die nicht selektive Voranreicherung und Herstellung einer Erstverdünnung wurde der Probe 225 ml gepufferte Peptonlösung zugegeben. Die Probe wurde für wenige Minuten in der Erstverdünnung eingeweicht und in einem Stomacher homogenisiert sowie anschließend für 18 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Der selektiven Anreicherung dienten zwei flüssige Nährmedien. Die RVS-

Bouillon wurde in 90 ml Glasbehältern geliefert, daher wurde die selektive Anreicherung abweichend in einem Stomacherbeutel durchgeführt. Hierbei wurden 90 ml der RVS-Bouillon in einen Stomacherbeutel überführt und mit 10 ml der bereits vorangereicherten Probe beimpft. Entgegen der Methode L 00.00-20 nach ASU § 64 LFGB wurde als zweites flüssiges Nährmedium die Selenit-C-Bouillon verwendet. Diese war mit 9,9 ml in einem Kulturröhrchen abgefüllt und wurde mit 0,1 ml der bereits bebrüteten Kultur beimpft. Im Brutschrank wurde die beimpfte RVS-Bouillon für 24 h bei 42 °C und die beimpfte Selenit-C-Bouillon für 24 h bei 37 °C bebrütet. Für den Ausstrich und die Identifizierung kamen ein XLD-Agar und ein BGA-Agar zum Einsatz. Statt des Ösenausstriches wurde eine Oberflächenbeimpfung durchgeführt. Hierfür wurde der XLD-Agar und der BGA-Agar mit Hilfe einer Markierung an der Außenseite der Petrischale in zwei Bereiche unterteilt. Anschließend wurde jeweils eine Seite der Agarplatten mit 0,1 ml der in RVS-Bouillon angereicherten Kultur, die jeweils andere Seite mit 0,1 ml der in Selenit-C-Bouillon angereicherten Kultur beimpft. Zur Sicherstellung von gut voneinander abgrenzbaren Kolonien wurde das Inokulum mittels einer Impföse in dem entsprechenden Agarbereich verteilt. Nach der Absorption des Inokulums durch den Agar wurden die Agarplatten für 24 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

Charakteristische, auf einem XLD-Agar gewachsene Salmonellenkolonien besitzen ein schwarzes Koloniezentrum und eine leicht transparente, rötlich gefärbte Zone (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 503). Auf einem BGA-Agar hingegen sind Salmonellenkolonien rosa bis farblos gefärbt und von einer roten Zone umgeben (VWR Chemicals, 2013, S. 1). Zur Identifizierung der gewachsenen Kolonien dienten biochemische Untersuchungen. Hierfür wurden ein Katalase-Test, ein Oxidase-Test und eine Gramfärbung mit anschließender Mikroskopie durchgeführt. Für den Katalase-Test wurde eine Kolonie auf einen Objektträger überführt und mit einem Tropfen Wasserstoffperoxid versetzt. Eine Bläschenbildung deutet auf ein Katalase-positives Bakterium hin. Für den Oxidase-Test wurde die isolierte Kolonie auf die Prüfzone des Teststreifens ausgestrichen. Im Falle einer Blaufärbung ist die untersuchte Prüfkultur Oxidase-positiv (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 193f.). Für eine Gramfärbung wurde ein hitzefixierter Kulturausstrich mit Karbol-Gentianaviolett-Lösung bedeckt. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute wurde die Lösung abgegossen und mit Lugolscher-Lösung und 96-%igem Alkohol ausgewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit einer Fuchsin-Lösung. Abschließend wurde der Ausstrich mit demineralisiertem Wasser abgespült. Die Identifizierung des trockenen, mit Immersionsöl versetzten Kulturausstrichs erfolgte mittels Mikroskopie.

Grampositive Bakterien weisen eine blauviolette Färbung auf, wohingegen gramnegative Bakterien rot gefärbt sind (Baumgart, Becker, und Stephan , 2016, S. 107ff.). Sofern kein eindeutiges Ergebnis erzielt wurde, erfolgte der Einsatz eines EnteroPluri-Tests. Die Angaben zu diesem Verfahren können dem Kapitel 5.2.3 entnommen werden.

Biochemische Untersuchungen geben Auskunft darüber, ob das untersuchte Isolat zur Gattung der Salmonellen gehört. Die Bestimmung des Serovars erfolgt mit Hilfe einer Serotypisierung. Hierfür hätten die Kolonien in ein dafür vorgesehenes Referenzlabor des Bundesinstituts für Risikobewertung geschickt werden müssen.

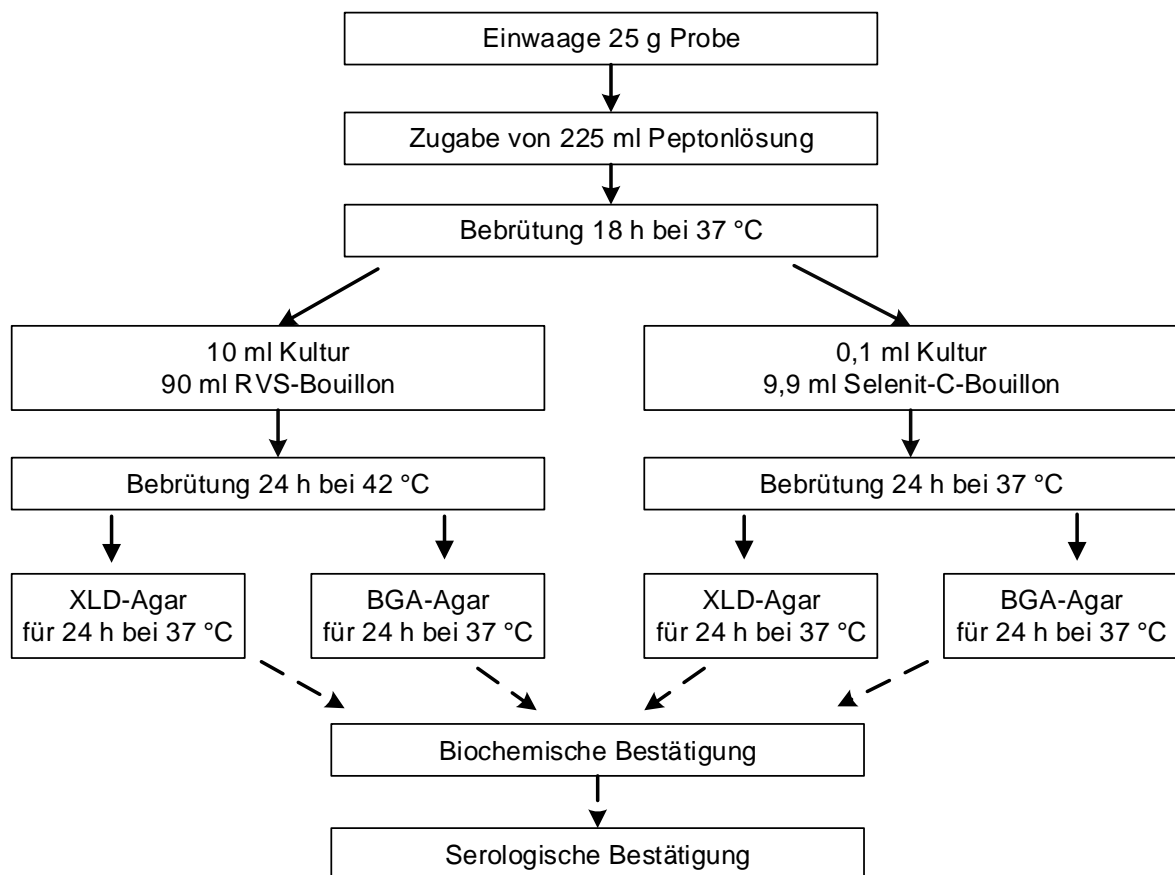


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bestimmung von *Salmonella spp.* in Anlehnung an die Methode L 00.00-20 nach ASU § 64 LFGB

5.2.5 Qualitativer Nachweis und Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

Das Ziel dieses Untersuchungsverfahrens war der qualitative Nachweis von *Staphylococcus aureus*. Zur Orientierung diente die Methode L 00.00-55 nach ASU § 64 LFGB. Statt des Gussplattenverfahrens wurde wiederholt das Spatelverfahren gemäß der Methode L 00.00-123 nach § 64 LFGB eingesetzt. Das Untersuchungsverfahren

zur Bestimmung von *Staphylococcus aureus* ist in der Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Die Probenvorbereitung und Herstellung der Erstverdünnung wurde analog zu dem Kapitel 5.2.1 durchgeführt. Bei dem Spatelverfahren wurde der BP-Agar mit 0,1 ml der Erstverdünnung beimpft. Das Inokulum wurde mit einem sterilen Drigalskispatel kreisförmig und gleichmäßig auf dem Agar ausgestrichen. Auf die Durchführung einer Doppelbestimmung wurde verzichtet. Nach dem Antrocknen des Inokulums wurde die Agarplatte für 48 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Zur besseren Bewertung der Kolonien wurden die Proben sowohl nach 24 h als auch nach 48 h überprüft und die sichtbaren Kolonien markiert.

Typische Kolonien, die auf *Staphylococcus aureus* hindeuten, sind schwarz gefärbt, glänzend und von einem opalisierenden Ring sowie einer Zone umgeben (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 627).

Bei Bedarf hätten die Koagulase-positive Staphylokokken mit Hilfe des Koagulase-Tests identifiziert und von den Koagulase-negativen Staphylokokken differenziert werden können. Hierfür wäre die Hirn-Herz-Bouillon mit den zu testenden Kolonien inkubiert und anschließend in Kaninchenplasma überführt worden.

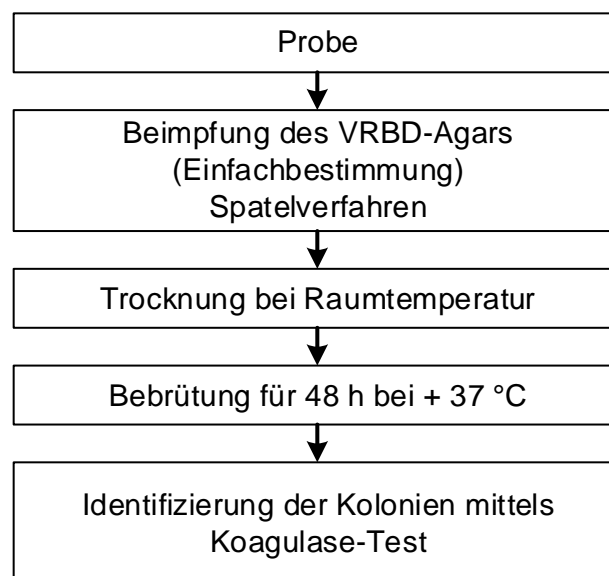


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Bestimmung von *Staphylococcus aureus* in Anlehnung an die Methode L 00.00-55 und gemäß der Methode L 00.00-123 nach ASU § 64 LFGB

5.2.6 Quantitative Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen

Derzeit liegen keine Amtlichen Untersuchungsverfahren oder entsprechende Normen hinsichtlich der quantitativen Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen in essbaren Insekten oder vergleichbaren Lebensmitteln vor. Das Tropfplattenverfahren ist jedoch für jede Lebensmittelgruppe anwendbar (Baumgart, Becker, und Stephan, 2016, S. 75f.) und wurde deshalb für die Untersuchung herangezogen. Das Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Die Probenvorbereitung und Herstellung der Verdünnungsreihe wurden analog zum Verfahren, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde der Malzextrakt-Agar mittels Markierungen an der Außenseite der Petrischale in sechs Sektoren unterteilt. Die sechs Verdünnungsstufen wurden mit je 0,05 ml in die entsprechenden Sektoren überführt. Um gut voneinander abgesetzte Kolonien zu erhalten und eine schnellere Trocknung zu gewährleisten, wurde das Inokulum innerhalb des Sektors mit einer Impföse verteilt. Nach der Trocknung wurde die Agarplatte bei 30° C für 48 h im Brutschrank bebrütet.

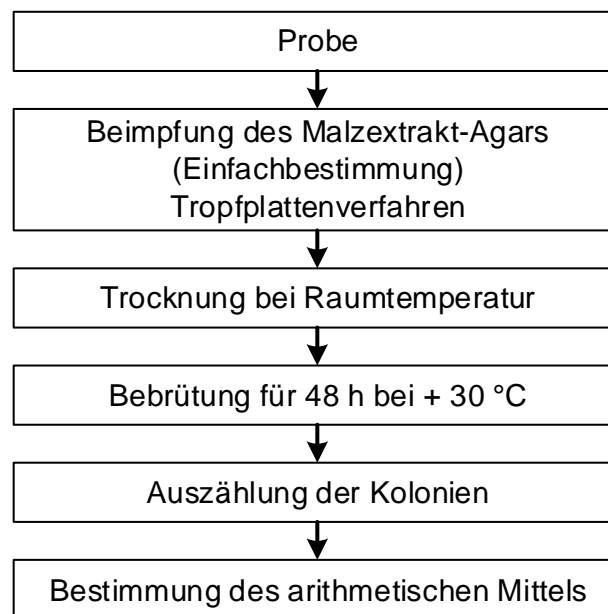


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen

Für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilze wurde der gewogene arithmetische Mittelwert (siehe Formel 1) bestimmt. Hierbei wurde die Summe der ausgezählten Kolonien, die Bestimmungsgrenze lag bei 1 bis 50 Kolonien, durch die Summe der untersuchten Substratmenge dividiert. Auf die Agarplatte wurde ein Inokulum von 0,05 ml aufgetragen, sodass der berechnete Wert abschließend mit dem Faktor 20 multipliziert wurde.

6. Ergebnisse

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung sind im Folgenden zusammengefasst. Sämtliche Einzelergebnisse der Untersuchung finden sich in Anhang A-E. Insgesamt wurden zehn Proben untersucht.

Untersuchung zur Gesamtkeimzahl

Die Ergebnisse der ermittelten Gesamtkeimzahl sind in Abbildung 8 dargestellt. Für die Berechnung der Gesamtkeimzahl wurden ausschließlich PC-Agarplatten ausgewertet, die ein Wachstum von mehr als 5 und weniger als 300 Kolonien aufwiesen. Offensichtliche Kontaminationen der Platten wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

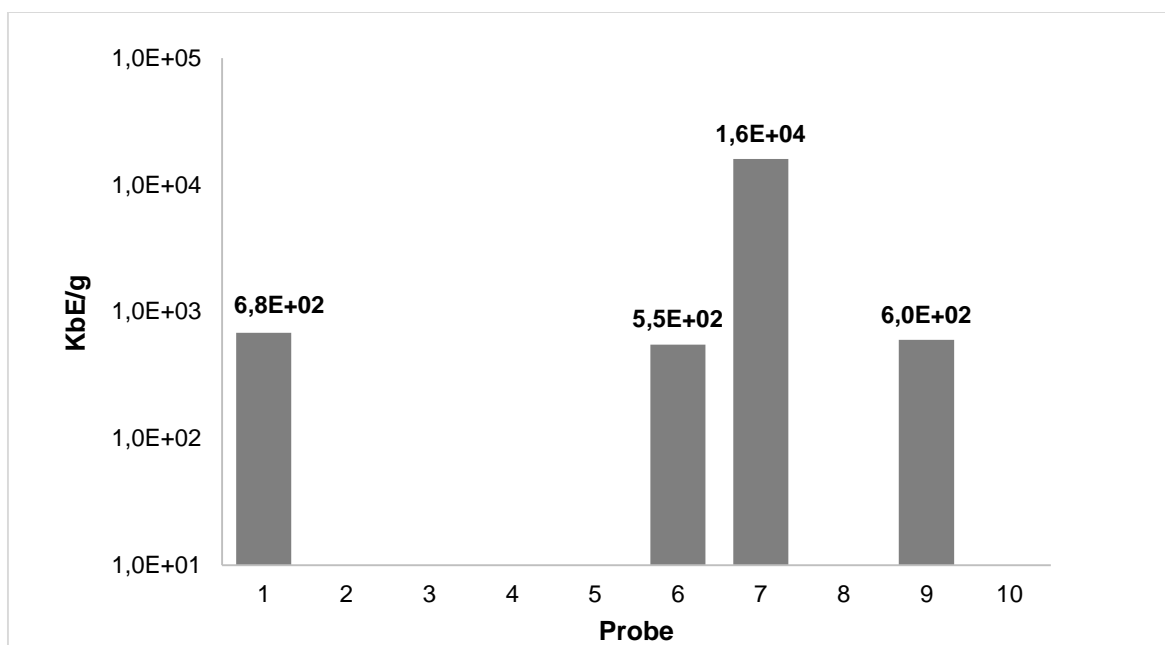


Abbildung 8: Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Wie aus der Abbildung 8 ersichtlich, wurden Ergebnisse unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/g sowie Ergebnisse bis zu einem Keimgehalt von $1,6 \times 10^4$ KbE/g ermittelt. Am häufigsten wurde ein Wert unterhalb der Nachweisgrenze von 10 KbE/g bestimmt. Insgesamt lagen 6 der 10 untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze, da gar keine oder weniger als 5 Kolonien nachgewiesen wurden. Somit liegt mehr als die Hälfte der untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze. In den Proben 1, 6 und 10 konnte ein Keimgehalt von $5,5 \times 10^2$ KbE/g bis $6,8 \times 10^2$ KbE/g ermittelt werden. Den höchsten ermittelten Wert enthielt die Probe 7 mit einem Keimgehalt von $1,6 \times 10^4$ KbE/g. Eine Doppelbestimmung der Proben 8, 9 und 10 war nicht möglich.

Untersuchung auf *Enterobacteriaceae*

Auf 6 von 10 VRBD-Agarplatten waren sehr kleine, lilafarbene, im Agar eingeschlossene Partikel sichtbar. Durch den Einsatz eines EnteroPluri-Tests wurde ausgeschlossen, dass es sich hierbei um Mikroorganismen handelte. Weitere Kolonien wurden nicht festgestellt. Somit wurde *Enterobacteriaceae* in keiner der zehn untersuchten Proben nachgewiesen.

Untersuchung auf *Salmonella spp.*

Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung des XLD-Agars und des BGA-Agars sind im Anhang C dokumentiert. Auf den XLD-Agarplatten konnten keine typischen Salmonellenkolonien identifiziert werden. Auf mehreren BGA-Agarplatten und insbesondere auf der Probe Nummer 6 sind runde, rosafarbene Kolonien gewachsen. Diese waren jedoch von keiner roten Zone umgeben. Mit Hilfe mehrerer biochemischer Tests wurde ausgeschlossen, dass es sich bei den rosafarbenen Kolonien um den Mikroorganismus *Salmonella spp.* handelt. Insofern wurde *Salmonella spp.* in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen.

Untersuchung auf *Staphylococcus aureus*

Auf den BP-Agarplatten 5, 6 und 7 wurde ein Wachstum atypischer Kolonien festgestellt. Diese zeigten eine runde Form und eine schwarze Färbung auf. Es war keine glänzende Färbung festzustellen, wie es für Koagulase-positive Staphylokokken charakteristisch ist. Sie verfügten zudem über keinen opalisierenden Ring und waren von keiner Zone umgeben. Demnach wurden die Kolonien der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken zugeordnet. In den gesamten Proben wurden keine typischen Kolonien, die auf die Anwesenheit von *Staphylococcus aureus* hindeuten, nachgewiesen. Die Ergebnisse der Untersuchung können dem Anhang D entnommen werden.

Untersuchung zur Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen

Die Ergebnisse der ermittelten Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen sind in Abbildung 9 dargestellt. Für die Berechnung der Gesamtkeimzahl wurden ausschließlich Malzextrakt-Agarplatten ausgewertet, die ein Wachstum von mehr als 1 und weniger als 50 Kolonien aufwiesen. Offensichtliche Kontaminationen der Platten waren vorhanden und wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

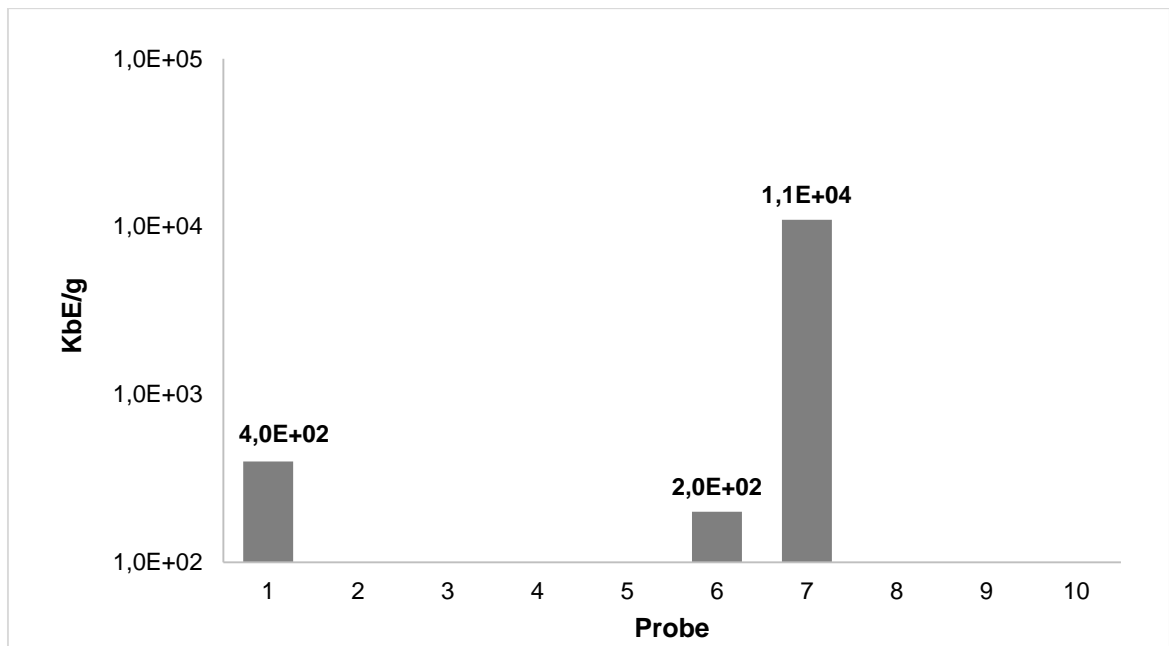


Abbildung 9: Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen

Wie in der Abbildung 9 dargestellt, wurden Werte von unterhalb der Nachweisgrenze von 100 KbE/g bis zum einem Keimgehalt von $1,1 \times 10^4$ KbE/g ermittelt. Am häufigsten wurde der Wert unterhalb der Nachweisgrenze von 100 KbE/g nachgewiesen. Insgesamt lagen 7 von 10 untersuchten Proben unterhalb der Nachweisgrenze, da keine Kolonien ersichtlich waren. Demgemäß liegt mehr als die Hälfte der Proben unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Proben 1 und 6 konnte ein Keimgehalt von $4,0 \times 10^2$ und $2,0 \times 10^2$ KbE/g ermittelt werden. Der höchste Wert lag bei $1,1 \times 10^4$ KbE/g und wurde in der Probe 7 nachgewiesen.

Der mikrobiologische Status essbarer Insekten ist bisher weitgehend unerforscht. Gemäß der Novel Food Verordnung und der Verordnung (EG) 178/2002 darf dieser keine Gefahr für die menschliche Gesundheit darstellen. Weitere Vorschriften in Bezug auf den Gehalt bestimmter Mikroorganismen in essbaren Insekten sind derzeit nicht festgelegt.

Für die Einordnung der ermittelten Ergebnisse wird folglich auf die mikrobiologischen Richt- und Warnwerte der DGHM zur Beurteilung von Lebensmitteln Bezug genommen. Sie sind nicht rechtskräftig, schaffen jedoch eine Grundlage zur Beurteilung des mikrobiologischen Status bestimmter Lebensmittel und Lebensmittelgruppen. Diese Richtwerte definieren die zu erwartende Diversität und den Gehalt an Mikroorganismen in einem spezifischen Lebensmittel bei Einhaltung einer guten Hygienepraxis. Ein Keim-

gehalt gleich dem Richtwert oder unterhalb dessen ist akzeptabel. Der Warnwert definiert den Anteil an Mikroorganismen, dessen Überschreitung auf die Verletzung der guten Hygiene- und Herstellungspraxis hinweist. Bei einer Überschreitung der Werte für pathogene Keime kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Gesundheitsgefährdung für den Verbraucher besteht (DGHM, 2012, S. 2). Wie in der Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen beschrieben (Kapitel 4), ist die Gruppe der essbaren Insekten in den Empfehlungen der DGHM nicht vertreten. Für die Einordnung des Keimgehaltes wird daher auf vergleichbare Lebensmittelgruppen zurückgegriffen. Mehlwürmer sind der Gruppe der tierischen Lebensmittel zuzuordnen. Wie auch bei rohen Fleischerzeugnissen ist vor dem Verzehr des Lebensmittels ein Durcherhitzen vorgesehen. Insofern werden die Mehlwürmer im rohen Zustand untersucht. Demgemäß wird für die Einordnung des ermittelten Keimgehaltes erneut auf die Lebensmittelgruppe der Fleischerzeugnisse zurückgegriffen. Besonderes Augenmerk fällt dabei auf die Richt- und Warnwerte von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene. Diese Einordnung wird dadurch gestützt, dass auf internationaler Ebene essbare Insekten ebenfalls anhand von Hackfleisch bewertet werden (Scientific Committee of the FASFC und Superior Health Council, 2014, S. 14).

Die untersuchten Mehlwürmer sind für den menschlichen Verzehr gezüchtet und verarbeitet worden. Somit ist anzunehmen, dass der ermittelte Keimgehalt mit den Richt- und Warnwerten der DGHM, die in Tabelle 2 dargestellt sind, konform ist.

Tabelle 2: Richt- und Warnwerte von ungewürztem Hackfleisch auf Handelsebene zur Beurteilung des mikrobiologischen Status gefriergetrockneter Mehlwürmer

Mikroorganismus	Richtwert	Warnwert	Maximaler Ermittelter Wert
	in KbE/g	in KbE/g	in KbE/g
Aerobe mesophile Keimzahl	5,0 x 10 ⁶	k.A.	1,6 x 10 ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ⁵	n.n.
Koagulase-positive Staphylokokken	5,0 x 10 ²	5,0 x 10 ³	n.n.
<i>Salmonella spp.</i>	k.A.	n.n. in 25 g	n.n. in 25 g
Hefen und Schimmelpilze	k.A.	k.A.	1,1 x 10 ⁴

k.A. = keine Angabe, n.n. = nicht nachweisbar

Quelle: DGHM, 2012, S. 25.

Der ermittelte Gehalt an aeroben mesophilen Keimen liegt, wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, mit mehr als einer Zehnerpotenz unterhalb des definierten Richtwertes. In der mikrobiologischen Untersuchung wurden die Proben auf *Staphylococcus aureus* untersucht, die für die Gruppe der Koagulase-positiven Staphylokokken repräsentativ sind. Es wurden weder Koagulase-positive Staphylokokken noch *Enterobacteriaceae* nachgewiesen. Diese liegen somit unterhalb des Richtwertes. Die Bedingung an das Nichtvorhandensein von Salmonellen in 25 g der Mehlwurmp Proben wird ebenfalls erfüllt. Empfehlungen hinsichtlich des Gehaltes an Hefen und Schimmelpilzen sind für das Lebensmittel Hackfleisch nicht definiert, sodass für die Einordnung weitere Lebensmittel miteinzubeziehen sind. Der Richtwert für Schimmelpilze in getrockneten Kräutern und Gewürzen liegt bei 1,0 x 10⁵ KbE/g. Der Richtwert für Hefen in Aufschnittwaren wie Brühwurst und Sülzen beträgt 1,0 x 10⁴ KbE/g. Von rohem Mischsalat liegt der Richtwert für Schimmelpilze bei 1,0 x 10³ KbE/g und für Hefen bei 1,0 x 10⁵ KbE/g. Die aufgeführten Lebensmittel sind für den direkten Verzehr, ohne ein weiteres Zubereitungsverfahren bestimmt. Demgegenüber liegt der Richtwert für Schimmelpilze von rohen oder teilgegartem Tiefkühlbackwaren, die vor dem Verzehr zu erhitzen sind, bei

$1,0 \times 10^4$ KbE/g (DGHM, 2012, S. 7-24). In den definierten Richtwerten wird zwischen dem Gehalt von Schimmelpilzen und Hefen differenziert. In der mikrobiologischen Untersuchung wird dabei nicht zwischen Hefen und Schimmelpilzen unterschieden. Der berechnete Keimgehalt von $1,1 \times 10^4$ KbE/g überschreitet die vorgeschriebenen Richtwerte nicht signifikant.

Wie zuvor angenommen, ist der ermittelte Keimgehalt mit den Richtwerten der DGHM konform. Um die Eignung der Mehlwürmer als sicheres Lebensmittel ausreichend beurteilen zu können, besteht die Notwendigkeit weitere Kriterien miteinzubeziehen.

7. Diskussion

Im Folgenden wird der ermittelte Keimgehalt diskutiert und die Eignung des Mehlwurms, repräsentativ für die Gesamtheit essbarer Insekten, als sicheres Lebensmittel beurteilt. Hierfür wird die Auswahl der Verfahren sowie die Versuchsdurchführung kritisch betrachtet und das Probenmaterial hinsichtlich der Repräsentativität für die Lebensmittelgruppe der essbaren Insekten bewertet. Anschließend werden Faktoren, die einen relevanten Einfluss auf den mikrobiologische Status der Mehlwürmer nehmen, diskutiert. Zudem dienen der Beurteilung vergleichbare wissenschaftliche Studien (Grabowski et al., 2014; Klunder et al., 2012).

7.1 Diskussion der Methoden

Für die mikrobiologischen Untersuchung wurden zehn unterschiedlichen Proben von Mehlwürmern des gleichen Herstellers verwendet. Der geringe Stichprobenumfang und die Beschränkung auf einen einzelnen Hersteller lassen jedoch nur eine begrenzte Repräsentativität der Ergebnisse für die Gruppe der Mehlwürmer zu. Ein breiteres Spektrum an Proben sowie verschiedene Hersteller und damit verbunden auch unterschiedliche Herstellungsprozesse bilden eine geeignete Grundlage für eine repräsentative Stichprobe. Die eingeschränkte Verfügbarkeit speziell für den menschlichen Verzehr gezüchteter essbarer Insekten in Deutschland erschwert dies jedoch erheblich. Anhand der untersuchten Mehlwürmer können dementsprechend nur begrenzt Rückschlüsse auf die Gesamtheit der essbaren Insekten als geeignetes Lebensmittel getroffen werden. Um eine repräsentative Aussage für essbare Insekten im Allgemeinen treffen zu können, ist eine Untersuchung eines breiteren Spektrums an Insektenarten notwendig.

Die mikrobiologische Untersuchung wurde in Anlehnung an die Methoden nach ASU § 64 LFGB und in Anlehnung an entsprechende ISO Normen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um standardisierte Verfahren, die für eine sichere und einheitliche Beurteilung von Lebensmitteln bestimmt sind. Lediglich für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen konnte auf kein standardisiertes Verfahren zurückgegriffen werden, sodass ein Tropfplattenverfahren angewendet wurde. Die vorhande-

nen Abweichungen in der Vorgehensweise zu den oben genannten Vorschriften werden im Folgenden hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung diskutiert.

Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl war keine Doppelbestimmung der Proben acht, neun und zehn möglich. In Anbetracht dessen konnte das arithmetische Mittel nur begrenzt berechnet werden. Da die Proben eins bis sieben keine signifikanten Unterschiede zwischen der Erst- und Zweitbestimmung aufwiesen, kann vermutet werden, dass die Proben acht bis zehn ebenfalls nur geringe Differenzen gezeigt hätten. Die PC-Agarplatten wurden bei der Keimzahlbestimmung gemäß Herstellerangaben für 48 h bei 37 °C bebrütet. Daher wurde die Bebrütung abweichend von der DIN EN ISO 4833-2:2013, die eine Bebrütungsdauer von 72 ± 3 h bei 30 °C vorschreibt, durchgeführt. Inwiefern diese Abweichung einen Einfluss auf die Anzahl der gewachsenen Keime genommen hat, kann rückblickend nicht ermittelt werden. Da die Bebrütungsdauer und Temperatur mit den Herstellerangaben konform waren, ist zu vermuten, dass auch bei längerer Bebrütungsdauer und geringerer Temperatur keine signifikant höhere Keimzahl nachweisbar gewesen wäre. Die anschließende Koloniezählung erfolgte manuell und ohne Zuhilfenahme von automatischen Gerätschaften, dadurch sind gegebenenfalls geringe Abweichungen der Zählung entstanden.

Anstelle des Gussplattenverfahrens wurde bei der Bestimmung von *Enterobacteriaceae* und *Staphylococcus aureus* eine Oberflächenimpfung mittels Spatelverfahren durchgeführt. Die Morphologie von Oberflächenkolonien lässt sich bei Ausplattierungsverfahren leichter erkennen (Bast, 2001, S. 301). Die Methode verbessert somit die Möglichkeiten der Differenzierung einzelner Kolonien. Das ermittelte Ergebnis weist gegebenenfalls höhere Keimzahlen auf, da die Mikroorganismen bei dem Spatelverfahren keinen hohen Temperaturen sowie keinen erheblichen Temperaturschwankungen ausgesetzt waren. Die verwendeten Methoden zur Analyse von *Enterobacteriaceae* und *Staphylococcus aureus* beinhalten einen qualitativen Nachweis mit anschließender Zählung. Abweichend dazu wurde in dieser Studie eine rein qualitative Untersuchung durchgeführt, daher wurde auf eine Doppelbestimmung verzichtet. Die Doppelbestimmung dient insbesondere als Bestätigung der ermittelten Ergebnisse und zum Ausschluss möglicher Kontamination. Da weder *Enterobacteriaceae* noch *Staphylococcus aureus* in den Proben nachgewiesen wurden, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass signifikante Abweichungen bei Durchführung einer Doppelbestimmung aufgetreten wären.

Die Untersuchung zur qualitativen Bestimmung von *Salmonella spp.* erfolgte in Anlehnung an die Methode L 00.00-20 nach ASU § 64 LFGB. Bei der Voranreicherung war die Probe im Brutschrank aufgrund von unzureichender Isolation einer Kontamination ausgesetzt. Anstelle des vorgeschriebenen Nährmediums wurde bei der selektiven Anreicherung Selenit-C-Bouillon verwendet. Diese Abweichung hat keinen Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchung. Wegen eines Irrtums bei der Berechnung wurde außerdem ein fälschliches Verhältnis zwischen angereicherter Probe und der entsprechenden Nährbouillon gewählt. Daher wurde eine neunmal höhere Menge der Probe in die RVS-Bouillon überführt. Diese höhere Konzentration bedeutet folglich auch einen höheren Anteil möglicher Salmonellenkolonien. Das Verhältnis zwischen angereicherter Probe und Selenit-C-Bouillon entsprach nur etwa einem Zehntel des vorgeschriebenen Wertes. Die geringe Konzentration lässt zwar gewisse Ungenauigkeiten in der Auswertung der Untersuchung zu, eignet sich jedoch weiterhin als Kontrollergebnis. Für den Ausstrich der angereicherten Kulturen wurde anstelle des Ösenausstriches die Oberflächenbeimpfung verwendet. Ziel des Ösenausstriches ist es, gut differenzierbare, einzelne Kolonien zu erhalten. Bei der Oberflächenbeimpfung wurde das Inokulum mit Hilfe einer Impföse verteilt. Abweichungen zwischen den Ausstrichverfahren nehmen keinen Einfluss auf das Ergebnis der Untersuchung. In allen zehn Proben konnte eine Diversität an Kolonien festgestellt werden. Ein EnteroPluri-Test ergab, dass sich unter diesen keine Salmonellen befinden. Die Mikroorganismen erklären sich durch die zuvor erwähnte Kontamination während der Voranreicherung im Brutschrank.

Bei der Untersuchung auf Hefen und Schimmelpilze erfolgte ebenfalls keine Doppelbestimmung. Dies führt zu einer Ungenauigkeit, die allerdings im Kontext vernachlässigt werden kann. Durch die anschließende manuelle Koloniezählung sind gegebenenfalls geringe Abweichungen entstanden.

Zuletzt sind auch einige allgemeine Fehlerquellen nicht auszuschließen, die bei einer mikrobiologischen Untersuchung auftreten können. Bei manuellen Messungen, wie beispielsweise bei der Einwaage des Probenmaterials und bei dem Auftragen des Inokulums auf die entsprechenden Agarplatten, ist von geringen Ungenauigkeiten und Abweichungen auszugehen. Zudem sind potentielle Kontaminationen über die Luft oder durch Kontakt zur untersuchenden Person nicht auszuschließen. Vorhandene Kontaminationen können den Ergebnissen zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl sowie der Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen entnommen werden (Anhang A und E). Da die Nährmedien und Reagenzien extern erworben wurden, kann

auch hier eine Kontamination nicht ausgeschlossen werden. Die aufgetretenen Ungenauigkeiten während der mikrobiologischen Untersuchung haben zu keinen signifikanten Abweichungen in den Ergebnissen geführt und können daher vernachlässigt werden.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Wie den Ergebnissen dieser Studie zu entnehmen ist (Kapitel 6), wurden in einigen Proben aerobe mesophile Keime sowie Hefen und Schimmelpilze nachgewiesen. Der ermittelte Keimgehalt kann auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden. Der Mehlwurm verfügt über eine eigene natürliche Mikroflora. Insbesondere im Intestinaltrakt des Mehlwurms ist eine hohe Diversität von Mikroorganismen vorzufinden (van Huis et al., 2013, S. 119). Des Weiteren ist eine Kontamination der Mehlwürmer während der Zucht, Verarbeitung und Lagerung möglich. Mikroorganismen können über den Menschen, technische Anlagen, unerwünschte Schädlinge sowie Umweltfaktoren wie Luft und Wasser übertragen werden (EFSA Scientific Committee, 2015, S. 17; Keweloh, 2009, S. 73f.; Marriott, 1992, S. 79ff.). Ein Einfluss des Futtermittels ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Zudem ist der Keimgehalt von der Vermehrung der Mikroorganismen im Lebensmittel abhängig. Faktoren, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen, werden in extrinsische und intrinsische Faktoren differenziert. Die jeweiligen Anforderungen an diese Faktoren variieren zwischen den einzelnen Mikroorganismen. Extrinsische Faktoren umfassen Einflüsse, die von außen auf das Lebensmittel einwirken. Hierzu zählen die Temperatur, die relative Luftfeuchte und die Zusammensetzung der Gasatmosphäre. Insbesondere bei der Lagerung kann das mikrobielle Wachstum, wie etwa durch die Reduktion der Temperatur, beeinflusst werden. Nähere Angaben zu den Zucht- und Lagerbedingungen der untersuchten Proben liegen nicht vor, sodass keine weiteren Aussagen diesbezüglich getroffen werden können. Intrinsische Faktoren resultieren aus den Eigenschaften des Lebensmittels selbst, wie etwa die Wasseraktivität (a_w -Wert), der pH-Wert, konkurrierende Mikroorganismen, der Nährstoffgehalt und das Redoxpotential (Krämer, 2011, S. 131; Marriott, 1992, S. 42-46). Der a_w -Wert beschreibt den für die Vermehrung von Mikroorganismen verfügbaren Anteil an Wasser in einem

Produkt (Zschaler und Heeschen, 2015, S. 93). Beeinflusst werden die intrinsischen Faktoren überwiegend von den Herstellungsverfahren (Krämer, 2011, S. 131).

Gemäß Herstellerangaben werden die untersuchten Mehlwürmer mit dem Verfahren der Gefriertrocknung verarbeitet. Hierbei wird der Mehlwurm zunächst eingefroren. Das anschließende Anlegen eines Vakuums unter Zufuhr von Wärme bewirkt ein Sublimieren des gefrorenen Wassers. Es kommt zum Entzug des Wassers, wodurch das Lebensmittel getrocknet wird. Hieraus resultiert ein geringerer a_w -Wert (Krämer, 2011, S. 177; Prändel et al., 1988, S. 274f.).

Der a_w -Wert der untersuchten Proben liegt nicht vor, dennoch ist davon auszugehen, dass das Verfahren der Gefriertrocknung einen signifikanten Einfluss auf den a_w -Wert der Mehlwürmer nimmt. Getrocknete Lebensmittel wie Trockenfrüchte weisen einen a_w -Wert von 0,60 bis 0,85 auf. Der a_w -Wert von getrockneten Linsen liegt bei 0,70, wohingegen eine halbgetrocknete Salami bereits über höhere a_w -Werte im Bereich 0,85 bis 0,93 verfügt. Demgegenüber liegt der a_w -Wert von frischem Fleisch bei über 0,98 (Wallhäußer, 1990, S. 40). In Anbetracht der Gegenüberstellung ist anzunehmen, dass der a_w -Wert gefriergetrockneter Mehlwürmer im Bereich von 0,60 bis 0,85 liegt. Der für das Wachstum erforderliche minimale a_w -Wert variiert zwischen den Mikroorganismen und ist in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Minimale a_w -Werte für das Wachstum der untersuchten und weiteren Mikroorganismen

Mikroorganismus	Minimaler a_w-Wert
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,95
<i>Salmonella spp.</i>	0,95
Hefen	0,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Schimmelpilze	0,80
Xerophile Schimmelpilze	0,60
Osmophile Hefen	0,60

Quelle: Krämer, 2011, S. 142; Riemelt et al., 2012, S. 51.

In Abhängigkeit von der Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber der Absenkung des a_w -Wertes, bewirkt der Entzug von Wasser eine Hemmung des Wach-

tums (Weber, 2010, S. 137). Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, ist die Toleranz gegenüber niedrigen a_w -Werten bei gramnegativen Bakterien wie Salmonellen und Enterobakterien am geringsten, da ein Wachstum unter einem a_w -Wert von 0,95 nicht mehr stattfindet. *Staphylococcus aureus* hingegen ist bis zu einem a_w -Wert von 0,86 zu Vermehrung fähig. Hefen und Schimmelpilze verfügen über einen weiten Toleranzbereich. Das Wachstum bestimmter Hefen und Schimmelpilze ist bis zu einem a_w -Wert von 0,6 möglich. Unter einem a_w -Wert von 0,6 wird ein Wachstum von Mikroorganismen ausgeschlossen.

Bislang sind keine wissenschaftlichen Untersuchungen hinsichtlich der Erhebung des mikrobiologischen Status gefriergetrockneter, speziell für den menschlichen Verzehr gezüchteter Mehlwürmern veröffentlicht wurden. Die weitere Beurteilung erfolgt daher anhand zweier vergleichbarer Studien, die in Relation zu den ermittelten Ergebnissen gesetzt werden. Es bestehen Differenzen in der Auswahl der untersuchten Mikroorganismen sowie in der Wahl des Probenmaterials.

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchung von Klunder et al. (2012, S. 628ff.) wird der Keimgehalt unverarbeiteter und verarbeiteter Mehlwürmer, die von einer Insektenfarm in den Niederlanden bezogen wurden, ermittelt. Verarbeitungsprozesse wie das Kochen mit anschließender Heißlufttrocknung kommen zum Einsatz. Ein abschließlicher Trocknungsprozess der Mehlwürmer ohne Wärmebehandlung wird nicht durchgeführt, sodass die Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse ausschließlich mit den unverarbeiteten Mehlwürmern erfolgt.

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchung von Grabowski, Jansen und Klein (2014, S. 48) wird der Keimgehalt von lebenden, aus zwei deutschen Tierfachgeschäften erworbenen Mehlwürmern, bestimmt. Die Auswahl der untersuchten Keime ist mit der für diese Untersuchung herangezogenen weitestgehend konform. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Gegenüberstellung des Keimgehaltes von unverarbeiteten, lebenden und gefriergetrockneten Mehlwürmern unterschiedlicher Bezugsquellen

Mikroorganismus	Insektenfarm unverarbeitet in KbE/g	Tierfachgeschäft lebend in KbE/g	Online-Händler gefriergetrocknet in KbE/g
Aerobe mesophile Keimzahl	$5,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^4$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$6,3 \times 10^6$	$5,1 \times 10^9$	n.n.
Staphylokokken	k.A.	$7,0 \times 10^7$	k.A.
Koagulase-positive Staphylokokken	k.A.	k.A.	n.n.
<i>Salmonella spp.</i>	k.A.	n.n.	n.n.
Hefen und Schimmelpilze	k.A.	$3,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^4$

k.A. = keine Angabe, n.n. = nicht nachweisbar

Quelle: Grabowski et al., 2014, S. 48; Klunder et al., 2012, S. 630.

Wie den Ergebnissen in Kapitel 6 zu entnehmen ist, weist der überwiegende Anteil der Proben innerhalb dieser Untersuchung einen Keimgehalt unterhalb der Nachweisgrenze auf. Folglich dienen der Gegenüberstellung ausschließlich die höchsten ermittelten Werte.

Der Gehalt an aeroben mesophilen Keimen und *Enterobacteriaceae* ist in den gesamten drei Studien bestimmt worden. Wie in der Tabelle 4 dargestellt, weisen die im Tierfachgeschäft erworbenen Mehlwürmer den höchsten Keimgehalt auf. Ausschließlich in den gefriergetrockneten Mehlwürmern sind keine Enterobakterien zu finden. Der Gehalt an Staphylokokken ist von Klunder et al. (2012, S. 630) nicht untersucht worden. In der Untersuchung der im Tierfachgeschäft erworbenen Mehlwürmer ist der Gehalt an Staphylokokken, ohne nähere Differenzierung in Koagulase-positive und -negative

Staphylokokken, dargestellt. Der Vergleich von Staphylokokken zwischen dieser Studie und der von Grabowski, Jansen und Klein (2014, S. 48) ist somit nur begrenzt möglich. In den gefriergetrockneten Mehlwürmern sind keine Koagulase-positiven Staphylokokken vorhanden, wie aus der Untersuchung auf *Staphylococcus aureus* hervorgeht. In den im Tierfachgeschäft erworbenen Mehlwürmern wurden Staphylokokken nachgewiesen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass keine Koagulase-positive Staphylokokken und demnach auch *Staphylococcus aureus* enthalten sind.

Wie der Gegenüberstellung zu entnehmen ist, weisen die gefriergetrockneten Mehlwürmer den geringsten Keimgehalt auf. Ursächlich hierfür kommen mehrere Faktoren in Betracht. Unverarbeitete und lebende Mehlwürmer werden in Relation zu bereits verarbeiteten Mehlwürmern gestellt. Zudem sind die Mehlwürmer für unterschiedliche Verbrauchsabsichten gezüchtet worden. Da von verschiedenen Zucht- und Lagerbedingungen auszugehen ist, können Differenzen in der Futterzusammensetzung, in der für die Vermehrung bereitgestellten Substrate sowie in der Zuchteinrichtung vorliegen. In den gefriergetrockneten Mehlwürmern sind neben einem geringen Keimgehalt weder Salmonellen noch Enterobakterien enthalten. Demgemäß kann eine Entleerung des Intestinaltrakt etwa mittels eines ein- oder mehrtägigen Fastens vermutet werden. Zudem ist die geringe Keimzahl auf das Verfahren der Gefriertrocknung zurückzuführen. Das Verfahren nimmt Einfluss auf den a_w -Wert der Mehlwürmer und folglich auf den mikrobiologischen Status der Proben, da das Wachstum der Mikroorganismen gehemmt wird. Bei einem niedrigen a_w -Wert sind bestimmte Hefen und Schimmelpilze zu Wachstum fähig, dadurch lässt sich der Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen in den Proben teilweise begründen. Der ermittelte Keimgehalt der gefriergetrockneten Mehlwürmer ist mit den Richtwerten der DGHM konform, daher kann eine guten Hygiene- und Herstellungspraxis vermutet werden.

Gemäß dem Hersteller sind die Mehlwürmer vor dem Verzehr zu erhitzen. Laut Klunder et al. (2012, S. 630f.) übt insbesondere das Kochen einen Einfluss auf den Keimgehalt aus und kann den Gehalt an aeroben mesophilen Keimen sowie *Enterobacteriaceae* signifikant reduzieren. Sporen hingegen sind gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, Kälte und Trockenheit resistent und können unter geeigneten Entwicklungsbedingungen wieder zu vegetativen Zellen auskeimen. Durch Erhitzungsprozesse werden sporenbildende Bakterien nicht vollständig eliminiert und stellen daher ein mögliches gesundheitliches Risiko dar (Klunder et al., 2012, S. 630; Weber, 2010, S. 32). Im Rah-

men dieser Untersuchung wurde der Gehalt an sporenbildenden Bakterien, die vorwiegend über den Kontakt zur Erde übertragen werden (Klunder et al., 2012, S. 631.), nicht bestimmt. Der Gehalt an sporenbildenden Bakterien ist in Mehlwürmern im Vergleich zu anderen Insektenarten gering. Dies kann unter anderem auf das für die Zucht verwendete Wachstumsmedium zurückgeführt werden (ebd., S. 630). Dieses setzt sich üblicherweise aus einem Futtermittel wie Weizenmehl oder Haferflocken mit Kleie sowie frischem Gemüse zusammen (Ghaly und Alkoaik, 2009, S. 321). Demnach ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination der Mehlwürmer mit sporenbildenden Bakterien gering. Ungeachtet dessen stellen hitzeresistente Sporen, die zudem von Hefen und Schimmelpilzen gebildet werden (Riemelt, Bartel, und Malczan, 2012, S. 170-175), ein relevantes gesundheitliches Risiko bei Insekten im Allgemeinen dar und sollten ferner bei weiteren Untersuchungen zur Beurteilung des mikrobiologischen Status essbarer Insekten berücksichtigt werden.

Des Weiteren ist die Berücksichtigung des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht zu vernachlässigen. Die gefriergetrockneten Mehlwürmer wurden im Februar 2016 erworben und sind mit dem Mindesthaltbarkeitsdatum 01. Dezember 2016 deklariert. Eine Veränderung des mikrobiologischen Status der Mehlwürmer während der Lagerung unter empfohlenen Bedingungen ist nicht auszuschließen. Weitere Kontaminationen über den Luftweg sind denkbar. Demnach wäre die Ermittlung der Keimzahl nach längerer, ordnungsgemäßer Lagerung, jedoch noch vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums ebenfalls zu empfehlen.

Die ermittelten Ergebnisse der untersuchten Mehlwürmer zeigen einen geringen Keimgehalt auf. Untersuchte pathogene Keime wurden nicht ermittelt. Somit gelten die untersuchten Mehlwürmer aus mikrobiologischer Sicht, hinsichtlich der untersuchten Mikroorganismen, als gesundheitlich unbedenklich. In Anbetracht dessen sind die untersuchten Mehlwürmer als sicheres Lebensmittel und für den menschlichen Verzehr als geeignet einzustufen. Um Rückschlüsse auf die gesamte Gruppe der essbaren Insekten treffen zu können bedarf es jedoch an weiterer Untersuchungen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Studie ist die Erhebung des mikrobiologischen Status essbarer Insekten am Beispiel des Mehlwurms. Hierfür wurde eine qualitative sowie eine quantitative mikrobiologische Untersuchung in Anlehnung an die ASU nach § 64 LFGB und entsprechende ISO Normen durchgeführt. Dabei wurden die Keimzahl der aeroben mesophilen Keime sowie die Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen quantitativ erfasst. Die Bestimmung von *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* und *Staphylococcus aureus* erfolgte qualitativ. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, konnten weder *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* noch *Staphylococcus aureus* in den Proben nachgewiesen werden. Das Wachstum aerober mesophiler Keime hingegen wurde in vier Proben mit einem Keimgehalt von $5,5 \times 10^2$ KbE/g bis $1,6 \times 10^4$ KbE/g und das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen in drei Proben mit einem Keimgehalt von $2,0 \times 10^2$ KbE/g bis $1,1 \times 10^4$ KbE/g festgestellt. In beiden Fällen wies die Probe sieben den höchsten Keimgehalt auf. Innerhalb der Bewertung und Diskussion des ermittelten Keimgehaltes wurden die untersuchten Mehlwürmer aus mikrobiologischer Sicht als sicher und für den menschlichen Verzehr geeignet eingestuft. Angesichts des geringen Stichprobenumfangs ist eine Aussage auf die Gesamtheit der essbaren Insekten nur bedingt möglich. Die physikalischen und chemischen Gesundheitsrisiken wie Toxine, Allergene, Schwermetalle oder Pestizide wurden nicht näher ermittelt. Zur Beurteilung der Lebensmittelsicherheit im Allgemeinen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Mangels spezifischer Rechtsvorschriften für Insekten als Lebensmittel wurde zur Beurteilung der Lebensmittelsicherheit der untersuchten Mehlwürmer unter anderem auf die Empfehlungen der DGHM für Hackfleisch auf Handelsebene zurückgegriffen. Der mikrobiologische Status essbarer Insekten wird von diversen Faktoren beeinflusst, daher ist die Gegenüberstellung essbarer Insekten mit Hackfleisch umstritten. Zum einen variiert der mikrobiologische Status zwischen einzelnen Insektenarten, zum anderen ist er von deren Verarbeitungsform abhängig (Klunder et al., 2012, S. 630). Ein Einfluss der Zucht- und Herstellungsbedingungen ist ebenfalls nicht auszuschließen. Spezifische Lebensmittelvorschriften für Insekten als Lebensmittel oder entsprechende Richt- und Warnwerte, welche die jeweiligen Einflussfaktoren berücksichtigen, würden die Beurteilung des mikrobiologischen Status essbarer Insekten erleichtern und damit die Bewertung der Sicherheit des Lebensmittels signifikant verbessern.

Kurzfassung

In Anbetracht der wachsenden Bevölkerung sowie der weltweiten Ressourcenknappheit gerät die Entomophagie vermehrt auch in den Fokus der westlichen Welt. Insekten können insbesondere als tierische Proteinquelle zur Sicherstellung der globalen Lebensmittelversorgung berücksichtigt werden. Trotz dieser zunehmenden Bedeutung ist das Wissen hinsichtlich des mikrobiologischen Status essbarer Insekten bisher begrenzt. Für das Inverkehrbringen essbarer Insekten auf dem deutschen Markt ist die Sicherheit des Lebensmittels zu gewährleisten. Als Teilaspekt zur Beurteilung dieser Sicherheit wird der mikrobiologische Status verarbeiteter Mehlwürmer anhand standardisierter Untersuchungsverfahren erhoben. Hierfür werden die Gesamtkeimzahl im Allgemeinen sowie die Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen quantitativ bestimmt. Zusätzlich erfolgt eine qualitative Untersuchung auf *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* und *Staphylococcus aureus*. Anhand der Ergebnisse wird das mikrobiologische Risiko erfasst und die Eignung des Mehlwurms, repräsentativ für die Gruppe der essbaren Insekten, als sicheres Lebensmittel beurteilt. Für die Untersuchung werden speziell für den menschlichen Verzehr gezüchtete und verarbeitete Mehlwürmer verwendet. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass weder *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* noch *Staphylococcus aureus* in den Proben enthalten sind. In weniger als der Hälfte der Proben sind aerobe mesophile Keime sowie Hefen und Schimmelpilze vorzufinden. Die untersuchten Mehlwürmer weisen somit eine geringe Keimzahl und keine pathogenen Keime auf. Folglich ist eine Gefahr der menschlichen Gesundheit durch den Verzehr der untersuchten Mehlwürmer aus mikrobiologischer Sicht auszuschließen. Der geringe Stichprobenumfang, die Beschränkung auf einen Hersteller und Bestimmung des Keimgehaltes nur einer Insektenart lassen lediglich eine begrenzte Repräsentativität der Ergebnisse zu. Um Rückschlüsse auf die Gesamtheit der essbaren Insekten zu ziehen, bedarf es somit weiterer Untersuchungen.

Abstract

In consideration of population growth and thus limited global resources, entomophagy attracts notice to western countries. Insects can be taken into account as a food and protein source to ensure global food supply. Despite this growing importance there is still very little known of the microbiological quality of edible insects. Distribution into the German market is restricted. For that it is necessary to provide complete safety of the product. One aspect of this assessment is evaluating the microbiological status of processed mealworms, by using standardized analytical methods. Therefore, the total viable aerobic count in general as well as the total count of yeasts and moulds is determined quantitatively. A qualitative evaluation concerning *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus* is also carried out. On the basis of these results the microbiological risk is captured and therefore the eligibility of mealworms, representing the group of edible insects, as safe food gets evaluated. The mealworms used for this research are specially cultured and processed for human consumption. Results show that neither *Enterobacteriaceae*, *Salmonella spp.* nor *Staphylococcus aureus* are present in the samples. There are aerobic mesophilic bacterial count present as well as yeasts and moulds in less than half of the samples. Analysed mealworms show little contamination with microorganisms and no pathogenic bacteria. The result of the microbiological analysis suggests that consumption of mealworms cannot harm human health in any way. The small number of samples, evaluation of only one species of insects obtained from one producer limit the representativeness of these results. To draw conclusions from edible insects at large more research needs to be done in the future.

Literaturverzeichnis

- Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (2004). Untersuchung von Lebensmitteln. Methode L 00.00-55: Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und anderen Spezies) in Lebensmitteln, Teil 1: Verfahren mit Baird Parker Agar.
- Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (2008). Untersuchung von Lebensmitteln. Methode L 00.00-123: Allgemeine Anforderung und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln.
- Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (2008). Untersuchung von Lebensmitteln. Methode L 00.00-20: Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella spp* in Lebensmitteln.
- Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (2010). Untersuchung von Lebensmitteln. Methode L 00.00-133/2: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Enterobacteriaceae* in Lebensmitteln, Teil 2: Koloniezählverfahren.
- Bast, E. (2001). Mikrobiologische Methoden, Eine Einführung in die grundlegenden Arbeitstechniken. (2. Ausg.). Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Baumgart, J., Becker, B., Stephan (Hrsg.), R. (2016). Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, - Ein Leitfaden für das Studium -. (6. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.
- Bellmann, H., Honomichl, K., Jacobs, W., Renner, M. (2007). Biologie und Ökologie der Insekten, Ein Taschenlexikon. (4. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Chinery, M. (1979). Insekten Mitteleuropas, Ein Taschenbuch für Zoologen und Naturfreunde. (2. Ausg.). Hamburg: Verlag Paul Parey.
- DGHM. (2012). Mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Hannover: DGHM e.V.
- EFSA Scientific Committee. (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. in: ej EFSA Journal, 13 (10), S. 1-60.

- Elmadfa, I. (2015). Ernährungslehre. (3. Ausg.). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- FAO (Hrsg.). (2010). Forest insects as food: humans bite back. Bangkok: FAO.
- Friederich, U., Volland, W. (1981). Futtermierzucht, Lebendfutter für Vivarientiere. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Ghaly, A., Alkokaik, F. (2009). The Yellow Mealworm as a Novel Source of Protein. in: American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4, S. 319-331.
- Grabowski, N., Jansen, W., Klein, G. (2014). Microbiological status of edible insects sold as pet feed in Germany. in: FAO/WUR, International Conference, Insects to Feed the World (S. 48). Niederlande: FAO/WUR.
- Günther, K., Hannemann, H.-J., Hieke, F., Königsmann, E., Schumann, H. (1968). Urania Tierreich, Insekten. Leipzig: Urania-Verlag Leipzig/Jena/Berlin.
- Halloran, A., Vantomme, P. (2013). Der Beitrag von Insekten zur Nahrungssicherheit, Lebensunterhalt und Umwelt. Rom: FAO.
- Heeschen (Hrsg.), W. (1989). Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Hamburg: Behr's Verlag.
- Heeschen, W. (2012). Pathogene Mikroorganismen, Zoonosen, Band I: Bakterielle Erreger von Infektionen und Intoxikationen. (2. Ausg., Bd. 1). Hamburg: Behr's Verlag.
- Holzappel (Hrsg.), W. H., Baumgart, J., Heeschen, W., Zschaler, R., Freiherr v. Rheinbaben, F. (2004). Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene (3. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.
- Keweloh, H. (2009). Mikroorganismen in Lebensmitteln, Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene. (3. Ausg.). Haan-Grutten: Fachbuchverlag Pflanzeberg.
- Klunder, H., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J., Nout, M. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. in: Food Control 26, S. 628-631.
- Krämer, J. (2011). Lebensmittel-Mikrobiologie. (6. Ausg.). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Marriott, N. G. (1992). Grundlagen der Lebensmittelhygiene. Hamburg: Behr's Verlag.

- Norm DIN EN ISO 6887-1. (1999). Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln, Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen, Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen.
- Norm DIN EN ISO 4833-2. (2013). Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen - Teil 2: Koloniezählung bei 30 °C mittels Oberflächenverfahren.
- Prändel, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H.-J. (1988). Handbuch der Lebensmittel-Technologie, Fleisch Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Rempe, C. (2014). Hui oder pfui: Insekten in der menschlichen Ernährung. in: Ernährung im Fokus, S. 198-202.
- Riemelt (Hrsg.), I., Bartel, B., Malczan, M. (2012). Milchwirtschaftliche Mikrobiologie (2. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.
- Rumpold, B., Schlüter, O. (2013). Nutritional composition and safety aspects of edible insects. in: Molecular Nutrition & Food Research, 75 (5), S. 802-823.
- Scientific Committee of the FASFC, und Superior Health Council. (2014). Food safety aspects of insects intended for human consumption. Brüssel: Scientific Committee of the FASFC, Superior Health Council.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., de Haan, C. (2006). livestock's long shadow, environmental issues and options. 2006: FAO.
- Stephan, R., Lehner, A., Zweifel, C., Hächler, H. (2014). Pathogene Mikroorganismen, Non-typhöse Salmonellen, Lebensmitthygienische Bedeutung. Hamburg: Behr's Verlag.
- van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Harmke, K., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome: FAO.
- Veldkamp, T., van Duinkerken, G., van Huis, A., Lakemond, C., Ottevanger, E., Bosch, G., und van Boekel, M. (2012). Insects as a sustainable feed ingredient in pig

and poultry diets - a feasibility study. Lelystad: Wageningen UR Livestock Research.

VWR Chemicals. (2013). Technical Data Sheet, Brilliant Green Agar: https://uk.vwr.com/store/asset?assetURI=https://uk.vwr.com/stibo/hi_res/std.lanng.all/77/86/11237786.pdf. Stand: 04. 04. 2016.

Wallhäußer, K. H. (1990). Lebensmittel und Mikroorganismen, Frischware - Konservierungsmethoden - Verderb. Darmstadt : Steinkopff Verlag Darmstadt.

Weber (Hrsg.), H. (2010). Mikrobiologie der Lebensmittel, Grundlagen. (9. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.

Weidner, H., Sellenschlo, U. (2003). Vorratsschädlinge und Hausungeziefer, Bestimmungstabellen für Mitteleuropa. (6. Ausg.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Wyniger, R. (1974). Insektenzucht, Methoden der Zucht und Haltung von Insekten und Milben im Laboratorium. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

Zschaler, R., Heeschen, W. (2015). Fragen & Antworten, Prozesshygiene. (2. Ausg.). Hamburg: Behr's Verlag.

Rechtsquellenverzeichnis

- Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, ABl. Nr. L 031, S. 1, zuletzt geändert durch Verordnung (EU) Nr. 652/2014 des Europäischen Parlaments und Rates vom 15. Mai 2014, ABl. Nr. L 188, S. 1Wyniger, R. (1974). Insektenzucht, Methoden der Zucht und Haltung von Insekten und Milben im Laboratorium. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
- Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 er mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, ABl. L 338, S. 1, zuletzt geändert durch die Verordnung (EU) Nr. 217/2014 der Kommission vom 7. März 2014, Abl. Nr. L 69, S. 93
- Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten, ABl. L 043, p.1, zuletzt geändert durch Verordnung (EG) Nr. 596/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Juni 2009, ABl. Nr. L 188, S. 14
- Verordnung (EU) Nr. 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. November 2015 über neuartige Lebensmittel, zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates und der Verordnung (EG) Nr. 1852/2001 der Kommission, ABl. Nr. L327, S. 1

Anhang

Anhangsverzeichnis

Anhang A: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: Gesamtkeimzahl	50
Anhang B: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: <i>Enterobacteriaceae</i>	51
Anhang C: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: <i>Salmonella spp.</i>	52
Anhang D: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Anhang E: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen	59
Anhang F: Geräte und Kleinmaterialien	60
Anhang G: Nährmedien und Reagenzien	63

Anhang A: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: Gesamtkeimzahl

Tabelle A 1: Untersuchungsmenge

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Einwaage										
in g	9,94	9,95	10,01	10,10	10,00	9,96	9,99	9,59	9,99	9,69

Tabelle A 2: Quantitative Auswertung des PC-Agars

Verdünnung		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Platte										
10¹	1	2	1	1	4	3	5	159	3	6	3
	2	9	0	0	2	1	4	142	/	/	/
10²	1	1	1	0	0	0	2	22	0	0	2
	2	3	0	0	0	0	1	18	/	/	/
10³	1	0	0	3	0	0	5	2	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	2	/	/	/
10⁴	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	0	0	1	0	0	2	0	/	/	/
10⁵	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	0
	2	0	0	4	0	0	1	1	/	/	/
10⁶	1	1	0	1	6	0	1	0	0	0	0
	2	0	0	1	3	0	1	0	/	/	/

Anmerkung: Doppelbestimmung der Proben 8, 9 und 10 war nicht möglich

Anhang B: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: *Enterobacteriaceae*

Tabelle B 1: Qualitative Auswertung des VRBG-Agars

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anzahl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aussehen	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Anhang C: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: *Salmonella spp.*

Tabelle C 1: Untersuchungsmenge *Salmonella spp.*

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Einwaage in g	20,03	25,08	25,00	25,03	24,97	25,06	25,01	25,03	25,01	24,99

Tabelle C 2: Qualitative Auswertung des XLD-Agars

Probe	Selenit-C-Bouillon	RSV-Bouillon
1	rosa Spur, schleimig, glänzend, zusammenhängende, Rand der Spur teils gelblich, vereinzelt rosa Kolonie, gelbe Zone, d = 0,2-2,0 mm, rund, glänzend, Agar: gelbe Färbung, Rand orange	gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, unterer Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, vereinzelt weißgelbe Kolonien mit Zone, d = 0,2-2,0 mm, Agar: gelbe Färbung
2	rosagelbe Schleier, glänzend, zusammenhängend, raue Oberfläche, einzelne rosa Kolonie, gelbe Zone, rund, glänzend, d = 0,2-4,0 mm, Agar: gelbe Färbung, Rand orange	gelber Schleier, schleimig, transparent, mit vielen gelben Kolonien, teils mit Zone, rund, glänzend, d = 0,1-1,0 mm, Agar: gelbe Färbung
3	rosa Spur, schleimig, zusammenhängend, transparent, mit zwei Phasen, unterer Schleier: glatt, obere Spur rau: glänzende Oberfläche, Agar: orangegelbe Färbung	gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend, transparent, gelbe Kolonien mit Zone, Agar: gelbe Färbung
4	rosa Schleier, transparent, schleimig, zusammenhängend, teils umgeben von schleimiger, glänzenden	gelbe Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, außerhalb der

Probe Selenit-C-Bouillon

Spur, zusammenhängend, im Schleier kleine rauer Bereich mit rosa Kolonien, d = 0,1 mm, außerhalb rosa Kolonie, gelbe Zone, glänzend, glatt, scharfer Rand, erhaben, d = 0,3-2,0 mm, Agar: gelbe Färbung, Rand orange

- 5** rosa Schleier, schleimig, zusammenhängend, glatt, mit vielen kleinen kräftig rosafarbene Kolonien, teils, gelbe Zone, d = 0,1-0,3 mm, Schleier teils gelblich, Agar: gelbe Färbung, Rand orange
- 6** rosa Schleier, transparente, schleimig, zusammenhängend, beinhaltet viele kleine kräftig rosafarbene Kolonien, glänzend, rund, scharfer Rand, d = 0,1-0,3 mm, am Rand des Schleiers: hellrosa Spur, schleimig, glänzend, zusammenhängend, Agar: gelbe Färbung, Rand rot
- 7** rosa Schleier, transparenter, umgeben von schleimiger, hellrosa Spur, glänzend, auf Schleier viele kleine rosa Kolonien, gelbe Zone, d = 0,2-2,0 mm, außerhalb Kolonien, perl-

RSV-Bouillon

Spur, einzelne Kolonie, perlmuttartiger Glanz, rund, erhaben, scharfrandig, d = 0,2-2,0 mm, Agar: seitlich gelbe Färbung

gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, untere Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, außerhalb einzelne Kolonien, perlmuttartiger Glanz, rund, scharfer Rand, erhaben, d = 0,3-1,5 mm, Agar: gelbe Färbung

gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, unterer Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, Agar: gelbe Färbung

gelber Schleier, transparenter, mit vielen gelben Kolonien, glänzend, d = 0,1-1,0 mm, außerhalb gelbe Kolonien mit Zone, perlmuttartiger Glanz, Agar: gelbe Färbung

Probe Selenit-C-Bouillon**RSV-Bouillon**

muttartiger Glanz, rund, scharfrandig, erhaben d = 1,0-2,0 mm, Agar: gelbe Färbung

- 8** rosa Schleier, transparent, Rand des Schleiers teils gelblich, schleimig, glänzend, außen Kolonien, teils rosa mit gelber Zone, teils perlmuttartiger Glanz, rund, erhaben, d = 0,2-2,0 mm, Agar: teils gelblich, teils rot, teils orange

gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, unterer Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, außen fünf Kolonien, perlmuttartig, rund, glänzend, scharfrandig, erhaben, eine gelbe Kolonie mit Zone, flache Oberfläche, d = 2,0 mm, Agar: gelbe Färbung

- 9** rosa Schleier, transparenter, umgeben von schleimiger, hellrosa Spur, glänzend, auf Schleier, viele kleine Kolonien, rosa, runde Kolonien, außerhalb sechs rosa Kolonien mit gelben Zone, eingesunken, glänzend, Agar: gelbe Färbung, Rand orange

gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, untere Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, außerhalb zwölf gelbe Kolonien mit Zone, glänzend, d = 0,5-2,0 mm, Agar: gelbe Färbung

- 10** rosa Schleier, transparenter, schleimig, zusammenhängend, beinhaltet viele kleine kräftig rosafarbene Kolonien, glänzend, rund, außerhalb drei rosa Kolonien, gelbe Zone, sieben gelbe Kolonien, gelbe Zone, Agar: gelbe Färbung

gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, untere Schleier, matt, leicht transparent, obere Spur, glänzend, raue Oberfläche, Agar: gelbe Färbung

d = Durchmesser

Tabelle C 3: Qualitative Auswertung des BGA-Agars

Probe	Selenit-C-Bouillon	RSV-Bouillon
1	rosa Spur, schleimig, am äußeren Rand teils gelblich, Oberfläche teils glatt eben, teils uneben rau, transparent, glänzend, außerhalb rosa Kolonien, gelbe Zone, teils rund, teils unförmig, d = 0,1-0,5 mm, Agar: grünelbe Färbung	weißgelbe Spur, schleimig, glänzend, glatt, einheitlich, ebene Oberfläche, weit zusammenhängendes Wachstum, eine gelbe Kolonie mit Zone, rund, glänzend, Agar: grünelbe Färbung
2	rosa Spur, glänzend, schleimig, mit kräftig rosafarbene Kolonien, d = 1 mm, Agar: rotorange Färbung	gelber Schleier, schleimig, mit vielen zusammenhängenden größeren tröpfchenartigen Spuren, laufend, glänzend, Agar: grünelbe Färbung
3	rosa Spur, leicht transparent, schleimig, glatte Oberfläche, zusammenhängend, Agar: rotorange Färbung	gelbe Spur, mit zwei Zonen, glatte und raue Zonen überlappend, zusammenhängend, teils mit vereinzelt laufenden Spuren, transparent, Agar: grünelbe Färbung
4	rosa Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, einheitlich, äußerer Rand teils gelblich, Agar: grünelbe Färbung	gelb Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, überlappend, einheitlich, Agar: grünelbe Färbung
5	rosa Spur, schleimig, transparent, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenhängend, Agar: grünelbe Färbung	gelbe Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenhängend, einheitlich, Agar: grünelbe Färbung
6	rosa Schleier, schleimig, glänzende Oberfläche, transparent, kräftig rosafarbene Kolonien, d = 0,1-0,3 mm,	gelber Schleier, einheitlich, transparent, aufliegend, gelb, glänzende

Probe Selenit-C-Bouillon**RSV-Bouillon**

	umgeben von rosa Spur, schleimig, einheitlich, glatt, glänzende Oberfläche, Agar: grüne Färbung	Spuren, glatte Oberfläche, einheitlich, Agar: grüne Färbung
7	rosa Spur, schleimig, transparent, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenhängend, Agar: grün-gelbe-orange Färbung	gelbe Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenhängend, einheitlich, Agar: grüngelbe Färbung
8	rosa Spur, schleimig, transparent, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenhängend, Agar: grün-gelbe-orange Färbung	gelbe Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenfassend, einheitlich, leicht transparent, äußerer Rand intensivere Farbe, Agar: grüngelbe Färbung
9	rosa Spur, schleimig zusammenhängend, transparent, innen glatte Oberfläche, außen raue Oberfläche, unebener, gezackter Rand, Agar: rote Färbung	gelbe Spur, einheitlich, zusammenhängend mit zwei Phasen, unterer Schleier: matt, leicht transparent, obere Spur: glänzend, raue Oberfläche, Agar: grüngelbe Färbung
10	rosagelbe Spur, schleimig, glatte Oberfläche, zusammenhängend, glänzend mit kräftig rosafarbenen Rand, Agar: grüngelbe Färbung	gelbe Spur, schleimig, glänzend, glatte Oberfläche, zusammenfassend, einheitlich, gelbe Kolonien mit gelber Zone und gelbe Kolonien mit rosa Zone, Agar: grüngelbe Färbung

d = Durchmesser

Tabelle C 4: Ergebnisse der biochemischen Tests

Katalase-Test	positiv
Oxidase-Test	negativ
Gramfärbung	gramnegativ
Mikroskopie	rote Stäbchen und rote Kokken

Tabelle C 5: Ergebnisse des EnteroPluri-Tests

Codenummer	4 0 0 0	4 0 2 0
Mikroorganismus	Yersinia pestis	Shigella boydii
	Shigella spp.	Pantoea agglomerans
	Pantoea agglomerans	

Anmerkung: Keine eindeutige Reaktion der Lactosekammer

Anhang D: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: *Staphylococcus aureus*

Tabelle D 1: Qualitative Auswertung des BP-Agars

Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Anzahl	0	0	0	0	1	4	43	0	0	0
Aussehen					d = 0,1 mm, schwarz, rund, scharf- randig, erhaben, keine Zone	d = 1,0 mm, schwarz, rund, scharf- randig, erhaben, keine Zone	d = 0,3-1,0 mm, schwarz, rund, scharfrandig, erhaben, keine Zone			

Anhang E: Mikrobiologischer Untersuchungsbericht: Gesamtkeimzahl von Hefen und Schimmelpilzen

Tabelle E 1: Quantitative Auswertung des Malzextrakt-Agars

Verdünnung											
Probe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10¹	2	0	0	0	0	1	55	0	0	0	
10²	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	
10³	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
10⁴	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
10⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Anhang F: Geräte und Kleinmaterialien

Tabelle F 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage, Sartorius M-pac AX 2202	Sartorius
Autoklave, Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG
<u>Brutschrank</u>	
Brutschrank, 50 L, 42 °C (Typ: B 5042)	Heraeus
HERATHERM Incubator, 37 °C	Thermo Electron LED GmbH
INCU-Line® IL 10, 30 °C (SN: 1100702)	VWR International bvba
INCU-Line® IL 10, 30 °C (SN: 1100708)	VWR International bvba
INCU-Line® IL 10, 37 °C (SN: 11100706)	VWR International bvba
INCU-Line® IL 10, 37 °C (SN: 11100707)	VWR International bvba
INCU-Line® IL 10, 37 °C (SN: 11080599)	VWR International bvba
INCU-Line® IL 10, 37 °C (SN: 14051879)	VWR International bvba
Bunsenbrenner, Fuego SCS basic	WLD-TEC GmbH
Kühlschrank, Typ: Nr. KSV36VL40	BOSCH
Mikroskop, Primo Star	ZEISS
<u>Pipette</u>	
Halmpipette Acura® manual 810	SOCOREX
Transferpipette® S, 100 µl	BRAND
Transferpipette® S, 1000 µl	BRAND
Reagenzschüttler, IKA®Vortex 1	IKA®-Werke
Stomacher, BagMixer® 400	interscience INTERNATIONAL

Tabelle F 2: Kleinmaterialien

Kleinmaterial	Hersteller
Aluminium-Folie, SYLVANA	Penny Markt GmbH
Besteck, steril	
Codebook, EnteroPluri-Test	Liofilmchen®
Deckgläser, Menzel-Gläser, 18x18 mm	VWR International GmbH
Drigalskispatel	Heathrow Scientific® LLC
Einmalhandschuhe, Rotiprotect-NITRIL	Carl Roth GmbH & Co. KG
Entsorgungsbeutel, 200x300 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Färbebank	Assistent
Händedesinfektionsmittel, L	ECOLAB Skinman® soft
Impföse, Ø 1 mm	VWR International GmbH
Impföse, Ø 5 mm	VWR International GmbH
Kartusche, Butan 10 CV360	CAMPINGAZ
Klammer, Holz	
<u>Objektiv</u>	
Primo, Plan-Achromat 100x/1,25 Oil	ZEISS
Primo, Plan-Achromat 10x/0,25	ZEISS
Primo, Plan-Achromat 40x/0,65	ZEISS
Primo, Plan-Achromat 4x/0,10	ZEISS
Objektträger, 76x26x1 mm	VWR International GmbH
Okular, WF10X/18	ZEISS
Pinzette, Metall	
Pipettenspitze, 1 ml	SOCOREX
Pipettenspitze, 100 µl	BRAND
Pipettenspitze, 1000 µl	BRAND
Reagenzglasständer	Kartell®
Regalhalter	Thermo Science
Schutzbrille	LABSOLUTE®
Spritzflasche, 500 ml	VITLAB®
Ständer für Stomacherbeutel, Bag Rack®	interscience
Beutelöffner, Stomacher® 400 Bag Opener	seward
Stomacherbeutel, 180x300 mm, 400 ml	VWR International GmbH
Tipbox, 100 µl	BRAND

Kleinmaterial**Hersteller**

Tipbox, 1000 µl

VWR International GmbH

Tütenständer aus Edelstahl

Überschuhe, HYGOSTAR® PP- Überschuh

Carl Roth GmbH & Co. KG

Verschlussfolie, PARAFILM® M

Carl Roth GmbH & Co. KG

Wischtücher Advanced

TORK

Anhang G: Nährmedien und Reagenzien

Tabelle G 1: Nährmedien und Reagenzien

Nährmedium und Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
Alkohol (Ethanol 96 %)	ROTH	T171.5
Baird-Parker-Agar	VWR	100063UA
Brilliantgrün-Agar	VWR	100121ZA
demineralisiertes Wasser		
Fuchsin-Lösung	WALDECK	2C-148
gepuffertes Peptonwasser, 225 ml	VWR	310173ZA
gepuffertes Peptonwasser, 9 ml	OXOID	TV5013D
gepuffertes Peptonwasser, 90 ml	VWR	400173ZA
Immersionsöl (Immersol 518 F)	ZEISS	4449600000000
Karbol-Gentianaviolett-Lösung	ROTH	CN00.1
Kovacs-Indolreagenz	MERCK	1.113.500.001
Kristallviolett-Neutralrot-Galle- Glucose-Agar	VWR	101203ZA
Lugolsche-Lösung (Iod-Iodkalium-Lösung)	WALDECK	3D-072
Malzextrak-Agar	VWR	100544ZA
Plate-Count-Agar	AppliChem	4537990922
Rappaport-Vassiliadis-Bouillon	VWR	313552ZA
Selenite-Cystine-Bouillon	VWR	600954ZA
Teststreifen (Bactident® Oxidase)	MERCK	1.133.000.001
Voges-Proskauer-A-Reagenz	BD	261192
Voges-Proskauer-B-Reagenz	BD	261193
Wasserstoffperoxid (Bactident® Katalase)	MERCK	1.1135.
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar	VWR	103542ZF

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Natalja Langolf