

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Department Ökotrophologie

Studiengang Ökotrophologie

Untersuchungen zur Verifizierung des Nachweises von koagulase-positiven Staphylokokken, Salmonellen und *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Starterkulturpräparaten

-Diplomarbeit-

vorgelegt am 18. September 2007

von

Manuela Wanger

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Betreuender Professor: Prof. Dr. Michael Häusler, HAW Hamburg

Korreferent: Dr. Roy Hörner, SGS Germany GmbH

Danksagung

Hiermit möchte ich der SGS, insbesondere Herrn Hörner, Frau Globisch und dem gesamten Mikrobiologie-Team für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung des Materials während der Bearbeitung meiner Diplomarbeit danken.

Der Blessing Biotech GmbH möchte ich für das Bereitstellen des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Probenmaterials danken.

An der Hochschule für angewandte Wissenschaften möchte ich hiermit Herrn Prof. Dr. Michael Häusler für die Betreuung während der Bearbeitung der Diplomarbeit danken.

Des Weiteren danke ich Antonia Jakobi für die gemeinsam mit unseren Diplomarbeiten verbrachten Stunden, die sehr hilfreich waren beim Erstellen der Arbeit.

Für die emotionale und auch finanzielle Unterstützung während meines Studiums und der Zeit der Diplomarbeit möchte ich meinen Eltern und Tobias Henschel danken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Einleitung	10
2 Theoretische Grundlagen	12
2.1 Allgemeine Bakteriologie	12
2.2 Starterkulturen	15
2.3 <i>S. aureus</i>	17
2.4 <i>Salmonella spp</i>	19
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3 Praktischer Teil	23
3.1 Material	23
3.1.1 Probenmaterial	23
3.1.2 Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien	24
3.1.3 Beimpfungskulturen	25
3.1.4 Sterilisation des Materials	26
3.2 Quantitatives Nachweisverfahren von <i>S. aureus</i>	27
3.2.1 Nährmedien und Reagenzien	27
3.2.2 Methoden	28
3.2.3 Ergebnisse	32
3.2.4 Bewertung	47

3.3	Qualitativer Nachweis von <i>Salmonella spp.</i>	48
3.3.1	Nährmedien und Reagenzien	48
3.3.2	Methoden	49
3.3.3	Ergebnisse	55
3.3.4	Bewertung	61
3.4	Qualitativer Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	62
3.4.1	Nährmedien und Reagenzien	62
3.4.2	Methoden	63
3.4.3	Ergebnisse	69
3.4.4	Bewertung	86
4	Diskussion	87
4.1	Diskussion der Ergebnisse des <i>S. aureus</i> Nachweises	88
4.2	Diskussion der Ergebnisse des Salmonellen Nachweises	90
4.3	Diskussion der Ergebnisse des <i>Listeria monocytogenes</i> Nachweises	91
5	Zusammenfassung	93
6	abstract	95
7	Literaturverzeichnis	96

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ALOA	Listerien- Agar nach Ottaviani und Agosti
ATCC	American Type Culture Collection
ASU	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren
BP	Baird- Parker Nährboden
BPLS	Brillantgrün- Phenolrot- Lactose– Agar
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Petersen- Medium und Teststämme
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EFFCA	European Food and Feed Cultures Association
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KbE	Kolonie bildende Einheiten
L.	<i>Lactobacillus</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MKTT	Tetrathionat- Anreicherungsbouillon nach Muller- Kauffmann
MPN	Most propable number
RVS	Rappaport- Vassiliadis- Sojamehlpepton
S.	<i>Staphylococcus</i>
SGS	Société Générale de Surveillance
TSA	Trypton- Soya- Agar
TSYEA	Trypton- Soja- Hefe- Extrakt- Agar
XLD	Xylose- Lysin- Desoxycholat- Agar

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aufbau einer Bakterienzelle_____	12
2.2	Wachstumsphasen der Bakterien_____	14
2.3	Mikroskopische Aufnahme von Staphylokokken_____	17
3.1	Typische <i>S. aureus</i> Kolonien auf BP-Agar_____	28
3.2	Verdächtige Giolitti-Cantoni-Bouillon in fünf Verdünnungsstufen_____	30
3.3	Bestätigung von <i>S. aureus</i> mit <i>Stapytect plus</i> durch positive Koagulase-Reaktion_____	31
3.4	Probe 1 auf BP-Agar nach 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C_____	33
3.5	Probe 9 auf BP-Agar nach 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C_____	33
3.6	Probe 10 auf BP-Agar nach 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C_____	33
3.7	Probe 6 Bebrütungstemperatur 37 °C mit $3,6 \cdot 10^3$ Keimen / g beimpft_____	39
3.8	Probe 6 Bebrütung bei 44 °C mit $3,6 \cdot 10^3$ Keimen / g beimpft_____	39
3.9:	Mit <i>S. aureus</i> beimpfte Probe 1 in den Verdünnungen 1-5 auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C_____	40
3.10:	Giolitti-Cantoni-Bouillon mit Probe 1 nach der Bebrütung bei 37 °C_____	43
3.11	Positiver Ausstrich aus Giolitti-Cantoni-Bouillon auf BP-Agar_____	46
3.12	Negativer Ausstrich aus Giolitti-Cantoni-Bouillon auf BP-Agar_____	46
3.13	Typische Salmonellen-Kolonien auf XLD-Agar_____	51
3.14	Typische Salmonellen-Kolonien auf BPLS-Agar_____	52
3.15	Typische Salmonellen-Biochemie_____	53
3.16	Senkung des pH-Wertes während 20 Std. Voranreicherung durch die Proben 1-10 in gepuffertem Peptonwasser_____	55
3.17	Senkung des pH-Wertes während 20 Std. Voranreicherung durch die Proben 1-10 in doppelt konzentriertem gepufferten Peptonwasser_____	56

3.18	Verdächtige Kolonien auf XLD- (links) und BPLS- (rechts) Platten im Verdünnungsausstrich	59
3.19	Listerien-Kolonien auf TSYE-Agar über dem Schräglicht der Henry-Lampe	63
3.20	Typische <i>Listeria monocytogenes</i> -Kolonien auf Aloa-Agar	65
3.21	Typische <i>Listeria monocytogenes</i> -Kolonien auf Oxford-Agar	66
3.22	Positiver CAMP-Test	67
3.23	Biochemische Reaktionen, die auf <i>Listeria monocytogenes</i> hinweisen	67
3.24	Türkise Färbung des Aloa-Agars	70
3.25	Schwarze Färbung des Oxford-Agars	70
3.26	Gelbe Schliere und Kolonien auf Oxford-Agar	70
3.27	Weißer Schliere auf Aloa-Agar	70
3.28	pH-Veränderung während der primären Anreicherung in Halbfraser-Bouillon	71
3.29	pH-Veränderung während der sekundären Anreicherung in Vollfraser-Bouillon	71
3.30	Typische und untypische Kolonien auf Aloa Agar	75
3.31	Typische und untypische Kolonien auf Oxford-Agar	75
3.32	Reaktion mit Rhamnose und Xylose	80
3.33	CAMP-Test	80
3.34	Zweite Verdünnung der Probe 7 auf Aloa-Agar	82
3.35	Erste Verdünnung der Probe 7 auf Oxford Agar	82
3.36	Erste Verdünnung der Probe 10 auf Aloa-Agar	83
3.37	Erste Verdünnung der Probe 10 auf Oxford-Agar	83

Tabellenverzeichnis

3.1	Verhalten der Starterkulturen auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 37 °C	32
3.2	Quantitative Bestimmung von <i>S. aureus</i> in den Starterkulturpräparaten auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 37 °C	35
3.3	Quantitative Bestimmung von <i>S. aureus</i> in den Starterkulturpräparaten auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C	37
3.4	Quantitative Bestimmung von <i>S. aureus</i> in Probe 1 in den Verdünnungen 1-5 auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C	40
3.5	Quantitativer Nachweis verschiedener <i>S. aureus</i> -Stämme bei 37 °C im Vergleich zu 44 °C	41
3.6	Anzahl verdächtiger Giolitti-Cantoni-Bouillon-Röhrchen der Proben 1, 6 und 9 nach der Bebrütung bei 37 °C	42
3.7	Anzahl verdächtiger BP-Ausstriche aus der Giolitti-Cantoni-Bouillon, die bei 37 °C bebrütet wurde	44
3.8	Anzahl verdächtiger Giolitti-Cantoni-Bouillon-Röhrchen der Proben 1, 6 und 9 nach der Bebrütung bei 44 °C	45
3.9	Anzahl verdächtiger BP-Ausstriche aus der Giolitti-Cantoni-Bouillon, die bei 44 °C bebrütet wurde	45
3.10	pH-Wert-Änderung in RVS und MKTT nach 24 Std Anreicherung bei 42 bzw. 37 °C	57
3.11	Präsumtive Salmonellen auf XLD- und BPLS-Agar nach der Anreicherung in RVS- und MKTT-Bouillon	60
3.12	Reaktionen zur Bestimmung von <i>Listeria spp.</i>	68
3.13	Verhalten der Proben auf den Nährböden Aloa und Oxford	69
3.14	Auswertung der Anreicherungsausstriche auf Aloa- und Oxford-Agar aus der Halbfraser-Bouillon	73

3.15	Quantitative Bestimmung von <i>Listeria monocytogenes</i> aus der vollständigen Anreicherung, angesetzt auf ALOA- und Oxford-Agar	74
3.16	pH-Verlauf während der Anreicherung in <i>Listeria</i> Anreicherungs-Bouillon	81
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	87

1. Einleitung

Starterkulturen sind in der Lebensmittelproduktion wichtige Hilfsmittel, bei der Produktion von vielen Milchprodukten und rohen Fleischerzeugnissen werden diese verwendet (Cogan, T. M. et al. 1996, Seite 101). So werden Reaktionen der Lebensmittelreifung von den Starterkulturen gesteuert und einige Stämme können das Wachstum von pathogenen Keimen verhindern, da sie für diese eine Konkurrenzflora darstellen oder so genannte Bacteriocine bilden, die gezielt Bakterien abtöten können (Antranikian, G., 2006, Seite 215ff).

Damit mit den zugesetzten Starterkulturen keine Fremdkeime, die humanpathogen sein können, in die Lebensmittel eingebracht werden, bedarf es neben einer guten Hygienepraxis einer mikrobiologischen Untersuchung des „Rohstoffes“ Starterkultur.

Derartige Untersuchungen werden bei der Societé Général de Surveillance (SGS) Germany GmbH u.a. für den Starterkulturproduzenten Blessing Biotech durchgeführt.

Da derzeit keine anderweitig genormten Verfahren für die Untersuchung von Starterkulturen auf Fremdkeime existieren, werden die Verfahren für Lebensmittel aus der Amtlichen Sammlung für Untersuchungsverfahren (ASU) angewendet.

Ziel der Versuche dieser Diplomarbeit ist, diese Methoden für die humanpathogenen Bakterien koagulase-positive Staphylokokken (*S.*), *Salmonella spp.* und *Listeria monocytogenes* in der Matrix Starterkultur zu testen und herauszufinden, ob sie für diese richtige Ergebnisse liefern.

Von der Firma Blessing Biotech wurden für die Versuche zehn exemplarische Starterkulturpräparate mit unterschiedlichen Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt.

Diese Starterkulturen wurden mit den zurzeit angewendeten Verfahren untersucht, nachdem sie mit einer definierten Keimzahl der humanpathogenen Bakterien *S. aureus*, *Salmonella* oder *Listeria monocytogenes* beimpft worden sind.

1. Einleitung

Das angewandte Nachweisverfahren für *S. aureus* ist eine quantitative Methode, d.h. es gilt festzustellen, ob dieses Bakterium in den Starterkulturen in der tatsächlich vorhandenen Menge wieder gefunden wird. Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass die Nachweisgrenze bei <10 Keimen pro g Starterkultur liegt. Problematisch könnten die in einigen Starterkulturen enthaltenen Staphylokokken (*S. carnosus*) sein, da diese auf dem selektiven Baird-Parker-Agar schwarze Kolonien bilden. Typische Kolonien von *S. aureus* sind ebenfalls schwarz, bilden aber einen weißen Hof aus. Durch die hohe Konzentration von *S. carnosus* in den Starterkulturen könnte der weiße Hof um die Staph. aureus Kolonien nicht sichtbar sein und somit der humanpathogene Keim *S. aureus* in den Proben nicht nachgewiesen werden.

Die Salmonellen und Listerien werden mit qualitativen Verfahren nachgewiesen, als Qualitätsstandard der Blessing Biotech GmbH darf sich in 25 g der Starterkulturen keines dieser Bakterien wieder finden. Um nachweisen zu können, dass in 25 g Kultur keines dieser Bakterien vorhanden ist, werden die Verdünnungen (25 g Probe in 225 ml Anreicherungslösung) zunächst etwa einen Tag bei optimalen Wachstumstemperaturen bebrütet, damit eventuell vorhandene Salmonellen bzw. Listerien sich vermehren. Nach dem ASU Verfahren findet des Weiteren eine zweite selektive Anreicherung statt. Anschließend sind Salmonellen bzw. Listerien auf Grund ihrer großen Keimzahl in einem Verdünnungsausstrich auf selektiven Nährmedien nachweisbar.

Auf Grund der in den Starterkulturen enthaltenen Milchsäurebakterien könnte es während der Anreicherung zu einem pH-Wert Abfall kommen und dadurch zum Absterben der pathogenen Keime *Salmonella* und *Listeria monocytogenes* führen.

2. Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden grundlegende Eigenschaften von Bakterien beschrieben und die speziellen Merkmale (Kapitel 2.3 - 2.5) der untersuchten Keime werden hervorgehoben.

2.1 allgemeine Bakteriologie

Bakterien sind prokaryontische Einzeller, die eine typische Größe von ca. 1 μm haben, sie besitzen keinen Zellkern, sondern einen meist ringförmig zusammen geschlossenes doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäure-(DNS-) Molekül, das als Nukleotid bezeichnet wird und nicht von einer Kernhülle umgeben ist. Einige Bakterien weisen zusätzlich so genannte Plasmide auf, die ebensolche DNS-Moleküle, nur kleiner sind. (Keweloh, H., 2006, S. 13)

Bakterien können in unterschiedlichen Formen auftreten, so gibt es z. B. kugelförmige Bakterien (Kokken), gerade oder gekrümmte Stäbchen-Bakterien (Oethinger, M., 1997, Seite 11).

Der typische Aufbau von Bakterien ist in der Abbildung 2.1 vereinfacht dargestellt..

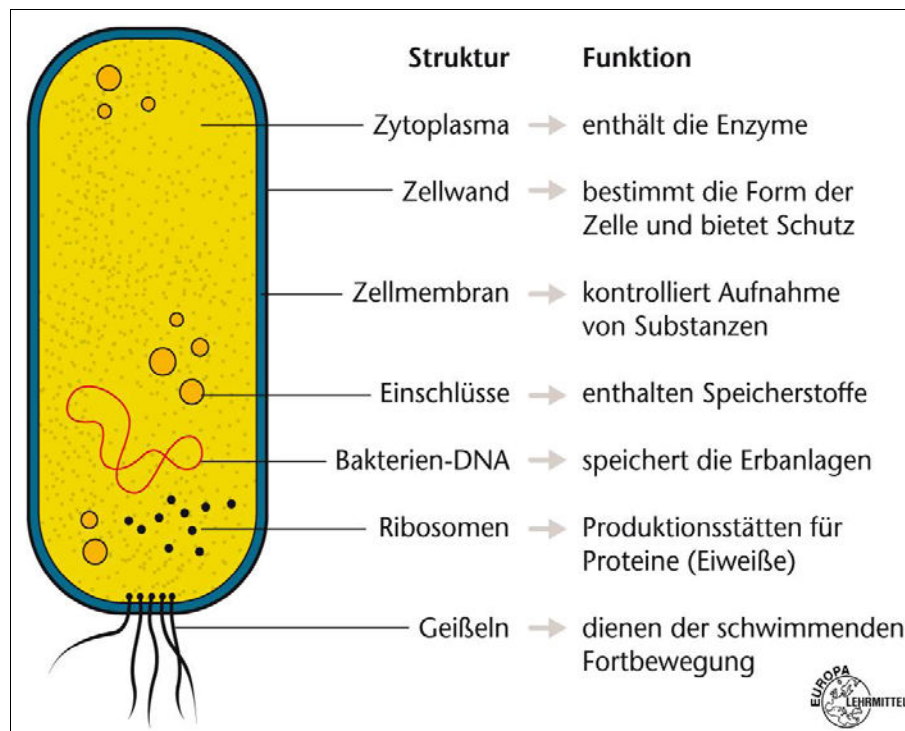


Abb.: 2.1 Aufbau einer Bakterienzelle (Quelle: Keweloh, H., 2006, S. 18)

2. Theoretische Grundlagen

In der Abbildung 2.1 ist der Aufbau einer Bakterienzelle schematisch dargestellt. Eine Struktur, die nicht alle Bakterien aufweisen, die also nicht essentiell ist, sind beispielsweise die Geißeln, unbegeißelte Bakterien sind unbeweglich. Geißeln können an einem Ende des Stäbchenbakteriums, wie in der Abbildung dargestellt ist, auftreten (monopolar monotrich), es kann eine einzige endständige Geißel (monopolar, lophotrich) vorhanden sein oder die gesamte Oberfläche der Zelle kann begeißelt (peritrich) sein (Oethinger, M., 1997, Seite 11). Zum Austausch von Nukleinsäure besitzen einige Bakterien an ihrer Oberfläche so genannte Pili, die ähnlich wie die Geißeln aussehen, jedoch nicht für die Fortbewegung genutzt werden können (Cypionka, 2003, Seite 30).

Eine weitere fakultative Eigenschaft, die die Grafik nicht zeigt, ist die Möglichkeit, bei schlechten Lebensbedingungen so genannte Endosporen als wasserarme Dauerform auszubilden (Oethinger, M., 1997, Seite 11).

Durch die unterschiedlichen Formen und aufgrund bestimmter physiologischer und biochemischer Eigenschaften können Bakterien in Gruppen eingeteilt werden. Einige wichtige Charakteristika zur Gruppenbildung sind die Fähigkeit Endosporen zu bilden, das Verhältnis zu Sauerstoff und die optimalen Wachstumsbedingungen (Antranikian, G., 2006, Seite 5).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Gramfärbung. Grampositive Bakterien besitzen eine dickere Zellwand, als die gramnegativen, da sie eine wesentlich dickere Mureinschicht aufweisen. Gramnegative Bakterien besitzen außerhalb der Zellwand zusätzlich eine äußere Membran, die aus Lipopolysacchariden (LPS) besteht. Beim Zelltod werden diese als so genannte Endotoxine frei und führen zu Fieber und Entzündungsreaktionen (Keweloh, H., 2006, Seite 19).

Durch Einfärbung der Bakterien auf einem Objektträger mit blauer Farbe und dem anschließendem Versuch diese Farbe mit Alkohol zu entfernen, kann mit Hilfe eines Mikroskops festgestellt werden, dass die Farbe im Zellinnern der grampositiven Bakterien eingeschlossen ist, wohingegen sie sich aus den gramnegativen ausspülen lässt. Diese Eigenschaft steht in direktem Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Aufbau der Zellwände (Oethinger, M., 1997, Seite 15).

2. Theoretische Grundlagen

Die Bakterien werden aufgrund der unterschiedlichen Merkmale und Eigenschaften in Familien (Endung auf *-aceae*), Gattungen (*genus*) und Arten (*species*) zusammengefasst. Die Nomenklatur der Bakterien wird nach der von Carl von Linné eingeführten binären Weise durchgeführt, das heißt, es werden der Gattungs- und der Artname aufgeführt, wobei die Art klein geschrieben wird; beispielsweise *Staphylococcus* = Gattung; *aureus* = Art (Antranikian, G., 2006, Seite 5).

Das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien durch Zellteilung hängt von zahlreichen äußeren Faktoren ab. So können einige Gattungen nur unter Sauerstoffausschluss wachsen, andere benötigen Sauerstoff für ihr Wachstum. Weitere das Wachstum beeinflussende Faktoren sind:

- pH-Wert
- aw-Wert
- Nährstoffangebot
- Temperatur
- Anfangskeimgehalt
- Salzgehalt

Üblicherweise verläuft das Wachstum und die Vermehrung einer statischen Bakterienkultur nach der in Abbildung 2.2 dargestellten Abfolge ab. Wachstum und Vermehrung stehen bei Bakterien in einem direkten Zusammenhang, da die Zelle zunächst wächst, das DNA-Molekül sich verdoppelt und die Zelle sich dann durch die Bildung einer Querwand und Einschnürung der Zelle in zwei Tochterzellen teilt. Am Ende der Generationszeit teilen sich beide Tochterzellen erneut, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung der Bakterienzellen kommt (Kunz, B., 2006, S. 14ff)

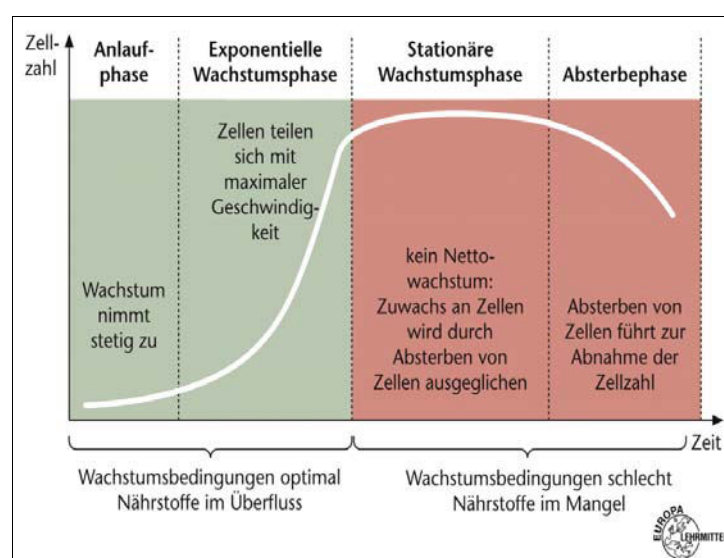


Abb. 2.2: Wachstumsphasen der Bakterien (Quelle: Keweloh, H., 2006, Seite 36)

Wenn man davon ausgeht, dass manche Bakterien sich bei optimalen Bedingungen alle zehn Minuten verdoppeln, kann innerhalb kurzer Zeit eine explosionsartige Vermehrung stattfinden. Durch die rasante Vermehrung der Mikroorganismen kann es bei unzureichender Hygiene und falscher Temperaturführung in Lebensmitteln zu gefährlich hohen Konzentrationen krankmachender Bakterien kommen (Keweloh, H. 2006, Seite 179ff).

2.2 Starterkulturen

„Starterkulturen sind Kulturen von lebenden Mikroorganismen in flüssiger, gefrorener, tiefgefrorener oder getrockneter (lyophilisierter) Form mit technologisch bedeutsamem Stoffwechsellpotential, die zur Anwendung in der Lebensmittelverarbeitung bestimmt sind. Sie kommen im Lebensmittelbetrieb über eine Subkultivierung (Intermediärkulturen) oder in konzentrierter Form direkt im Verarbeitungsprozess zur Anwendung.“ (Kunz, B., 2006, Seite 297)

Seit der Mitte des 19. Jahrhunderts werden Mikroorganismen gezielt in der Lebensmittelproduktion, insbesondere in der Milchindustrie, eingesetzt. (Zehntner, U., 2004, Seite 3). Bereits früher waren fermentierte Lebensmittel wie Bier, Wein oder Käse bekannt, zu deren Herstellung aber nativ vorkommende Mikroorganismen zur Spontanfermentation genutzt wurden.

Der Begriff Starterkultur wird als Oberbegriff für Reifungskulturen, Schutzkulturen und die eigentlichen Starterkulturen genutzt. Ihre technologischen Möglichkeiten erstrecken sich über die Reifung, die Prozessstabilisierung beispielsweise durch pH-Wert-Absenkung, die Aroma-, Textur- und Farbbildung und die Qualitätsstabilisierung. (Kunz, B., 2006, S. 297ff) Reifungskulturen spielen aufgrund ihrer proteolytischen und lipolytischen Aktivität eine große Rolle bei der Herstellung von Rohwürsten. Insbesondere werden zur Reifung dieser Würste Staphylokokken (z. B. *Staph. carnosus*, *Staph. xylosus*) und Schimmelpilze eingesetzt, wobei die Schimmelpilze ausschließlich auf der Oberfläche der Wurst aktiv sind, während die Staphylokokken in der gesamten Wurst aufzufinden sind. Durch die Zugabe der Reifungskulturen und deren Stoffwechselprodukte wird das Aroma der getrockneten Rohwurst entscheidend geprägt (Antranikian, G., 2006, Seite 521).

2. Theoretische Grundlagen

Schutzkulturen können die Lebensmittel unspezifisch oder spezifisch vor dem Befall von Krankheits- oder Verderbniserregern schützen. Unspezifischer Schutz bedeutet, dass die Kulturen für andere Mikroorganismen eine Konkurrenzflora darstellen, beispielsweise wird die gesamte Oberfläche von erwünschten Schimmelpilzen besiedelt, so dass anderen Keimen die Besiedelung erschwert wird (Rutloff, H., 1997, Seite 133). Spezifische Schutzkulturen wirken antagonistisch gegenüber bestimmten unerwünschten Mikroorganismen. Sie können antimikrobielle Stoffe bilden, die sich an die Zellwand gram-positiver Bakterien heften können. Dadurch wird die Wand durchlässig für Zellinhaltsstoffe, der Stoffwechsel bricht zusammen oder die Zelle lysiert. Diese antimikrobiellen Stoffe sind Eiweiße mit einer typischen Kettenlänge von 20-45 Aminosäuren und werden Bacteriocine genannt. (Winkler, H., 2006, Seite 12)

Die eigentlichen Starterkulturen lassen sich aufteilen in solche, die vor allem für die Fermentation pflanzlicher Lebensmittel, solche die in der Fleischverarbeitung und des Weiteren in der Milchwirtschaft verwendet werden. Da diese Lebensmittelgruppen spezifische Zusammensetzungen und Herstellungsweisen haben, ist eine derartige Einteilung der hierfür vorgesehenen Starterkulturen sinnvoll. (Antranikian, G., 2006, S. 515ff)

Die für die Versuche dieser Arbeit verwendeten Starterkulturpräparate sind vorwiegend Fleischstarter (Hummerjohann, J., 2004, Seite 7), wobei der *Lactobacillus (L.) sakei* der Probe 3 laut Produktbeschreibung ein Bacteriocin-Bildner ist, also als Schutzkultur eingesetzt werden kann.

Um nachzuweisen, dass die Starterkulturen im Rahmen der Guten Hygienepraxis nicht mit pathogenen Bakterien verunreinigt sind, werden diese mikrobiologisch untersucht. Besondere Bedeutung wegen ihrer krank machenden Wirkungsweise haben hierbei die Salmonellen, *Listeria monocytogenes* und *S. aureus*. Aus diesem Grund wurden für diese Bakterien die Nachweisverfahren in der Probenmatrix Starterkultur untersucht und ihre Eigenschaften werden nachfolgend beschrieben.

2.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein gram-positives, kugelförmiges, nicht sporenbildendes Bakterium, welches häufig traubenförmige Zellhaufen bildet, wie in Abbildung 2.3 dargestellt. Er wird der Familie der *Micrococcaceae* zugeordnet (Heeschen, W., 1989, Seite 97).

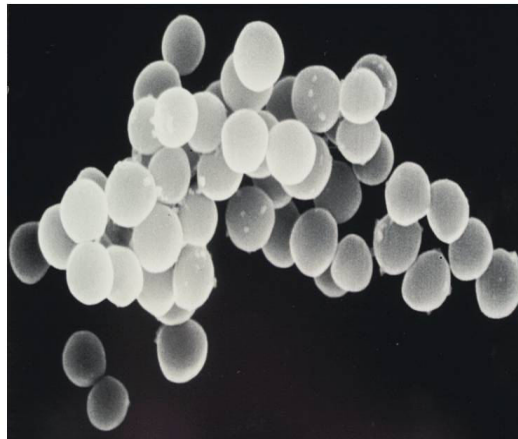


Abb. 2.3 Mikroskopische Aufnahme von Staphylokokken (Quelle: Keweloh, H., 2006, Seite 216)

Der in Abbildung 2.3 dargestellten typischen Form entstammt der Name (Staphylo = Traube; Kokkus = Kreis), der Name der Art „aureus“ beschreibt den gelb-goldenen Glanz der Kolonien auf vielen Festnährböden (Jassoy, C. et al., 2005, Seite 78).

Staphylococcus aureus ist der einzige humanpathogene Keim seiner Gattung, der Katalase- und Koagulase-positiv reagiert (Oethinger, M., 1997, Seite 37).

S. aureus wächst unter fakultativ aeroben Bedingungen, die optimalen Temperaturen liegen bei 10 – 40 °C, die pH-Toleranz liegt bei 4,0 – 10,5 und der optimale Wassergehalt liegt bei einem a_w -Wert über 0,86. *S. aureus* kann sich bei einem Salzgehalt von bis zu 15% vermehren. Dieses Bakterium ist also relativ anspruchslos und kann im ausgetrockneten Zustand über einen Monat überleben (BfR, Stellungnahme Nr. 004/2006, 2005).

Die von einigen Stämmen des *S. aureus* gebildeten hitzestabilen Enterotoxine können beim Menschen zu Lebensmittelintoxikationen führen. Diese Lebensmittelvergiftungen sind in der Bundesrepublik Deutschland nicht meldepflichtig, aus

2. Theoretische Grundlagen

diesem Grund ist die Anzahl der Vorfälle nicht bekannt (Keweloh, H., 2006, Seite 216).

In der Regel tritt die Erkrankung nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von 2-8 h auf und äußert sich als akute Gastroenteritis. Nach 24-48 h klingen die Symptome auch ohne Therapie wieder ab (Oethinger, M., 1997, Seite 36).

Insbesondere durch Sekundärkontamination durch den Menschen kann *S. aureus* auf Lebensmittel gelangen, da die Haut und die Schleimhäute vieler Menschen von diesem Keim besiedelt sind. Hier führt der Keim in der Regel nicht zu Erkrankungen. Wenn er aber beispielsweise in Lebensmitteln eine optimale Wachstumsgrundlage findet, kann er bereits im Lebensmittel seine hitzestabilen Toxine ausbilden und durch den Verzehr der Lebensmittel zu Vergiftungen führen (Heeschen, W., 1989, Seite 100f).

Der wirksamste Schutz vor diesen Lebensmittelintoxikationen bietet eine ausreichende Küchen- und Personalhygiene und eine gute Temperaturführung der Produkte (BfR, Stellungnahme Nr. 004/2006, 2005).

2.4 *Salmonella* spp.

Salmonellen sind gramnegative, stäbchenförmige, zumeist bewegliche Bakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören und keine Sporen bilden können (Heeschen, W., 1989, Seite 41). Die häufigste Subspecies der Salmonellen ist die *Salmonella Enterica* (99,5 % aller isolierter Salmonellen), der etwa 2500 Serotype und Serovare zugeordnet werden und die beim Menschen zu Enteritis-Infektionen, genannt Salmonellose, führt (Kopra, N., 2005, Seite 6).

Ebenfalls zur Gruppe der Salmonellen gehören die Erreger des Typhus und des Paratyphus, diese spielen vor allem in Ländern der Dritten Welt eine Rolle. In Deutschland werden pro Jahr etwa 100 Fälle bekannt, von denen ca. 90 % aus Entwicklungsländern eingeschleppt werden (Braveny, I. et al., 2002, Seite 309).

Salmonellen-Enteritis-Infektionen sind in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig und zählen aufgrund der hohen Anzahl der Erkrankungsfälle zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten. Es wird angenommen, dass die gemeldeten Fälle nur 10-20 % der tatsächlich auftretenden Erkrankungen entsprechen (www.bfr.bund.de/cd/537). Die Salmonellen-Enteritis ist eine Zoonose, was bedeutet, dass die Erreger vom Tier auf den Menschen, meist durch den Verzehr tierischer Lebensmittel, übertragen werden können (BfR). Das Erregerreservoir erstreckt sich von Geflügel, über Rinder, Schafe und Schweine. Die häufigste Infektionsquelle für Salmonellen sind mit Abstand die Hühnereier, wenn sie roh verspeist werden (Braveny, I. et al., 2002, Seite 319).

Salmonellen sind relativ anspruchslos, ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C, wobei sie auch Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes überleben. Sie wachsen fakultativ anaerob, und können auch im trockenem Zustand mehrere Monate überleben. Der optimale a_w -Wert liegt bei 0,95 (Keweloh, H., 2006, Seite 106), die Säuretoleranz liegt je nach vorliegender Säure zwischen 4,0 und 5,5, im Falle der Milchsäure wachsen Salmonellen oberhalb eines pH-Wertes von 4,5 (Jay, J. M. et. al., 2005, Seite 624). Bei Temperaturen oberhalb von 50 °C stellen sie ihr Wachstum ein, ab 70 °C werden Salmonellen wirkungsvoll abgetötet (Keweloh, H., 2006, Seite 195).

2. Theoretische Grundlagen

Das Krankheitsbild der Salmonellose äußert sich in Fieber und Durchfall, gelegentlich auch mit Erbrechen, einhergehend mit hohem Wasser- und Elektrolytverlust (Oethinger, M., 1997, Seite 51). Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Tage, wobei die Symptome meist nach etwa 5 Tagen wieder abklingen (Jassoy, C. et al., 2005, Seite 101). In einigen Fällen werden die Erkrankten zu Dauerausscheidern, was bedeutet, dass die Erreger einige Wochen bis mehrere Jahre im Stuhl nachweisbar, jedoch keine Symptome mehr vorhanden sind. Dies kann bei nicht ausreichender Personalhygiene zu weiteren Infektionen führen (www.bfr.bund.de/cd/537).

Durch Einhaltung der Kühlkette, sinnvolle Temperaturführung und gute Prozess- und Personalhygiene kann die Vermehrung von Salmonellen eingeschränkt werden (Heeschen, W., 1989, Seite 52).

2.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria spp. sind grampositive, bewegliche, nicht sporenbildende Stäbchen-Bakterien, die noch bei 4 °C vermehrungsfähig, also psychrotolerant sind. Ihre optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37 °C, sie tolerieren pH-Werte von 4,4 – 9,4 und a_w -Werte bis 0,92 (Ellerbroek, L., 2007, www.bfr.bund.de). Bei Temperaturen oberhalb von 45 °C stellen Listerien ihr Wachstum ein (Jay, J. M., 2005, Seite 595). Durch Temperaturen über 70 °C werden Listerien wirkungsvoll abgetötet (Heeschen, W. 1989, Seite 88).

Listerien kommen ubiquitär in der Umwelt vor, man findet sie im Boden, im Wasser und auf Pflanzen; auch viele Tiere sind symptomlos mit ihnen infiziert (Keweloh, H., 2006, Seite 210).

Die einzige humanpathogene Art ist *Listeria monocytogenes*, sie ist opportunistisch, was bedeutet, dass in der Regel nur Menschen erkranken, deren Immunsystem bereits geschwächt ist, wobei auch Schwangere gefährdet sind (Winkler, H., 2006, Seite 4).

Die Krankheit, die durch Listerien verursacht wird, wird als Listeriose bezeichnet. Sie kann sich bei Erkrankten mit stabilem Immunsystem mit grippeähnlichen Symptomen äußern. Bei Immungeschwächten kann nach 3-70 Tagen Inkubationszeit eine Listeriose des zentralen Nervensystems auftreten, es kann eine Entzündung der Hirnhaut oder des Gehirns entstehen, und eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* kann auch zum Fruchttod oder zu schweren Schädigungen bei Neugeborenen führen (Oethinger, M.; 1997, Seite 71).

Aus diesem Grund sollten Schwangere und Immungeschwächte keine Rohmilchprodukte, rohes Fleisch oder vakuumverpackten, geräucherten Fisch oder Salat verspeisen, denn diese Lebensmittel sind besonders gefährdet, mit Listerien verunreinigt zu sein. Lebensmittel sollten hygienisch einwandfrei hergestellt und gelagert werden (Ellerbroek, L., 2007, www.bfr.bund.de).

Im Jahr 2004 wurden 295 Listeriose-Fälle in Deutschland gemeldet, wobei ein steigender Trend seit dem Jahr 2001 zu beobachten ist. 27 der im Jahr 2004 an Listeriose Erkrankten starben an den Folgen der Krankheit (Koch, J. et al, 2005,

Seite 172).

Aufgrund des schweren Krankheitsverlaufes sollten lebensmittelproduzierende Betriebe ein wirksames Konzept (HACCP) gegen das Einbringen von Listerien in die Lebensmittel erarbeiten. Ein Listerien-freier Betrieb ist aufgrund des ubiquitären Vorkommens dieses Bakteriums kaum möglich, aus diesem Grund sollten die Abläufe in den Betrieben durch Prävention, Monitoring und Notfallmaßnahmen beherrscht werden. (Winkler, H., 2006, Seite 4)

3. Praktischer Teil

3.1 Material

In diesem Kapitel werden die in allen Versuchen verwendeten Materialien aufgelistet und es wird deren Behandlung zur Sterilisation beschrieben.

3.1.1 Probenmaterial

Von der Firma Blessing Biotech GmbH wurden exemplarisch 10 unterschiedliche Starterkulturpräparate als Probenmaterial zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden im weiteren Verlauf der Arbeit die in der folgenden Auflistung voran gestellten Ziffern als Kennzahlen für das entsprechende Starterkulturpräparat genutzt. Folgende Produktbeschreibungen wurden von der Firma Blessing für die verschiedenen Präparate übermittelt:

- 1 *S. carnosus*
- 2 *Lactobacillus sakei* (*L. sakei*), homofermentativ
- 3 *L. sakei*, Bacteriocin-Bildner, homofermentativ
- 4 *L. brevis*, heterofermentativ
- 5 Trägerstoff Saccharose; *S. carnosus*, *L. sakei*, *L. paracasei*, *Kocuria varians*
- 6 Trägerstoff Saccharose; *S. carnosus*, *L. sakei*
- 7 Trägerstoff Lactose; *L. plantarum*
- 8 Trägerstoff Lactose; *Propionibacterium freudenreichii*, *Streptococcus thermophilus*
- 9 Trägerstoff Lactose und Enzym; *L. fermentum*
- 10 Trägerstoff Dextrose; *Pediococcus pentosaceus*, *S. carnosus*

Das Probematerial wurde bei -20 °C im Tiefkühlraum gelagert, damit keine Veränderungen der Aktivität auftreten.

3.1.2 Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien

In diesem Abschnitt werden die Geräte, Hilfsmittel und Chemikalien aufgeführt, die für die Nachweisverfahren von *S. aureus*, *Salmonella spp.* und *Listeria monocytogenes* benötigt werden. Die speziellen Nährmedien und Reagenzien für die einzelnen Bakterien werden in den darauf folgenden Kapiteln für die jeweiligen Keime beschrieben.

Geräte

Autoklav (Münchner Medizin Mechanik GmbH)

Waage (Sartorius; Type 1574)

Kühlraum (Viessmann)

Abfüllautomat für Petrischalen (Integra Biosciences)

Whirl Mix (Gallenkamp; SpinMix)

Wärmeschrank für Nährmedien; 52 °C (Mettler)

Bruträume; 30°C, 37°C, 42°C und 44°C (Mettler)

Schüttelmaschine (Edmund Bühler)

Tiefkühlraum (Viessmann)

Dispenser (Fortuna)

Hilfsmittel

Sterile Einweg-Petrischalen (Nerbe plus; 92 x 16 mm und 120 x 14 mm)

Sterile Edelstahlöffel

Ablage für Löffel

Bunsenbrenner/ Gaskartusche

Spezial-Vernichtungsbeutel, autoklavierbar (Nerbe plus)

Ständer für Müllbeutel

Sterile Reagenzgläser

Reagenzglasverschlüsse

Reagenzglasständer

Glasflaschen (Schott)

Glasperlen

Sterile Einweg-Pipetten (Nerbe plus; 1 ml und 10 ml Fassungsvermögen)

Pipettierhilfe

Sterile Einweg-Spatel (Nerbe plus)

Sterile Einweg-Impfösen (Sarstedt; 10 µl)

Schere

Chemikalien

Spiritus zum Abflammen der Löffel (Wundi GmbH)

Flächendesinfektionsmittel Bacillol (Bode)

Händedesinfektionsmittel Sterillium (Bode)

3.1.3 Beimpfungskulturen

Für die Beimpfungsversuche wurden Stämme von *S. aureus*, *Salmonella senftenberg* und *Listeria monocytogenes* aus der Stammsammlung der SGS verwendet. Diese wurden als Gitterausstrich auf Trypton-Soya-Agar (TSA) aus dem Labor für Desinfektion bezogen. Durch regelmäßiges Überimpfen im Gitterausstrich auf frischen TSA wurde gewährleistet, dass die Arbeitskulturen für jeden Versuch frisch waren. Zum Beimpfen der Proben wurde die Agaroberfläche mit 9 ml Kochsalzpepton überschwemmt, mit einem Spatel wurden die Kolonien vom Agar gelöst und mit einer Pipette wurde die Suspension in ein Reagenzglas gegeben. Aus dieser Suspension wurden die weiteren Verdünnungen hergestellt.

Im weiteren Verlauf wurden die *S. aureus* Stämme der American Type Culture Collection (ATCC) Nr. 6538, 14458, 27664, 19095 und 13565 auf ihr Wachstumsverhalten bei 44 °C im Vergleich zu 37 °C getestet.

3.1.4 Sterilisation des Materials

Um sicherzustellen, dass die Nährmedien keine Fremdkeime enthalten, die das Ergebnis verfälschen könnten, müssen die Nährmedien vor der Verwendung sterilisiert werden. Die sicherste Sterilisationsmethode ist das Autoklavieren (Dampfsterilisieren), hierbei werden durch Überdruck, hohe Temperatur (121 °C) und ausreichend Zeit Mikroorganismen und deren Endosporen abgetötet.

Während des Sterilisationsprozesses in der Anheizphase, wird die vorhandene Luft durch den vom Autoklaven produzierten Wasserdampf vollständig verdrängt. In der Steigephase wird der Druck erhöht und die Sterilisationstemperatur von 121 °C wird in der Druckkammer erreicht. Das Sterilisiergut erreicht diese Temperatur erst etwas später, aus diesem Grund ist eine Ausgleichszeit nötig. Nach Ablauf dieser Phase setzt die Abtötungszeit ein, in der die Zellproteine der Mikroorganismen denaturiert und die Keime somit abgetötet werden. Um die Sterilisation des Gutes zu gewährleisten, sollten die Ausgleichs- und Abtötungszeit in der Regel insgesamt 20 min. dauern. Ihnen folgt die Abkühlzeit, während der auch der Überdruck wieder auf den Atmosphärendruck abgesenkt wird (Bast, E., 2001, Seite 6ff). Im SGS Labor wurde zur Sterilisation aller Materialien ein MMM-Autoklav verwendet.

Die zum Einwiegen der Proben verwendeten Löffel wurden vor der Benutzung in Alkohol getaucht und durch das Entflammen des anhaftenden Alkohols oberflächlich sterilisiert. Nachdem die Löffel abgekühlt waren, konnten sie verwendet werden.

Da diese Methode keine absolut sichere Sterilisation darstellt, wurden die Löffel nach der Benutzung für die Starterkulturen autoklaviert, um eine Verschleppung dieser Keime in andere Proben zu verhindern (Bast, E., 2001, Seite 17f).

3.2 Quantitatives Nachweisverfahren von *S. aureus*

S. aureus wird in den Starterkulturen bei der SGS nach dem Verfahren ASU L-00.00-55 für Lebensmittel, auf BP-Agar, nachgewiesen. Dieses Verfahren galt es auf seine Tauglichkeit für Starterkulturen zu untersuchen. Es bestand die Annahme, dass *S. aureus* in den Starterkulturen bereits in der ersten Verdünnung (1:10) wieder gefunden werden kann, d.h. die Nachweisgrenze < 10 Keime / g Kultur ist.

Nach Empfehlungen der European Food and Feed Cultures Association (EFFCA) kann für den Nachweis von *S. aureus* in Starterkulturpräparaten des Weiteren das MPN-Verfahren nach Giolitti und Cantoni angewandt werden. Um festzustellen, ob diese Methode evtl. Vorteile gegenüber der Methode mit BP-Agar hat, wurde sie im Rahmen dieser Diplomarbeit ebenfalls untersucht.

3.2.1 Nährmedien und Reagenzien

Für die Nachweisverfahren von *S. aureus* werden folgende Nährmedien und Reagenzien benötigt, welche von verschiedenen Herstellern als Fertignährböden bezogen werden. Die Zusammensetzungen der Nährmedien können vom Hersteller erfragt oder der Norm entnommen werden.

- Trypton-Soja-Agar (TSA), Oxoid
- Kochsalzpepton
- Baird-Parker-Agar (BP), Oxoid
- Giolitti-Cantoni-Bouillon, Merck
- Staphytect Plus, Oxoid

3.2.2 Methoden

Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken (nach ASU L-00.00-55)

Der Nachweis und die Zählung koagulase-positiver Staphylokokken erfolgte im Verfahren mit Baird Parker. Das Verfahren ist in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB unter der Nummer L-00.00-55 festgelegt. Das Verfahren nach der ASU ist eine Übersetzung der internationalen Norm DIN EN ISO 6888-1:1999. Nach der Definition in der ASU-Verfahrensanleitung sind koagulase-positive Staphylokokken „Mikroorganismen, die auf der Oberfläche eines selektiven Nährmediums typische und / oder atypische Kolonien bilden und eine positive koagulase-Reaktion zeigen“ (ASU L 00.00-55).

Im praktischen Gebrauch wird der Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken dem Nachweis von *S. aureus* gleichgesetzt, wobei zu beachten ist, dass auch andere *Staphylococcus* Stämme koagulase-positiv reagieren. Da die Proben im Rahmen dieser Arbeit mit *S. aureus* beimpft wurden, wird vereinfacht *S. aureus* geschrieben. Der Nachweis von *S. aureus* erfolgte im Oberflächen-spatelverfahren auf Baird-Parker-Agar. Hierzu werden die Proben in einer 1:10 Verdünnung in Kochsalzpepton eingewogen, die Suspension wird gut vermischt und evtl. in weiteren Verdünnungen auf den Agar gegeben. Nach 48 h Bebrütung bei 37 °C sind typische Kolonien von *S. aureus* auf BP-Agar grau oder schwarz, glänzend und gewölbt. Sie sind von einer klaren Zone umgeben, die auch trüb sein kann.

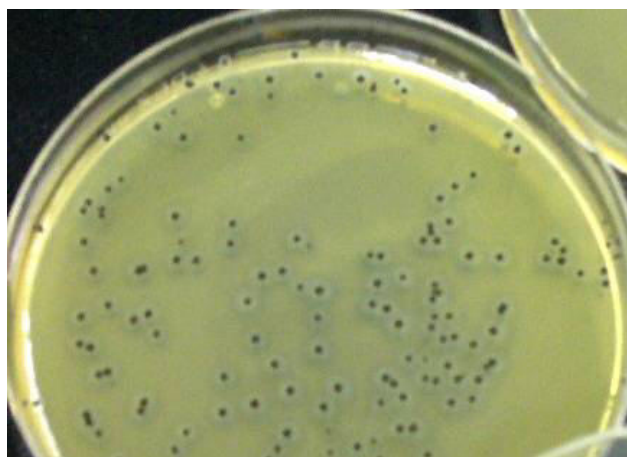


Abb.3.1: Typische *S. aureus* Kolonien auf BP-Agar

Fünf der verdächtigen Kolonien müssen durch den *Staphytect plus* bestätigt werden.

Wirkungsweise von BP-Agar

Durch die genau aufeinander abgestimmte Zusammensetzung des Agars wird das Wachstum von Staphylokokken gefördert und die meisten in Lebensmitteln vorkommenden Bakterien werden durch die selektiven Inhaltsstoffe Glycin, Lithium und Tellurit am Wachstum gehindert. Als Diagnostikum enthält der Nährboden Natriumpyruvat und Eigelb-Kaliumtellurit-Emulsion, diese Inhaltsstoffe schützen geschädigte Staphylokokkenzellen und sie sind durch Reduktion des Tellurits leicht auffindbar. Durch die Reduktion des Tellurits entstehen die grauschwarzen Kolonien, die klaren Höfe entstehen bei der Proteolyse von Eiweiß.

Verfahren ISO 5944:2001 (E); IDF 60:2001 (E)

Milk and milk-based products – Detection of coagulase-positive staphylococci - Most probable number (MPN) technique

Des Weiteren wurde das MPN-Verfahren mit Giolitti-Cantoni-Bouillon nach ISO 5944:2001 durchgeführt. Die Giolitti-Cantoni-Bouillon ist für die anaerobe Anreicherung und quantitative Analyse von *S. aureus* hauptsächlich aus Milch und Milchprodukten vorgesehen. Es wird eine 1:10 Verdünnung der Proben mit Kochsalzpepton hergestellt, für die 0. Verdünnung werden 10 ml dieser Suspension in 10 ml Giolitti-Cantoni-Bouillon gegeben. 1 ml der Suspension entspricht der 1. Verdünnung. Weitere Verdünnungen werden mithilfe von Kochsalzpepton hergestellt. Nach der Anreicherung bei 37 °C wird aus verdächtigen Röhren im Verdünnungsausstrich auf Baird-Parker-Agar ausgestrichen. Verdächtige Kolonien nach der Bebrütung müssen mit dem *Staphytest* bestätigt werden.

Da einige Milchprodukte ebenso wie Starterkulturen, lebendige Kulturen enthalten, bestand die Annahme, dass dieses Verfahren für die Starterkulturen geeignet sein könnte.

Wirkungsweise der Giolitti-Cantoni-Bouillon

Diese Bouillon dient zur selektiven Anreicherung von Staphylokokken aus Nahrungsmitteln, das Wachstum der Staphylokokken wird durch Pyruvat, Glycin und Mannit gefördert. Auf das Wachstum von gramnegativen Bakterien wirkt der Inhaltsstoff Lithiumchlorid, auf das von grampositiven Bakterien wirkt Tellurit hemmend. Durch die anaeroben Bedingungen werden aerob wachsende Bakterien in ihrer Vermehrung gehemmt. Als verdächtig gelten Röhrchen, in denen sich die Bouillon nach der Bebrütung schwarz verfärbt hat. Die schwarze Färbung der Bouillon durch Staphylokokken entsteht durch die Reduktion des Tellurits zu metallischem Tellur.



Abb. 3.2: Verdächtige Giolitti-Cantoni-Bouillon in fünf Verdünnungsstufen

Bestätigung mit dem *Staphytest plus*

Der *Staphytest plus*-Test dient zur Differenzierung von *S. aureus*, von anderen Staphylokokken. Zum Nachweis von *S. aureus* müssen fünf der typischen Kolonien bestätigt werden. Laut ASU 00.00-55 wird die Bestätigungsreaktion mit Kaninchenplasma durchgeführt, es kann aber auch auf den *Staphytest Plus* Test von Oxoid zurückgegriffen werden. Dieser beinhaltet zum einen ein Testreagenz, aus blauen Latexpartikeln, die mit Schweinfibrinogen, Kaninchen-IgG und spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen die Kapselpolysaccharide von *S. aureus* beschichtet sind und zum anderen ein Kontrollreagenz, das unbeschichtete blaue Latexpartikel enthält. Des Weiteren sind Einweg-Reaktionskarten enthalten.

3. Praktischer Teil

Um die Bestätigungsreaktion durchzuführen, gibt man auf ein Feld der Reaktionskarte das Testreagenz, auf ein anderes Feld wird das Kontrollreagenz gegeben, mit einer sterilen Impföse wird eine vereinzelt verdächtige Kolonie entnommen und zunächst mit dem Kontrollreagenz auf der Karte vermischt und auf dem Reaktionsfeld verteilt anschließend wird die gleiche Kolonie mit dem Testreagenz ebenso verteilt. Die Karte wird nun geschwenkt, wobei bei einem positiven Nachweis von *S. aureus* spätestens nach 20 s die Koagulase- Reaktion auftreten muss. Hierbei agglutinieren die Latexpartikel, wodurch es zu einer Klumpenbildung kommt. Diese Reaktion darf nur mit dem Testreagenz stattfinden, sollte auch das Kontrollreagenz agglutinieren, kann die Kolonie nicht als positiv gewertet werden (Gebrauchsanleitung Staphytest plus; Oxoid).

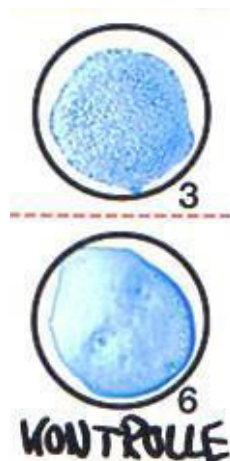


Abb.:3.3 Bestätigung von *S. aureus* mit *Staphytest plus* durch positive Koagulase-Reaktion

Auf dem Feld drei wurde die Kolonie mit dem Testreagenz gemischt, auf Feld 6 mit dem Kontrollreagenz, es ist deutlich zu erkennen, dass auf Feld drei Agglutination auftritt, auf Feld sechs hingegen nicht. Die Kolonie muss als positiv gewertet werden, also ist es ein koagulase-positiver Staphylokokkus.

3.2.3 Ergebnisse

Vorversuche

Beschreibung des Wachstums der Proben auf Baird-Parker-Agar nach verschiedenen Bebrütungszeiten

Um herauszufinden, ob das Wachstum der Staphylokokken aus den Starterkulturen bei unterschiedlichen Bebrütungszeiten verschieden weit fortgeschritten ist, wurden die Proben nach dem Nachweisverfahren ASU L-00.00-55 (mit Baird Parker-Agar) untersucht und nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütung bei 37 °C ausgewertet.

Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum von *Staphylococcus carnosus* bereits nach einem Tag (24 Std.) weit fortgeschritten war, d.h. der Nährboden hat sich durch die Staphylokokken schwarz gefärbt. Nach 48 Std. konnte eine weitere Vermehrung der schwarzen Kolonien beobachtet werden. Nach weiteren 24 Stunden konnte kein weiteres Wachstum beobachtet werden.

Außerdem konnte festgestellt werden, dass auf einigen Platten von Proben, in denen kein *S. carnosus* enthalten sein soll, ebenfalls schwarze Kolonien wuchsen (s. Tabelle 3.1). In Tabelle 3.1 sind die verschiedenen Reaktionen der Starterkulturen auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Verhalten der Starterkulturen auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 37 °C

Probe	Verhalten auf dem BP-Agar
1	Der Nährboden färbt sich nahezu komplett schwarz
2	Der Nährboden färbt sich grau, es befinden sich schwarze Kolonien auf ihm
3	Der Nährboden färbt sich grau, einige schwarze Kolonien befinden sich auf ihm
4	Es bilden sich graue Schlieren auf dem Nährboden
5	Fast der gesamte Nährboden verfärbt sich schwarz
6	Fast der gesamte Nährboden verfärbt sich schwarz
7	Keine Veränderung des Nährbodens- kein Wachstum von Kolonien
8	Es befinden sich einige schwarze Kolonien auf dem Nährboden
9	Der Agar färbt sich grau, einige schwarze Kolonien
10	Der Nährboden färbt sich schwarz, es bilden sich schwarze Kolonien aus

3. Praktischer Teil

Zur Veranschaulichung sind auf den folgenden Abbildungen drei Starterkulturpräparate auf BP-Agar nach 48 h bei 37 °C Bebrütung dargestellt.

Auf der Abb. 3.4 kann man sehen, wie sich die Probe 1 auf BP-Agar verhält, Abb. 3.5 zeigt Probe 9 auf BP-Agar, Abb. 3.6 zeigt Probe 10.

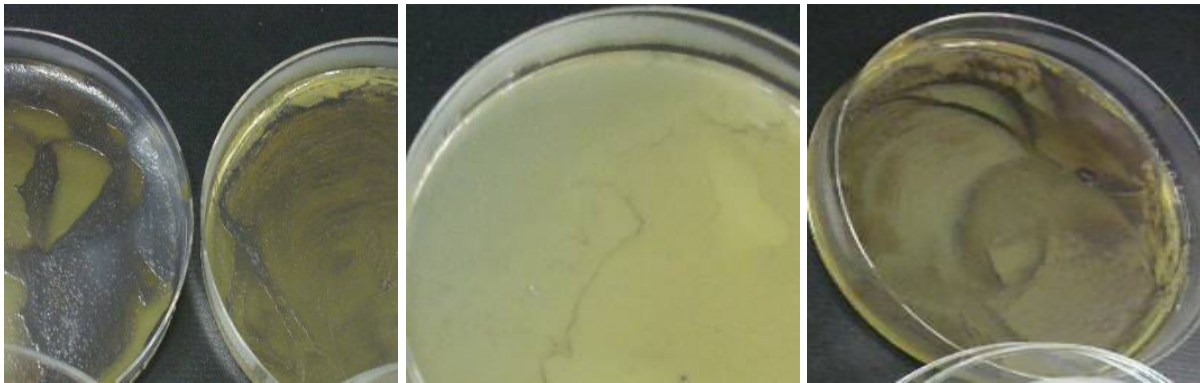


Abb.: 3.4 Probe 1 auf BP-Agar 3.5: Probe 9 auf BP-Agar 3.6 Probe 10 auf BP-Agar
nach 48 Stunden Bebrütung bei 37 °C

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Probe 1, die eine Reinkultur des *S. carnosus* darstellt, den Nährboden nahezu komplett schwärzt, somit könnte ein Auffinden des *S. aureus* aus dieser Probe problematisch sein. Durch die Probe 9 färbt sich der BP-Agar grau, die typischen *S. aureus* sollten, wenn vorhanden, sichtbar sein. Der Nachweis des *S. aureus* aus Probe 10 könnte sich ebenso wie aus Probe 1 als schwierig erweisen, in der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass der Nährboden durch dieses Probenmaterial ebenfalls schwarz gefärbt wird.

Vergleich zwischen großen und kleinen Petrischalen

Um herauszufinden, ob ein Unterschied zwischen kleinen und großen Petrischalen besteht und sich evtl. die Kolonien des *S. carnosus* auf großen Platten besser verteilen, wurde von jedem Starterkulturpräparat jeweils 1 ml auf eine kleine und auf eine große Platte mit BP-Agar gegeben anschließend wurden diese 48 h bei 37 °C bebrütet.

Bei der Auswertung der Platten ergab sich allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen kleinen und großen Petrischalen, aus diesem Grund wurden die folgenden Hauptversuche weiterhin auf kleinen Platten durchgeführt.

Hauptversuche

Beimpfung der Proben, um herauszufinden, ob *S. aureus* gefunden wird

Alle Proben wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von *S. aureus* beimpft, um festzustellen, ob es möglich ist die typischen *S. aureus* Kolonien von denen des *S. carnosus* zu differenzieren. Für die Beimpfung aller Proben wurde die Ausgangssuspension von *S. aureus* mit 9 ml Kochsalzpepton hergestellt. Diese Suspension beinhaltete $5,2 \cdot 10^9$ Keime. Zum einen wurde 1 ml der 6. Verdünnung dieser Suspension in 90 ml Kochsalzpepton + 10 g Probe gegeben (= **$5,2 \cdot 10^3$ Keime / g** = hohe Beimpfung) zum anderen wurde aus der 7. Verdünnung 1 ml zu 90 ml Kochsalzpepton + 10 g Probe gegeben (= **520 Keime / g** = niedrige Beimpfung). Um die theoretische Ausgangskeimzahl zu bestimmen wurden des Weiteren 1 ml der beiden eingesetzten Verdünnungen der Suspension in 100 ml Kochsalzpepton gegeben. Von allen beimpften Proben und dem beimpften Kochsalzpepton wurde jeweils 1 ml (= 1. Verdünnung) und 0,1 ml (= 2. Verdünnung) auf BP-Agar gegeben und dieser wurde bebrütet. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, damit das Ergebnis aussagekräftig ist, in der Tabelle sind die einzelnen Werte aus der Doppelbestimmung als a bzw. b aufgeführt. Da die beiden Verdünnungen der Starterkulturen unterschiedliche Ergebnisse liefern, wurde aus den ausgezählten Kolonien kein Mittelwert gebildet, sondern jeder Wert einzeln aufgeführt, umgerechnet in Keime / g Probe.

Tabelle 3.2: Quantitative Bestimmung von *S. aureus* in den Starterkulturpräparaten auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 37 °C

Probe	Beimpfung niedrig von <i>S. aureus</i> ATCC 6538		Beimpfung hoch von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	
	KbE / g Kultur 1. Verdünnung	KbE / g Kultur 2. Verdünnung	KbE / g Kultur 1. Verdünnung	KbE / g Kultur 2. Verdünnung
1a	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
1b	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
2a	350	1,3*10 ³	>3*10 ³	8,2*10 ³
2b	230	1,1*10 ³	>3*10 ³	9*10 ³
3a	180	1,2*10 ³	>3*10 ³	8,4*10 ³
3b	180	500	>3*10 ³	6*10 ³
4a	Nicht positiv	500	Nicht positiv	3,8*10 ³
4b	Nicht positiv	500	Nicht positiv	7,1*10 ³
5a	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
5b	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
6a	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
6b	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
7a	360	1,2*10 ³	3*10 ³	7,6*10 ³
7b	410	1,3*10 ³	3*10 ³	9*10 ³
8a	470	1,8*10 ³	2,7*10 ³	6,3*10 ³
8b	530	900	3*10 ³	8,3*10 ³
9a	Nicht positiv	600	Nicht positiv	3,4*10 ³
9b	Nicht positiv	500	Nicht positiv	6,6*10 ³
10a	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
10b	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv

„Nicht positiv“ bedeutet in dieser ebenso wie in folgenden Tabellen dieses Kapitels, dass aufgrund der Verfärbung des Nährbodens durch die Starterkulturpräparate keine typischen Kolonien des *S. aureus* identifiziert werden konnten.

Der Tabelle 3.2 kann entnommen werden, dass in allen Kulturen, die *S. carnosus* enthalten, also 1, 5, 6 und 10, der hinzu gegebene *S. aureus* nicht nachweisbar ist.

In den Kulturen 2, 3, 7 und 8 ließen sich teilweise in der zweiten Verdünnung wesentlich mehr *S. aureus* Kolonien wieder finden als durch die theoretisch vorhandene Ausgangskeimzahl ermittelt wurde. Die erste Verdünnung lieferte vergleichbare Werte mit der Ausgangskeimzahl, es kann in diesen Proben also die

Nachweisgrenze <10 Keime / g Starterkultur eingehalten werden.

Die Proben 4 und 9 konnten in der ersten Verdünnung nicht als positiv gewertet werden, der Agar verfärbt sich grau und der *S. aureus* konnte seine typischen Kolonien nicht ausbilden. Die zweite Verdünnung der beiden Starterkulturpräparate zeigte im Gegenteil dazu eine Übereinstimmung mit der theoretisch vorhandenen Ausgangskeimzahl.

Diese Ergebnisse treffen sowohl für die niedrige wie auch für die hohe Beimpfung mit *S. aureus* zu.

Bebrütung bei 44 °C

Aufgrund der Ergebnisse des vorangegangenen Versuchs und der Annahme, dass *S. aureus* Kolonien auch bei 44 °C wachsen, andere Staphylokokken aber ihr Wachstum minimieren, wurde diese Bebrütungstemperatur für alle Präparate getestet. Außer der Temperaturänderung wurde das ASU-Verfahren nicht verändert; Nährboden, Bebrütungszeit und andere Parameter blieben gleich.

Es wurde wiederum eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Beimpfung der Proben wurde für diesen Versuch eine *S. aureus*- Suspension mit einem Ausgangskeimgehalt von $3,6 \cdot 10^9$ Keimen verwendet. Für die niedrige Beimpfungsstufe wurde 1 ml der 7. Verdünnung der Suspension in 90 ml Kochsalzpepton + 10 g Probe gegeben somit enthielten die Proben theoretisch **360 Keime**, die hohe Beimpfung entspricht einem ml der 6. Verdünnung der *S. aureus*-Gehalt der hoch beimpften Proben entsprach **$3,6 \cdot 10^3$ Keimen**.

Für die Bestimmung des theoretischen Ausgangskeimgehaltes wurde jeweils 1 ml der verwendeten Verdünnungen der Suspension in 100 ml Kochsalzpepton gegeben. Es wurden zwei Verdünnungen des beimpften Kochsalzpeptons auf BP-Agar angesetzt, zum einen 1 ml, zum anderen 0,1 ml. Mit einem Spatel wurde die Probensubstanz auf dem Nährboden verteilt und er wurde, ebenso wie die angesetzten beimpften Proben 48 h bei 44 °C bebrütet.

In der Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengefasst.

Tabelle 3.3: Quantitative Bestimmung von *S. aureus* in den Starterkulturpräparaten auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C

Probe	Beimpfung niedrig von <i>S. aureus</i> ATCC 6538		Beimpfung hoch von <i>S. aureus</i> ATCC 6538	
	KbE / g Kultur 1. Verdünnung	KbE / g Kultur 2. Verdünnung	KbE / g Kultur 1. Verdünnung	KbE / g Kultur 2. Verdünnung
1a	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
1b	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv	Nicht positiv
2a	70	300	$2,2 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$
2b	60	100	$2,3 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^3$
3a	180	200	$1,8 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$
3b	150	300	$1,8 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$
4a	Nicht positiv	900	160	$2,4 \cdot 10^3$
4b	10	200	Nicht positiv	$2,7 \cdot 10^3$
5a	40	500	150	$1,9 \cdot 10^3$
5b	Nicht positiv	Nicht positiv	340	$3,8 \cdot 10^3$
6a	110	300	$2,1 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^3$
6b	160	200	$2,1 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$
7a	250	100	$2,9 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^3$
7b	330	100	$2,3 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
8a	300	300	$2,6 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^3$
8b	280	400	$2,1 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$
9a	Nicht positiv	300	Nicht positiv	$4,5 \cdot 10^3$
9b	Nicht positiv	400	30	$3,9 \cdot 10^3$
10a	Nicht positiv	100	Nicht positiv	$2,3 \cdot 10^3$
10b	Nicht positiv	200	Nicht positiv	300

Der Tabelle kann entnommen werden, dass Probe 1 weiterhin keine positiven Ergebnisse zeigte, der *S. aureus* konnte auch bei 44 °C nicht vom *S. carnosus* differenziert werden. Die Auswertung der ersten Verdünnungen der Proben 4, 5, 9 und 10 war ebenfalls auch bei 44 °C problematisch, wohingegen die zweite Verdünnung dieser Proben zufriedenstellende Ergebnisse lieferte dies bedeutet, dass die Nachweisgrenze für *S. aureus* in diesen Proben auf <100 Keime / g Probe erhöht werden sollte. Die zweite Verdünnung der Probe entspricht einer 1:100 Verdünnung, wenn in dieser eine Kolonie als *S. aureus* identifiziert wird, enthält die Probe rechnerisch 100 Keime pro g. Wenn keine Kolonien auf den Nährböden dieser Verdünnung wachsen, kann davon ausgegangen werden dass die Probe <100 *S.*

aureus Keime enthält.

Die Proben 2, 3, 6, 7 und 8 konnten sowohl in der ersten als auch in der zweiten Verdünnung gut ausgewertet werden, die Nachweisgrenze für *S. aureus* in diesen Proben kann weiterhin <10 Keime / g Kultur sein.

Die prozentuale Wiederfindung von *S. aureus* in den Proben mit niedriger Beimpfung nach Bebrütung bei 37 °C und 44 °C wurde ermittelt. Hierzu wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen (siehe Tabelle 3.2 und 3.3) gebildet, und diese wurden mit der theoretischen Ausgangskeimzahl ins Verhältnis gesetzt. Um einen direkten Vergleich zwischen den Bebrütungstemperaturen zu ermöglichen werden im folgenden die prozentualen Wiederfindungen von *S. aureus* bei 37 °C und 44 °C gegenübergestellt.

Probe	1. Verdünnung		2. Verdünnung	
	<u>37 °C</u>	<u>44 °C</u>	<u>37 °C</u>	<u>44 °C</u>
1	0	0	0	0
2	55,8	18,1	230	55,6
3	34,6	45,8	163,5	69,4
4	0	1,4	96	152,8
5	0	5,5	0	69,4
6	0	37,5	0	69,4
7	74	80,6	240,4	27,8
8	96	80,6	259,6	97,2
9	0	0	105,8	97,2
10	0	0	0	41,7

Durch die Berechnung der Wiederfindung kann deutlich der Vorteil der Bebrütungstemperatur 44 °C gegenüber der Temperatur von 37 °C für die Proben, die *S. carnosus* enthalten, erkannt werden. In allen Präparaten, außer Probe 1, kann die Wiederfindung von *S. aureus* mindestens mit der Nachweisgrenze < 100 gewährleistet werden.

3. Praktischer Teil

Auf den folgenden Fotos ist am Beispiel von Probe 6 der Unterschied zwischen den Bebrütungstemperaturen 37 °C und 44 °C dargestellt. Bild 3.7 zeigt die Reaktion bei 37 °C, man kann keine schwarzen Kolonien mit einem weißen Hof erkennen, der Nährboden ist fast komplett schwarz eingefärbt. Abb. 3.8 zeigt, dass nach der Bebrütung bei 44 °C die Differenzierung von *S. carnosus* und *S. aureus* sehr gut möglich ist.

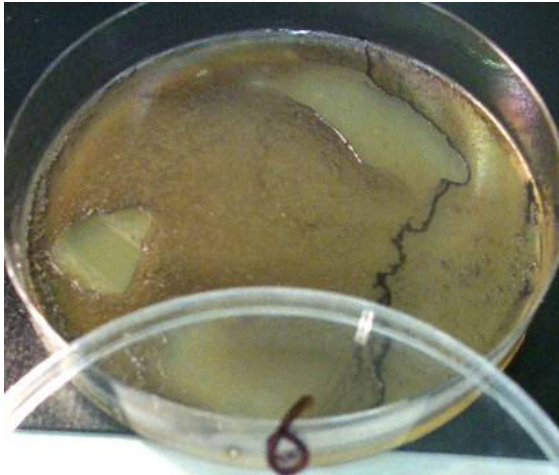


Abb 3.7: Probe 6 Bebrütungstemperatur 37 °C

Abb. 3.8 Probe 6 Bebrütung bei 44 °C

jeweils mit $3,6 \cdot 10^3$ Keimen / g beimpft

Probe 1, Reinkultur *S. carnosus* mit $> 10^{11}$ KbE/g

Da in der Probe 1 auch bei 44 °C der *S. aureus* weder in der ersten noch in der zweiten Verdünnung nachzuweisen war, wurden mit dieser Starterkultur weitere Versuche durchgeführt.

Zunächst wurde dieses Präparat erneut in einer 1:10 Verdünnung eingewogen und es wurden weitere vier Verdünnungsstufen hergestellt, hierzu wurde jeweils 1 ml aus der nächsthöheren Verdünnung in ein Reagenzglas mit 9 ml Kochsalzpepton gegeben. Auf diese Weise entstanden die Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10.000 und 1:100.000. Aus der 1:10 Verdünnung wurden 10 ml in ein steriles Reagenzglas gegeben, damit diese Verdünnung das gleiche Ausgangsvolumen hat, wie die folgenden Verdünnungen. Zur Beimpfung der Proben wurde eine *S. aureus* Suspension mit einem Anfangskeimgehalt von $2 \cdot 10^9$ Keimen verwendet, 1 ml der siebten Verdünnung dieser Suspension wurde den Verdünnungen der Probe

3. Praktischer Teil

zugefügt, doppelt auf BP-Agar angesetzt (a und b) und anschließend 48 h bei 44 °C bebrütet. In der folgenden Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Quantitative Bestimmung von *S. aureus* in Probe 1 in den Verdünnungen 1-5 auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C

Verdünnung	theoretische Anfangskeimzahl KbE / g	KbE / g a	KbE / g b
1	200	Nicht positiv	Nicht positiv
2	$2 \cdot 10^3$	Nicht positiv	Nicht positiv
3	$2 \cdot 10^4$	Nicht positiv	300
4	$2 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^4$	$6,9 \cdot 10^4$
5	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$

Der Tabelle kann entnommen werden, dass ein Auszählen der *S. aureus*-Kolonien in Probe 1 erst ab der vierten Verdünnung möglich war. In der ersten und zweiten Verdünnung konnten die Nährböden nicht als positiv gewertet werden, auch in der dritten Verdünnung kann der *S. aureus* auf Grund des Erscheinungsbildes der Platte nicht oder nur in geringer Zahl wieder gefunden werden. In einem weiteren Versuch mit einer höheren Beimpfungsstufe konnte das Ergebnis bestätigt werden. Auch hier konnte der *S. aureus* in den Verdünnungen 1 – 3 nicht nachgewiesen werden. Das folgende Bild zeigt die fünf Verdünnungen von Probe 1, beimpft mit der hohen Beimpfungsstufe von *S. aureus*.



Abb. 3.9: Mit *S. aureus* beimpfte Probe 1 in den Verdünnungen 1-5 auf BP-Agar nach 48 h Bebrütung bei 44 °C

Die Verdünnungen 1-5 sind auf der Abbildung 3.9 von links nach rechts und von oben nach unten angeordnet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die *S. aureus* Kolonien in den Verdünnungen 1- 3 nicht von denen des *S. carnosus* zu differenzieren sind. Die vierte und die fünfte Verdünnung liefern zuverlässige Ergebnisse. Die Nachweisgrenze von *S. aureus* in dieser Probe ist demnach >10.000 Keime / g Kultur.

Bestätigung mit fünf verschiedenen *S. aureus* Stämmen

Um zu beweisen, dass unterschiedliche Stämme von *S. aureus* die Eigenschaft besitzen, bei 44 °C zu wachsen, wurden jeweils drei Verdünnungen der Suspensionen von dem für die vorigen Versuche verwendeten *S. aureus* Stamm und vier weiteren Stämmen auf BP-Agar gegeben und zum einen bei 37 °C und zum anderen bei 44°C bebrütet. Nach der Bebrütungszeit von 48 h wurden die Kolonien ausgezählt. Die folgende Tabelle 3.5 zeigt die Werte im Vergleich.

Tabelle 3.5: Quantitativer Nachweis verschiedener *S. aureus*-Stämme bei 37 °C im Vergleich zu 44 °C

S. aureus Stamm ATCC	Bebrütung bei 37 °C			Bebrütung bei 44 °C		
	Beimpfung stark KbE/ ml	Beimpfung mittel KbE/ ml	Beimpfung niedrig KbE/ ml	Beimpfung stark KbE/ ml	Beimpfung mittel KbE/ ml	Beimpfung niedrig KbE/ ml
6538	179	25	4	132	24	2
14458	222	39	5	192	45	6
27664	223	29	6	223	36	7
19095	179	38	4	174	29	4
13565	197	37	5	202	32	4

Der Tabelle 3.5 kann entnommen werden, dass alle getesteten *S. aureus* Stämme bei 44 °C ein vergleichbares Wachstum zeigen, wie bei der in der Norm vorgeschriebenen Temperatur von 37 °C. Der Nachweis von *S. aureus* kann also auch bei 44 °C Bebrütungstemperatur durchgeführt werden.

Giollitti-Cantoni-Bouillon

Um eventuell eine niedrigere Nachweisgrenze erreichen zu können, wurde als weitere Methode das MPN-Verfahren nach Giolitti und Cantoni getestet. Für diesen Versuch wurden exemplarisch nur die Proben 1, 6 und 9 herangezogen.

Da dieses Nachweisverfahren insbesondere für Milch- und Milchprodukte, die teilweise lebende Kulturen enthalten können, bestimmt ist, bestand die Annahme, dass es in der Probenmatrix Starterkultur zu zuverlässigen Ergebnissen führt.

Aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Versuche, wurde dieses Verfahren sowohl mit der in der Methode vorgesehenen Bebrütungstemperatur von 37 °C als auch mit 44 °C durchgeführt, es wurde also die Bouillon bei beiden Temperaturen bebrütet und auch die Ausstriche auf BP-Agar.

Die Proben wurden jeweils zwei mal in Kochsalzpepton eingewogen (10 g + 90 ml) und anschließend wurde ihnen 1 ml der 6. bzw. der 7. Verdünnung einer *S. aureus* Suspension mit einem Anfangskeimgehalt von $1,5 \cdot 10^9$ Keimen zugefügt. Ebenso wurde 100 ml reines Kochsalzpepton mit *S. aureus* beimpft, um einen Blindwert zu ermitteln.

Zur besseren Übersichtlichkeit werden in der folgenden Tabelle 3.6 zunächst die vorläufigen Ergebnisse der Bouillon, die bei 37 °C bebrütet und mit den Proben, die mit der 6. Verdünnung der *S. aureus* Suspension beimpft wurde, dargestellt.

Tabelle 3.6: Anzahl verdächtiger Giolitti-Cantoni-Bouillon-Röhrchen der Proben 1, 6 und 9 nach der Bebrütung bei 37 °C

Probe	Anzahl verdächtiger Reagenzgläser			
	Verdünnung 0	Verdünnung 1	Verdünnung 2	Verdünnung 3
Blindwert	3	3	3	3
1	3	3	3	3
6	3	3	3	3
9	3	3	3	3

Die Bouillon, die lediglich *S. aureus*, aber keine Probe enthält, hier Blindwert genannt, färbte sich in allen Verdünnungen komplett schwarz, teilweise war

Gasbildung zu beobachten, das Paraffin war aufgestiegen.

Komplett schwarz färbte sich bei Probe 6 nur die 0. Verdünnung, die erste Verdünnung war grau und durchsichtig, bei den weiteren Verdünnungen bildete sich ein schwarzer Bodensatz. Ebenso verhielt sich Probe 9.

Die Verdünnung 0 der Probe 1 färbte sich orange, der Bodensatz war schwarz-braun, die Verdünnungen 1 und 2 färbten die Nährlösung schwarz, die 3. Verdünnung war gräulich-braun. Alle Verdünnungen wurden als verdächtig angesehen, da eine Verfärbung der Bouillon auftrat. Auf dem folgenden Bild 3.10 sind die Reagenzgläser mit Probe 1 dargestellt.

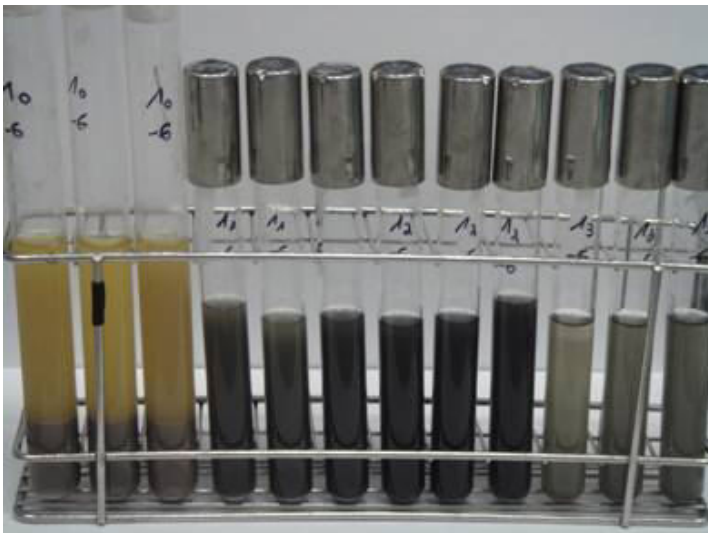


Abb. 3.10: Giolitti-Cantoni-Bouillon mit Probe 1 nach der Bebrütung bei 37 °C

Aus den verdächtigen Röhrcchen wurde zwei mal auf BP-Agar ausgestrichen, um zu bestätigen, dass die verdächtige Reaktion durch *S. aureus* ausgelöst wurde. Jeweils eine Platte aus den Röhrcchen wurde bei 37 °C und die andere bei 44 °C bebrütet. Bei der Auswertung der BP-Platten ergaben sich die in Tabelle 3.7 zusammengefassten Werte.

Tabelle 3.7: Anzahl verdächtiger BP-Ausstriche aus der Giolitti-Cantoni-Bouillon, die bei 37 °C bebrütet wurde

Probe	Anzahl verdächtiger Platten							
	Verdünnung 0		Verdünnung 1		Verdünnung 2		Verdünnung 3	
	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C
Blindwert	3	3	3	3	3	3	3	3
1	0	0	2	2	0	0	0	0
6	0	0	0	0	2	2	0	0
9	0	0	0	0	0	0	2	2

Von allen verdächtigen Platten wurden Kolonien mit dem *Staphylect* bestätigt. In allen Fällen konnten die verdächtigen Kolonien als *S. aureus* bestätigt werden. Der Tabelle kann entnommen werden, dass die Konzentration an *S. aureus* in den Proben hoch ist, da der Blindwert in allen Verdünnungen positiv ist. Nach dem MPN Auswertungsschema sind mindestens 1100 Keime pro g enthalten.

Die verdächtigen Platten aller Proben können nicht nach dem MPN-Auswertungsschema (s. Anhang S. A-3) ausgewertet werden, da diese Kombinationen nicht im Schema enthalten sind. Die meisten Platten waren negativ, da zum Einen durch das starke Wachstum des *S. carnosus* keine verdächtigen Kolonien auf dem Agar ausgemacht werden konnten, zum Anderen die Starterkulturen für *S. aureus* anscheinend eine starke Konkurrenz darstellen. Deutlich zu erkennen ist, dass bei diesem Verfahren kein Unterschied zwischen den beiden Bebrütungstemperaturen der Baird-Parker-Platten besteht. Die positiven Befunde entsprechen sich exakt bei beiden Temperaturen.

Da eventuell das Wachstum von *S. carnosus* auch in der Bouillon bei 44 °C gehemmt werden könnte, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dessen Verlauf bereits die beimpfte Nährlösung bei dieser Temperatur bebrütet wird. Für diesen Versuch wurden die Proben herangezogen, die mit der 7. Verdünnung der *S. aureus* Suspension beimpft wurden (s. o.)

In der Tabelle 3.8 ist die Anzahl der verdächtigen Röhren der einzelnen Verdünnungen aufgeführt.

3. Praktischer Teil

Tabelle 3.8: Anzahl verdächtiger Giolitti-Cantoni-Bouillon-Röhrchen der Proben 1, 6 und 9 nach der Bebrütung bei 44 °C

Probe	Anzahl verdächtiger Reagenzgläser			
	Verdünnung 0	Verdünnung 1	Verdünnung 2	Verdünnung 3
Blindwert	3	3	2	0
1	3	3	3	3
6	3	3	3	3
9	3	3	3	3

Aus jedem verdächtigen Röhrchen wurde zwei mal auf BP-Agar ausgestrichen und zum einen bei 37 zum anderen bei 44 °C bebrütet.

In der folgenden Tabelle 3.9 ist die Anzahl der Platten mit verdächtigen Kolonien in den verschiedenen Verdünnungen zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Anzahl verdächtiger BP-Ausstriche aus der Giolitti-Cantoni-Bouillon, die bei 44 °C bebrütet wurde

Probe	Anzahl verdächtiger Platten							
	Verdünnung 0		Verdünnung 1		Verdünnung 2		Verdünnung 3	
	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C	37 °C	44 °C
Blindwert	3	3	3	3	2	2	-	-
1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0

Nach dem Auswertungsschema für MPN-Verfahren beinhaltet der Blindwert 110 Keime pro g Probe.

Die Auswertung dieses Versuches ergibt, dass es mit dieser Methode nicht möglich ist eine kleine Konzentration von *S. aureus* in den Starterkulturen wieder zu finden.

Keiner der Ausstriche der Proben zeigte typische Kolonien, weil vermutlich ein Überwachsen von *S. carnosus* im Ausstrich erfolgte, alle müssen als nicht positiv bewertet werden. Zur Veranschaulichung zeigen die folgenden Bilder 3.11 und 3.12 einen positiven und einen negativen Ausstrich.



Abb. 3.11: Positiver Ausstrich (Blindwert)

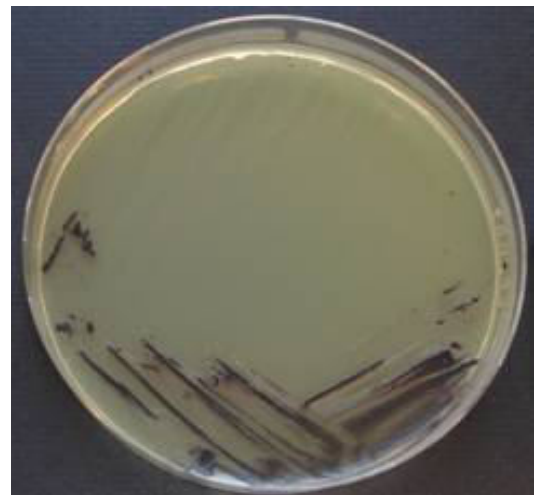


Abb. 3.12: Negativer Ausstrich (Probe 1)

aus Giolitti-Cantoni-Bouillon auf BP-Agar

Auf Abbildung 3.11 sind deutlich die typischen Kolonien des *S. aureus* zu erkennen, wohingegen keine Kolonien mit Hofbildung auf dem Foto 3.12 zu erkennen sind. Der Ausstrich, den diese Abbildung zeigt, wird folglich als negativ gewertet. Da die Proben keinen positiven Ausstrich zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die schwarze Färbung der Bouillon auch durch die Starterkulturen verursacht wurde.

3.2.4 Bewertung

Der Nachweis von *S. aureus* in einigen der vorliegenden Starterkulturpräparaten gestaltete sich schwierig. Durch die Versuche konnte festgestellt werden, dass durch das starke Wachstum des *S. carnosus* eine Differenzierung des *S. aureus* bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C auf BP-Agar nicht möglich ist. Des Weiteren ist auch in zwei Proben, die keine *S. carnosus* Kulturen enthalten, der Nachweis von *S. aureus* problematisch, diese Kulturen enthalten *L. brevis* bzw. *L. fermentum*.

Durch die Erhöhung der Bebrütungstemperatur auf 44 °C konnte bei allen Proben ein quantitativer Nachweis von *S. aureus* ermöglicht werden. Die Nachweisgrenze von < 10 Keimen pro g kann allerdings nicht in allen Proben eingehalten werden. Da die Labormitarbeiter nicht die Zusammensetzungen aller Starterkulturpräparate, die von der Firma Blessing eingeschickt werden, kennen sollte die Nachweisgrenze in allen Kulturen auf < 100 angehoben werden, denn die zweite Verdünnung aller Proben (bis auf Probe 1) liefert zuverlässige Ergebnisse.

Für die Probe 1, die ca. 10^{11} *S. carnosus* Keime enthält, muss eine Nachweisgrenze von < 10.000 festgesetzt werden, da eine Differenzierung von *S. aureus* erst in der vierten Verdünnung möglich ist.

Eine Möglichkeit, um verschiedene Nachweisgrenzen auch für die übrigen Kulturen festlegen zu können, wäre dass der Auftraggeber Blessing angibt, für welches Präparat welche Nachweisgrenze einzuhalten ist.

Die Versuche mit der Giolitti-Cantoni-Bouillon haben ergeben, dass diese nicht einsetzbar ist für die Probenmatrix Starterkultur.

3.3 Qualitativer Nachweis von *Salmonella spp.*

Salmonellen werden bei der SGS u. a. nach dem Verfahren ASU L 00.00-20 nachgewiesen. Dies ist ein qualitatives Verfahren, in dem es herauszufinden gilt, ob in einer definierten Menge Probenmaterial Salmonellen enthalten sind. Die Firma Blessing hat sich als Qualitätsstandard für die Starterkulturen das Ziel „keine Salmonelle in 25 g Kultur“ gesetzt.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die PCR-Methode mit der Probenmatrix Starterkultur getestet, um die Ergebnisse aus der klassischen Methode zu bestätigen.

3.3.1 Nährmedien und Reagenzien

Für das Nachweisverfahren von Salmonellen wurden folgende Nährmedien und Reagenzien benötigt, welche von den genannten Herstellern als Fertignährböden bezogen wurden. Produktinformationen können von den Herstellern erfragt oder der Verfahrensanweisung entnommen werden.

- Trypton Soja Agar (TSA), Oxoid
- Gepuffertes Peptonwasser, einfach und doppelt konzentriert, Oxoid
- entrahmte H-Milch; Hansano
- Tetrathionat-Anreicherungsbouillon nach Muller-Kauffmann (MKTT), Merck
- Rappaport-Vassiliadis-Sojamehlpepton (RVS), Oxoid
- Xylose-Lysin-Desoxycholat- Agar (XLD), Oxoid
- Brillantgrün-Phenolrot-Lactose–Agar (BPLS), Merck
- *Salmonella* Latex Test; Oxoid

Biochemie:

- Lysin-Decarboxylase-Bouillon, Oxoid
- Harnstoff-Agar, Oxoid
- Dreizucker-Eisen-Agar, Oxoid

PCR (*Salmonella* Kit), Biorad:

- Lyse Reagenz
- Fluoreszenz markierte Sonden
- Amplifikationslösung
- Negativ PCR Kontrolle
- Positiv PCR Kontrolle

3.3.2 Methoden

Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln

Die bei der SGS angewandte Methode für Salmonellen in Starterkulturen ist das Horizontale Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln nach ASU L-00.00-20. Diese Methode entspricht der Norm DIN EN ISO 6579:2003.

Der Nachweis und die Bestätigung der Salmonellen erfolgt in vier Schritten, zunächst werden die Proben in Peptonwasser eingewogen (25 g in 225 ml), es folgt die Voranreicherung anschließend wird ein Aliquat dieser Voranreicherung in RVS und MKTT umgeimpft und es folgt eine selektive Anreicherung, wonach dann aus den Selektivanreicherungen auf die Nährböden XLD und BPLS ausgestrichen wird. Nach der Bebrütung (24 h bei 37 °C) werden verdächtige Kolonien auf ihre biochemischen Reaktionen überprüft. Wenn diese typisch ausfallen und auch der *Salmonella* Latex Test positiv verläuft, sind Salmonellen in der Probe enthalten.

Um zu verhindern, dass die in den Starterkulturen enthaltenen Milchsäurebakterien den pH-Wert während der Voranreicherung im gepufferten Peptonwasser stark absenken, wird dieses in doppelter Konzentration eingesetzt, somit sind auch die puffernden Komponenten Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat in doppelter Menge enthalten.

Wirkung der Anreicherung

Durch die im gepuffertem Peptonwasser enthaltenen Nährstoffe, wird das Wachstum von Salmonellen gefördert und auch geschädigte Zellen können wiederbelebt werden. Die Anreicherungszeit von 16-20 Stunden gewährleistet, dass die erforderliche minimale Keimzahl für eine Weiterführung der Analyse erreicht wird.

Durch die Pufferkomponenten wird zudem erreicht, dass der pH-Wert während der Anreicherung konstant gehalten wird.

Die selektive Anreicherungslösung RVS nutzt folgende Wachstumseigenschaften der Salmonellen:

- „Überlebensfähigkeit bei relativ hohem osmotischem Druck
- Vermehrung bei niedrigen pH-Werten
- hohe Resistenz gegen Malachitgrün
- relativ geringe Nährstoffansprüche“

(Oxoid Handbuch S.271)

In der Bouillon entsteht durch Jod und Thiosulfat Tetrathionat, welches von Salmonellen reduziert wird. Die entstehende Schwefelsäure wird durch Calciumcarbonat gepuffert. Die enthaltene Galle wirkt wachstumsfördernd auf Salmonellen, hemmt aber das Wachstum der Begleitflora. Eine weitere hemmende Substanz ist das enthaltene Brillantgrün, durch dieses werden gram-positive Bakterien im Wachstum gehemmt. Durch den Zusatz von Novobicin kann das Wachstum von Bakterien der Proteus-Gruppe gehemmt werden. (Oxoid Handbuch, S.295)

Wirkungsweise von XLD-Agar

Der XLD-Agar kann sowohl für den Nachweis von Salmonellen als auch den Nachweis von Shigellen herangezogen werden. Im Folgenden wird der Nachweis von Salmonellen auf diesem Agar beschrieben. Sie sind in der Lage die im Nährboden enthaltene Xylose zu fermentieren, des Weiteren decarboxylieren sie das Lysin, wodurch der pH-Wert erhöht wird. Aufgrund der Bildung von

Schwefelwasserstoff durch die Salmonellen färben sich die Koloniezentren schwarz. Diese Reaktion lässt eine Differenzierung von Salmonellen und Shigellen zu, da Shigellen keinen Schwefelwasserstoff bilden.

Das im Nährboden enthaltene Desoxycholat dient als Hemmstoff für Coliforme, in der eingesetzten Konzentration können sowohl Salmonellen als auch Shigellen wachsen. Die Differenzierung von anderen Bakterien erfolgt, da viele die enthaltene Lactose oder Saccharose verwerten, wodurch ein relativ hoher Säuregehalt entsteht und somit der pH-Wert nicht in den alkalischen Bereich verschoben werden kann.

Typische Salmonellen-Kolonien auf XLD-Agar sind rot oder gelb-orange, transparent und weisen ein schwarzes Zentrum auf, der Nährboden ist rot. (Oxoid Handbuch S. 316)



Abb. 3.13: Typische Salmonellen-Kolonien auf XLD-Agar

Wirkungsweise von BPLS-Agar

BPLS-Agar dient der Isolierung von Salmonellen, außer *Salmonella typhi* aus Fleisch, Lebensmitteln, klinischem Material und anderem.

Der BPLS-Agar enthält als selektive Inhaltsstoffe Lactose und Saccharose, da die meisten Salmonellen keine Saccharose und keine Lactose abbauen können, sind typische Kolonien rot mit einem leuchtend rotem Hof. Aufgrund des pH-Indikators

färben sich Lactose- und Saccharose-positive Kolonien gelb-grün. Nicht immer vollständig gehemmt ist das Wachstum von *Proteus spp.*, die rote, nicht schwärmende Kolonien ausbilden und *Pseudomonas spp.*, diese Kolonien, sind ebenfalls rot, aber gezackt.

Typische *Salmonella spp.*-Kolonien auf BPLS-Agar sind auf der Abbildung 3.14 dargestellt.



Abb. 3.14: Typische Salmonellen-Kolonien auf BPLS-Agar

Wirkungsweise der Biochemie

Zur Bestätigung der verdächtigen Salmonellen-Kolonien wird von jedem Nährboden eine Kolonie auf ihre biochemischen Eigenschaften getestet.

Hierfür wird zum Einen Lysindecaboxylase-Bouillon mit der verdächtigen Kolonie beimpft und unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Ein Farbumschlag des pH-Indikators Bromkresolpurpur nach Purpur bis Violett und eine Trübung des Mediums zeigen eine positive Reaktion an, da Salmonellen das Lysin zu Cadaverin decarboxylieren.

Des Weiteren wird die Reaktion mit Harnstoff getestet. Salmonellen können diesen nicht spalten, da sie nicht das Enzym Urease besitzen. Bei einer negativen Harnstoff-Reaktion bleibt die Farbe des Harnstoff-Agars gleich. Dies deutet auf das Vorhandensein von Salmonellen hin.

3. Praktischer Teil

Als weitere biochemische Eigenschaft wird der Glucose-Abbau zu Säure überprüft. Durch den Farbumschlag des pH-Indikators Phenolrot, der im TSI-Agar enthalten ist, von rot nach gelb, wird die Produktion der Säure angezeigt. Das im Nährboden enthaltene Thiosulfat kann zu Schwefelwasserstoff reduziert werden, wodurch eine schwarz-Färbung entsteht. Salmonellen sind unter anaeroben Bedingungen in der Lage Glucose abzubauen und einige Spezies zeigen auch die Eigenschaft, Thiosulfat zu reduzieren.

Unter aeroben Bedingungen veratmen Salmonellen die Glucose, dies löst auf der Oberfläche des Nährbodens keine Reaktion aus. Allerdings bauen die Salmonellen Eiweiß unter Bildung von Ammoniak ab, was zu einer tiefroten Färbung des Nährbodens führt.



Abb. 3.15: Typische Salmonellen-Biochemie

Salmonella Latex-Test

Der *Salmonella* Latex Test enthält ein Testreagenz, ein Kontrollreagenz und die entsprechenden Kontrollkarten. Die Latex-Partikel des Testreagenz sind mit polyvalenten *Salmonella*-Antikörpern (IgG) beschichtet. Bei positivem Salmonellen-Befund kommt es bei Vermischung des Testreagenz mit der verdächtigen Kolonie innerhalb von zwei Minuten zu Agglutination. Das Ergebnis kann allerdings nur als positiv gewertet werden, wenn bei der Vermengung des Kontrollreagenz mit der Kolonie keine Reaktion auftritt, denn diese Latex-Partikel sind mit unspezifischen Kaninchenglobulinen beschichtet (Oxoid Handbuch, Seite 449).

Polymerase Chain Reaction (PCR)-Methode

Die PCR-Methode ist eine häufig genutzte molekular-genetische Methode, mit der man Bakterien und Viren in Lebensmitteln nachweisen und identifizieren kann (Jay, J. M. et al, 2005, S.258).

Bei der PCR lassen sich, mit Hilfe von Desoxy-Nukleosid-Triphosphaten (dNTP), hitzestabiler DNA-Polymerasen und Startsequenzen (Primer), DNA-Moleküle fast beliebig oft vermehren. Das Gemisch aus diesen Reagenzien und der Probe wird auf 96 °C erhitzt, wodurch die DNA denaturiert wird. Durch das Abkühlen auf 60 °C paaren sich die DNA-Stränge wieder, wozu auch die komplementären Primer in der Lage sind. Durch erneutes Erhitzen auf 72 °C werden die Primer durch die DNA-Polymerase verlängert und es entsteht eine neue Anheftungssequenz für den zweiten Primer. Nun wird das Gemisch erneut auf 96 °C erhitzt und der zweite Zyklus beginnt. Nach ca. 30 Cyclen entstehen auf diese Weise etwa 10^6 Tochtermoleküle. (Cypionka, H., 2003, S. 76 f)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Real-Time PCR Gerät Chromo 4 von Biorad genutzt. Als zusätzliche Hilfsmittel wurden Multiplates und Sealers von Biorad eingesetzt.

Die Auswertung der Proben übernimmt das Gerät, wobei Proben, die Salmonellen-DNS enthalten als positiv bewertet werden, solche die keine Salmonellen-DNS enthalten, als negativ.

Auch für dieses Verfahren werden die Proben zunächst in gepuffertem Peptonwasser vorangereichert. Im Falle der Starterkulturen wird auch für die PCR-Methode das doppelt konzentrierte Peptonwasser zur Anreicherung genutzt, nach 20 Std. bei 37 °C wird die PCR durchgeführt.

Die Vorteile der PCR gegenüber der klassischen Methode bestehen in der hohen Sensitivität und Spezifität (Jay, J. M. et al., 2005, Seite 258).

3.3.3 Ergebnisse

Vorversuche

Um herauszufinden, in wie weit die Starterkulturen in der Lage sind den pH-Wert in unterschiedlichen Voranreicherungsmedien und in den selektiven Anreicherungsmedien abzusenken, wurde ein Vorversuch durchgeführt. 25 g jedes Starterkulturpräparates wurden in jeweils 225 ml gepuffertes Peptonwasser und doppelt konzentriertes, gepuffertes Peptonwasser eingewogen, die Proben 2 und 9 wurden zusätzlich in 225 ml entrahmte Milch mit 1 ml Brillantgrün gegeben. Der AusgangspH-Wert am Zeitpunkt t_0 wurde gemessen. Anschließend wurden diese Suspensionen in den 37 °C Brutraum gestellt und 20 Std. vorangereicht. Nach diesen 20 Std. Voranreicherung wurde der pH-Wert erneut gemessen (Zeitpunkt t_1)

In den folgenden Grafiken 3.16 und 3.17 sind die pH-Verläufe in gepuffertem Peptonwasser und doppelt konzentriertem gepufferten Peptonwasser dargestellt.

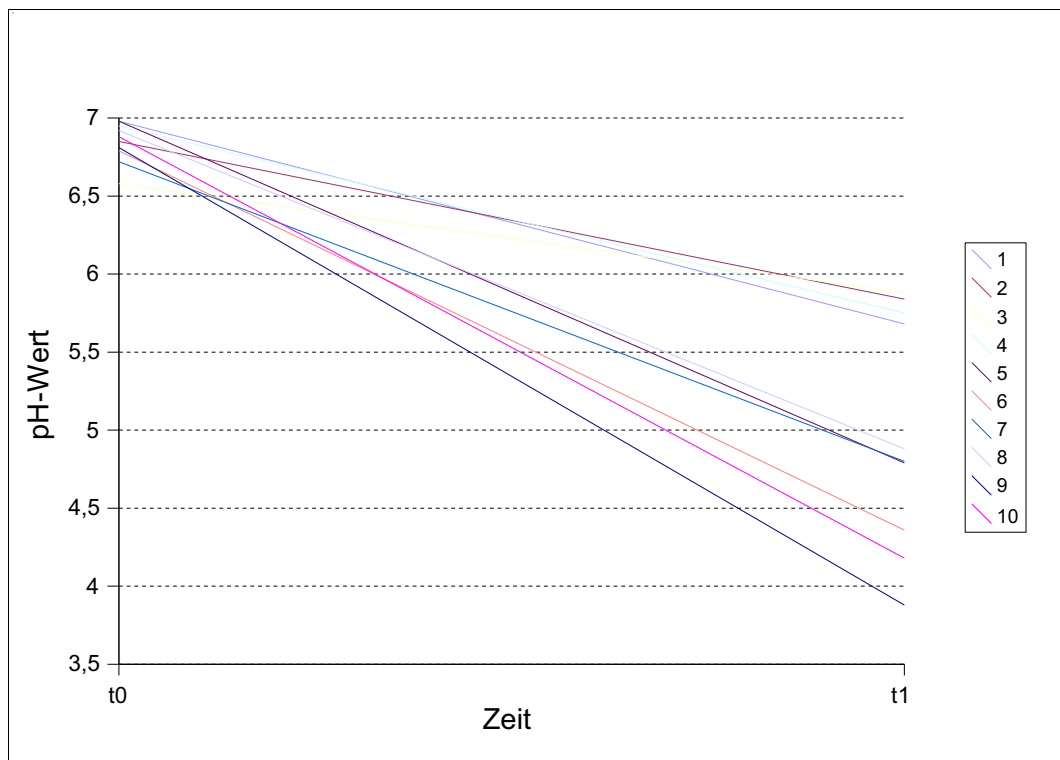


Abb. 3.16: Senkung des pH-Wertes während 20 Std. Voranreicherung durch die Proben 1-10 in gepuffertem Peptonwasser

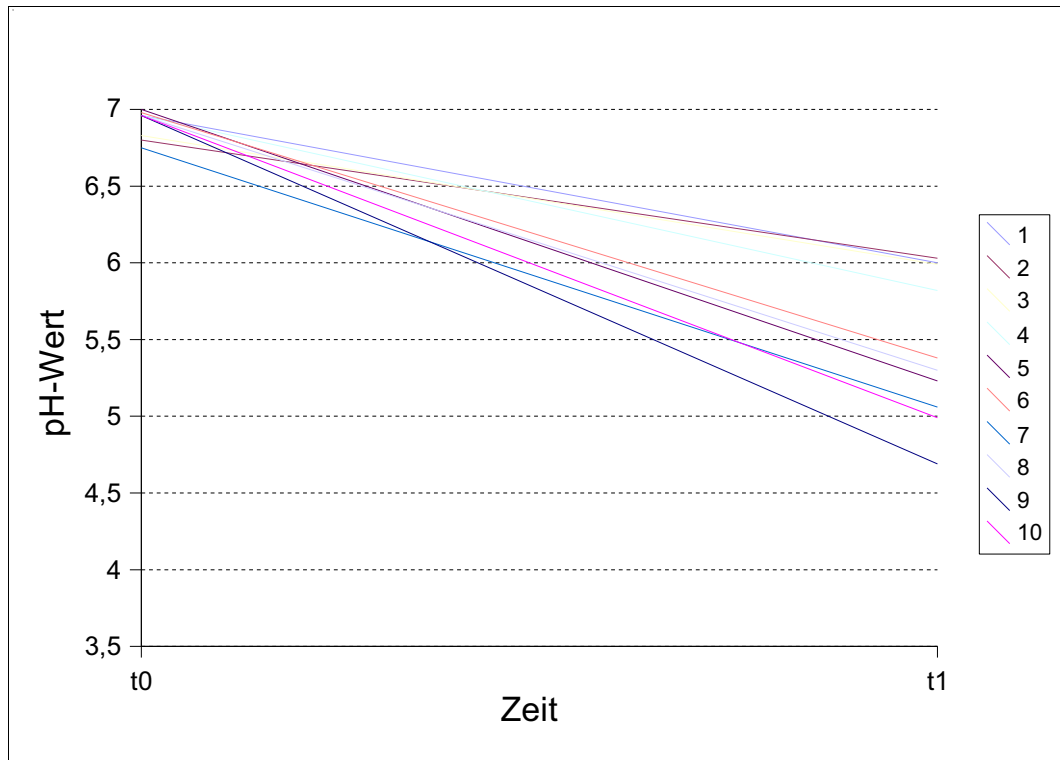


Abb. 3.17: Senkung des pH-Wertes während 20 Std. Voranreicherung durch die Proben 1-10 in doppelt konzentriertem gepuffertem Peptonwasser

Auf den beiden Grafiken ist zu erkennen, dass alle 10 Starterkulturen in der Lage sind, den pH-Wert, sowohl im einfach konzentrierten als auch im doppelt konzentrierten Peptonwasser während der 20 Std. Voranreicherung zu senken. In beiden Anreicherungsmedien senkten die Proben 9 und 10 den pH-Wert besonders stark ab.

Deutlich zu erkennen ist der Vorteil des doppelt konzentrierten Peptonwassers gegenüber dem einfach konzentrierten. Während beispielsweise die Probe 9 im einfach konzentrierten den pH-Wert bis auf 3,88 senkte, konnte sie ihn im doppelt konzentrierten nur auf 4,69 senken.

Auch in der Milch wurde der pH-Wert durch die Starterkulturpräparate 2 und 9 deutlich reduziert, nach der 20-stündigen Voranreicherung fiel er bei Probe 2 auf 4,74 und Probe 9 senkte ihn sogar auf 4,39.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Versuche mit doppelt konzentrierten Peptonwasser durchgeführt.

3. Praktischer Teil

In den selektiven Anreicherungsmedien RVS und MKTT wurde der pH-Wert, während der zweiten Anreicherung, durch einige Starterkulturen ebenfalls abgesenkt, in der folgenden Tabelle 3.10 sind die Werte zusammengefasst. Die Ausgangs-pH-Werte von RVS und MKTT sind 5,2 und 8,0.

Tabelle 3.10: pH-Wert-Änderung in RVS und MKTT nach 24 Std Anreicherung bei 42 bzw. 37 °C

Probe	RVS		MKTT	
	Anfang	Ende	Anfang	Ende
1	5,31	4,94	7,38	6,08
2	5,18	5,17	7,58	5,91
3	5,26	5,31	7,52	5,89
4	5,34	5,18	6,94	5,86
5	5,29	5,16	6,83	5,86
6	5,29	5,21	6,43	5,65
7	5,33	5,25	7,69	5,44
8	5,23	5,26	7,05	5,74
9	5,26	5,22	7,17	5,66
10	5,26	5,09	6,74	5,33

Der Tabelle 3.10 kann entnommen werden, dass der pH-Wert der MKTT-Bouillon auch während der zweiten Anreicherung durch die Starterkulturen gesenkt wird. Keine der Proben konnte diesen allerdings auf Werte unterhalb von 4 zu senken.

In der RVS-Bouillon wurde der pH-Wert nur geringfügig verändert, wobei die Proben 1, 2, 4, 5 und 10 den pH-Wert senkten, die Proben 3, 7 und 8 den pH-Wert leicht erhöhten und ein nahezu konstanter Wert bei den Proben 6 und 9 zu beobachten war.

Beimpfung der Proben mit *Salmonella senftenberg*

Um einen ersten Eindruck darüber zu gewinnen, ob die Salmonellen die Anreicherungen überleben und sich vermehren können, wurden die Proben in einer Suspension mit 225 ml doppelt konzentriertem Peptonwasser mit einer undefinierten Menge von *Salmonella senftenberg* beimpft. Das ASU-Verfahren L-00.00-20 wurde angewendet und die Ausstriche wurden nach der Bebrütung ausgewertet.

Die Ausstriche lieferten sowohl auf BPLS-Agar als auch auf XLD-Agar aus beiden Anreicherungsbouillons folgende Ergebnisse:

1. verdächtig
2. verdächtig
3. verdächtig
4. verdächtig
5. verdächtig
6. verdächtig
7. verdächtig
8. verdächtig
9. verdächtig
10. verdächtig

Da alle Kulturen mit Salmonellen beimpft waren, kann davon ausgegangen werden, dass alle verdächtigen Platten als positiv gewertet werden können. Aus diesem Grund und da es sich um einen Vorversuch handelte, wurde auf die weitere Identifizierung verzichtet.

Auf der folgenden Abbildung 3.18 sind verdächtige Kolonien auf XLD- und BPLS-Platten im Verdünnungsausstrich dargestellt.



Abb. 3.18: Verdächtige Kolonien auf XLD- (links) und BPLS- (rechts) Platten im Verdünnungsausstrich

Hauptversuche

Um herauszufinden, inwieweit sich die Salmonellen während der Anreicherung vermehren, wurden 25 g der Proben in Lösung mit 225 ml doppelt konzentriertem Peptonwasser mit zwei bekannten Konzentrationen von *Salmonella senftenberg* beimpft. Nach der Voranreicherung in doppelt konzentriertem Peptonwasser wurden diese auf XLD-Agar angesetzt und anschließend in die selektiven Anreicherungsbouillons umgeimpft. Nach der zweiten Anreicherung wurden alle Proben sowohl aus der RVS- als auch aus der MKTT-Bouillon auf XLD- und BPLS-Agar angesetzt.

Zur Beimpfung der Proben wurde eine Salmonellen-Suspension mit einem Anfangskeimgehalt von $2,6 \cdot 10^9$ Keimen herangezogen. Von dieser Suspension wurde 1 ml der 6. Verdünnung für die hohe Beimpfungsstufe und 1 ml der 7. Verdünnung für die niedrige Beimpfung in die Anreicherungslösungen gegeben, so dass die Proben mit $2,6 \cdot 10^3$ bzw. mit 260 Keimen beimpft wurden. Der Keimgehalt der Salmonellen-Suspension wurde bestimmt, indem aus den verwendeten Verdünnungen der Suspension direkt auf XLD-Agar angesetzt wurde.

3. Praktischer Teil

Bereits nach der Voranreicherung in doppelt konzentrierten Peptonwasser konnte eine deutliche Vermehrung der Salmonellen festgestellt werden; typische Salmonellen-Kolonien wuchsen auf beiden Nährböden noch in der siebten und achten Verdünnung der Anreicherungslösungen, was bedeutet, dass in jedem Fall mehr als 10^7 Salmonellen / ml in der Anreicherung gewachsen waren. Aufgrund des nicht abgeschlossenen Versuches, werden diese Ergebnisse nicht konkret dargestellt.

Nach der selektiven Anreicherung in RVS- und MKTT-Bouillon wurden bei der Auszählung die in der folgenden Tabelle 3.11 zusammengefassten Keimzahlen in KbE / ml erzielt:

Tabelle 3.11: Präsumtive Salmonellen auf XLD- und BPLS-Agar nach der Anreicherung in RVS- und MKTT-Bouillon

Probe	RVS				MKTT			
	Beimpfung hoch KbE / ml		Beimpfung niedrig KbE / ml		Beimpfung hoch KbE / ml		Beimpfung niedrig KbE / ml	
	XLD	BPLS	XLD	BPLS	XLD	BPLS	XLD	BPLS
1	$2,7 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$
2	$8,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$	$7,8 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$
3	$2,5 \cdot 10^7$	$5,8 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$
4	$3,2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^7$	$9,6 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^8$
5	$2,7 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^7$	$7,9 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^8$	$4,1 \cdot 10^8$
6	$4,0 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$	$3,1 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$
7	$6,6 \cdot 10^7$	$9,7 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$
8	$7,1 \cdot 10^7$	$9,6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^8$
9	$1,4 \cdot 10^8$	$8,6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^8$
10	$2,9 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$

Der Tabelle 3.11 ist zu entnehmen, dass die Salmonellen sich während der Anreicherung deutlich vermehrten. In allen Fällen wurde eine Keimzahl $>10^6$ erzielt. Durch das vorherige Umimpfen in die Anreicherungslösungen (0,1 ml in RVS und 1 ml in MKTT) waren nur noch sehr geringe Mengen der Probensubstanz und dementsprechend der Salmonellen in der Lösung, dennoch waren nach der Anreicherung Salmonellen in der Größenordnung 10^6 nachweisbar. Durch das

Anreicherungsverfahren spielt die zugesetzte bzw. vorhandene Menge an Salmonellen keine Rolle, deutlich ist dies an Probe 4 zu erkennen, insbesondere im Anreicherungsmedium MKTT. Hierin haben sich die Salmonellen in der niedrigen Beimpfungsstufe auffällig besser vermehrt, als in der hohen Beimpfung.

Scheinbar vermehren sich die Salmonellen in den Proben 4 und 10 nicht so stark, wie in den anderen Proben, allerdings reicht das Wachstum aus, um sie nachweisen zu können. Dies wird auch belegt durch den Vorversuch, in dem lediglich die Ausstriche herangezogen wurden.

Von jeder Probe wurde eine verdächtige Kolonie mittels Biochemie und Salmonella Latex Test bestätigt. Alle Bestätigungsreaktionen zeigten die typischen Reaktionen der Salmonellen.

PCR

Um die Ergebnisse aus der klassischen Methode zu bestätigen, wurde zusätzlich eine PCR mit allen Proben durchgeführt. Es wurde das Biorad Gerät und das Testkit dieses Herstellers genutzt.

Auch mit dieser Methode wurden alle beimpften Proben positiv auf Salmonellen getestet (Ergebnisse siehe Anhang S. A-4).

3.3.4 Bewertung

Die Methode ASU L-00.00-20 ist für alle 10 Starterkulturpräparate anwendbar. Während der Versuche konnten keine Probleme festgestellt werden. Auch mittels PCR konnten die Salmonellen in allen Proben wiedergefunden werden.

Als Voranreicherungsmedium sollte weiterhin das doppelt konzentrierte gepufferte Peptonwasser verwendet werden, da die pH-Wert-Messung ergeben hat, dass die Kulturen im einfach konzentrierten Peptonwasser den pH-Wert teilweise auf <4 senken konnten.

3.4 Qualitativer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wird bei der SGS für die vorliegenden Starterkulturproben üblicherweise im qualitativen Verfahren nach ASU L-00.00-32 Teil 1 nachgewiesen. Als Qualitätsstandard gilt, entsprechend dem der Salmonellen, keine Listerie pro 25 g Starterkultur. Um festzustellen, ob mittels dieser Methode die Listerien in den Starterkulturen wiedergefunden werden können, wurden beimpfte Proben nach diesem Verfahren untersucht.

Auch das quantitative Zählverfahren wurde für einige Kulturen getestet. Anhand dieses Verfahrens wurde auch die Reaktion der einzelnen Präparate auf den Nährböden Aloa und Oxford überprüft.

3.4.1 Nährmedien und Reagenzien

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* werden folgende Nährmedien und Reagenzien verwendet, welche als Fertigmischungen von den genannten Herstellern bezogen werden. Rezepturen können von den Herstellern erfragt oder der Norm entnommen werden.

- TSA, Oxoid
- Halb-Fraser-Bouillon, Oxoid
- Voll-Fraser-Bouillon, Oxoid
- Listeria-Anreicherungsbouillon, Oxoid
- Peptonwasser, doppelt gepuffert, Oxoid
- Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti (Aloa), AES
- Oxford- Agar, Oxoid
- Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Agar (TSYEA), Oxoid
- Columbia-Agar, Oxoid mit Schafblut, Elocin Lab
- Christie, Atkins, Munch-Petersen- Medium (CAMP), Oxoid
- Purple-Broth mit Rhamnose/ Xylose, Becton Dickinson

3.4.2 Methoden

Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* (ASU L-00.00-32)

Die Verfahrensanweisung L-00.00-32 ist in zwei Teile untergliedert, zum einen Teil 1: Nachweisverfahren und zum anderen Teil 2: Zählverfahren.

Üblicherweise wird für die Probenmatrix Starterkultur bei der SGS Teil 1, also das Nachweisverfahren angewendet. Hierbei gilt es festzustellen, ob in 25 g Probenmaterial *Listeria monocytogenes* (bzw. *Listeria spp.*) enthalten ist. Um dies herauszufinden, wurde diese Menge an Starterkultur in 225 ml Halbfraser-Bouillon eingewogen und 24 h \pm 2 h bei 30 °C angereichert, nach dieser Zeit wird aus dieser Bouillon 0,1 ml in Vollfraser umgeimpft und auf zwei selektive Nährböden ausgestrichen und diese werden 48 h bei 37 °C bebrütet. Der Nährboden Aloa ist durch die Norm vorgeschrieben, der zweite Nährboden ist frei wählbar, bei der SGS wird zu diesem Zwecke Oxford-Agar genutzt. Die Vollfraser-Bouillon wird 48 h \pm 2 h bei 37 °C angereichert, anschließend wird hieraus erneut auf den zwei Nährböden ein Verdünnungsausstrich gemacht und dieser wird bebrütet.

Bis zu fünf verdächtige Kolonien müssen auf TSYE-Agar ausgestrichen, um mittels CAMP-Test und biochemischer Eigenschaften bestätigt zu werden.

Über dem Schräglicht der Henry-Lampe scheinen Listerien-Kulturen auf TSYE-Agar bläulich, diese Eigenschaft kann zur ersten Kontrolle herangezogen werden.

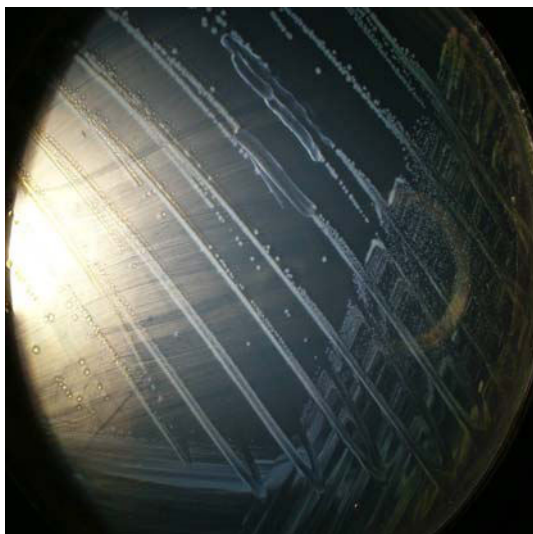


Abb. 3.19: Listerien-Kolonien auf TSYE-Agar über dem Schräglicht der Henry-Lampe

Beim Zählverfahren werden die Proben nicht angereichert, sondern in Kochsalzpeptonlösung eingewogen und direkt ggf. in weiteren Verdünnungen auf die oben genannten Nährböden angesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde als Anreicherungsbouillon anstelle der Fraser-Bouillons auf gepufferte *Listeria*-Anreicherungslösung zurückgegriffen, da diese zur selektiven Anreicherung von Listerien aus fermentierten und sauren Lebensmitteln empfohlen wird. Das Verfahren ist eine einstufige Anreicherung, entspricht aber ansonsten dem oben beschriebenen.

Wirkungsweise der Halb- und Vollfraser-Bouillon

Die Fraserbouillons sind zur selektiven zweistufigen Anreicherung von Listerien in Lebensmitteln bestimmt. Durch den Inhaltsstoff Lithiumchlorid wird das Wachstum von Enterokokken gehemmt. Weitere Substanzen die die Bouillons enthalten, sind Äsculin und Eisen(III)-ammoniumcitrat. Die Eisenverbindung fördert das Wachstum von *Listeria monocytogenes*. Während der primären Anreicherung in der Halbfraser-Bouillon ist die Anzucht geschädigter Listerien, durch die geringere Menge der Inhaltsstoffe Nalidixinsäure und Acriflavin verbessert. Der Vollfraser-Bouillon werden diese in doppelter Konzentration zugesetzt.

Eine Schwarzfärbung der Bouillon deutet auf die Anwesenheit von Listerien hin, da diese das Äsculin hydrolisieren und das Produkt dieser Reaktion mit den Eisen(III)-Ionen schwarze Präzipate bildet.

Wirkungsweise des Aloa-Agars

Durch die im Aloa-Agar enthaltenen Nährstoffe Fleischpepton, Caseinpepton, Hefeextrakt, Natriumpyruvat, Glucose und Magnesiumsulfat wird das Wachstum der Listerien gefördert, während durch die selektiven Inhaltsstoffe Lithiumchlorid, Ceftacimid, Nalidixinsäure und Polymyxin B andere Bakterien am Wachstum gehindert werden. Als Antimykotikum enthält der Nährboden zusätzlich Amphotericin B.

Durch *Listeria monocytogenes* werden auf diesem Agar die Enzyme phosphatidylspezifische Phospholipase (PIPLC) und β -Glucosidase gebildet. PIPLC kann das im Nährboden enthaltene Substrat L- α -Phosphatidylinositol abbauen. Aufgrund des Abbaus entsteht der trübe Hof um die Kolonien.

Durch die β -Glucosidase wird das chromogene Substrat x-Glucosid gespalten, wodurch die blaue Färbung der Kolonien entsteht (www.heipha.de).



Abb.: 3.20 Typische *Listeria monocytogenes*-Kolonien auf Aloa-Agar

Wirkungsweise des Oxford-Agars

Oxford-Agar enthält eine Vielzahl von selektiven Substanzen, die das Wachstum anderer Keime einschränken sollen, nicht aber das Wachstum von Listerien unterdrücken. Folgende selektive Inhaltsstoffe sind im Nährboden enthalten: Lithiumchlorid, Acriflavin, Colistin, Cefotetan, Cycloheximid und Fosfomytin, wodurch das Wachstum gramnegativer Bakterien vollständig gehemmt wird. Durch Hydrolyse des im Nährboden enthaltenen Äsculins und Bildung eines Eisen-Phenol-Komplexes

entstehen die typischen, durch Listerien gebildeten, schwarzen Höfe. Einige Staphylokokken können als Äsculin-negative, gelbe Kolonien wachsen.

Typische *Listeria monocytogenes*-Kolonien sind braun und haben einen braunschwarzen Hof, als weiteres Charakteristikum bilden sie einen Krater in der Kolonienmitte (Oxoid Handbuch S. 218 f).

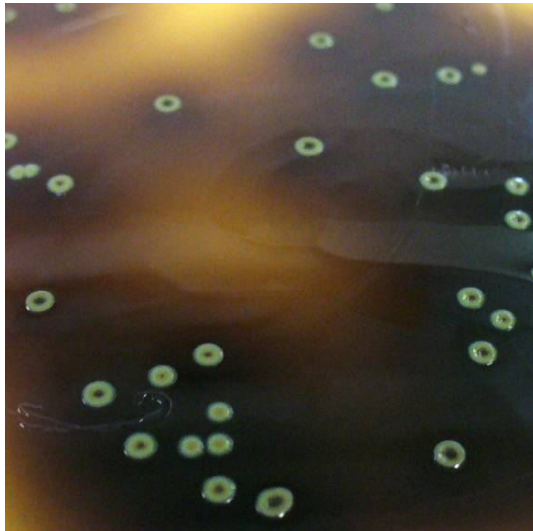


Abb. 3.21: Typische *Listeria monocytogenes*-Kolonien auf Oxford-Agar

Wirkungsweise des CAMP-Tests

Der CAMP-Test wird auf einem Agar, der 5 % Schafblut enthält, durchgeführt. Es wird das Verhalten der verdächtigen Kolonie gegenüber *S. aureus* getestet. Zu diesem Zwecke wird ein *S. aureus* Stamm quer über dem Nährboden ausgestrichen, im rechten Winkel dazu werden die verdächtigen Kolonien ausgestrichen, ohne dass diese sich untereinander und den *S. aureus* berühren. Zur Kontrolle wird auf die gleiche Weise zum einen *Listeria monocytogenes* und zum anderen *Listeria innocua* auf dem Nährboden ausgestrichen. Wenn sich nach 24 h eine klare Zone am Rand des *S. aureus* Ausstriches gebildet hat, ist dies ein Hinweis auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes*, da diese in der Lage ist, das Schafblut zu hämolysieren. Der Kontrollausstrich von *Listeria innocua* darf keine Reaktion zeigen.

Auf der Abbildung 3.22 ist ein CAMP-Test dargestellt, der darauf hindeutet, dass alle fünf verdächtigen Kolonien tatsächlich *Listeria monocytogenes*-Kolonien sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich durch die Hämolysierung des Schafblutes die typischen

„Nasen“ gebildet haben. Der Kontrollausstrich von *Listeria monocytogenes* zeigt die gleiche Reaktion, während der Kontrollausstrich von *Listeria innocua* nicht in der Lage ist das Blut zu verstoffwechseln.

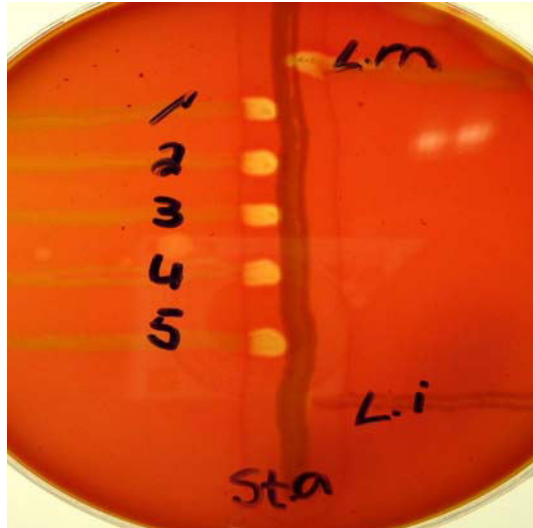


Abb. 3.22: Positiver CAMP-Test

Biochemische Reaktionen

Um die biochemischen Reaktionen der Kolonien zu testen, werden diese mit Hilfe einer Impföse in zwei unterschiedliche Kohlenhydrat-Bouillons gegeben. Eine der Bouillons enthält Rhamnose, die andere Xylose. Aufgrund des Abbaus der Kohlenhydrate entsteht Säure, was durch die gelb-Färbung der Lösung sichtbar wird. *Listeria monocytogenes* ist in der Lage Rhamnose abzubauen, kann Xylose allerdings nicht verstoffwechseln.



Abb.3.23: Biochemische Reaktionen, die auf *Listeria monocytogenes* hinweisen

3. Praktischer Teil

Auf der Abbildung 3.23 ist deutlich die gelbe Färbung der Lösung mit Rhamnose zu erkennen (Kennzeichnung durch das „R“ auf dem Röhrchen), wohingegen die Xylose-Lösung ihre Farbe nicht verändert. Diese Konstellation deutet auf *Listeria monocytogenes* hin.

Wenn alle typischen Reaktionen auftreten, kann davon ausgegangen werden, dass die verdächtige Kolonie tatsächlich *Listeria monocytogenes* ist. Sollten nur einige der Bestätigungsreaktionen mit denen von *Listeria monocytogenes* übereinstimmen, sollte geprüft werden, ob es sich möglicherweise um eine andere Art der Gattung *Listeria* handelt. Hierzu steht folgendes Auswertschema, das nahezu aus der ASU L 00.00-22 übernommen wurde, zur Verfügung:

Tabelle 3.12: Reaktionen zur Bestimmung von *Listeria* spp.

<i>Listeria</i> -Art	Hämolyse	Säureproduktion		CAMP-Test
		Rhamnose	Xylose	
<i>monocytogenes</i>	+	+	-	+
<i>innocua</i>	-	V	-	-
<i>ivanovii</i>	+	-	+	-
<i>seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)
<i>welshimeri</i>	-	V	+	-
<i>grayi</i>	-	-	-	-

V unterschiedliche Reaktion
 (+) schwache Reaktion
 + positive Reaktion in mehr als 90 % der Fälle
 - keine Reaktion

In seltenen Fällen existieren Stämme von *Listeria monocytogenes*, die keine β -Hämolyse oder eine positive Reaktion im CAMP-Test unter den genannten Bedingungen zeigen.

3.4.3 Ergebnisse

Vorversuch

Verhalten der Starterkulturen auf Aloo- und Oxford-Agar

Um herauszufinden, wie sich die Starterkulturen auf den selektiven Nährböden für Listerien Aloo und Oxford verhalten, wurden diese in Kochsalzpepton eingewogen, in der 1:10 und in der 1:100 Verdünnung auf den beiden Nährböden angesetzt und 48 h bei 37 °C bebrütet. Dabei konnten folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Tabelle 3.13: Verhalten der Proben auf den Nährböden Aloo und Oxford

Probe	Verhalten auf Oxford-Agar	Verhalten auf Aloo-Agar
1	gelbe Schlieren	weiße Schlieren
2	gelbe Schlieren und Kolonien	kein Wachstum
3	gelbe Kolonien	schwache weiße Schlieren
4	leichte schwarze Färbung	türkise Flecken
5	gelbe Schlieren	weiße Kolonien
6	gelbe Kolonien	weiße Kolonien
7	grau-schwarze Färbung	türkise Färbung
8	dunkle Kolonien, gelbe Schlieren	kein Wachstum
9	gelbe Kolonien	kein Wachstum
10	gelbe Kolonien, dunkle Flecken	türkise Färbung, weiße Kolonien

Interessant an diesen Ergebnissen erscheint, dass die Proben 4 und 7 die gleichen Farbreaktionen auf beiden Nährböden auslösten, die auch durch Listerien bewirkt werden, ohne dabei jedoch Kolonien zu bilden, wobei dieses daran liegen kann, dass sich aufgrund der riesigen Zahl an Keimen keine Einzelkolonien ausbilden können. Die gelben Kolonien auf dem Oxford-Agar sind vermutlich die *S. carnosus*-Kulturen, die in den Proben enthalten sind, was darauf hindeutet, dass auch die Präparate 2, 3, 8 und 9 durch diese leicht verunreinigt sind. Um diese Ergebnisse zu verdeutlichen, zeigen die folgenden Abbildungen beispielhaft das Verhalten der Probe 7 (Abb. 3.24), Probe 4 (Abb. 3.25) Probe 2 (Abb. 3.26) und Probe 1 (Abb. 3.27) auf den Nährböden.

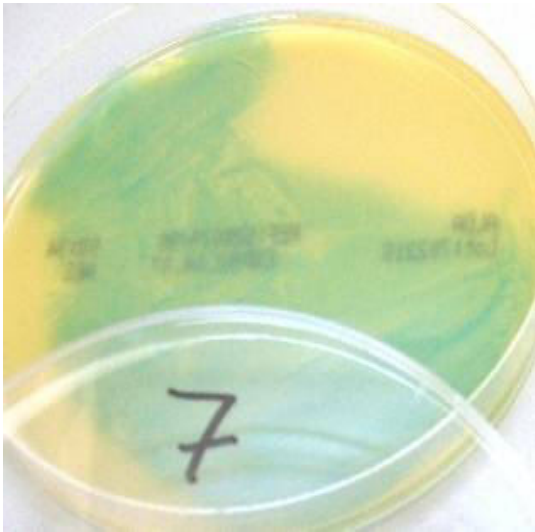


Abb. 3.24: Türkise Färbung des ALOA-Agars



Abb. 3.25: Schwarze Färbung des Oxford-Agars



Abb. 3.26: Gelbe Schlieren und Kolonien auf Oxford-Agar



Abb. 3.27: Weiße Schlieren auf ALOA-Agar

pH-Wert Verlauf während der Anreicherung

Um festzustellen, ob die Starterkulturen in der Lage sind, den pH-Wert während der 72-stündigen Anreicherung zu verändern, wurden diese in Halbfraser eingewogen und im direkten Anschluss zum Zeitpunkt t_0 wurde der pH-Wert gemessen. Nach der primären Anreicherung (nach 24 h) in dieser Bouillon wurde der pH-Wert am Zeitpunkt t_1 erneut gemessen. Aus der Halbfraser-Bouillon wurde 0,1 ml in Voll-

fraser-Bouillon umgeimpft, der pH-Wert wurde am Zeitpunkt t_2 , direkt nach Umimpfen in Vollfraser-Bouillon wiederum gemessen und notiert. Nach weiteren 48 h bei 37 °C wurde der pH-Wert ein letztes Mal (t_3) gemessen.

Folgende pH-Wert Veränderungen traten während der Anreicherung in den Fraser-Bouillons auf:

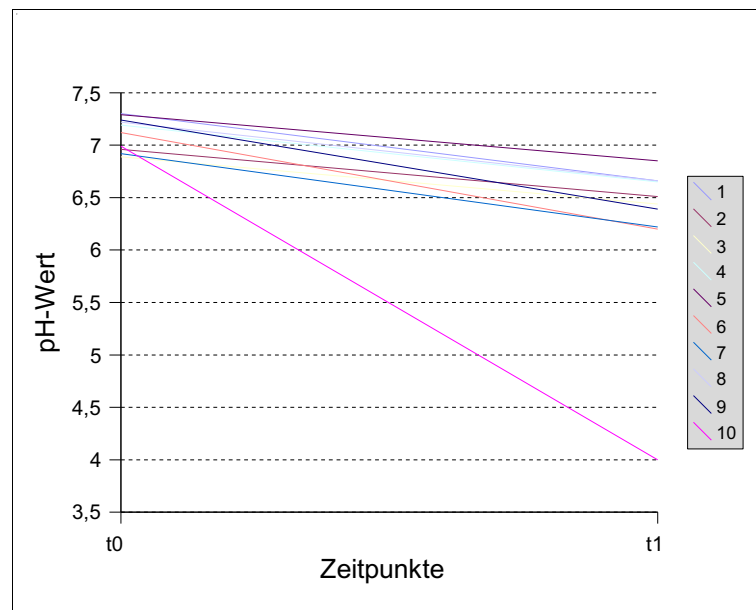


Abb. 3.28: pH-Veränderung während der primären Anreicherung in Halbfraser-Bouillon

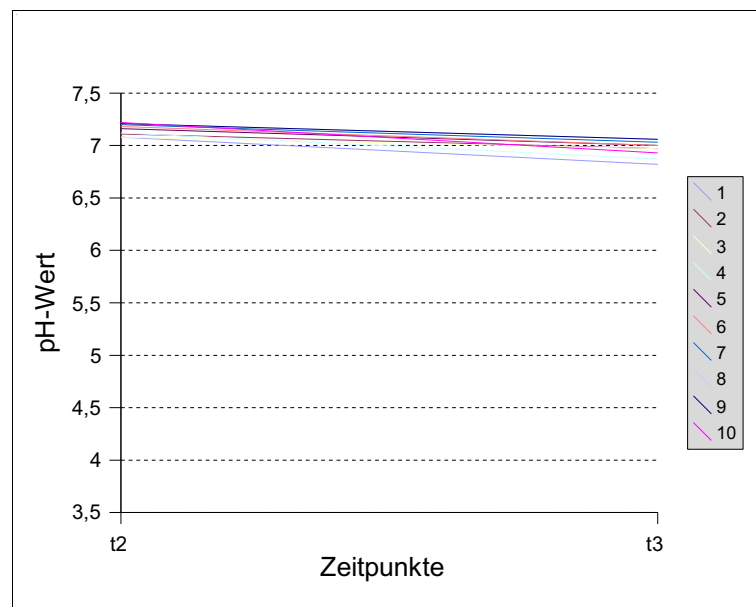


Abb. 3.29: pH-Veränderung während der sekundären Anreicherung in Vollfraser-Bouillon

Während der ersten Anreicherung in Halbfraser-Bouillon senkten die Proben 1-9 den pH-Wert nur geringfügig. Da Listerien bis zu einem pH-Wert von 4,5 wachsen

können, sind diese Werte nicht bedenklich. Lediglich die Probe 10 senkte den pH-Wert bis auf einen Wert von 4, was zur Beeinträchtigung des Wachstums oder zum Absterben von Listerien führen könnte.

Während der sekundären Anreicherung in der Vollfraser-Bouillon sind alle Proben scheinbar nicht in der Lage den pH-Wert stark abzusenken. Interessant ist hierbei, dass während der zweiten Anreicherung die Probe 1 den pH-Wert am stärksten senkt, wobei zwischen den Proben kein signifikanter Unterschied besteht.

Hauptversuche

Zur Untersuchung, ob die Listerien mit der Methode L-00.00-32 in den Starterkulturen gefunden werden können, wurden diese zwei mal in Halbfraser-Bouillon eingewogen (25 g Probe in 225 ml Bouillon) und mit zwei bekannten Konzentrationen von *Listeria monocytogenes* beimpft. Anschließend wurde das Verfahren nach der Anweisung durchgeführt, zusätzlich zu den Anreicherungsausstrichen wurden die Proben nach der kompletten Anreicherungsphase auf Aloa- und Oxford-Agar angesetzt, um die ungefähre Keimzahl nach der Anreicherung zu bestimmen.

Die Proben, eingewogen in Halb-Fraser-Bouillon, wurden mit 1 ml der 6. bzw. 7. Verdünnung einer *Listeria monocytogenes*-Suspension mit einem Ausgangs-keimgehalt von $1,2 \cdot 10^9$ Keimen beimpft. Die Proben mit hoher Beimpfung enthielten also am Ausgangszeitpunkt $1,2 \cdot 10^3$ Keime, die mit niedriger Beimpfung enthielten an diesem Zeitpunkt 120 Keime.

Die Bestimmung des *Listeria monocytogenes*-Gehaltes der Suspension erfolgte durch direktes Ansetzen der verwendeten Verdünnungen (1 ml) auf Oxford-Agar, Bebrütung dieses und Auszählen der Kolonien.

Die Ausstriche auf den beiden selektiven Nährböden Aloa und Oxford aus der Halbfraser-Bouillon lieferten nach 48 h Bebrütung die in Tabelle 3.14 zusammengefassten Ergebnisse.

Tabelle 3.14: Auswertung der Anreicherungsausstriche auf Aloo- und Oxford-Agar aus der Halbfraser-Bouillon

Probe	Ausstriche auf Aloo-Agar		Ausstriche auf Oxford-Agar	
	Beimpfung niedrig	Beimpfung hoch	Beimpfung niedrig	Beimpfung hoch
1	negativ	verdächtig	negativ	negativ
2	verdächtig	verdächtig	negativ	verdächtig
3	negativ	negativ	negativ	verdächtig
4	verdächtig	verdächtig	verdächtig	verdächtig
5	verdächtig	verdächtig	negativ	negativ
6	negativ	verdächtig	negativ	negativ
7	negativ	negativ	negativ	negativ
8	verdächtig	verdächtige	verdächtig	verdächtig
9	verdächtig	verdächtig	verdächtig	verdächtig
10	negativ	negativ	negativ	negativ

Die Ausstriche aus der Halbfraser-Bouillon konnten zum großen Teil nicht als positiv gewertet werden, bei den Proben 7 und 10 befanden sich auf keiner Platte verdächtige Kolonien. Die Proben 1, 2, 3, 5 und 6 zeigten einige verdächtige Kolonien, wobei diese sich teilweise nur auf einer Platte befanden, wie z. B. bei Probe 6. Hier konnte nur die höhere Beimpfung ausgestrichen auf Aloo-Agar als verdächtig gewertet werden. Für Probe 3 galt, dass die gleiche Beimpfungsstufe, allerdings der Oxford-Agar als verdächtig gewertet wurde.

Da die Anreicherung noch nicht abgeschlossen war, sondern in der Vollfraser-Bouillon fortgesetzt wurde, wurden die verdächtigen Kolonien noch nicht bestätigt.

Nach der selektiven sekundären Anreicherung in der Vollfraser-Bouillon wurden die Proben erneut ausgestrichen und auch angesetzt, um zu erkennen wie stark sich die Listerien vermehrten.

Die Ausstriche aller Proben, außer 7 und 10, konnten nach der vollständigen Anreicherung in beiden Beimpfungsstärken sowohl auf Aloo-Agar als auch auf Oxford-Agar als positiv bzw. verdächtig gewertet werden. Auf den Ausstrichen der Proben 7 und 10 sind keine Kolonien gewachsen.

3. Praktischer Teil

In der Tabelle 3.15 sind die Ergebnisse des Ansatzes zusammengefasst, wobei jeweils zwei Verdünnungen der Anreicherung ausgezählt wurden. Die oberen Werte entsprechen der weniger starken Verdünnung, die unteren sind der nächst stärkeren Verdünnungsstufe entnommen. Diese Verdünnungsstufen gelten sowohl für die typischen als auch für die untypischen Kolonien einer Probe und Beimpfungsstufe.

Tabelle 3.15: Quantitative Bestimmung von *Listeria monocytogenes* aus der vollständigen Anreicherung, angesetzt auf Aloa- und Oxford-Agar

Probe	Aloa				Oxford			
	Beimpfung niedrig KbE / ml		Beimpfung hoch KbE / ml		Beimpfung niedrig KbE / ml		Beimpfung hoch KbE / ml	
	KbE typisch	KbE un- typisch	KbE typisch	KbE un- typisch	KbE typisch	KbE un- typisch	KbE typisch	KbE un- typisch
1	4,9*10 ⁸	1,5*10 ⁹	3,3*10 ⁸	7,5*10 ⁸	1,4*10 ⁸	1,9*10 ⁹	1,8*10 ⁸	1,8*10 ⁹
	5*10 ⁸	1,9*10 ⁹	-	1,8*10 ⁹	2*10 ⁸	2,9*10 ⁹	4*10 ⁸	2*10 ⁸
2	3*10 ⁸	>3*10 ⁸	3,1*10 ⁸	1,2*10 ⁹	8*10 ⁷	1,5*10 ⁹	1*10 ⁸	1,6*10 ⁹
	1*10 ⁷	1,1*10 ⁸	-	2,1*10 ⁸	2*10 ⁸	-	3*10 ⁸	1,2*10 ⁹
3	1,4*10 ⁷	4,4*10 ⁶	1,5*10 ⁹	1,2*10 ⁸	3,1*10 ⁷	4*10 ⁶	3,7*10 ⁸	1,3*10 ⁹
	1,6*10 ⁷	5*10 ⁸	9*10 ⁸	-	3*10 ⁷	-	1,7*10 ⁹	-
4	1*10 ⁷	>3*10 ⁹	4,4*10 ⁸	9*10 ⁸	5*10 ⁷	5,1*10 ⁹	3,3*10 ⁸	1,9*10 ⁹
	-	5*10 ⁹	-	1*10 ⁹	1,4*10 ⁹	2,4*10 ⁹	1,1*10 ⁹	3*10 ⁸
5	1,5*10 ⁹	2,9*10 ⁹	1,1*10 ⁸	3,7*10 ⁸	6*10 ⁷	5,5*10 ⁹	3*10 ⁷	5*10 ⁸
	2,7*10 ⁹	5,3*10 ⁹	1*10 ⁸	3*10 ⁸	9*10 ⁸	7,4*10 ⁹	-	1*10 ⁸
6	1,2*10 ⁹	9,9*10 ⁸	2*10 ⁸	2,5*10 ⁸	1,2*10 ⁸	3,5*10 ⁹	2,4*10 ⁸	1*10 ⁷
	-	2,3*10 ⁹	-	6*10 ⁸	3,2*10 ⁹	8*10 ⁸	5*10 ⁸	-
7	1,3*10 ⁶	7,3*10 ⁵	Kein Wachstum		2,3*10 ⁶	9*10 ⁷	Kein Wachstum	
	1,4*10 ⁶	1,5*10 ⁶			3*10 ⁶	-		
8	3,5*10 ⁸	5,3*10 ⁸	4,4*10 ⁸	1,2*10 ⁹	3,4*10 ⁸	1,1*10 ⁸	3,1*10 ⁸	2*10 ⁹
	-	1*10 ⁹	-	8*10 ⁸	1*10 ⁹	2*10 ⁸	2,1*10 ⁹	5*10 ⁸
9	1,1*10 ⁹	5*10 ⁸	3,7*10 ⁸	3,7*10 ⁸	3,2*10 ⁸	9,5*10 ⁸	3,6*10 ⁸	7,6*10 ⁸
	5*10 ⁸	6*10 ⁸	1*10 ⁸	-	1,5*10 ⁹	1*10 ⁸	2*10 ⁸	3*10 ⁸
10	Kein Wachstum		Kein Wachstum		Kein Wachstum		Kein Wachstum	

Der Tabelle 3.15 kann entnommen werden, dass in den Proben 1-6 und 8-9 eine starke Vermehrung der präsumtiven Listerien während der Anreicherung

stattgefunden hat.

Auf allen Platten der Probe 10 wuchsen weder typische noch untypische Kolonien. Erstaunlicherweise konnte bei Probe 7 in der höheren Beimpfungsstufe ebenfalls kein Wachstum festgestellt werden, wobei in der niedrigeren Beimpfung sowohl typische als auch untypische Kolonien wuchsen. Während der Anreicherung haben sich diese aber anscheinend nicht so stark vermehrt, wie bei den übrigen Proben, lediglich ca. 10^6 Keime pro ml konnten gefunden werden. In den anderen Proben konnten ca. 10^8 Keime gefunden werden. Interessant ist, dass sowohl typische als auch untypische Kolonien auf den Nährböden wuchsen, wobei auf Aloa-Agar untypische Kolonien solche sind, die keinen Hof bildeten und deren Durchmesser oftmals nur bis zu 1 mm betrug. Untypische Kolonien auf Oxford-Agar zeigten keine Kraterbildung. Um zu verdeutlichen, wie diese Kolonien aussahen, zeigen die folgenden Abbildungen 3.30 und 3.31 beide Arten von Kolonien auf den beiden Nährmedien.

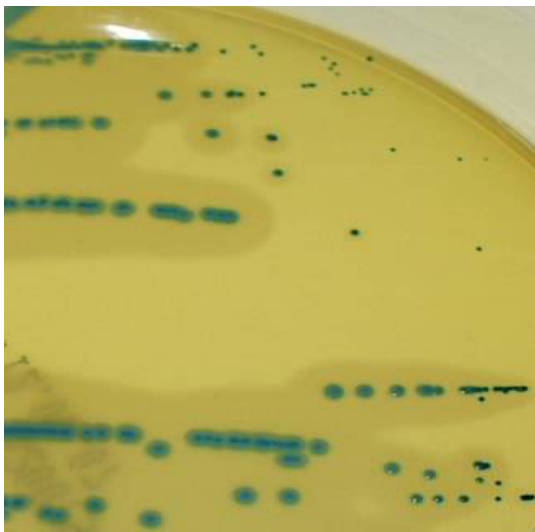


Abb. 3.30: typische und untypische Kolonien auf Aloa Agar

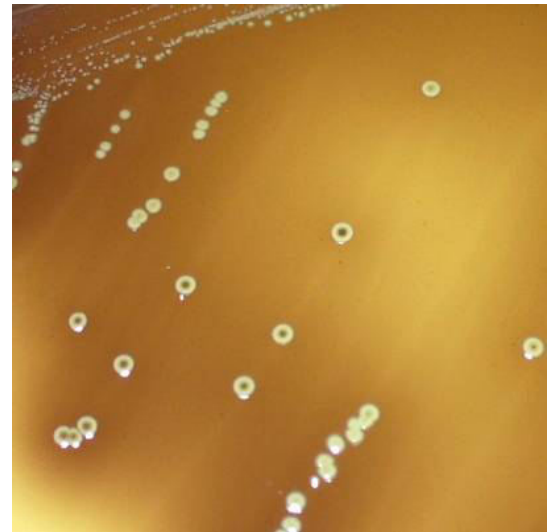


Abb. 3.31: typische und untypische Kolonien auf Oxford-Agar

Von jeder Probe wurde entweder vom Ausstrich oder vom Ansatz eine typische oder untypische Kolonie auf TSYEA ausgestrichen, um diese als *Listeria monocytogenes* zu bestätigen. Nach der Bebrütung wurden diese fraktionierten Ausstriche durch das Schräglicht der Henry-Lampe betrachtet und auf allen erschienen die Kolonien bläulich.

Der CAMP-Test und die biochemischen Untersuchungen mit Rhamnose und Xylose zeigten die typischen Reaktionen von *Listeria monocytogenes*, so dass alle getesteten Kolonien identifiziert werden konnten.

Der Beimpfungsversuch wurde wiederholt, da das Ergebnis der Probe 7 kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferte, und um die Ergebnisse der anderen Präparate zu bestätigen. Zur Beimpfung der Proben eine *Listeria monocytogenes* Suspension mit einem Ausgangskeimgehalt von $1,1 \cdot 10^9$ verwendet.

Aufgrund des Vorversuches zur pH-Wert-Minderung während der Anreicherung und des Ergebnisses dass die Probe 10 diesen stark absenkte, wurde der Halbfraser-Bouillon für diese Probe die doppelte Konzentration an puffernden Substanzen (Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat) zugesetzt. Ansonsten wurde auch für diese Probe das Standardverfahren angewandt.

Ergebnisse des Wiederholungsversuches

Die Ergebnisse des vorhergegangenen Versuches der Proben 1-6 und 8-9 konnten in diesem Versuch bestätigt werden, wiederum waren die Ausstriche aller Proben positiv und auch die Ansätze konnten in der siebten und achten Verdünnung ausgezählt werden.

Auf den Ausstrichen und den Ansätzen der Probe 7 konnte kein Wachstum festgestellt werden. Ebenso verhielt es sich mit Probe 10 in der niedrigen Beimpfung und auch auf den Platten der Ausstriche der hohen Beimpfung.

Allerdings wuchsen bei dieser Probe mit hoher Beimpfung ($= 1,1 \cdot 10^3$ Keime / 25 g) auf den Platten der Ansätze aus Vollfraser in der siebten Verdünnung auf Aloa-Agar 140 typische und 38 untypische, auf Oxford-Agar 22 typische und 241 untypische Kolonien. Auch in der achten Verdünnung kann noch Kolonienwachstum festgestellt werden. Auf Oxford-Agar wachsen 30 typische Kolonien, auf Aloa-Agar 11 typische und 13 untypische.

Wiederum wird von jeder Probe eine Kolonie (typisch oder untypisch) zur Bestätigung herangezogen und alle können aufgrund ihrer typischen Reaktionen als *Listeria monocytogenes* identifiziert werden.

Gepufferte *Listeria* Anreicherungsbouillon

Da die Proben 7 und 10 mit der Anreicherungsbouillon nach Fraser keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten, wurden diese in die gepufferte *Listeria* Anreicherungsbouillon, die für die Verwendung mit sauren und fermentierten Lebensmitteln empfohlen wird, eingewogen und mit zwei Konzentrationen von *Listeria monocytogenes* (Keimzahl der Ausgangssuspension = $1,5 \cdot 10^9$) beimpft. Aus der Anreicherungsbouillon wurde nach 24 h bei 30 °C ein fraktionierter Ausstrich auf Oxford-Agar gemacht, nach weiteren 24 h wurden die Proben auf Aloa- und Oxford-Agar ausgestrichen und zusätzlich angesetzt.

Die Ausstriche auf Oxford-Agar nach 24 Std. Anreicherung und 48 Std. Bebrütung ergaben folgendes Ergebnis:

Probe 7

Beimpfung mit 150 Keimen / 25 g Probe

- Kein Wachstum von Kolonien
- der Agar verfärbte sich schwarz

Beimpfung mit 15 Keimen / 25 g Probe

- Kein Wachstum

Probe 10

Beimpfung mit 150 Keimen / 25 g Probe

- Wachstum von grauen Kolonien mit schwarzem Hof aber ohne Kraterbildung
- Wachstum gelber Kolonien

Beimpfung mit 15 Keimen / 25 g Probe

- Wachstum gelber Kolonien

Nachdem die Proben 48 h angereichert, ausgestrichen und bebrütet wurden, konnte weder auf den Aloa- noch auf den Oxford-Platten ein Wachstum von Listerien-Kolonien festgestellt werden.

Die *Keimzählungsansätze* der Proben ließen sich wie folgt auswerten:

Probe 7

Beimpfung mit 150 Keimen / 25 g Probe

- Der Oxford-Agar färbte sich in der ersten und zweiten Verdünnung der Probe schwarz, es wuchsen keine Kolonien.
- Höhere Verdünnungen zeigten keine Veränderung des Nährbodens
- Der Aloa-Agar färbte sich in der ersten Verdünnung der Probe türkis, auf ihm befanden sich drei Kolonien, die typische Merkmale von Listerien zeigten
- Höhere Verdünnungen zeigten kein Wachstum

Beimpfung mit 15 Keimen / 25 g Probe

- Die Oxford-Platte der ersten Verdünnung färbte sich schwarz
- auf der Platte der zweiten Verdünnung waren schwarze Schatten erkennbar, kein Wachstum von Kolonien
- Der Aloa-Nährboden der ersten Verdünnung färbte sich zum Teil türkis

Probe 10

Beimpfung mit 150 Keimen / 25 g Probe

- Auf dem Oxford-Agar der 1:10 Verdünnung befanden sich viele gelbe Kolonien
- einige Kolonien mit der typischen Farbe der Listerien-Kolonien sind gewachsen, ansonsten wiesen diese allerdings keine typischen Merkmale auf
- Der Aloa-Nährboden der ersten Verdünnung färbte sich komplett türkis
- die zweite Verdünnung zeigte schwache türkise Schlieren

Beimpfung mit 15 Keimen / 25 g Probe

- Auf der Oxford-Platte der ersten Verdünnung befanden sich verdächtige Kolonien, die aber nicht alle charakteristischen Merkmale zeigten (keine Kraterbildung)
- Auf der 1:100 Verdünnung färbte sich lediglich der Nährboden schwarz
- Die Aloa-Platte der 1:10 Verdünnung färbte sich türkis
- kein Wachstum von Kolonien

Von diesen Platten wurden sechs Kolonien ausgewählt und auf TSYEA ausgestrichen, um herauszufinden, ob es sich bei ihnen um *Listeria monocytogenes*-Kolonien handelte. Folgendermaßen lassen sich diese Ausstriche beschreiben:

- 1 Probe 7; Kolonie von Aloa-Platte, ohne Hofbildung
- 2 Probe 10; Material aus der türkis gefärbten Fläche des Aloa-Agars
- 3 Probe 10; Kolonie vom Oxford-Agar, ohne Kraterbildung
- 4 Probe 7; eingezogene Kolonie vom Oxford-Nährboden
- 5 Probe 10; Kolonie vom Oxford-Agar mit untypischer Farbe, mit Kraterbildung
- 6 Probe 10; rotbraune Kolonie von Oxford-Platte

Durch das Schräglicht der Henry-Lampe waren die Kolonien der Ausstriche 1, 2 und 3 weiß, aus diesem Grunde wurden mit diesen dreien keine weiteren Bestätigungsreaktionen durchgeführt und sie wurden als negativ bewertet. Alle Kolonien des Ausstriches 4 schimmerten bläulich, auch auf den Ausstrichen 5 und 6 befanden sich einige blau schimmernde Kolonien.

Mit jeweils einer dieser blau-schimmernden Kolonien wurden die Bestätigungsreaktionen durchgeführt, wobei nur diejenigen der Ausstriche 5 und 6 die typischen Reaktionen von *Listeria monocytogenes* zeigten, wie auch auf den folgenden Abbildungen 3.32 und 3.33 zu erkennen ist.



Abb.3.32: Reaktion mit Rhamnose und Xylose

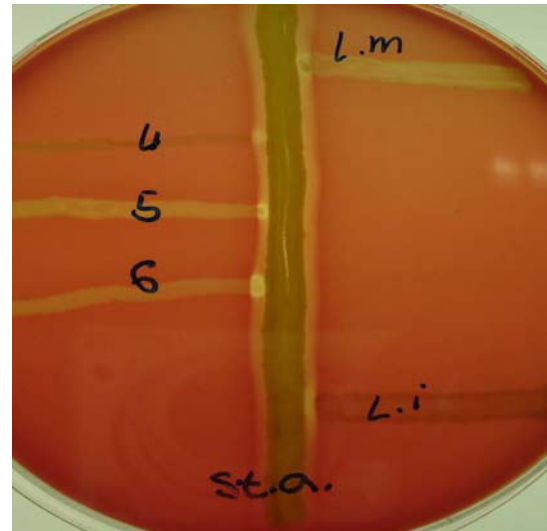


Abb.3.33: CAMP-Test

Das Bakterium, das auf dem Ausstrich 4 gewachsen war, war nicht in der Lage den Zucker Rhamnose zu verstoffwechseln, auch die Hämolyse auf dem Schafblut-Agar war recht gering. Die Ausstriche 5 und 6 zeigten sowohl die Verstoffwechslung von Rhamnose als auch die typische Reaktion im CAMP-Test.

Demzufolge können zwei Kolonien, die keine typischen Merkmale auf Oxford-Agar zeigten als *Listeria monocytogenes* bestätigt werden. Beide sind dem Keimzählungsansatz der Probe 10 entnommen.

Das Ergebnis für Probe 10 ist dennoch nicht zufriedenstellend, da der Ausstrich, gemäß Methode negativ war und auch im Ansatz nach der Anreicherung keine deutliche Vermehrung von Listerien festgestellt werden konnte. Lediglich die erste Verdünnung zeigte einige typische oder untypische Kolonien.

Um herauszufinden, ob dieses Ergebnis eventuell in Zusammenhang mit einer Absenkung des pH-Wertes steht, wurden die Proben 7 und 10 erneut in die Listeria-Anreicherungsbouillon eingewogen. Zu den Zeitpunkten t_0 (Anfang), t_1 (nach 24 h Anreicherung) und t_2 (nach 48 h Anreicherung) wurden die pH-Werte gemessen, diese sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.

Tabelle 3.16: pH-Verlauf während der Anreicherung in Listeria Anreicherungs-Bouillon

	Probe 7 pH-Wert	Probe 10 pH-Wert
t ₀	6,69	6,96
t ₁	4,02	4,20
t ₂	3,81	4,09

Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Listerien während der Anreicherungsphase in beiden Proben absterben könnten oder zumindest keine optimalen Wachstumsbedingungen vorfinden.

Quantitatives Verfahren

Um zu verhindern, dass die Listerien während der Anreicherung durch die Proben 7 und 10 geschädigt werden, wurde das quantitative Verfahren mit diesen beiden Proben getestet.

Zu diesem Zwecke wurden die Proben in Kochsalzpepton eingewogen, mit *Listeria monocytogenes* beimpft (500 Kolonien / g) und in den Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ direkt auf Aloa- und Oxford-Agar angesetzt.

Nach der Bebrütung konnten folgende Ergebnisse festgehalten werden:

Probe 7

Der Oxford-Agar färbte sich in den Verdünnungen 1 und 2 komplett schwarz, die dritte Verdünnung entwickelte schwarze Flecken auf dem Nährboden.

Durch die erste Verdünnung der Probe färbte sich der Aloa-Nährboden komplett türkis, auf der zweiten Verdünnung entstanden türkise Stellen.

3. Praktischer Teil

Auf beiden Nährböden befanden sich keine Kolonien. Um dieses Ergebnis anschaulich darzustellen, zeigen die folgenden Abbildungen 3.34 und 3.35 zum einen die zweite Verdünnung auf Aloa-Agar und zum anderen die erste Verdünnung auf Oxford-Agar.

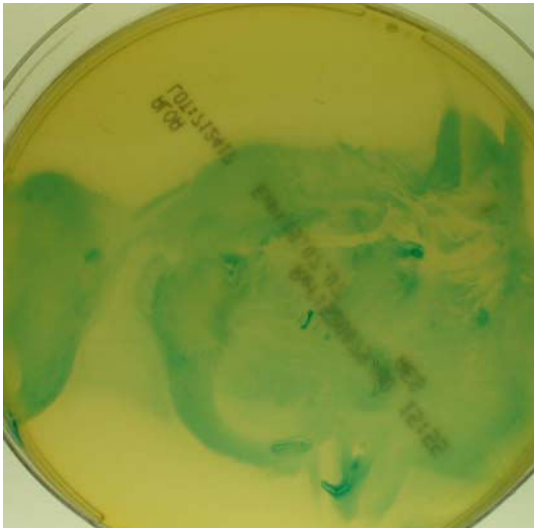


Abb. 3.34: Zweite Verdünnung der Probe 7 auf Aloa-Agar



Abb. 3.35: Erste Verdünnung der Probe 7 auf Oxford-Agar

Für diese Probe ist das quantitative Verfahren nicht anwendbar, in der ersten Verdünnung sollten ca. 50 Keime wachsen, in der zweiten Verdünnung noch ca. 5 Kolonien. Auf beiden Nährböden und in allen Verdünnungen wuchsen keine Kolonien.

Probe 10

Auf dem Oxford-Agar der ersten Verdünnung bildeten sich sowohl gelbe als auch dunkle Kolonien. Die dunklen Kolonien zeigten keine typischen Eigenschaften von Listerien-Kolonien, da sie recht klein waren, nicht die typische Färbung hatten und keine Krater bildeten.

Eine verdächtige Kolonie befand sich auf dem Aloa-Ansatz in der ersten Verdünnung, der Nährboden färbte sich zusätzlich türkis. In der zweiten Verdünnung konnte ebenfalls eine Kolonie gefunden werden, die allerdings keine Hofbildung zeigte.

Auf den Abbildungen 3.36 und 3.37 ist die erste Verdünnung der Probe auf Aloo- und Oxford-Agar dargestellt.



Abb. 3.36: Erste Verdünnung der Probe 10 auf Aloo-Agar

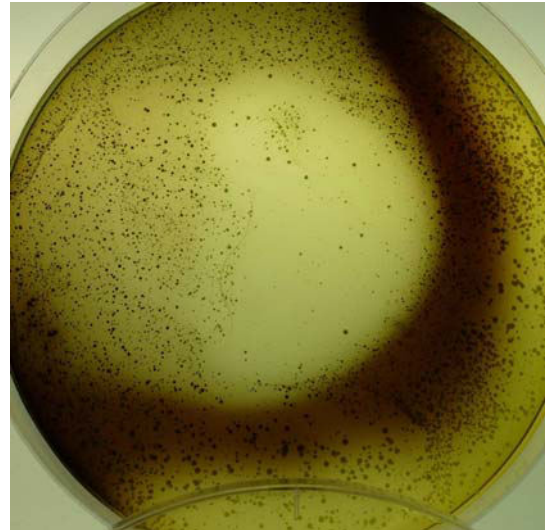


Abb. 3.37: Erste Verdünnung der Probe 10 auf Oxford-Agar

Auch diese Probe konnte quantitativ nicht ausgewertet werden, es befand sich lediglich eine verdächtige Kolonie auf dem Aloo-Nährboden der ersten und zweiten Verdünnung.

Vermutlich stellen die in den Starterkulturen enthaltenen Milchsäurebakterien für *Listeria monocytogenes* eine starke Konkurrenzflora dar, so dass keine typischen Kolonien gebildet werden können.

Anreicherung in doppelt konzentriertem gepuffertem Peptonwasser

Durch den Vorversuch der pH-Wert-Absenkung während des Salmonellenachweises (s. S. 56) wurde festgestellt, dass die Probe 10 den pH-Wert im Laufe der Anreicherung in doppelt konzentriertem gepuffertem Peptonwasser nicht stark senkt. Aus diesem Grund und weil vermutet wird, dass die Absenkung des pH-Wertes während der primären Anreicherung zur Schädigung der Listerien-Zellen führt, wurde das primäre Anreicherungsmedium Halbfraser ausgetauscht durch doppelt konzentriertes gepuffertes Peptonwasser. Alle weiteren Verfahrensschritte entsprechen dem ISO-Verfahren für den Nachweis von *Listeria monocytogenes*.

Probe 10 und auch Probe 7 wurden zwei mal in Peptonwasser eingewogen (25 g in 225 ml) und zum einen mit 240, zum anderen mit 24 KbE von *Listeria monocytogenes* beimpft. Das Standardverfahren für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde durchgeführt und die Ausstriche nach 48 h der zweiten Anreicherung lieferten folgende Ergebnisse:

Probe 7

- hohe Beimpfung: kein Wachstum
- niedrige Beimpfung: türkise Kolonien ohne Hof auf Aloa-Agar

Probe 10

- hohe Beimpfung: kein Wachstum
- niedrige Beimpfung: kein Wachstum

Die türkisen Kolonien, die auf den Ausstrichen der Probe 7 gewachsen sind, wurden auf TSYEA ausgestrichen, anschließend wurden die Bestätigungsreaktionen durchgeführt. Diese ergaben allerdings keine typischen Merkmale für *Listeria monocytogenes*, die Kolonien wurden also als negativ bewertet.

Anreicherung in Halbfraser mit verschiedenen Enthemmern

Da die Annahme bestand, dass der *Lactobacillus plantarum* in Probe 7 eventuell ein Bacteriocin ausbildet, welches in der Lage ist, *Listeria monocytogenes* abzutöten, wurden der Halbfraser-Bouillon verschiedene Enthemmer zugesetzt (Zusammensetzung der Enthemmer siehe Anhang S. A-6), die das eventuell vorhandene Bacteriocin inaktivieren sollten. Zur Kontrolle, dass diese nicht auch die Listerien abtöten, wurden des Weiteren die Bouillons mit Enthemmer, ohne Probe, mit *Listeria monocytogenes* beimpft und die ASU-Methode wurde durchgeführt. Zum Überblick sind im folgenden die verschiedenen verwendeten Lösungen aufgeführt.

- A) Halbfraser + Enthammer 3 + *Listeria monocytogenes* (65 KbE)
- B) Halbfraser + Enthammer 3 + Saponin + *Listeria monocytogenes* (65 KbE)
- C) Halbfraser + Enthammer 4 + *Listeria monocytogenes* (65 KbE)
- D) Halbfraser + Enthammer 3 + Probe 7 + *Listeria monocytogenes* (65 KbE)
- E) Halbfraser + Enthammer 3 + Probe 7 + *Listeria monocytogenes* (650 KbE)
- F) Halbfraser + Enthammer 3 + Saponin + Probe 7 + *Listeria monocytogenes*
(65 KbE)
- G) Halbfraser + Enthammer 3 + Saponin + Probe 7 + *Listeria monocytogenes*
(650 KbE)
- H) Halbfraser + Enthammer 4 + Probe 7 + *Listeria monocytogenes* (65 KbE)
- I) Halbfraser + Enthammer 4 + Probe 7 + *Listeria monocytogenes* (650 KbE)

Abgesehen von dem Zusatz der Enthammer wurde das Standardverfahren durchgeführt, die Inhaltsstoffe der übrigen Nährmedien wurden nicht verändert.

Aus der Auswertung der Ansätze der Nährböden Aloa und Oxford ergaben sich folgende Ergebnisse:

- A) kein Wachstum auf allen Platten
- B) starke Vermehrung von *Listeria monocytogenes* (Wachstum bis Verdünnung 8)
- C) ebenfalls starke Vermehrung und Wachstum bis Verdünnung 8
- D) kein Wachstum auf allen Platten, sowohl Ausstrich, als auch Ansatz
- E) ebenso kein Wachstum auf allen Platten
- F) Ausstrich und Ansatz negativ
- G) Ausstrich negativ, Ansatz: auf dritter Verdünnung 65 KbE
- H) Ausstrich und Ansatz negativ
- I) Ausstrich und Ansatz negativ

Die getesteten Enthemmer sind offensichtlich nicht in der Lage den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in der Probe 7 zu ermöglichen.

3.4.4 Bewertung

Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* in den Kulturen 1-6 und 8-9 ist mit dem ASU-Verfahren L-00.00-32 problemlos möglich.

In den Proben 7 und 10 gestaltet sich dieser aber als schwierig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Methode gefunden werden, die zu eindeutigen Ergebnissen führte. Zwar konnten vereinzelt positive Listerien-Kulturen gefunden werden, aber in den meisten Fällen waren die fraktionierten Ausstriche, die in der Norm vorgeschrieben sind und in der Praxis angewendet werden, negativ. Ein Nachweis von *Listeria monocytogenes* in diesen Proben sollte mit dem Standardverfahren und auch den weiteren getesteten Verfahren nicht durchgeführt werden.

4. Diskussion

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den Versuchen diskutiert und es werden Empfehlungen zur weiteren Behandlung der Proben im Labor gegeben. Zunächst werden die Ergebnisse in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Probe	<i>S. aureus</i> Nachweisgrenze KbE / g	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp.</i>
1	< 10.000	v	v
2	< 10	v	v
3	< 10	v	v
4	< 100	v	v
5	< 100	v	v
6	< 100	v	v
7	< 10	-	v
8	< 10	v	v
9	< 100	v	v
10	< 100	-	v

Legende: v = nachweisbar; - = nicht nachweisbar

Diese Ergebnisse gelten für die zehn getesteten Starterkulturpräparate, ob sie ohne weiteres übertragbar sind auf die anderen Starterkulturen, die von der Firma Blessing produziert werden, ist nicht erforscht, da auch unerwartete Reaktionen während des Nachweises aufgetreten sind. Eventuell sollten noch weitergehende Versuche mit anderen Präparaten unternommen werden. Die erzielten Ergebnisse sind zunächst auch nur valide für die untersuchten Chargen, da nicht bekannt ist, ob die gleiche Starterkulturrezeptur in unterschiedlichen Chargen verschiedene Ergebnisse liefert.

Die Ergebnisse der zehn untersuchten Kulturen werden im folgenden erläutert.

4.1 Diskussion der Ergebnisse des *S. aureus*-Nachweises

Wie bereits angenommen, erweist sich der Nachweis von *S. aureus* in den Starterkulturen, die *S. carnosus* enthalten, also Probe 1, 5, 6 und 10, als schwierig. Der *S. carnosus* wächst als schwarze Kolonie auf dem BP-Agar, durch die hohe Konzentration in den Proben (Reinkultur: Probe 1, ca. 10^{11} Keime; Mischkulturen Proben 5, 6 und 10, ca. 10^9 Keime) wird der gesamte Nährboden von diesen schwarzen Kolonien überdeckt, so dass es nicht möglich ist, die typischen *S. aureus* Kolonien von denen des *S. carnosus* zu differenzieren.

In den Proben 2, 3, 7 und 8, die alle keinen *S. carnosus* enthalten, kann der *S. aureus* gut nachgewiesen werden. Bereits in der ersten Verdünnung ist ein Auszählen der Kolonien möglich. Die Nachweisgrenze des *S. aureus* könnte also weiterhin bei < 10 KbE / g Kultur liegen.

Verwunderlich ist, dass der Nachweis von *S. aureus* in den Proben 4 und 9 nicht mit der Nachweisgrenze < 10 KbE / g Kultur durchführbar ist. Diese beiden Proben enthalten keinen *S. carnosus*, weswegen die Annahme besteht, dass der Nachweis von *S. aureus* unproblematisch verlaufen sollte. Aus den Ergebnissen der Versuche geht allerdings hervor, dass die erste Verdünnung des Probenmaterials nicht zu zuverlässigen Ergebnissen führt. Die zweite Verdünnung dieser Proben kann hingegen ausgewertet werden, so dass für diese Proben die Nachweisgrenze bei < 100 KbE / g Kultur liegen muss. Die Laktobazillen dieser Proben stellen anscheinend auf dem selektiven Nährboden für Staphylokokken eine Konkurrenzflora für den *S. aureus* dar. Dieser kann sich durch die Anwesenheit der Laktobazillen nicht vermehren und wird auf dem Nährboden nicht wieder gefunden.

Durch einen weitergehenden Versuch, in dem die Bebrütungstemperatur um 7 °C erhöht wurde, konnte festgestellt werden, dass der *S. carnosus* bei dieser Temperatur sein Wachstum einschränkt, der *S. aureus* währenddessen ein vergleichbares Wachstum zeigt wie bei 37 °C .

Aufgrund der Temperaturerhöhung kann für *S. aureus* aus Probe 6 eine Nachweisgrenze von < 10 KbE / g Kultur erreicht werden, bereits die erste Verdünnung dieser Probe lässt sich quantitativ auswerten. Die erste Verdünnung der

4. Diskussion

Probe 5 liefert keine zuverlässigen Koloniezahlen, sie liegen deutlich unter denen der theoretischen Ausgangskeimzahl. Allerdings kann die zweite Verdünnung dieser Probe, sowie auch die zweite Verdünnung der Probe 10 zur Auswertung herangezogen werden. Während auf den Platten der ersten Verdünnung der Probe 5 lediglich zu wenige Kolonien gefunden werden, konnte die erste Verdünnung der Probe 10 nicht als positiv gewertet werden, da lediglich ein Wachstum des *S. carnosus* erkennbar war.

Ebenso verhält es sich mit der ersten und zweiten Verdünnung der Probe 1, die Kolonien des *S. aureus* sind nicht erkennbar. In einem weiterführendem Versuch konnte gezeigt werden, dass erst in der vierten Verdünnung der Probe ein Auszählen der Kolonien möglich ist. Aus diesem Grund muss die Nachweisgrenze dieser Probe auf < 10.000 KbE / g Kultur gelegt werden und die Probe muss in Zukunft in fünf Verdünnungen auf BP-Agar angesetzt werden. Die anderen Proben sollten möglichst einheitlich behandelt werden, da dieses für das Untersuchungslabor einfacher zu handhaben ist und die Zusammensetzungen der eingeschickten Proben nicht bekannt gegeben werden. Durch die Differenzierung der Nachweisgrenzen im Auftrag könnte erreicht werden, dass in den Proben, die eine Nachweisgrenze von < 10 KbE / g Kultur aufweisen, diese weiterhin eingehalten werden kann.

Für alle Proben sollte die Bebrütung bei 44 °C stattfinden, da diese Temperatur das Wachstum des *S. aureus* nicht beeinträchtigt aber dessen Nachweis in allen Proben ermöglicht.

Die unterschiedlichen Nachweisgrenzen von *S. aureus* in den Proben, die *S. carnosus* enthalten, kommen wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Mengen des *S. carnosus* in den verschiedenen Starterkulturpräparaten zustande. Deutlich zu sehen ist dies an Probe 1, denn diese ist eine Reinkultur des *S. carnosus*. Es ist davon auszugehen, dass Probe 10 ebenfalls eine relativ hohe Dosis an *S. carnosus* enthält, wohingegen Probe 6 vermutlich nicht so viel beinhaltet.

Durch das Verfahren nach Giolitti und Cantoni kann kein besseres Ergebnis erzielt werden, so dass davon abzuraten ist, dieses als Standardmethode aufzunehmen.

Da durch die BP-Methode gute Ergebnisse erzielt wurden, sollte diese weiterhin angewendet werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse des Salmonellen-Nachweises

Im Rahmen der Versuche dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass Salmonellen sich in der Probenmatrix Starterkultur gut nachweisen lassen. Sowohl in der klassischen Methode als auch mit der PCR-Methode konnten die Salmonellen in allen Proben wieder gefunden werden.

Es sollte weiterhin das doppelt konzentrierte gepufferte Peptonwasser zur primären Anreicherung verwendet werden, da in den Vorversuchen zur pH-Wert Veränderung während dieser Zeit festgestellt wurde, dass einige Proben in dem einfach konzentriertem Peptonwasser den pH-Wert stark absenken können und die Salmonellen dies womöglich nicht überleben könnten. Der minimale pH-Wert, bei dem Salmonellen lebensfähig sind, liegt zwischen 4,0 und 4,5 (Keweloh, H. 2006, S. 114).

In dem einfach konzentriertem Anreicherungsmedium wurde der pH-Wert durch die Laktobazillen der Probe 9 auf < 4 gesenkt, so dass eine Schädigung der Salmonellen wahrscheinlich ist. Die Proben 6 und 10 haben den pH-Wert ebenfalls bedenklich stark gesenkt, so dass pH-empfindliche Salmonellen-Stämme möglicherweise geschädigt würden.

Aufgrund der doppelten Konzentration des Peptonwassers und der puffernden Komponenten kann keine der Starterkulturen den pH-Wert auf $< 4,5$ senken, so dass die Salmonellen die Anreicherung überleben, sich stark vermehren und nachgewiesen werden können.

Die durchgeführten Untersuchungen können sich nur auf die untersuchten Proben beziehen. Aufgrund der möglichen Einflüsse der Säuerungsaktivitäten von Starterkulturpräparaten auf die Anreicherung ist nicht auszuschließen, dass es bei den Kulturen stamm- und chargenabhängige Unterschiede gibt. Dieses kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr betrachtet werden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse des *Listeria monocytogenes*-Nachweises

Die den Proben zugefügten *Listeria monocytogenes* Kolonien konnten in den Starterkulturpräparaten 1-6 und 8-9 nachgewiesen werden. Für diese Proben kann das Verfahren L-00.00-32 weiterhin angewandt werden. Lediglich in den Proben 7 und 10 sollte diese Nachweismethode nicht mehr durchgeführt werden, da diese nicht zu einheitlichen Ergebnissen führte.

Ein Problem des Nachweises könnte darin bestehen, dass in den Anreicherungskulturen eine starke pH-Wert-Absenkung zu einer Schädigung der *Listeria monocytogenes* führte. Dieses ist insbesondere für Probe 10 zu vermuten, da der pH-Wert in der 1. Anreicherung auf pH 4,0 abgesunken war (s. S. 71). Bei Probe 7 fand hingegen keine signifikante pH-Wert-Absenkung statt, so dass hier nach anderen Ursachen geforscht werden könnte. Eventuell könnte der in Probe 7 enthaltene *L. plantarum* ein Bacteriocin-Bildner sein. Bacteriocine sind mikrobielle Hemmstoffe, die von Bakterien gebildet werden und andere Bakterien schädigen können. Es gibt *Lactobacillus*-Stämme, die in der Lage sind Bacteriocine, die schädlich auf *Listeria monocytogenes* wirken, auszubilden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Versuche durchgeführt, in denen die primäre Anreicherungsbouillon Halbfraser verschiedene Enthemmer enthielt, die das evtl. vorhandene Bacteriocin inaktivieren sollten. Einer dieser Enthemmer hat anscheinend schädlich auf die Listerien gewirkt, was durch den Beimpfungsversuch ohne Starterkultur bewiesen wurde. Hier konnte kein Listerien-Wachstum auf den Nährmedien festgestellt werden. Diesen Enthemmer kann man also bereits aufgrund dieses Ergebnisses von der Verwendung ausschließen.

Die zwei weiteren getesteten Enthemmer hatten nicht diese Wirkung auf die Listerien, konnten allerdings auch das eventuell durch die Probe gebildete Bacteriocin nicht inaktivieren. Die Ausstriche nach der Anreicherung waren alle negativ, so dass auch diese Lösungen nicht geeignet sind für die Anreicherung von *Listeria monocytogenes* aus dieser Starterkultur.

In weiteren Versuchen wurde die gepufferte *Listeria* Anreicherungsbouillon für saure und fermentierte Lebensmittel getestet, um festzustellen, ob diese den Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Probe 7 und 10 ermöglicht.

4. Diskussion

Insbesondere für Probe 10 schien dies eine Alternative darzustellen, da diese die Halbfraser-Bouillon während der Anreicherung stark gesäuert hat und angenommen wurde, dass die *Listeria* Anreicherungsbouillon eine höhere Pufferkapazität aufweist.

In den Versuchen stellte sich allerdings heraus, dass auch durch die Anreicherung in dieser Bouillon keine zufriedenstellenden und eindeutigen Ergebnisse zustande kommen, dass die Bouillon sogar ebenso stark von Probe 10 gesäuert wird und Probe 7, die den pH-Wert der Halbfraser-Bouillon nicht stark verändert hat, in dieser Bouillon den pH-Wert auf <4 gesenkt hat.

Eine Alternative zur Anreicherung in den Fraser-Bouillons stellt diese Lösung also nicht dar.

Auch das quantitative Verfahren kann weder für Probe 7 noch für Probe 10 verwendet werden, da ein Auszählen verdächtiger Kolonien kaum möglich war oder keine verdächtigen Kolonien auf den Nährmedien wuchsen. Bereits im Vorversuch, in dem die reinen Starterkulturen auf den Agars angesetzt wurden, konnte festgestellt werden, dass diese nicht im Wachstum gehemmt werden, sondern in der Lage sind, Kolonien auf den Nährböden zu entwickeln und Farbreaktionen auf diesen auszulösen. Evtl. entsteht durch die Anwesenheit sehr hoher Zahlen an Kulturkeimen auch auf den festen Nährmedien eine derart starke Konkurrenz, dass einzelne *Listeria monocytogenes* Zellen sich nicht zu Kolonien entwickeln können

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Methode gefunden werden, mit der der Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus den Proben 7 und 10 einwandfrei durchführbar ist. Es sollten also in Zukunft weitere Versuche gemacht werden, um zu ermöglichen, dass *Listeria monocytogenes* aus diesem Untersuchungsmaterial isoliert werden kann.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde an zehn exemplarischen Starterkulturpräparaten untersucht, ob mittels der zur Zeit angewandten Methoden für Lebensmittel zum Nachweis von koagulase-positiven Staphylokokken, *Salmonella spp.* und *Listeria monocytogenes*, diese Keime in den Kulturen nachweisbar sind. Da derzeit keine standardisierten Verfahren für den Nachweis dieser Bakterien in Starterkulturen existieren, werden die Methoden zum Nachweis in Lebensmitteln durchgeführt. Um herauszufinden, ob diese Verfahren anwendbar sind, wurden die Kulturen mit den drei humanpathogenen Keimen versetzt und die Untersuchungen wurden gemäß Verfahrensanweisung durchgeführt.

Durch die Versuche der Diplomarbeit wurde die Annahme bestätigt, dass der **Nachweis von *S. aureus*** aus Proben, die *S. carnosus* enthalten, nach dem Verfahren L-00.00-55 mit der Nachweisgrenze $< 10 \text{ KbE} / \text{g}$ Kultur nicht möglich ist. Durch die Erhöhung der Bebrütungstemperatur um 7 °C auf 44 °C kann in Proben, die unter anderem *S. carnosus* enthalten, eine Nachweisgrenze von $< 100 \text{ KbE} / \text{g}$ Kultur erzielt werden. In der Reinkultur von *S. carnosus* kann *S. aureus* lediglich mit einer Nachweisgrenze von $< 10.000 \text{ KbE} / \text{g}$ Kultur nachgewiesen werden. Aus diesem Grund muss diese Probe in Zukunft in mindestens vier Verdünnungen angesetzt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass auch *L. brevis* und *L. fermentum* das Wachstum von *S. aureus* auf BP-Agar beeinflussen, da diese wahrscheinlich eine Konkurrenz für *S. aureus* darstellen. Auch für diese Proben muss die Nachweisgrenze auf $< 100 \text{ KbE} / \text{g}$ Kultur festgesetzt werden.

In den Proben 2, 3, 7 und 8 kann der *S. aureus* sowohl bei der Bebrütungstemperatur 37 °C als auch bei 44 °C in der ersten Verdünnung nachgewiesen werden, das heißt hier kann als Nachweisgrenze $< 10 \text{ KbE} / \text{g}$ eingehalten werden.

Um eine einheitliche Bebrütungstemperatur festlegen zu können, wurden fünf Stämme von *S. aureus* auf ihr Wachstumsverhalten bei 44 °C getestet und es wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wachstumsrate zu 37 °C gefunden. Eine Änderung des Standardverfahrens hinsichtlich der Bebrütungstemperatur ist demnach zu empfehlen.

5. Zusammenfassung

Die Anreicherung der **Salmonellen** erfolgte bereits in der Vergangenheit in doppelt konzentrierten gepufferten Peptonwasser. Die Versuche dieser Arbeit ergaben, dass dies ein geeignetes Anreicherungsmedium für Salmonellen aus der Probenmatrix Starterkultur ist. Es konnte festgestellt werden, dass sich in allen Kulturen die Salmonellen während der primären und sekundären Anreicherung stark vermehren und somit auch im Ausstrich problemlos nachweisbar sind. Die Kolonien auf den selektiven Nährmedien XLD- und BPLS-Agar bilden alle charakteristischen Merkmale aus und auch die Bestätigungsreaktionen verlaufen typisch.

Auch der Nachweis von **Listeria monocytogenes** nach dem Verfahren L-00.00-32 Teil 1 ist in den Kulturen 1-6 und 8-9 möglich. Lediglich für die Proben 7 (*L. plantarum*) und 10 (*Pediococcus pentosaceus* und *S. carnosus*) konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Methode gefunden werden, mit der der Nachweis von *Listeria monocytogenes* eindeutig durchzuführen ist. In einigen Versuchsteilen konnten die hinzu gegebenen Listerien zwar gefunden werden, in anderen sind auf den Nährböden ALoa- und Oxford-Agar jedoch keine Kolonien gewachsen. Auch auf den Ausstrichen dieser Proben wuchsen in der Regel keine Kolonien, so dass diese im Laboralltag als falsch negativ gewertet werden würden. Aus diesem Grund sollten weitere Versuche unternommen werden, um eine Methode zu finden oder zu entwickeln, mit der der Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus diesen Präparaten möglich ist.

6. Abstract

Within the framework of this thesis for a degree, the DIN EN ISO methods for proving the bacteria *S. aureus*, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in food were tested considering if they are applicable for the matrix “starter cultures”.

These methods for food are used because there are no official methods for starter cultures.

Ten exemplary cultures were inoculated with *S. aureus*, *Salmonella senftenberg* or *Listeria monocytogenes* and the investigation methods were carried out.

In four cultures the proof of *S. aureus* works without any problems, but in those cultures, that include *S. carnosus*, the quantitative method for the proof of *S. aureus* was complex, because after the incubation at 37 °C the BP-agar was almost completely black and the typical colonies of *S. aureus* could not be seen. Just as the colonies of *S. aureus* did not grow in those cultures that included *L. fermentum* and *L. brevis*.

By increasing the incubation temperature to 44 °C the proof of *S. aureus* in all starter cultures was made possible. In all cultures, except sample 1, *S. aureus* can be proved with a limit of < 100 cbu / g culture. In sample 1 it can be proved with a limit of < 10,000 cbu / g culture.

The qualitative proof of *Salmonella spp.* in these cultures worked without any problems. The PCR method worked as well.

The qualitative proof of *Listeria monocytogenes* worked also in all samples apart from sample 7 and 10. For these two cultures that include *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* and *S. carnosus*, no method that leads to unambiguous results could be found.

7. Literaturverzeichnis

Bücher

1. Antranikian, G. (Hrsg): Angewandte Mikrobiologie, Berlin, Heidelberg (Springer), 2006
2. Bast, E.: Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Berlin, Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag), 2001
3. Biesalski, H. K.; Grimm, P.: Taschenatlas der Ernährung, Stuttgart (Thieme), 2004
4. Braveny, I; Maschmeyer, G: Infektionskrankheiten, München (medco), 2002
5. Cogan, T. M.; Accolas, J. -P.: Dairy Starter Cultures, New York (VCH Publishers), 1996
6. Cypionka, H.: Grundlagen der Mikrobiologie, Berlin, Heidelberg, (Springer), 2003
7. Heeschen, W. (Hrsg): Pathogene Mikroorganismen und deren Toxine in Lebensmitteln tierischer Herkunft, Hamburg (Behrs), 1989
8. Jassoy, C.; Schwarzkopf, A. (Hrsg): Hygiene, Mikrobiologie und Ernährungslehre für Pflegeberufe, Stuttgart (Thieme), 2005
9. Jay, J. M.; Loessner, M. J.; Golden, D. A.: Modern Food Microbiology, New York (Springer), 2005
10. Keweloh, Dr. H.: Mikroorganismen in Lebensmitteln, Haan-Gruiten (Pfanneberg), 2006
11. Kunz, B.: Grundlagen der Lebensmittelbiotechnologie, Hamburg (Behrs), 2006
12. Oethinger, M. (Hrsg): Mikrobiologie und Immunologie (Gustav Fischer), 1997

13. Oxoid GmbH (Hrsg.): Oxoid Handbuch, Weser (Oxoid GmbH), 2003

14. Ruttloff, H.; Proll, J.; Leuchtenberger, A.: Lebensmittel-Biotechnologie und Ernährung, Berlin, Heidelberg (Springer), 1997

Aufsätze

1. Alpers, K.; Jansen, A.: Infektionen mit Salmonellen beim Menschen in: Bericht aus der Abteilung für Infektionsepidemiologie, Fachgebiet Gastrointestinale Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen des Robert Koch-Instituts, Berlin, 2004
2. EFFCA: References and guidelines for methods for detection and enumeration of contaminants in meat starter cultures: coliforms, enterococci, sulfite-reducing bacteria, staphylococcus aureus, yeasts & moulds, salmonella and listeria
3. Hummerjohann, J.: Fleischfermentation in: ALP science 2004, Nr. 482 (Hrsg.: Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Bern, 2004
4. Koch, J.; Stark, K.: Listeriose-Erkrankungen des Menschen 2004 in: Bericht aus der Abteilung für Infektionsepidemiologie, Fachgebiet Gastrointestinale Infektionen, Zoonosen und tropische Infektionen des Robert Koch-Instituts, Berlin, 2005
5. Zehntner, U.; Hadorn, R.: Fleischstarterkulturen in der Schweiz – eine Übersicht in: ALP science 2004, Nr. 484, (Hrsg.: ALP), Bern, 2004

Normen

ASU L-00.00-20

ASU L-00.00-32; Teil 1 Und Teil 2

ASU L-00.00-55

EN ISO 4833:2003 (D)

ISO 5944:2001(E); IDF 60:2001(E)

Internet

1. BfR – Salmonellen und ihre Bedeutung als Krankheitserreger

www.bfr.bund.de/cd/537

2. Stellungnahme Nr. 004/2006 des BfR vom 21.12.05:

www.bfr.bund.de/cm/208/kritischer_als_gammelfleisch_toxinbildende_bakterien_und_ihre_giftstoffe_in_fleisch_und_fleischerzeugnissen.pdf, 22. 05. 2007

3. Ellerbroek, L.: Listeriose und Lebensmittel – aktuelle Trends

www.bfr.bund.de/cm/232/listeriose_und_lebensmittel_aktuelle_trends.pdf,
20.05.2007

4. Winkler, H.: So halten wir die Listerien unter Kontrolle

www.db-alp.admin.ch/de/publikationen/docs/pub_WinklerH_2006_16151.pdf,
7.05.2007

Dissertation

Loessner, M.: *Listeria monocytogenes*: Vorkommen in oberflächengereiften Weichkäsen und Entwicklung antagonistischer Reifungskulturen, Dissertation, Technische Universität München, 2000

Skript

Kopra, N.: Mikrobio 4, Hamburg, 2005

Eidesstattliche Erklärung

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

Manuela Wanger