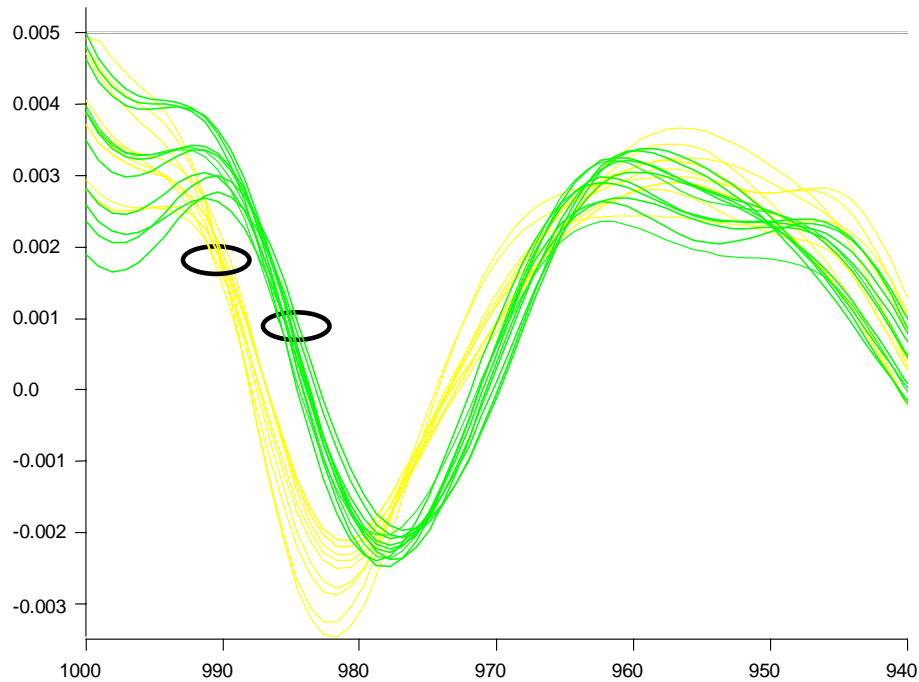




Das Lebensministerium



## Identifizierung von *Bacillus cereus*

Schriftenreihe der  
Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft  
Heft 3 – 8. Jahrgang 2003

Freistaat  Sachsen

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

**Charakterisierung und Identifizierung von  
*Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und  
Lebensmitteln mittels Fourier-Transform-  
Infrarot (FT-IR) Spektroskopie**

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Ernährung im Wandel</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Probiotika</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Der Einsatz von Probiotika im historischen Verlauf</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	Wirkungsweise von Probiotika	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Bacillus cereus</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Das Genus Bacillus cereus</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Art <i>Bacillus cereus</i></b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b><i>Bacillus cereus</i> im Einsatz als Probiotikum</b>	<b>3</b>
<b>4.1</b>	Zur Wirkung von <i>Bacillus cereus</i> als Probiotikum	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Der Einsatz von Toyocerin® und Paciflor® in Futter- und Lebensmitteln –ein Problem für die mikrobielle Analytik?</b>	<b>4</b>
<b>6</b>	<b>Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie</b>	<b>5</b>
<b>6.1</b>	<b>Beschaffenheit des Interferometers zur FT-IR-Analyse</b>	<b>5</b>
<b>6.2</b>	<b>FT-IR-Spektren von Mikroorganismen</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>Aufbau einer FT-IR-Datenbank</b>	<b>6</b>
<b>7.1</b>	<b>Methodik zur Erstellung einer FT-IR-Datenbank</b>	<b>6</b>
7.1.1	Stämme	6
7.1.2	Nährmedien und Wachstumsbedingungen	7
7.1.3	Probenpräparation für die FT-IR-Analyse	7
<b>7.2</b>	<b>Die FT-IR-Spektren</b>	<b>8</b>
7.2.1	Aufnahme der Spektren	8
7.2.2	Bearbeitung der Spektren	8
7.2.3	Auswertung der Spektren	9
7.2.4	Mittelwertbildung von FT-IR-Spektren	9
7.2.5	Spektrale Fenster	9
<b>7.3</b>	<b>Die Grundlage der <i>Bacillus cereus</i> FT-IR-Datenbank</b>	<b>10</b>
<b>7.4</b>	<b>Erweiterung der <i>Bacillus cereus</i> FT-IR-Datenbank</b>	<b>11</b>
7.4.1	Ausbau der Datenbank durch <i>Bacillus cereus</i> -Isolate aus Futtermitteln mit deklariertem Probiotika-Zusatz	11
7.4.2	Vergrößerung der Datenbank durch vermeintliche „wild“-Stamm-Isolate	12
7.4.3	Fortsetzung des Ausbaus der Datenbank durch scheinbar verschleppte Probiotika-Isolate	12
<b>8</b>	<b>Entwicklung eines Antibigramms zur Unterscheidung verschiedener <i>Bacillus cereus</i> Varietäten und zur Überprüfung der FT-IR-Resultate</b>	<b>13</b>
<b>8.1</b>	<b>Methodik des Agardiffusionstestes</b>	<b>13</b>
8.1.1	Stämme	13
8.1.2	Nährmedien und Wachstumsbedingungen	13
8.1.3	Methode der Empfindlichkeitsprüfung gegen Antibiotika	13
8.1.4	Antibiotikaempfindlichkeit unterschiedlicher <i>Bacillus cereus</i> -Isolate	14
<b>8.2</b>	<b>Formulierung eines Antibigramms zur Differenzierung von <i>Bacillus cereus</i>-Varietäten</b>	<b>15</b>
<b>9</b>	<b>Ausbau der <i>Bacillus cereus</i> FT-IR-Datenbank</b>	<b>15</b>
<b>9.1</b>	<b>FT-IR-Analytik verschiedener <i>Bacillus cereus</i>-Isolate</b>	<b>15</b>
<b>9.2</b>	<b>Das Identifizierungspotential der FT-IR-Datenbank</b>	<b>17</b>
<b>9.3</b>	<b>Darstellung der Stämme der FT-IR-Datenbank in der Clusteranalyse</b>	<b>17</b>
<b>10</b>	<b>Kurzer Exkurs zur Frage nach der Ausbreitung probiotischer <i>Bacillus cereus</i>-Isolate in der Umwelt</b>	<b>18</b>

<b>11</b>	<b>Bioregulatoren: Probleme des Einsatzes und die Bedeutung der Kontrolle</b>	<b>19</b>
<b>12</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>20</b>
<b>13</b>	<b>Literatur</b>	<b>22</b>
<b>14</b>	<b>Anhang</b>	<b>24</b>

## Einleitung

Die Identifizierung und Charakterisierung qualitätsbeeinflussender Mikroorganismen aus landwirtschaftlichen Produkten dominiert die Aufgabe der mikrobiellen Diagnostik der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft. Für andere Laboratorien des Verbraucherschutzes steht die mikrobiologische Kontrolle aus der Sicht der Human- und Veterinärmedizin im Vordergrund. Allen mikrobiologischen Untersuchungseinrichtungen, sei es im Rahmen von Diagnostik, Registrierung oder zur Durchführung von epidemiologischen Erhebungen ist gemeinsam, dass die qualitativen Anforderungen an z. B. die Differenzierungstiefe zugenommen haben. Wurde früher häufig eine Identifizierung auf der Genus-Ebene als ausreichend angesehen, so gilt heute die Spezies-Ebene als Standard. Bezogen auf z. B. Probiotika ist sogar die Identifizierung auf Subspezies-Ebene notwendig.

Für die mikrobielle Diagnostik stehen zahlreiche konventionelle Identifizierungsmethoden zur Verfügung, die in der Regel auf biochemischen, physiologischen und serologischen Techniken basieren. Zunehmend werden auch molekulargenetische Techniken, wie z.B. PCR (polymerase chain reaction) und DNA-Sequenzierung, eingesetzt. Einige dieser Techniken lassen jedoch die Identifizierung bis zur Subspezies-Ebene nicht zu. Manche sind arbeits- und kostenintensiv, zu langsam, gelegentlich extrem störanfällig und häufig nicht automatisierbar (Naumann et al., 1990).

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Charakterisierung von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln“ stand die Evaluierung des Potentials der physikalischen Methode der Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie zur schnellen und eindeutigen Subspezies-Identifizierung von *Bacillus cereus*-Isolaten im Vordergrund.

Es wurde eine FT-IR-Datenbank zur Identifizierung und Differenzierung probiotischer *Bacillus cereus* (*B. cereus*)-Keime von „wild“-Typ-Stämmen etabliert, so dass nunmehr eine Unterscheidung probiotischer, apathogener *B. cereus*-Isolate von potentiell toxinbildenden „wild“-Typ-Stämmen sowie eine Identifizierung probiotischer *B. cereus*-Stämme auf Subspezies-Ebene mit der schnellen, kostengünstigen und zum Großteil automatisierbaren Methode der FT-IR-Analyse praktikabel ist.

### 1 Ernährung im Wandel

Die Rolle von Ernährung, Gesundheit und Diätetik unterliegt einem Wandel, so wie sich die Wissenschaft der Ernährung entwickelt und verändert.

Nahrung diene ursprünglich der Deckung des Energiebedarfes für Wachstum und der Aufrechterhaltung von Körperfunktionen. Heute liegt der Focus auf dem Verstehen, wie Ernährung und Diätetik Risiken für Krankheiten verringern und physiologische und funktionale Prozesse des Körpers beeinflussen können.

Mehr noch: Nahrungsmittel werden entwickelt und modifiziert, um deren Möglichkeiten, Funktionen des Körpers zu beeinflussen, zu verstärken. Die Grenze zwischen Lebensmittel und Medikament scheint daher oft fließend.

Durch Namen wie „functional food“ und „wellness food“ werden angebliche gesundheitsfördernde Eigenschaften dieser veränderten Lebensmittel werbemäßig hervorgehoben.

Zu dieser Generation von Nahrungsmitteln gehören auch solche mit Probiotika-Zusatz, die in den letzten Jahren verstärkt angeboten und konsumiert werden.

Probiotika kommen sowohl als Nahrungsmittel als auch als Humantherapeutika zum Einsatz. In bezug auf die moderne Fütterung von Nutztieren stellen Probiotika eine willkommene Alternative zur Verwendung der in Kritik geratenen antimikrobiellen Leistungsförderer dar.

Der Sporenbildner *Bacillus cereus* spielt in der Produktpalette der Probiotika der Futtermittelindustrie die dominierende Rolle. Das Präparat Toyocerin® der Firma Lohmann enthält die *B. cereus* Varietät *toyoi*, das Erzeugnis Paciflor® der Firma Hoechst den Stamm *B. cereus* CIP 5832. CIP 5832 ist aufgrund des Verdachtes der Pathogenität als Futtermittelzusatz seit Februar 2001 nicht mehr zugelassen, findet jedoch weiterhin als Humantherapeutikum Anwendung.

Aerobe Sporenbildner der Gattung *Bacillus* sind sehr widerstandsfähig und spielen im Stoffkreislauf der Natur aufgrund ihres großen Enzymspektrums eine bedeutende Rolle. Bestimmte *B. cereus*-Stämme sind starke Toxinbildner und Lebensmittelvergifter und gelten in der mikrobiellen Diagnostik als Verderbanzeiger.

Durch den Einsatz probiotischer *B. cereus*-Sporen als Futtermittelzusatz wurde in den letzten Jahren im Rahmen der amtlichen Futtermittelkontrolle der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft ein stetiger Anstieg von *B. cereus*-Kolonien unbekannter Herkunft verzeichnet. Diese Beobachtung wirft diagnostische und Bewertungsprobleme auf, da die meisten Probiotika-Stämme kulturmorphologisch und biochemisch nicht eindeutig von häufig pathogenen „wild“-Formen zu unterscheiden sind und der Kenntnisstand über die Ausbreitung probiotischer *B. cereus*-Stämme in der Umwelt gering ist.

Mit der Evaluierung des Potentials der FT-IR-Spektroskopie zur Subspezies-Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten und dem Aufbau einer FT-IR-Bibliothek zur Unterscheidung der verschiedenen *B. cereus*-Varietäten liefert das Forschungsprojekt „Charakterisierung von

*Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln“ einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der diagnostischen Möglichkeit für Routinelaboratorien, in denen der ubiquitär vorkommende Keim *B. cereus* von Bedeutung ist.

## 2 Probiotika

Bei Menschen und homoiothermen Tierarten bilden Wirt und die im Darm ansässige Mikroflora ein Ökosystem, von dem je nach Zusammensetzung des Keimbefalles der Wirt profitieren oder aber auch Schaden nehmen kann (Rolle und Mayr, 1993). Erkenntnisse auf dem Gebiet der Keimkonkurrenz zeigten Möglichkeiten auf, über die Verabreichung ausgewählter lebender Keime bioregulativ in die Besiedlung der Darmflora einzugreifen.

Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die, als Futtermittelzusatz oder als Therapeutikum verabreicht, das mikrobielle Gleichgewicht im Verdauungstrakt stabilisieren und somit das allgemeine Wohlbefinden fördern sollen. Sie werden als getrocknete Kulturen oder als deren Dauerformen (Sporen) verwendet.

### 2.1 Der Einsatz von Probiotika im historischen Verlauf

Die systematische Erforschung der Probiotika begann bereits Anfang des 20sten Jahrhunderts.

Jedoch erst in den 60er und 70er Jahren hat man sich in der Human- und Tierernährung wieder auf Probiotika besonnen. Erste leistungsfähige Produkte für die Tierernährung, die den speziellen Anforderungen für den Einsatz als Futterzusatzstoffe gerecht wurden, kamen in Europa Mitte der 80er Jahre auf den Markt (Busch et al., 1999).

Der Begriff Probiotika wurde im Laufe der Jahre mit unterschiedlichsten Bedeutungen belegt. In den 60er Jahren des 20sten Jahrhunderts wurde er ursprünglich gebraucht, um Substanzen zu beschreiben, die von einem Mikroorganismus produziert werden und einen anderen beeinflussen (Lilly & Stillwell, 1965). Anknüpfend wurde er zur Beschreibung von Futterzusätzen eingesetzt, die durch Beeinflussung der Magen-Darm-Flora eine positive Wirkung auf den Wirtsorganismus ausüben (Parker, 1974). In seiner späteren Rolle wurde der Begriff Probiotika definiert als: Organismen oder Substanzen, die zur intestinalen mikrobiellen Balance beitragen. Diese Definition ist unbefriedigend, da sie auch Antibiotika beinhaltet. Fuller (1989) überarbeitete die Definition zu „ein lebender mikrobieller Futtermittelzusatz, der den Wirtsorganismus positiv durch heilsame Wirkung auf die intestinale mikrobielle Balance beeinflusst“. Seither existiert der Begriff „Probiotika“ (griechisch: für das Leben) in seiner heutigen Bedeutung.

Gebräuchliche Synonyme sind die Begriffe: Bioregulatoren, Darmflorastabilisatoren und

„direct fed microbials“ (dfm) (Busch et al., 1999).

Zu Beginn der Nutzung von Probiotika stand zunächst der therapeutische Gebrauch im Vordergrund. Probiotika fanden als Medikamente beispielsweise bei pathologisch veränderter Darmflora Verwendung. Zu diesen in der Humanernährung und Medizin eingesetzten Probiotika werden nicht nur - wie in der Tierernährung - lebende, sondern auch abgetötete Keime gezählt (Busch et al., 1999). Der Einsatz der Bioregulatoren hat sich im Laufe der Jahre gewandelt, wonach Probiotika gegenwärtig vorwiegend nach dem prophylaktischen Prinzip eingesetzt werden. Hinsichtlich der menschlichen Ernährung folgt dieser vorbeugende Einsatz dem Wunsch nach Förderung von Gesundheit und Steigerung des allgemeinen Wohlbefindens (Kreusmann und Krewer, 2000). Bezogen auf die Ernährung von Nutztieren geht es beim Einsatz von Probiotika hauptsächlich um die Verhütung krankheitsbedingter wirtschaftlicher Verluste, um eine bessere Ausnutzung angebotener Futtermittel sowie um die Steigerung des Schlachtgewichts.

### 2.2 Wirkungsweise von Probiotika

Die zur Zeit in der Tierernährung eingesetzten Probiotika lassen sich in drei wesentliche Gruppen unterteilen: Hefen, Milchsäurebakterien und *Bacillus*-Sporen (Kühn, 1998). Sie werden als getrocknete Kulturen oder als Sporen eingesetzt.

In der Literatur werden vor allem die folgenden vier Anforderungen an probiotische Mikroorganismen genannt:

- Gesundheitliche Unbedenklichkeit
  - Gute Überlebensfähigkeit während der Magen-Darm-Passage
  - Nachweis eines gesundheitlichen Nutzens für den Wirtsorganismus
  - Technologische Eignung
- (Kreusmann und Krewer, 2000).

Probiotika dienen dem Zweck, regulativ in die mikrobielle Besiedlung des Verdauungstraktes einzugreifen. Im Gegensatz zu den Antibiotika sind es nicht bestimmte Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen mit wachstumshemmender oder keimtötender Wirkung, sondern es sind hier die Mikroorganismen selbst, die lebend oder abgetötet dem Nutztier zu höherer Leistung auf der Basis eines grundsätzlich davon abweichenden Wirkungsmechanismus verhelfen sollen (Gedek, 1986).

Eine dauerhafte Besiedlung des Intestinaltraktes mit probiotischen Keimen findet nicht statt. Nach Unterbrechung der oralen Zufuhr nimmt die Keimzahl kontinuierlich ab.

Für probiotische Mikroorganismen gilt ein hohes Anheftungsvermögen an Darmepithelzellen als günstige Voraussetzung für die temporäre Besiedlung und Erzielung gesundheitsrelevanter Effekte (Kreusmann und Krewer, 2000).

### 3 **Bacillus cereus**

#### 3.1 **Das Genus Bacillus cereus**

Das Genus *Bacillus* gehört der Sektion 18 (endosporenbildende grampositive Stäbchen und Kokken) nach Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9. Aufl. 1994) an.

Das Genus *Bacillus cereus* besteht aus vier nahe verwandten Spezies: *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* und *Bacillus anthracis*.

Als Gruppe haben diese Bakterien einen weiten Temperatur-Wachstums-Bereich, wobei einzelne Stämme sogar Vermehrung bei einer Temperatur von 4 °C zeigen, andere noch bei 42 °C. Stämme, die bei unter 7 °C Wachstum zeigen, werden als psychrotolerant bezeichnet, solche, die bei 7 °C nicht mehr zur Teilung fähig sind, als mesophil. Psychrotolerante *B. cereus*-Stämme wurden unlängst als neue Spezies *B. weihenstephanensis* beschrieben (Stetten et al., 1998).

Die vier bzw. fünf Spezies des Genus *Bacillus* haben einen hohen Grad an genetischer Ähnlichkeit, wie durch DNA-DNA-Hybridisierungsstudien gezeigt werden konnte (Lechner et al., 1998).

Aerobe Sporenbildner gehören aufgrund ihrer ausgeprägten proteolytischen Eigenschaften zu den wichtigsten Verursachern von Qualitätsabfall und Verderb von Lebensmitteln. Ihre Sporen sind ubiquitär verbreitet, so dass Bazillen, außer in sterilisierten Produkten, in nahezu allen Nahrungsmitteln als Kontaminanten auftreten (Fehlhaber und Kunze, 1999). Die Sporen stellen Ruhezellen dar, die nach Beendigung der exponentiellen Wachstumsphase oder, wenn vegetative Zellen von einem nährstoffreichen in ein nährstoffarmes Medium kommen, gebildet werden. Sporen zeigen keinerlei metabolische Aktivität. Der Ruhezustand, der als Kryptobiose bezeichnet wird, kann über Monate und Jahre aufrechterhalten werden.

Einige Stämme der aeroben Sporenbildner sind Toxinproduzenten. Die Spezies *Bacillus cereus* ist daher als häufige Ursache von Lebensmittelvergiftungen bekannt (Fehlhaber und Kunze, 1999).

Für pasteurisierte Lebensmittel stellen die hitze-resistenten Sporen aufgrund der geringen Konkurrenzflora ein besonderes Problem dar. *Bacillus cereus* / *Bacillus weihenstephanensis* dominiert häufig die Verderbsflora in Milch und Milchprodukten und ist für die „Kürze“ der Haltbarkeit verantwortlich (Mayr et al., 1999).

#### 3.2 **Die Art Bacillus cereus**

Unter dem Mikroskop erscheinen *Bacillus cereus*-Zellen als große, Gram-positive Stäbchen, die aufgrund von peritricher Begeißelung beweglich sind. Die Zellen besitzen einen Durchmesser von 1,2 µm und eine Länge von 3,0- 5,0 µm (Gibson und Gordon, 1974). Die

Stäbchen lagern sich zu Ketten zusammen. Die einzelnen Endosporen befinden sich in zentraler oder in parazentraler Position und verursachen keine Schwellungen des Sporangiums. Der Organismus sporuliert in vielen Medien, wenn der Sauerstoffgehalt ausreichend ist, obwohl vegetative Zellen auch anaerob wachsen (Sneath et al., 1986).

*B. cereus* ist bekannt als Verursacher lebensmittelinduzierter Gastroenteritis (Magen-Darm-Katarrh). Die Krankheit tritt in zwei Formen auf, entweder mit emetischen oder mit diarrhöetischen Symptomen, die durch zwei unterschiedliche Toxine ausgelöst werden (Schraft and Griffiths, 1995). Das emetische Toxin ruft nach kurzer Inkubationszeit ein Krankheitsbild hervor, dass durch Erbrechen und Schwindel gekennzeichnet ist. Das diarrhöetische Toxin hat eine längere Inkubationszeit und löst Diarrhöe und abdominale Krämpfe aus.

Neben gastrointestinalen Intoxikationen verursacht *Bacillus cereus* beim Menschen aber auch Erkrankungen wie Ophthalmiden, Meningitiden, Knochen- und Weichteilerkrankungen sowie systemische Erkrankungen. Beim Tier sind vor allem Mastitiden aber auch Wundinfektionen und Otitiden bekannt. Neben den erwähnten Toxinen ist *Bacillus cereus* weiterhin zur Bildung mehrerer Hämolsine,  $\beta$ -Laktamasen und Phospholipasen in der Lage.

#### 4 **Bacillus cereus im Einsatz als Probiotikum**

Die in der Tierernährung eingesetzten Probiotika müssen EU-einheitlich als mikrobielle Futterzusatzstoffe zugelassen sein. Hierzu belegen die Herstellerfirmen die Unbedenklichkeit, Wirksamkeit und Stabilität ihrer Produkte.

Der in Japan aus dem Boden isolierte *Bacillus cereus* var. *toyoi* (NCIMB 40112 / CN CM I-1012) ist als Toyocerin®-Pulver mit einer Sporenkonzentration von 10<sup>9</sup>/g bzw. als Toyocerin®-Pulver-B mit einer Sporenkonzentration von 10<sup>10</sup>/g erhältlich. Als Trägerstoff dient Kalziumkarbonat (CaCO<sub>3</sub>) (Gritzer und Leitgeb, 1998). In Japan wird Toyocerin® seit 1975 in der Futtermittelindustrie eingesetzt (Kozasa, 1986).

Toyocerin® wurde in der EU vorläufig seit 1994 als Futtermittelzusatz für die Tierkategorien Ferkel, Schweine und Sauen zugelassen. Nach Ablauf der höchstzulässigen Dauer von fünf Jahren für eine vorläufige Zulassung eines Futtermittelzusatzes am 21.04.1999, wurde mit der EG-VO Nr. 256/2002 eine Zulassung als Futtermittelbeimischung mit uneingeschränkter Dauer erteilt.

Als Futtermittelzusatz für Masthühner, Legehennen, Kälber, Mastrinder, Zuchtkaninchen und Mastkaninchen wurde Toyocerin® mit der EG-VO Nr. 2293/99 in die Futtermittelverordnung aufgenommen und mittels der BLM-Ausnahmegenehmigung für diese Tierkategorien bis zum 01.03.2002 zugelassen. Nach Ablauf der Frist ist die Ausnahmegenehmigung

durch die EG-VO Nr. 256/2002 bis zum 07.10.2004 verlängert worden.

Paciflor® (*Bacillus cereus* CIP 5832 / ATCC 14893) ist als Futterzusatzstoff registriert und wurde am 05. Juli 1994 als mikrobieller Zusatzstoff zur Stabilisierung der Darmflora vom BLM zugelassen. Im Juli 1998 wurde *Bacillus cereus* CIP 5832 mit Wirkung zum 01.07.1999 in den Anhang 2 der EU-Futtermittelverordnung aufgenommen (Hoechst Roussel Vet, 1999) und offiziell ab dem 14.10.1999 zum Einsatz in Europa in Futtermitteln für Ferkel, Mastschweine, Sauen, Kälber, Masthühner, Mastkaninchen und Zuchtkaninchen freigegeben. Die Zulassung für Paciflor® endete am 20.02.2001 (für Pferde am 31.12.2001) und wurde nicht verlängert.

Nach Meinung des wissenschaftlichen Ausschuss für Futtermittel der EU – Kommission (SCAN / Scientific Committee of Animal Nutrition) geht vom im Produkt Paciflor® enthaltenen Bakterienstamm *Bacillus cereus* CIP 5832 ein potentiell Risiko für den Verbraucher aus. Es ist nach Meinung des SCAN nicht ausgeschlossen, dass *Bacillus cereus* CIP 5832 unter bestimmten Bedingungen zwei Toxine produziert, von denen bekannt ist, dass diese beim Konsumenten Lebensmittelvergiftungen auslösen. Bei der Schlachtung könne nicht ausgeschlossen werden, dass Fleisch durch *Bacillus cereus*-Sporen kontaminiert werde und so die Bakterien zum Konsumenten gelangen (Europäische Kommission, 13/06/01).

*Bacillus* Sporen sind bemerkenswert stabil und zeigen eine Haltbarkeit von mehreren Monaten bis Jahren. Sie sind (in gewissen Grenzen) unempfindlich gegen Hitze, Säuren und Basen und haben daher eine sehr hohe Resistenz gegenüber der Magensäure (Gedek, 1986). Andere Probiotika, wie beispielsweise *Lactobacillus* oder *Bifidobakterien*, die keine Sporen bilden, zeigen weniger Stabilität in Futtermitteln und nur eine geringe Resistenz gegen Säuren des Verdauungstraktes. Bioregulatoren, die den Sporenbildner *Bacillus subtilis* enthalten, weisen ebenfalls eine geringere Stabilität auf, da sie eher vegetative Zellen als Sporen enthalten (Kozasa, 1986).

#### 4.1 Zur Wirkung von *Bacillus cereus* als Probiotikum

Die grampositiven Bakterien der Gattung *Bacillus* gehören zu den „Transienten“, die im Darmtrakt auskeimen und zu vegetativen Zellen heranwachsen, ohne sich anzusiedeln bzw. wesentlich zu vermehren (Gritzer und Leitgeb, 1998). Die mikrobiellen Leistungsförderer Toyocerin® und Paciflor® heften sich an die Darmepithelien und bilden dadurch einen Biofilm aus, der als Barriere zum Schutz gegen von außen vordringende oder aus dem Dickdarm aufsteigende potentielle Krankheitserreger gesehen werden kann.

Als exogene Keime besitzen *Bacillus* Probiotika ein starkes Potential zur Stimulierung der lokalen Immunität im Darm der Tiere (Busch et al., 1999). Sie sind dort stoffwechselaktiv und werden anschließend ausgeschieden. Den Probiotika Toyocerin® und Paciflor® wird die Befähigung zur Entfaltung antagonistischer Eigenschaften zugeschrieben, die eine Verschiebung innerhalb der Keimflora des Darms bewirkt. Die säurebildende Hauptflora wird unter gleichzeitiger Hemmung der unerwünschten Begleitflora, wie z. B. *E. coli*, gefördert, so dass der physiologische Zustand der Keimbesiedlung (Eubiose) aufrecht erhalten wird (Gritzer und Leitgeb, 1998). Ob die keimhemmende oder keimabtötende Wirkung auf der Bildung kurzkettiger Fettsäuren oder antimikrobieller Substanzen beruht, ist vielfach diskutiert aber noch nicht eindeutig beantwortet (Gedek, 1990).

Fuller (1989) beschreibt den Einsatz von Probiotika folgendermaßen: „Was wir mit der Probiotika-Behandlung bewirken, ist eine Re-etablierung der natürlichen Verhältnisse, die bei Wildtieren existieren, aber durch moderne Trends in der Tierhaltung, inklusive der Behandlung menschlicher Babys, sowie durch moderne Einstellung zur Ernährung und Krankheits-Therapie, zerstört wurden“.

Bei der kritischen Betrachtung des prophylaktischen Einsatzes von Probiotika stellt sich die Frage, ob die natürliche Darmflora durch Bioregulatoren langfristig verändert werden kann oder ob dieses überhaupt erstrebenswert ist. Die Darmflora, ein komplexes System mit ca. 400 verschiedenen Arten, ist bei Gesunden optimal an die Verhältnisse im Darm angepasst, bei jedem Menschen individuell zusammengesetzt und verändert sich im Laufe des Lebens. Die Darmflora stellt ein ausgeklügeltes Abwehrsystem gegen Fremdkeime und einen bedeutenden Teil der Immunantwort des Organismus dar. Ist es da überhaupt wünschenswert, durch den Einsatz von Probiotika bewusst an der Ordnung der Darmflora herum zu manipulieren? (www.BIOWEB.CH, 2002).

#### 5 Der Einsatz von Toyocerin® und Paciflor® in Futter- und Lebensmitteln - ein Problem für die mikrobielle Analytik?

Mit dem gesteigerten Einsatz probiotischer Zusätze in der Futter- und Lebensmittelproduktion stellen sich der mikrobiologischen Analytik neue Aufgaben. Die meisten Probiotika-Stämme sind kulturmorphologisch und biochemisch nicht eindeutig von „wild“-Formen zu unterscheiden.

Sowohl im Rahmen der Qualitätssicherung probiotischer Produkte, als auch bei Routineuntersuchungen von Futter- und Lebensmitteln, ist eine eindeutige Charakterisierung und Identifizierung ausgewählter Stämme zwingend.

Ein als Probiotikum eingesetzter Keim muss beispielsweise sowohl im Produkt als auch im Zielort Darm unter vielen anderen Bakterien



stämmen und unter evtl. natürlich vorkommenden gleichen Bakterienspezies nachweisbar und eindeutig identifizierbar, sowie in seiner Anzahl bestimmbar sein. Ohne Kenntnis der exakten genotypischen Identität des probiotischen Keimes können die erforderlichen Nachweismethoden nicht entwickelt und mögliche Verstöße von den zuständigen Kontrollbehörden nicht ermittelt werden (Kreusemann und Krewer, 2000).

Um die diagnostische Lücke der Differenzierungs- und Identifizierungsmöglichkeiten, bezogen auf den Stamm *B. cereus*, zu schließen, wurde in dieser Studie eine Methode der Subspezies-Identifizierung etabliert.

## **6 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie**

Die Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren zu einer wirksamen und flexiblen Technik der mikrobiellen Diagnostik entwickelt. Durch die Absorption infraroten Lichtes durch einen Film aus getrockneten Bakterien wird im resultierenden Absorptionsspektrum ein Fingerabdruck aller Zellkomponenten erhalten, der für jeglichen Mikroorganismus hochspezifisch ist und die eindeutige Identifizierung von Keimen erlaubt. Die Analyse der Spektren erfolgt mit Methoden der Korrelationstechnik, der Clusteranalyse (in Form von Dendrogrammen) und der Datenbanksuche. Die Güte der Identifizierung hängt signifikant von der Größe und Qualität der Referenz-Bibliothek ab (Oberreuther et al., 2000). Die Selektivität der FT-IR-Technik ist sehr hoch und erlaubt eine Differenzierung auch zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies.

Die FT-IT-Spektren werden 1.) optisch auf Unterschiede zwischen den Varietäten untersucht und 2.) in Clusteranalysen ausgewertet. Die Methode der Clusteranalyse wird angewandt, um Ähnlichkeiten festzustellen. Sie ist weniger für eine Identifizierung als für die Differenzierung von Mikroorganismen geeignet.

Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie wird die von einer Substanz bei einer bestimmten Wellenlänge absorbierte Strahlungsmenge gemessen. Die in einem Molekül um ihren Gleichgewichtszustand schwingenden Atome werden durch die Absorption von Lichtquanten zu verstärkten Streck- und Deformationsschwingungen ange-regt.

Atomgruppen und Bindungen weisen bei einer bestimmten Wellenlänge charakteristisch auftretende Schwingungen auf. Die Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenzahl (Einheit [ $\text{cm}^{-1}$ ]) bezeichnet man als Spektrum. Aus der Lage der Banden, ihrer Intensität und Anzahl kann auf die Struktur und Zusammensetzung der gemessenen Substanz geschlossen werden. Das Schwingungsspektrum

einer Substanz stellt einen charakteristischen Fingerabdruck eines Stoffes auf molekularer Ebene dar.

Im Unterschied zur konventionellen Infrarotspektroskopie können bei der FT-IR-Spektroskopie mit einem sogenannten Michelson-Interferometer verschiedene Frequenzen gleichzeitig erzeugt und durch den Detektor gemessen werden.

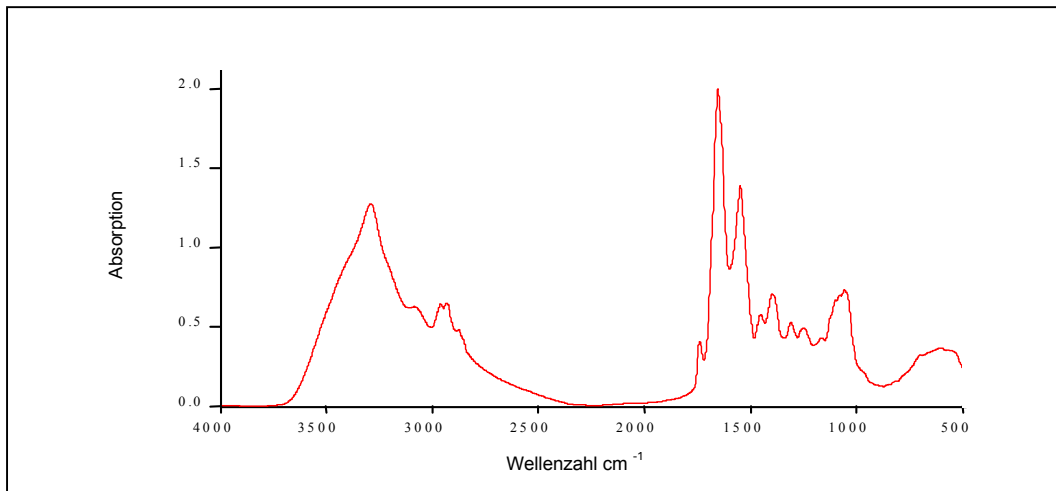
Das vom Spektrometer erhaltene Interferogramm wird mit Hilfe einer mathematischen Operation - der Fourier-Transformation - in das eigentliche IR-Spektrum umgewandelt.

### **6.1 Beschaffenheit des Interferometers zur FT-IR-Analyse**

Das Interferometer besteht aus drei wesentlichen Komponenten: dem Strahlenteiler, einem festen Spiegel und einem beweglichen Spiegel. Gebündelte Strahlung der IR-Quelle gelangt auf den Strahlenteiler, der so beschaffen ist, dass er 50 % des Lichtes zum festen Spiegel durchlässt, den Rest hingegen zum beweglichen Spiegel hin reflektiert. Beide Anteile des Strahles werden an den Spiegeln reflektiert und rekombinieren am Strahlenteiler, wo sie je nach Position des bewegten Spiegels, d.h. je nach Gangunterschied der rekombinierenden Strahlung, zur verstärkenden oder auslöschenden Interferenz gebracht werden. Der resultierende Strahl durchdringt die Probe, wird von dieser selektiv absorbiert und gelangt zum Detektor. Im Endeffekt wird am Detektor ein Signal erzeugt, das die Summe aller modulierten Einzel-frequenzen darstellt. Der Vorschub des beweglichen Spiegels wird dabei elektronisch gesteuert. Eine komplette Auslenkung des beweglichen Spiegels wird zwischen seinen beiden Extrempositionen als Scan bezeichnet. Die Aufzeichnung der Intensität der am Detektor gemessenen IR-Strahlung gegen die Spiegelposition wird als Interferogramm bezeichnet. Da das Interferogramm durch Überlagerung von reinen Sinusschwingungen entsteht, kann es mit den mathematischen Mitteln der Fourier-Transformation in das eigentliche Spektrum umgerechnet werden, d.h. in die Darstellung der Intensität in Abhängigkeit von Wellenlänge oder Frequenz (Bruker<sup>®</sup> Analytik GmbH).

### **6.2 FT-IR-Spektren von Mikroorganismen**

Aufgrund der extrem hohen Komplexität ganzer Bakterienzellen treten bei der FT-IR-Spektroskopie mikrobiellen Materials stark verbreiterte und wenig aufgelöste Peaks auf, die durch Überlagerung vieler Einzelbanden entstehen. Die FT-IR-Spektren aller Bakterien erscheinen daher zunächst als grundsätzlich sehr ähnlich (Abb. 1).



**Abb. 1:** Darstellung eines für Bakterien typischen FT-IR-Spektrums, hier *Bacillus cereus* ATCC 11778.

Die modernen Verfahren der rechnergesteuerten Auswertung der Spektren, die selbst kleinste Spektrenunterschiede erfassen sowie die Möglichkeit der multivariaten Statistik ermöglichen jedoch eine hohe Spezifität der FT-IR-Spektroskopie (Steffen, 1996).

Zur Differenzierung und / oder Identifizierung von Bakterien kann das Infrarotspektrum eines unbekanntes Keimes mit vorher aufgenommenen, in einer Datenbank enthaltenen Referenzspektren, verglichen und so identifiziert werden. Die Güte der Identifizierung geht Hand in Hand mit der Quantität und der Qualität der Referenz-Bibliothek.

Zur Subspeziesidentifizierung von *B. cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Charakterisierung von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln“ innerhalb der letzten zwei Jahre eine Datenbank erstellt, die mehr als 500 Mittelwertspektren verschiedener *B. cereus*-Isolate enthält. Die bestehende Bibliothek ermöglicht seither eine klare Identifizierung der probiotischen *B. cereus* Varietäten *toyoi* und *CIP 5832* sowie die sichere Differenzierung von anderen *B. cereus*-Isolaten.

## 7 Aufbau einer FT-IR-Daten-bank

Der Ausgangspunkt einer erfolgreichen Identifizierung von Mikroorganismen mit der FT-IR-Technik ist das Vorhandensein einer Datenbank aus Referenzspektren. Das Identifizierungspotential einer Bibliothek nimmt dabei mit der Quantität der enthaltenen Spektren zu.

### 7.1 Methodik zur Erstellung einer FT-IR-Datenbank

Zum Aufbau einer FT-IR-Bibliothek und zur Identifizierung von unbekanntes Keimen ist eine standardisierte Präparation der Bakterien,

einschließlich der Festlegung der Kulturbedingungen, notwendig, um eine reproduzierbare biochemische Zusammensetzung der Keime, und damit reproduzierbare Spektren, zu garantieren.

#### 7.1.1 Stämme

Um die breite Varianz des Umwelkeimes und Sporenbildners *B. cereus* in der Datenbank repräsentieren zu können, wurden über mehrere Jahre Keime verschiedenster Proben, unterschiedlicher geographischer Herkunft sowie mit abweichenden phänotypischen Ausprägungen gesammelt.

Die in dieser Studie analysierten rund 600 Bakterien-Isolate stammen aus Futtermitteln (Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft) und Lebensmitteln (Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Kiel, Institut für Lebensmittelhygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig sowie vom Lebensmittelinstitut Kompetenz In Nahrungsmitteln, Neumünster), Umweltproben (Bundesanstalt für Milchwirtschaft, Kiel), Gewürzen (KIN, Neumünster), Milch und Milchprodukten (Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt, Oranienburg), Medikamenten (Bactisubtil<sup>®</sup>, Hoechst; Bactisubtil<sup>®</sup>, cassella med; Latensin<sup>®</sup>, Sanum) sowie von der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen). Isolate der Spezies *Bacillus weihenstephanensis* wurden freundlicherweise vom Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan (Technischen Universität München) zur Verfügung gestellt, *Bacillus thuringiensis*-Isolate vom Institut für biologischen Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Darmstadt.

Bei sämtlichen Isolaten aus Futtermitteln, der Umwelt und Lebensmitteln aus eigenem Hause

sowie von den genannten Untersuchungseinrichtungen handelt es sich um sogenannte präsumptive *B. cereus*-Stämme. Nach § 35 LMBG versteht man unter präsumptiven *B. cereus* Mikroorganismen, die auf beschriebenen selektiven Nährböden (PEMBA und MYP-Agar) (siehe 7.1.2.) typische Kolonien bilden (bgvv 2001). *B. thuringiensis* kann mit dieser Methode nicht von *B. cereus* getrennt werden. Ein mikroskopischer Nachweis der insektizid wirkenden parasporalen Kristalle, die ausschließlich von *B. thuringiensis* gebildet werden, wird in der Routinediagnostik weder von der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft noch von den beteiligten Untersuchungseinrichtungen vorgenommen. Es ist davon auszugehen, dass in dem Gesamtpool der ca. 600 Bakterienstämme ein gewisser Anteil *B. thuringiensis* enthalten ist. Inwieweit eine Speziestrennung zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis* überhaupt sinnvoll erscheint, ist fraglich, da die plasmidgebundene Eigenschaft der Kristallbildung zwischen den Spezies transferieren kann (Battisti et al., 1985; Gonzalez et al., 1982). Somit kann, nach Forschungsergebnissen der Genetiker, ein *B. thuringiensis*-Stamm in einen *B. cereus*-Stamm übergehen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes werden alle präsumptiven *B. cereus*-Keime, die nicht den Bioregulatoren zuzurechnen sind, also nicht eindeutig zu den beiden in der Spezies *B. cereus* bekannten probiotischen Varietäten CIP 5832 oder *toyoi* gehören, als Wildformen bzw. „wild“-Stämme bezeichnet. Die Bezeichnung „wild“-Stamm beschreibt einen Keim, der nicht zwangsläufig Toxinbildner ist, sondern lediglich einen Stamm, der nicht als probiotischer Keim erfasst wird.

### 7.1.2 Nährmedien und Wachstumsbedingungen

Selektivnährböden zur Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten:

- BCM<sup>®</sup> *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Plating Medium (BIOSYNTH<sup>®</sup>, Cat. No. C-0700).

- *Bacillus-cereus*-Agar-Basis (Oxoid, Art. Nr. CM 617) plus 50 ml/l sterile Eigelb-Imulsion (Merck, Art. Nr. 1.03784.0001) = Polymyxin-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA)

- *Cereus*-Selektivagar nach Mossel (Basis) (Merck, Art. Nr. 1.05267.05000) plus 100 ml/l sterile Eigelb-Imulsion (Merck, Art. Nr. 1.03784.0001) = Mannit-Eigelb-Polymyxin-Agar (M.Y.P.-Agar).

Anzucht-Medium der *B. cereus*-Isolate für die FT-IR-Analyse:

a.) Caso-Agar Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar Merckoplate<sup>®</sup>-Fertigplatten (Merck, Art. Nr. 1.13499.0001).

b.) Caso-Agar, Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar USP (Merck, Art. Nr. 1.05458.0500).

Die Stämme werden im Drei-Quadrantenverfahren auf die Nährböden aufgebracht und jeweils für 24 h bei 30 °C (Selektivnährböden) bzw. 37 °C (für die FT-IR-Analyse) inkubiert.

Die Gruppierung der Keime in die Spezies *Bacillus cereus* erfolgt nach Überprüfung der charakteristischen Eigenschaften von *B. cereus* wie Lecithinase-Aktivität und negativer Mannit-Reaktion durch Kultivierung der Isolate auf *Cereus*-Selektivagar (Oxoid, Merck) sowie durch Auswertung der Keime nach Kultivierung auf BCM<sup>®</sup>-Medium der Firma BIOSYNTH<sup>®</sup>, dass sich zur Zeit in der Testphase befindet und im Handel noch nicht erhältlich ist.

Das BCM<sup>®</sup>-Medium zur Isolierung und Differenzierung von *Bacillus cereus* und *Bacillus thuringiensis* basiert auf einer chromogenen Reaktion. Die Phosphatidylinositol-spezifische Phosphorylase C-Produktion durch *Bacillus*-Spezies dient diesem Medium als Nachweisverfahren. *B. cereus* und *B. thuringiensis* bilden auf BCM<sup>®</sup>-Medium türkis-farbene, flache, stumpfe 2-7 (bzw. 2-8) mm große Kolonien mit oder ohne türkischem Hof. Andere *Bacillus*-Spezies bilden weiße Kolonien oder wachsen nicht auf diesem Nährboden.

Sowohl der *Cereus*-Selektivagar nach Mossel (Merck) als auch der *Bacillus-cereus*-Agar (Oxoid) basieren auf dem Nachweis der Eigenschaft von *B. cereus*, Mannit-negativ und Lecithinase-positiv zu sein. Eine positive Mannit-Reaktion von evt. vorhandener Begleitflora lässt sich durch einen pH abhängigen Farbumschlag beobachten, die Lecithinase-Aktivität ist durch den Abbau des unlöslichen Eigelb-Lecithins als weißes Präzipitat um die Kolonien sichtbar.

### 7.1.3 Probenpräparation für die FT-IR-Analyse

Eine Einzelkolonie *Bacillus cereus* wird auf Caso-Agar Merckoplate<sup>®</sup>-Fertigplatten (a.) oder selbstgegossene Caso-Platten (b.) transferiert, im Drei-Quadrantenverfahren ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

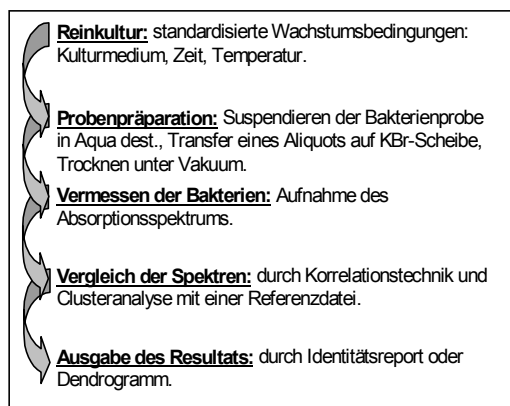
Durch einen Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Kultivierungsbedingungen der Keime deutliche Auswirkungen auf deren FT-IR-Spektren haben. Phänotypische Veränderlichkeit ist dabei ein Ausdruck der Anpassung an Umwelteinflüsse. Die Kultivierungszeit und -temperatur sind für die FT-IR-Analyse von entscheidender Bedeutung.

Da die spektralen Differenzen der Keime nach Kultivierung auf Merckoplate<sup>®</sup>-Agar und selbstgegossenen Medien gering sind, werden aus Kostengründen für alle folgenden Messungen und Versuche Nährböden selbst hergestellt. Dabei wird auf eine genaueste Einhaltung standardisierter Bedingungen geachtet. Dazu gehört auch, dass die Medien immer von der gleichen Person bereitet werden.

Nach doppelter Passagierung erfolgt die Probenpräparation. Dazu werden Zellen der späten exponentiellen Wachstumsphase mit einer

kalibrierten, vibrierenden Platinöse (Durchmesser 1 mm) dem zusammenfließenden Wachstumsbereich des dritten Quadranten der 24 h Kultur entnommen und in 80 µl H<sub>2</sub>O dest. suspendiert (Vortex und Ultraschall). Ein Aliquot (35 µl) wird auf ein Probenfeld des ZnSe-Probenrades transferiert und bei Raumtemperatur unter Vakuum (40-50 mbar) im Exsikkator über Phosphorpentoxid (Roth, Art. Nr. 9076.2) ca. 20-30 min. getrocknet. Nach Ausbildung eines transparenten Bakterienfilmes wird das Probenrad mit einer KBr-Scheibe verschlossen. Die FT-IR-Messung wird mit dem IFS 28/B der Firma Bruker® nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Der experimentelle Ablauf zur Differenzierung und Identifizierung von Bakterien mittels FT-IR ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes zur Differenzierung und Identifizierung von Bakterien mittels FT-IR.

## 7.2 Die FT-IR-Spektren

### 7.2.1 Aufnahme der Spektren

Alle Spektren zwischen der Wellenzahl [cm<sup>-1</sup>] 4000 und 500 werden mit dem IFS/28B FT-IR-Spektrometer (Bruker®, Karlsruhe, Germany) aufgezeichnet. Die Anzahl der Scans (Einzelaufnahmen) beträgt 64. Aus diesen wird automatisch ein Mittelwert gebildet und daraus das originale Absorptionsspektrum erhalten.

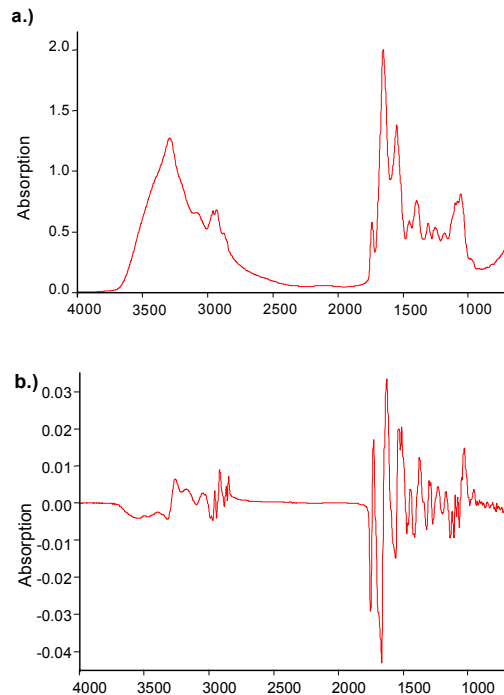
### 7.2.2 Bearbeitung der Spektren

Mit den aufgenommenen Spektren der Mikroorganismen werden verschiedene Bearbeitungsschritte durchgeführt. Die Software OPUS, Version 4.0 für mikrobiologische Identifikation (Bruker®), wird für die Datenbearbeitung genutzt.

Mit der OPUS-Option „quality test“ werden alle Spektren im Anschluss an die Messung einem Qualitätstest unterzogen. Der Test beinhaltet die Prüfung von vorgegebenen Grenzwerten für Absorptionswerte, Signal / Rauschverhältnis, Intensität von Wasserbanden und sog. „Restfringes“ (u.a. elektronisch bedingte

Schwankungen). Spektren, die den Test nicht bestehen, werden aus der Auswertung ausgeschlossen.

Um eine Gegenüberstellung von Spektren, die an unterschiedlichen Geräten aufgenommen wurden, zu ermöglichen, werden diese automatisch kompatibel gemacht.



**Abb. 3:**

- a.) Darstellung eines typischen Bakterienpektrums am Beispiel von *B. cereus*.  
b.) Erste Ableitung des unter a.) abgebildeten Absorptionsspektrums.

Um quantitative Schwankungen der aufgetragenen Proben, die sich in unterschiedlichen Extinktionswerten der einzelnen Spektren wieder spiegeln, auszugleichen, wird eine Spektrennormierung vorgenommen. Dieses geschieht bei der Mustererkennung (Clusteranalyse) und dem Identitätstest automatisch. Zur visuellen Betrachtung der Spektren sollten alle Spektren gleich skaliert sein und eine Normierung separat durchgeführt werden.

Die Auswertung der Spektren von Mikroorganismen wird mit der ersten Ableitung dieser Spektren vorgenommen, da sich hier das günstigste Verhältnis zwischen „Rauschen“ und „spektroskopischer Information“ zeigt. Die typisch breiten, sich überlappenden Banden der Mikroorganismen-Spektren (Abb. 3a) werden durch die Berechnung der ersten Ableitung stärker aufgelöst (Abb. 3b). Gleichzeitig bewirkt die Berechnung der ersten Ableitung eine Basislinienkorrektur (Bruker®, Arbeitsanleitung zum IFS 28/B).

Die zweite Ableitung ist dann von Interesse, wenn direkt über die Betrachtung der Kurven Informationen über die Mikroorganismen gewonnen werden sollen.

### 7.2.3 Auswertung der Spektren

Die Auswertung gemessener Spektren erfolgt entweder als Dendrogramm (durch eine Clusteranalyse) oder durch den Identitätstest.

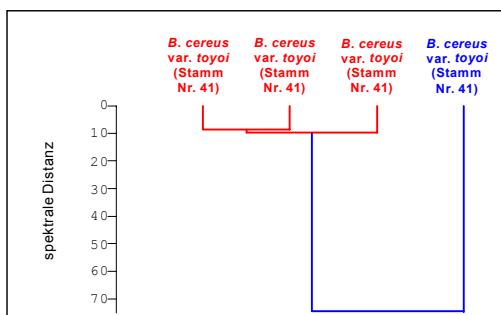
Die Clusteranalyse wird angewendet, um Ähnlichkeiten festzustellen. Anhand von Dendrogrammen sind Unterscheidungen verschiedener Stämme möglich.

Es kann eine Auswahl zwischen verschiedenen Clusteranalyseverfahren getroffen werden. Für die mikrobiologische Diagnostik stehen bevorzugt die Verfahren „Average linkage“ (zeigt die spektrale Distanz an), sowie der „Ward's Algorithmus“ (gibt Auskunft über die Heterogenität), der jedoch die Gruppen weit voneinander trennt, zur Verfügung.

### 7.2.4 Mittelwertbildung von FT-IR-Spektren

Bevor die FT-IR-Spektren von Mikroorganismen in eine Datenbank aufgenommen werden, sollten zunächst Mittelwertspektren von mindestens drei Einzelmessungen erstellt werden, um die beobachtete Varianz der Spektren vollständig zu erfassen. „Ausreißer“ unter den Einzelmessungen müssen erkannt werden und dürfen bei der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt werden. „Ausreißer“ können durch eine Verwechslung von Stämmen, eine genetische Mutation, eine Kontamination der Probe oder durch veränderte Wachstumsbedingungen zustande kommen.

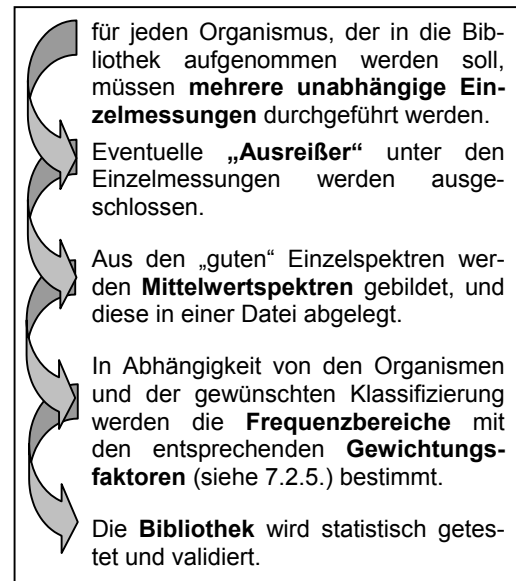
Zur Mittelwertbildung wird eine Clusteranalyse unabhängiger Präparationen von Einzelmessungen mit der Funktion „Average Linkage“ und „scaling to the 1<sup>st</sup> range“ durchgeführt (Abb. 4).



**Abb. 4:** Clusteranalyse von vier Wiederholungsmessungen des Stammes *B. cereus* var. *toyoi* (interne Stamm-Nr. 41). Datenvorbehandlung: erste Ableitung, Vektornormierung, „Average Linkage“, „scaling to the 1<sup>st</sup> range“. Frequenzbereich und Wichtung: 1200-900 (0,8), 3000-2800 (0,6), 900-700 (0,6). Die spektralen Distanzen von drei Wiederholungsmessungen (rot) liegen nahe bei einander. Eine Messung (blau) stellt einen „Ausreißer“ dar, der nicht in die Mittelwertbildung eingeht.

In der Clusteranalyse ist die normale Varianz eines Stammes zu erkennen und offensichtliche „Ausreißer“, deren Spektren erst bei einem hohen Wert der spektralen Distanz mit den übrigen Spektren fusionieren, können entfernt und die entsprechenden Einzelmessungen unter der Funktion „average“ gemittelt werden.

Die Mittelwertspektren der einzelnen *B. cereus*-Isolate werden in einer Datei, die für zukünftige Analysen als Vergleichsgröße und Datenbank dient, abgelegt. Eine schematische Darstellung der Mittelwertbildung und Erstellung einer Bibliothek ist in Abb. 5 gezeigt.

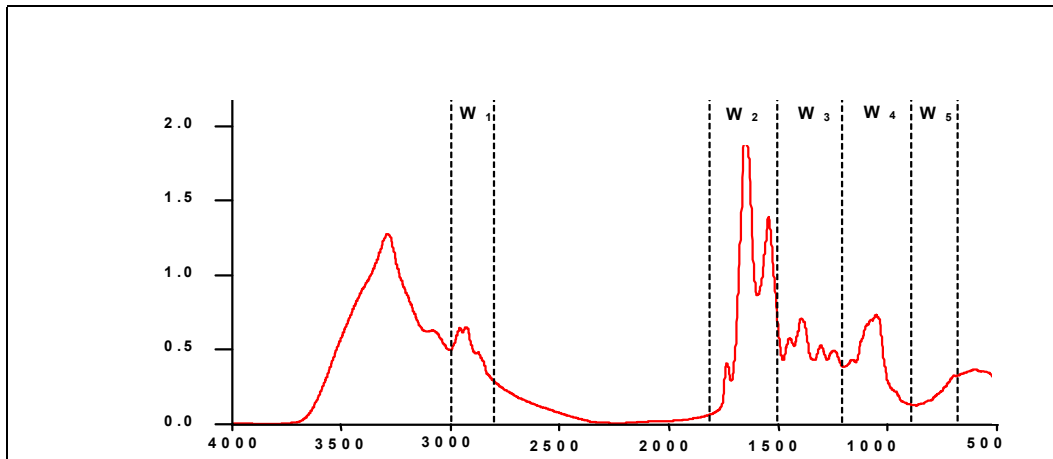


**Abb. 5:** Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes zur Mittelwertbildung und Erstellung einer Bibliothek.

### 7.2.5 Spektrale Fenster

Einzelne Frequenzbereiche, die als spektrale Fenster bezeichnet werden, sind mit bestimmten chemischen Bindungen assoziiert.

Das Fenster  $W_1$  über den Wellenzahlbereich von 3000 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$  umfasst die Fettsäureregion, in der die einzelnen Peaks die Streckungs-Schwingungen der  $-\text{CH}_3$ ,  $>\text{CH}_2$  und  $\equiv\text{CH}$ -Gruppen der Fettsäuren markieren. Das zweite Fenster ( $W_2$ , 1800- 1500  $\text{cm}^{-1}$ ) stellt die Protein- und Peptidregion dar, in der die Amid I- und Amid II-Banden dominieren.  $W_3$  (1500 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) ist eine Mischregion, die Schwingungen von Fettsäuren, Proteinen und Polysacchariden umfasst.  $W_4$  (1200-900  $\text{cm}^{-1}$ ) wird von Polysaccharid-Peaks dominiert. Die sogenannte Fingerabdruck-Region ( $W_5$ ) umfasst den Wellenzahlbereich von 900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ . Sie zeigt Organismus-spezifische Peak-Muster, die Charakteristika auf Spezies-Ebene widerspiegeln und bisher nicht mit zellulären Komponenten oder funktionellen Gruppen in Zusammenhang gebracht wurden (Abb. 6).



**Abb. 6:** Darstellung spektraler Fenster ( $W_x$ ), die für die Auswertung der Spektren von besonderer Bedeutung sind.

Für die FT-IR-spektroskopische Auswertung der *B. cereus*-Isolate werden die für die mikrobielle Diagnostik kennzeichnenden Wellenzahlbereiche  $1200-900\text{ cm}^{-1}$  ( $W_4$ ),  $3000-2800\text{ cm}^{-1}$  ( $W_1$ ), und  $900-700\text{ cm}^{-1}$  ( $W_5$ ) genutzt.

Die Beurteilung der Spektren mittels der oben genannten Fenster erfolgt mit einem Gewichtungsfaktor von 0,8 ( $W_4$ ), 0,6 ( $W_1$ ) und 0,6 ( $W_5$ ).

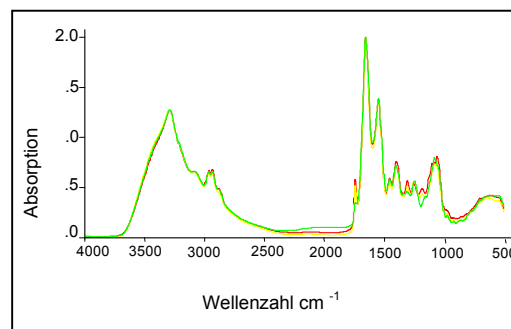
### 7.3 Die Grundlage der *B. cereus* FT-IR-Datenbank

Für den Aufbau einer FT-IR-Spektren-Bibliothek ist es unabdingbar, dass zunächst auf Subspeziesebene identifizierte *B. cereus*-Isolate zur Verfügung stehen, deren FT-IR-Spektren als Referenz für alle weiteren FT-IR-Analysen dienen.

Um dieses Fundament für die Datenbank zu legen, werden zunächst in Mehrfachmessungen die Stämme *B. cereus* var. *toyoi* (Toyocerin<sup>®</sup>, Lohmann), *B. cereus* CIP 5832 (Paciflor<sup>®</sup>, Hoechst) sowie der „wild“-Typ-Stamm ATCC 11778 (DSMZ) mittels FT-IR-Technik analysiert und die entsprechenden Mittelwertspektren gebildet. Abbildung 7 zeigt die Mittelwertspektren der drei unterschiedlichen *B. cereus*-Isolate.

*B. cereus* CIP 5832 ist als gelbe, *B. cereus* var. *toyoi* als grüne und der „wild“-Typ-Stamm als rote Kurve dargestellt.

Die Berechnung der ersten und zweiten Ableitung der Absorptionsspektren löst die fächerartigen Banden auf und lässt die optische Beurteilung spektraler Unterschiede innerhalb der untersuchten *B. cereus*-Varietäten zu (Abb. 8 a und 8 b).

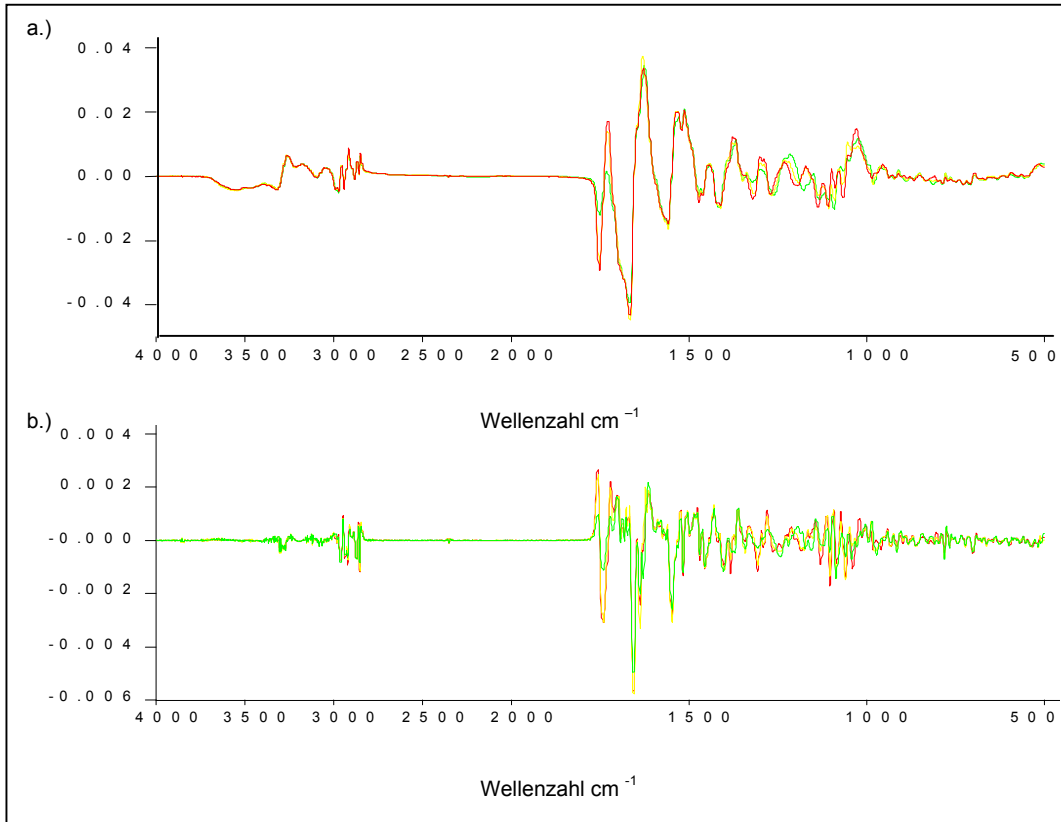


**Abb. 7:** Absorptionsspektren der *B. cereus*-Stämme CIP 5832 (gelb), var. *toyoi* (grün) und „wild“-Typ (rot) über den Wellenzahlbereich  $4000-500\text{ cm}^{-1}$ .

Ein signifikanter Unterschied in der Absorption der drei *B. cereus* „Gruppen“ zeigte sich besonders deutlich in der ersten Ableitung der Absorptionsspektren im Wellenzahlbereich von  $1000\text{ bis }940\text{ cm}^{-1}$  (Abb. 9).

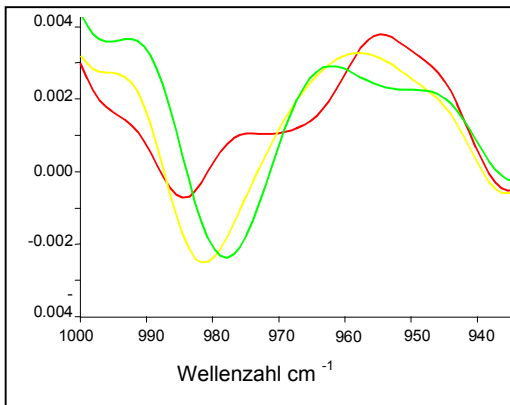
Die Mittelwertspektren der Stämme *B. cereus* CIP 5832 (Hoechst<sup>®</sup>), var. *toyoi* (Lohmann<sup>®</sup>) und „wild“ ATCC 11778 (DSMZ) werden zur Bildung einer Datenbank in einer Datei abgelegt. Die Spektren stellen so den Grundstock der Bibliothek und dienen für alle folgenden Analysen als Referenz und Vergleichsgröße.

Der Wellenzahlbereich innerhalb der Polysaccharid-Region von  $1000\text{ bis }940\text{ cm}^{-1}$  zeigt bei der Betrachtung des gesamten Mittel-Infrarot-Spektrums die deutlichste Divergenz der untersuchten Subspezies.



**Abb. 8:**

a.) Erste Ableitung der Absorptionsspektren von *B. cereus* CIP 5832 (gelb), *B. cereus* var. *toyoi* (grün) und „wild“-Typ-Stamm (rot).  
 b.) Zweite Ableitung der Absorptionsspektren von *B. cereus* CIP 5832 (gelb), *B. cereus* var. *toyoi* (grün) und „wild“-Typ-Stamm (rot).



**Abb. 9:** Erste Ableitung der Absorptionsspektren der *B. cereus*-Stämme CIP 5832 (gelb), var. *toyoi* (grün) und „wild“-Typ (rot) über den Wellenzahlbereich 1000-940  $\text{cm}^{-1}$ .

Dieser Bereich stellt für alle weiteren Analysen, neben den drei für Bakterien üblichen Fenstern (siehe 7.2.5. Spektrale Fenster), die für die

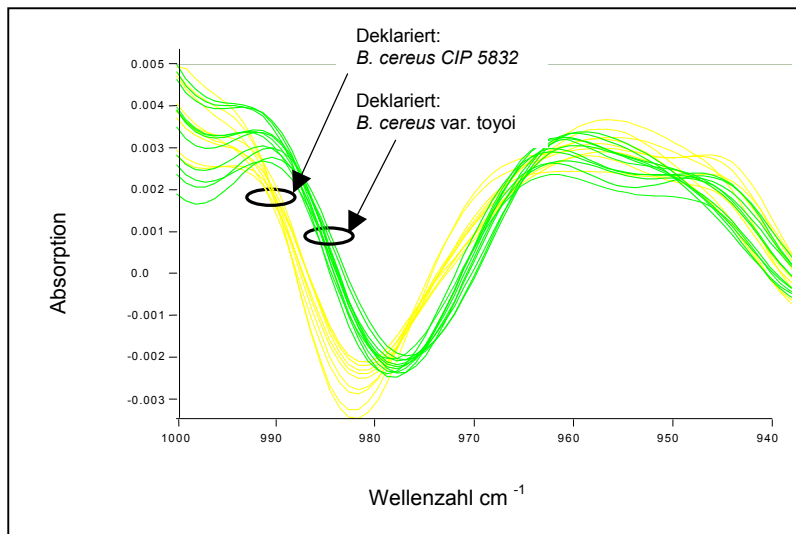
Trennung der drei *B. cereus*-„Gruppen“ spezifische Region dar. Sie geht bei der Clusteranalyse und dem Identitätstest mit einer Wichtung von 0,3 in die Auswertung ein.

#### 7.4 Erweiterung der *B. cereus* FT-IR-Datenbank

##### 7.4.1 Ausbau der Datenbank durch *B. cereus*-Isolate aus Futtermitteln mit deklariertem Probiotika-Zusatz

Zur Vergrößerung der Bibliothek werden nachfolgend *B. cereus*-Keime, die aus Futtermitteln mit Toyocerin® (*B. cereus* var. *toyoi*) bzw. Paciflor® (*B. cereus* CIP 5832) -Zusatz isoliert wurden, analysiert. Die FT-IR-Spektren dieser Isolate, in Abb. 10 über den Wellenzahlbereich von 1000 bis 940  $\text{cm}^{-1}$  dargestellt, zeigen eindeutig eine Disposition in zwei Gruppen.

Die mutmaßlichen *toyoi*-Isolate sind als grüne Kurven, die vermeintlichen CIP 5832-Isolate als gelbe Kurven angezeigt.



**Abb. 10:** Erste Ableitung der Absorptionsspektren von *B. cereus*-Isolaten aus Futtermitteln mit deklariertem Paciflor®- (gelb) und Toyocerin®- (grün) Zusatz. Wellenzahlbereich 1000-940 cm<sup>-1</sup>.

Mit dem Identitätstest (Datenvorbehandlung: erste Ableitung und Vektornormierung, „Average Linkage“ oder „Ward’s Algorithm“, „scaling to the 1<sup>st</sup> range“; Frequenzbereich 1200-900 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,8; 3000-2800 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,6; 900-700 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,6 und 1000-940 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,3) werden die Spektren analysiert. Als Vergleich dienen die Referenz-Stämme der Datenbank (siehe 7.3.). Die Subspezies-Identifizierung der Isolate entspricht durchgängig dem infolge der Deklaration angenommenen Ergebnis.

Zusätzlich zur FT-IR-analytischen Identifizierung der 20 Isolate liegen PCR-Ergebnisse von Dr. Pecoraro (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, München) vor. Die Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion bestätigen ausnahmslos die FT-IR-Resultate.

Nach dieser eindeutigen Charakterisierung auf Subspeziesebene werden die Mittelwertspektren der 20 *B. cereus*-Isolate in die Datenbank aufgenommen.

#### 7.4.2 Vergrößerung der Datenbank durch vermeintliche „wild“-Stamm-Isolate

Zum Ausbau der FT-IR-Bibliothek werden nachfolgend vermeintliche „wild“-Stamm-Isolate spektroskopisch (entsprechend 7.3.1.) analysiert, die Ergebnisse durch PCR-Resultate abgesichert und die entsprechenden Mittelwert-

spektren der *B. cereus*-FT-IR-Datenbank zugefügt.

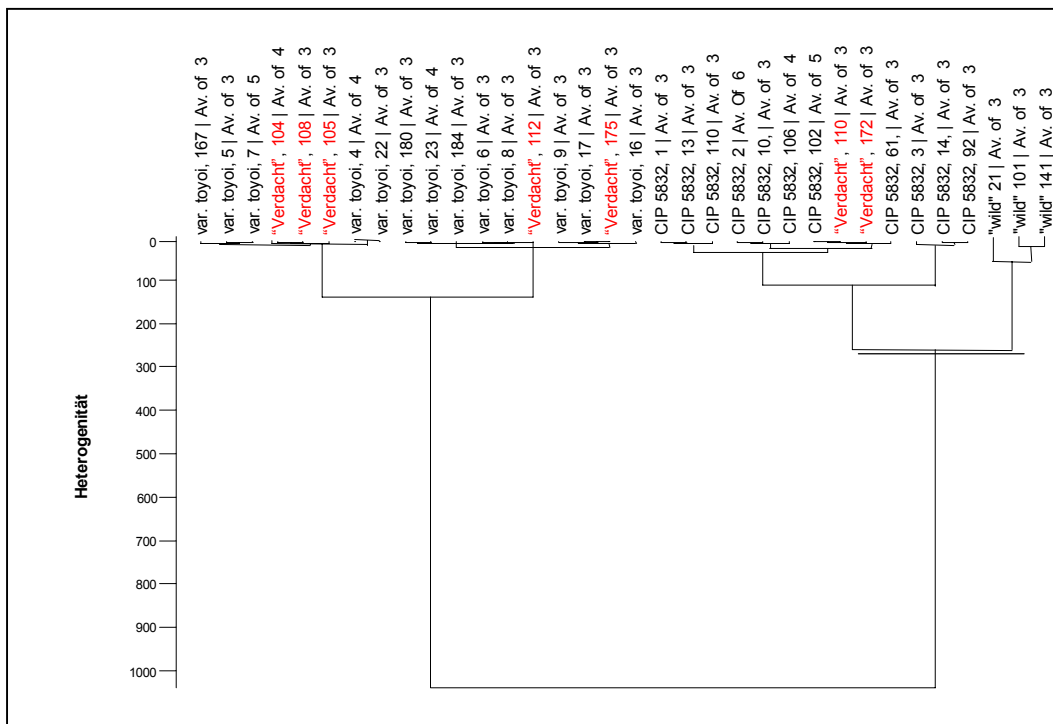
#### 7.4.3 Fortsetzung des Ausbaus der Datenbank durch scheinbar verschleppte Probiotika-Isolate

Diverse Isolate, die in der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft aus Futtermitteln ohne die Deklaration eines probiotischen Zusatzes isoliert wurden, legen aufgrund ihrer hohen *B. cereus*-Konzentration von rund 10.000 Keimen pro g Futtermittel-Probe die Vermutung auf eine Verschleppung probiotischer *B. cereus*-Keime aus den Mischfutterwerken nahe.

Mit diesen „Verdacht-Isolaten“ wird eine FT-IR-Analyse durchgeführt. Die Charakterisierung der Keime erfolgt zunächst mittels einer hierarchischen Clusteranalyse, die in Abb. 11 wiedergegeben ist (Datenvorbehandlung: erste Ableitung und Vektornormierung, „Ward’s Algorithm“, „scaling to the 1<sup>st</sup> range“; Frequenzbereich 1200-900 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,8; 3000-2800 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,6; 900-700 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,6 und 1000-940 cm<sup>-1</sup>, Wichtung 0,3).

Die Clusteranalyse zeigt, dass sich die „Verdacht“-Isolate eindeutig in die bisher in der Datenbank enthaltenen *B. cereus*-Stämme eingruppiert. Fünf „Verdacht“-Isolate clustern mit *B. cereus* var. *toyoi* und zwei mit *B. cereus* CIP 5832.





**Abb. 11:** Hierarchische Clusteranalyse von „Verdacht“-Isolaten und Stämmen der Bibliothek. Datenbehandlung: „Ward's Algorithmus“, scaling to the 1<sup>st</sup> range“, Wellenzahlbereich 1200-900 cm<sup>-1</sup> (0,8), 3000-2800 cm<sup>-1</sup> (0,6), 900-700 cm<sup>-1</sup> (0,6) und 1000 bis 940 cm<sup>-1</sup> (0,3).

PCR-Resultate dieser Isolate bestätigen das Ergebnis der Clusteranalyse und identifizieren die Stämme mit der Nr. 104, 105, 108, 112 und 175 ebenfalls als Vertreter der Varietät *toyoi*, die Stämme 110 und 172 als *B. cereus* CIP 5832 (Pecoraro and Bucher, 2002).

Die „Verdacht“-Isolate werden entsprechend ihrer Subspezies-Identifizierung in *B. cereus* var. *toyoi* bzw. CIP 5832 umbenannt und als solche in die Datenbank aufgenommen.

## 8 Entwicklung eines Antibioagramms zur Unterscheidung verschiedener *B. cereus* Varietäten und zur Überprüfung der FT-IR-Resultate

Um neben der apparativ und arbeitstechnisch aufwendigen sowie kostenintensiven Methode der PCR eine Möglichkeit zu haben, die Differenzierung von *B. cereus* Varietäten durch FT-IR-Befunde zu verifizieren und dadurch die Aufnahme von Mittelwertspektren unterschiedlicher *B. cereus*-Isolate in die FT-IR-Datenbank zu begründen, wurde ein spezielles Antibio-gramm entwickelt.

### 8.1 Methodik des Agardiffusionstests

Der Agardiffusionstest ist ein Plattentest, der den Nachweis der Wirkstoffempfindlichkeit von Mikroorganismen gegen Chemotherapeutika erlaubt. Bakterienpopulationen werden auf der

Agaroberfläche ausgeimpft und der Wirkstoff in definierten Mengen zur Diffusion gebracht. Die entstehende Wachstums- bzw. Hemmzone ist ein Maß für den Effekt des Wirkstoffes.

#### 8.1.1 Stämme

- *B. cereus* var. *toyoi* (Toyocerin<sup>®</sup>, Lohmann),
- *B. cereus* CIP 5832 (Paciflor<sup>®</sup>, Hoechst),
- *B. cereus* ATCC 11778 (DSMZ) sowie
- rund 600 putative *B. cereus*-Isolate.

#### 8.1.2 Nährmedien und Wachstumsbedingungen

- Antibiotika-Bouillon (Merck, Art. Nr. 1.05273.0500).
- Mueller-Hinton-Agar nach NCCLS (Merck, Art. Nr. 1.05435.0500).
- Antibiotika: Cefamandole (30 µg), Penicillin G (10 µg) und Tetracyclin (30 µg).

Die Kultivierung von *B. cereus*-Isolaten in Antibiotika-Bouillon erfolgt für 20-24 h bei 30 °C, die Kultivierung der beimpften Mueller-Hinton-Agar-Platten für 16-20 h bei 30 °C.

#### 8.1.3 Methode der Empfindlichkeitsprüfung gegen Antibiotika

Bei der Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegen Chemotherapeutika mit dem Agardiffusionstest werden mehrere Filterpapierscheiben

auf Agarplatten, die mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft sind, aufgelegt. Ein zu hohes Inokulum kann zu kleine Hemmhöfe verursachen und damit eine zu geringe Empfindlichkeit widerspiegeln. Die Einsaat sollte so beschaffen sein, dass sich nach 16-20 h Bebrütung des Nährbodens dicht stehende, jedoch nicht konflorierende Einzelkolonien entwickeln.

Jedes der Scheibenblättchen enthält ein anderes Chemotherapeutikum. Der Abstand der Blättchen untereinander und der Abstand vom Rand der Petrischalen muss so bemessen sein, dass kreisförmige Hemmhöfe ohne Überschneidung entstehen können (maximal 6 Blättchen pro Schale von 9 cm Durchmesser). Nach dem Auflegen saugen sich die Scheibchen mit Wasser voll, der Wirkstoff wird gelöst und diffundiert entsprechend der entstandenen Konzentration und den Substanzeigenschaften in den Agar. Je größer der nach der Bebrütung entstandene Hemmhof ist, desto empfindlicher ist der geprüfte Stamm gegen den entsprechenden Wirkstoff. Resistente Stämme zeigen, wenn überhaupt, nur kleine Hemmhöfe.

Mueller-Hinton-Agar in Petri-Schalen mit geradem Boden (23 ml Nährmedium pro Schale von 9 cm) wird mit 130 µl einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur eines Bakterienstammes beimpft. Nach dem Trocknen des beimpften Nährbodens werden die Antibiotika-

Testblättchen mit leichtem Druck auf die Agaroberfläche aufgelegt.

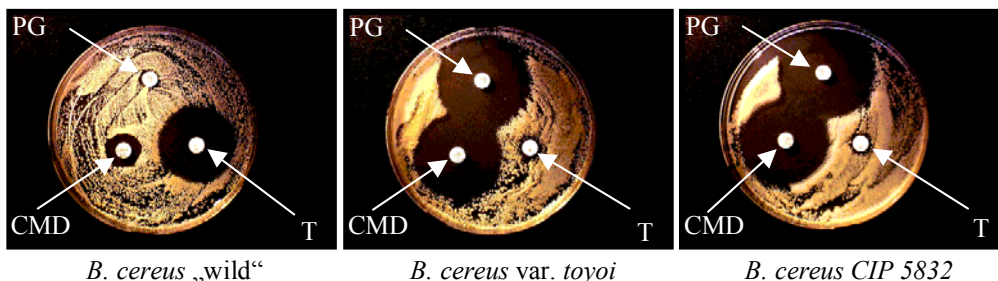
Die Auswertung erfolgt nach 16-20 h Bebrütung bei 30 °C. Die Hemmhöfe werden mit einem Lineal (in ganzen Millimetern) abgelesen.

Die Größe des Hemmhofes gibt Auskunft über die Empfindlichkeit des entsprechenden Keimes gegenüber dem Chemotherapeutikum. Die Auswertung wird nach folgender Tabelle vorgenommen:

Hemmhof mm	Empfindlichkeit	Verhalten
0-2	---	resistent
2-5	--	resistent
6-8	-	resistent?
9-11	+	sensitiv?
12-14	++	sensitiv
15-...	+++	sensitiv

#### 8.1.4 Antibiotikaempfindlichkeit unterschiedlicher *B. cereus*-Isolate

In Abbildung 12 ist das Sensitivitätsverhalten der Typ-Stämme *B. cereus* ATCC 11778 (DSMZ), *B. cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®, Lohmann) und *B. cereus* CIP 5832 (Paciflor®, Hoechst) bei Verwendung der drei Chemotherapeutika Cefamandole (30µg), Penicillin G (10µg) und Tetracycline (30µg) dargestellt.



**Abb. 12:** Sensitivitätsverhalten der Stämme *B. cereus* „wild“ (ATCC 11778), *B. cereus* var. *toyoi* (Toyocerin®, Lohmann) und *B. cereus* CIP 5832 (Paciflor®, Hoechst) bei Verwendung der drei Chemotherapeutika Cefamandole (CMD) (30µg), Penicillin G (PG) (10µg) und Tetracycline (T) (30µg).

Der „wild“-Typ-Stamm zeigt Resistenz gegenüber den Antibiotika Penicillin G und Cefamandole und Sensitivität gegenüber Tetracycline. Bezogen auf die probiotischen *B. cereus* Varietäten *toyoi* und *CIP 5832* ist die Wirkung der Antibiotika genau gegensätzlich. Sie sind sensitiv gegen Penicillin G und Cefamandole sowie resistent gegen Tetracycline. Eine Divergenz in der Sensibilität der beiden probiotischen Varietäten in Bezug auf die drei Antibiotika ist nicht zu erkennen.

Die Empfindlichkeitsprüfung gegen die Antibiotika wird mit rund 600 mutmaßlichen *B. cereus*-Isolaten durchgeführt.

Es zeigt sich, dass die Stämme angesichts eines unterschiedlichen Sensitivitätsverhaltens in drei Einheiten dividieren.

Eine Gruppe der Stämme ist demnach gegen Cefamandole und Penicillin G sensitiv, gegen Tetracyclin dagegen resistent.

Für die zweite, größte Fraktion ist das Bild entgegengesetzt. Sie zeigt Resistenz gegen Cefamandole und Penicillin G, gegen Tetracyclin Sensitivität, selten jedoch auch Resistenz.

Die dritte Gruppe zeigt im Antibiotogramm ein gänzlich anderes Bild.

Von den rund 600 wahrscheinlichen *B. cereus*-Keimen stammen ca. 90 Isolate aus Futtermitteln

telproben, die den ausgewiesenen Zusatz probiotischer *B. cereus*-Keime enthalten. All diese Isolate, mit einer Ausnahme, zeigen im Antibiotogramm das in Abb. 12 für die Probiotika *B. cereus* var. *toyoi* und CIP 5832 beobachtete Bild.

Ca. 60 Stämme stellen „Probiotika-Verdacht“-Isolate aus Futtermitteln, ohne die Deklaration eines probiotischen *B. cereus*-Zusatzes dar. Im Antibiotogramm zeigen die meisten Isolate das Bild von Toyocerin® bzw. Paciflor®, wenige (6 Isolate) das des „wild“-Typ-Stammes.

Rund 440 der untersuchten Keime sind dem Anschein nach *B. cereus*-„wild“-Typ-Stämme. Diese Mikroorganismen wurden als Umweltkeime aus Futter- und Lebensmitteln, aus Milch und Milchprodukten und von Gewürzen isoliert. Ca. 90 % der augenscheinlichen *B. cereus*-„wild“-Typ-Isolate (394 Stämme) lassen ein Antibiotogramm, welches dem des „wild“-Stammes in Abb. 12 entspricht, erkennen. Das Verhalten gegenüber Tetracyclin ist dabei variabel und zeigt meist Sensitivität, gelegentlich Resistenz.

44 Isolate präsentieren ein Antibiotogramm, das weder dem der probiotischen Stämme der Produkte Toyocerin® bzw. Paciflor®, noch dem des „wild“-Typ-Stammes in Abb. 12 entspricht.

31 dieser Isolate mit „differierendem“ Antibiotogramm werden nach morphologischer und z.T. physiologischer Identifizierung dennoch sicher als *B. cereus* „wild“-Typ-Stämme angesehen.

Die übrigen 13 Stämme dieser im Antibiotogramm divergierenden Keime erweisen sich nach Anwendung des biochemischen Identifizierungssystems API (BioMerieux®, Frankreich) als Stämme, die nicht der Spezies *B. cereus* angehören.

## 8.2 Formulierung eines Antibiotogramms zur Differenzierung von *B. cereus* Varietäten

Durch die Untersuchung von 600 putativen *B. cereus*-Isolaten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber drei unterschiedlichen Antibiotika kann ein differierendes Resistenzverhalten von probiotischen *B. cereus*-Isolaten und „wild“-Typ-Stämmen gezeigt werden.

Die probiotischen *B. cereus*-Stämme der Varietät *toyoi* und CIP 5832 lassen Sensitivität gegen Penicillin G und Cefamandole, gegen Tetracyclin dagegen Resistenz erkennen. Für den größten Teil der Gruppe der „wild“-Typ-Stämme ist das Bild genau entgegengesetzt. Sie sind resistent gegen Cefamandole und Penicillin G, gegenüber Tetracyclin sensitiv, bisweilen jedoch auch resistent.

Einige „wild“-Typ-Stämme zeigen im Antibiotogramm ein gänzlich anderes Bild.

Das Antibiotogramm mit den Chemotherapeutika Cefamandole, Penicillin G und Tetracyclin stellt eine sichere Möglichkeit dar, probiotische

*B. cereus*-Isolate von „wild“-Typ-Stämmen vorzuisolieren, und umgekehrt.

Die Empfindlichkeitsprüfung liefert eine Handhabe, FT-IR-Resultate von *B. cereus*-Keimen zu verifizieren und die Aufnahme der Mittelwertspektren unterschiedlicher *B. cereus*-Varietäten in die Datenbank zu begründen.

Ferner gibt ein „abnormes“ Sensitivitätsverhalten einen Hinweis auf Isolate, die evtl. irrtümlich der Spezies *B. cereus* zugerechnet wurden oder durch einen Fremdkeim verunreinigt sind. Durch das Antibiotogramm können demzufolge uneindeutige Identifizierungsergebnisse der FT-IR-Analyse gedeutet werden.

## 9 Ausbau der *B. cereus* FT-IR-Datenbank

Die Qualität der erfolgreichen Identifizierung von Mikroorganismen mittels der FT-IR-Analytik hängt maßgeblich vom Umfang der in einer Bibliothek gespeicherten Referenz-Spektren ab. Daher ist das Ziel der Forschung, eine Datenbank mit möglichst vielen FT-IR-Mittelwertspektren unterschiedlicher *B. cereus*-Keime aufzubauen, um eine eindeutige Identifizierung unbekannter Isolate zu ermöglichen.

### 9.1 FT-IR-Analytik verschiedener *B. cereus*-Isolate

In Abbildung 13 sind alle Isolate dargestellt, die während des Projektes zur „Charakterisierung und Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten aus Futter- und Lebensmitteln“ mit der FT-IR-Technik analysiert wurden.

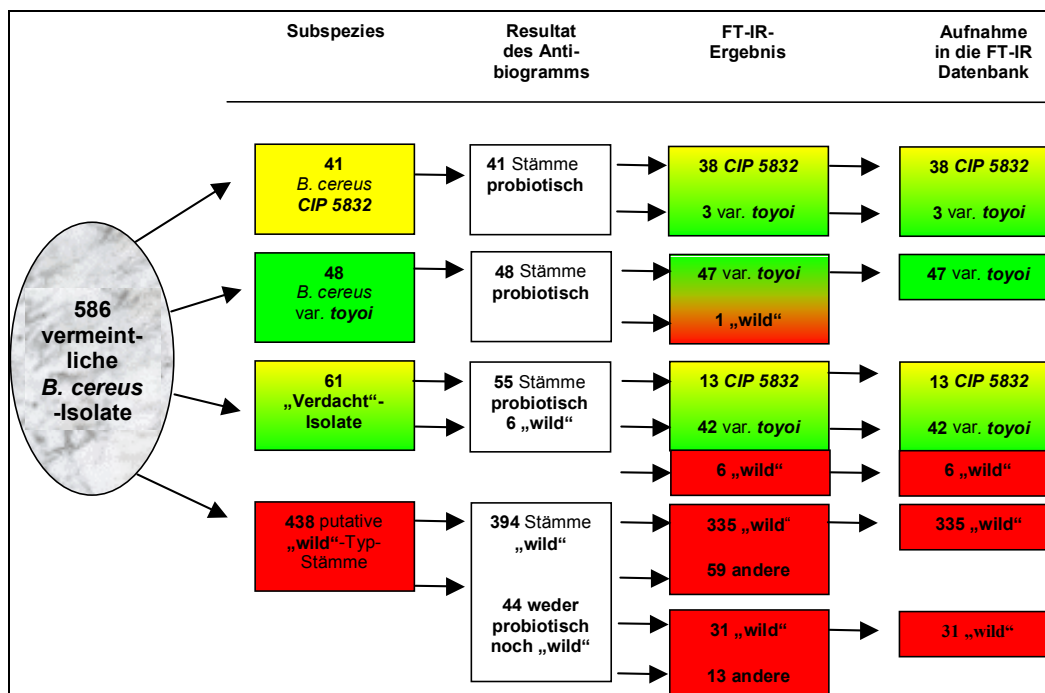
Die Keime wurden vor der FT-IR-Spektroskopie auf ihre Antibiotikaempfindlichkeit untersucht (siehe 8.1.4.).

41 Isolate stammen aus Futtermitteln mit deklarierter *B. cereus* CIP 5832 - Beimischung, 48 Isolate aus Futtermitteln mit *B. cereus* var. *toyoi* - Zusatz.

61 Stämme kommen aus Futtermitteln, für die eine Beimengung probiotischer *B. cereus*-Keime nicht deklariert war, die jedoch aufgrund ihrer hohen *B. cereus*-Konzentration (rund 10.000 Keime pro g Futtermittel) den Verdacht auf eine Kontamination mit probiotischen Keimen aufwerfen.

438 Stämme stellen mutmaßliche „wild“-Stamm-Isolate dar.

Durch die Anwendung des Empfindlichkeitstests gegen Chemotherapeutika (siehe 8.2.) wird, mit einer Ausnahme, bei allen als Probiotika deklarierten Isolaten (89 Stück) die Zugehörigkeit zu der „Gruppe der Probiotika“ bekräftigt.



**Abb. 13:** Darstellung aller vermeintlichen *B. cereus*-Isolate, die mittels FT-IR-Technik analysiert wurden.

Die FT-IR-Analyse der erklärten CIP 5832-Isolate zeigt, dass es sich lediglich bei 38 der 41 Isolate tatsächlich um Vertreter der Subspezies CIP 5832 handelt. Drei Isolate werden als *B. cereus* var. *toyoi* identifiziert.

Im Falle der deklarierten Toyocerin®-Isolate sprechen die FT-IR-Ergebnisse bei 47 von 48 Isolaten dafür, dass es sich um die Subspezies *toyoi* handelt. Ein Stamm wird in der FT-IR-Analyse als „wild“-Typ-Stamm identifiziert. Bei diesem Stamm stimmt das Resultat der Empfindlichkeitsprüfung nicht mit dem der FT-IR-Spektroskopie überein.

55 der 61 „Verdacht“-Isolate zeigen im Antibiogramm das für Probiotika typische Bild, sechs Isolate das für „wild“-Typ-Stämme kennzeichnende.

Alle 55 im Empfindlichkeitstest als probiotisch ausgemachten Isolate werden in der FT-IR-Analyse als Vertreter der *B. cereus* Varietät *toyoi* bzw. CIP 5832 identifiziert. Die Auswertung ergibt, dass 13 dieser „Kontaminations“-Isolate der Subspezies CIP 5832 und 42 der Varietät *toyoi* angehören.

Alle sechs Isolate, die laut Antibiogramm „wild“-Typ-Stämme sind, werden in der FT-IR-Analyse ebenfalls als „wild“-Typ-Stämme beurteilt.

Die Gruppe der scheinbaren „wild“-Typ-Stämme mit 438 Isolaten teilt sich in zwei Fraktionen.

Eine, mit 394 Vertretern, weist im Antibiogramm das „wild“-Stamm typische Bild auf. Die andere, mit 44 Keimen, zeigt in der Empfindlichkeitsprüfung ein Bild, dass weder dem der „wild“-

Stamm-Isolate noch dem der Probiotika entgegenkommt.

Die Befunde der FT-IR-Analyse beschreiben den Großteil der mutmaßlichen „wild“-Stamm-Isolate beider Gruppen als Vertreter der *B. cereus* „wild“-Typ-Stämme.

Isolate, die mittels der FT-IR-Spektroskopie nicht eindeutig der Spezies *B. cereus* „wild“-Typ bzw. der Varietät *toyoi* oder CIP 5832 zugeordnet werden können, werden genauer betrachtet und durch den API-Test (BioMerieux®, Frankreich) als z. B. *B. cereus* var. *mycooides*, var. *spaericus*, var. *megaterium* oder var. *coagulans* identifiziert. Einige Isolate werden auch nicht eindeutig erkannt und stellen sich als kontaminierte Proben heraus. Die Identität einiger Isolate bleibt ganz offen.

Die Mittelwertspektren aller *B. cereus*-Isolate, die durch die FT-IR-Analytik eindeutig identifiziert werden und bei denen das FT-IR-Resultat mit dem Ergebnis des Antibiogramms übereinstimmt, gehen in die Datenbank ein. Die Korrelationsrate von FT-IR- und Antibiogramm-Resultat liegt bei 95 %.

*B. cereus*-Spektren, deren Ergebnis im Antibiogramm nicht mit der FT-IR-Analyse korreliert, werden nicht in die Datenbank aufgenommen.

Von den in dem Projekt „Charakterisierung und Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten aus Futter- und Lebensmitteln“ analysierten 600 Isolaten sind 510 Mittelwertspektren in der *B. cereus* FT-IR-Datenbank enthalten. Durch diesen quantitativ und qualitativ umfangreichen Quer-

schnitt von Spektren in der *B. cereus*-Bibliothek ist eine eindeutige Subspezies-Identifizierung der probiotischen *B. cereus* Varietäten *toyoi* und *CIP 5832* möglich und eine deutliche Abgrenzung von „wild“-Stamm-Isolaten evident.

Die Etablierung der FT-IR-Analytik zur Subspezies-Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten bietet der Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft die Möglichkeit, ihrer Kontroll- und Überwachungsfunktion bezogen auf die mikrobiologische Qualität landwirtschaftlicher Produkte in schneller und einfacher Weise nachzukommen. Mit der *B. cereus* FT-IR-Datenbank kann die Richtigkeit der Deklaration probiotischer *B. cereus*-Zusätze in Futtermitteln überprüft werden. Im Jahr 2002 wurde in zwei Futtermitteln, die laut Deklaration die Beimischung von *B. cereus* var. *toyoi* enthielten, der seit über einem Jahr nicht mehr als Futtermittelzusatz anerkannte Stamm *B. cereus CIP 5832* nachgewiesen. Andere Futtermittel, die wegen einer hohen *B. cereus*-Konzentration unbekannter Herkunft auffielen, wurden nach FT-IR-Analyse als mikrobiologisch unbedenklich eingestuft, da es sich um verschleppte probiotische Keime und nicht um einen möglicherweise toxischen „wild“-Typ-Stamm handelte.

## 9.2 Das Identifizierungspotential der FT-IR-Datenbank

Mit der Zunahme an unterschiedlichen *B. cereus*-Spektren in der Datenbank nimmt das Identifizierungspotential der Bibliothek signifikant zu.

Keime, die mittels einer Datenbank mit ca. 100 Mittelwertspektren nicht eindeutig identifiziert werden konnten und die in der Clusteranalyse keine ausdrückliche Gruppierung zeigten, können mit einer auf rund 400 Spektren angewachsenen Datenbank offenkundig identifiziert werden.

Auf Grund der Größe der Datenbank und der hohen Anzahl enthaltener unterschiedlichster „wild“-Typ-Stämme ist eine schnelle Entscheidung über fragwürdige Isolate bezüglich ihrer Spezieszugehörigkeit möglich. Aerobe Sporenbildner, die nicht zur Spezies *B. cereus* gehören, fallen durch eine hohe „Hit Quality“ auf und werden zumindest als Problemstamm in der FT-IR-Analytik auffällig.

Das Phänomen, dass eine Identifizierung erst durch eine große Datenbank erzielt wird, betrifft ausschließlich „wild“-Typ-Stämme. Diese Beobachtung spiegelt die breite Varianz des Umweltkeimes *B. cereus* wieder.

Die Identifizierung der probiotischen *B. cereus*-Isolate (ca. 150 Stämme) wird bereits mit einer relativ kleinen Bibliothek konkret. Die probiotischen Isolate stammen alle von den Stämmen *CIP 5832* bzw. *NCIMB 40112* ab. Die Produkte Paciflor® und Toyocerin® sind erst seit wenigen Jahren im Handel, so dass natürliche Veränderungen der Stämme durch Umwelteinflüsse,

Adaptation an den Lebensraum oder spontane Mutationen scheinbar keine Rolle spielen.

Durch die spezifischen Eigenschaften der probiotischen *B. cereus*-Stämme erweist sich die FT-IR-Analyse mit der geschaffenen Datenbank als wirksame Methode zur schnellen Identifizierung von Kultusubstraten.

In der Routinediagnostik liefert die *B. cereus*-FT-IR-Datenbank die Möglichkeit, Kolonien der probiotischen Keimzählerfassung (Caso-Agar, 24 h, 37 °C) direkt ohne weitere Subkultivierung im Infrarot-Spektrometer mit hinreichender Genauigkeit zu identifizieren.

*B. cereus*-Isolate eines Futtermittels mit Toyocerin®-Zusatz wurden im Identitätstest mit einer „Hit Quality“ < 10 eindeutig der *B. cereus* Varietät *toyoi* zugeordnet. Durch diese Beobachtung verringert sich die Gesamt-Analysezeit einer Probe auf 24 h. Mit der FT-IR-Technik steht der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft eine schnelle, kostengünstige und zum Großteil automatisierbare Methode des qualitativen Probiotika-Nachweises zur Verfügung, die direkt mit dem quantitativen Nachweis gekoppelt werden kann.

## 9.3 Darstellung der Stämme der FT-IR-Datenbank in der Clusteranalyse

Eine Clusteranalyse der ca. 500 in der Datenbank enthaltenen *B. cereus*-Spektren (Datenvorbehandlung: erste Ableitung und Vektornormierung: „Ward's Algorithm“, „scaling to the 1<sup>st</sup> range“. Frequenzbereich und Wichtung: 1200-900 (0,8), 3000-2800 (0,6) und 900-700 (0,6) cm<sup>-1</sup>) stellt die Heterogenität der drei untersuchten *B. cereus*-Gruppen „wild“-Typ, var. *toyoi* und *CIP 5832* dar (Abb. 14).

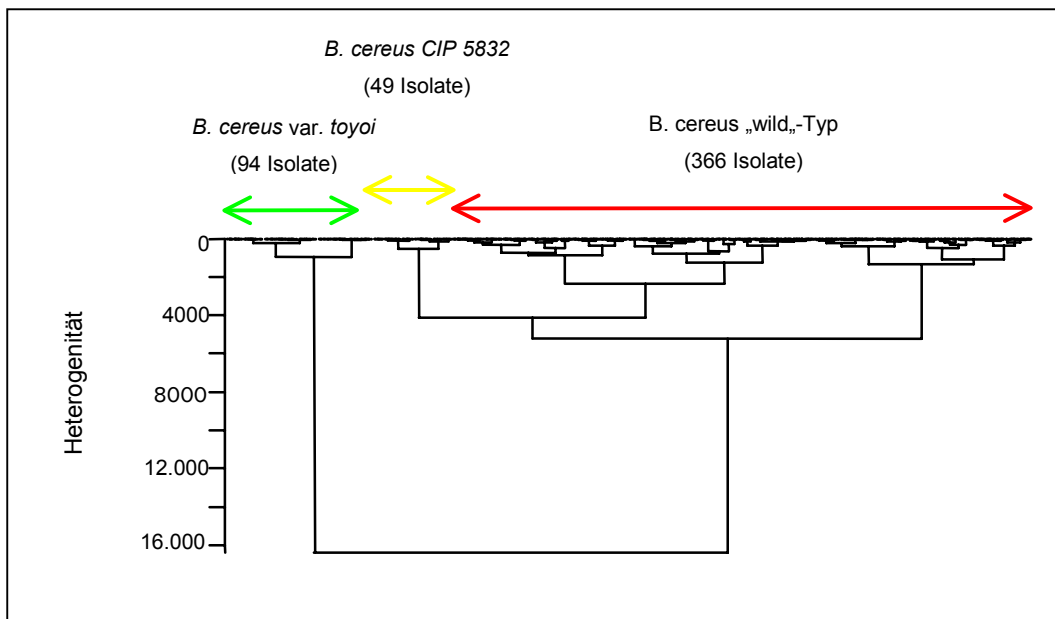
Diese Heterogenität von ungefähr 6.000 zwischen den „wild“-Typ- und den *CIP 5832*-Stämmen, gegenüber einer Verschiedenartigkeit von 16.000 zwischen den beiden probiotischen Varietäten *toyoi* und *CIP 5832*, zeigt, dass die spektrale Ähnlichkeit der *B. cereus*-Gruppen „wild“-Typ- und *CIP 5832* höher ist als die der probiotischen Varietäten untereinander. Die Beobachtung einer, bezogen auf alle Zellkomponenten, größeren Kongruenz von „wild“-Typ- und *CIP 5832*-Stämmen als zwischen den Probiotika, deutet evt. das im Jahre 2001 in Kraft getretene Verbot des Futtermittelzusatzes *B. cereus CIP 5832*.

Die Clusteranalyse zeigt weiter, dass sich die Gruppe der „wild“-Typ-Stämme in verschiedene Fraktionen aufteilt. Eine Teil der „wild“-Typ-Stämme weist eine höhere Ähnlichkeit zu den *CIP 5832*-Stämmen als zu den übrigen „wild“-Stamm-Isolaten auf.

Ob diese Verschiedenartigkeit innerhalb der „wild“-Typ-Gruppe mit der Potenz zur Toxinproduktion bzw. dem Vorhandensein eines Toxins der *B. cereus*-Isolate in Zusammenhang gebracht werden kann oder ob diese Differenz evt. durch die zwei unterschiedlichen *Bacillus cereus* Toxine, das emetische und das diarrhätische, zu begründen ist, bleibt offen.

Um genaueres über das Toxinproduktionspotential unterschiedlicher *B. cereus*-Isolate zu erfahren, wurden zwei Testsysteme zum Nachweis von *B. cereus* Toxinen verwendet. Der BCET-RPLA Kit von Oxiod® dient dem Nachweis des *Bacillus cereus* Enterotoxins durch reverse passive Latex Agglutination, der BDET-VIA Test von Tecra® der Dokumentation des *Bacillus* Diarrhöe Enterotoxins durch einen visuellen Immunassay. Beide Systeme weisen

unterschiedliche Komponenten des Toxins nach. Die Untersuchungsergebnisse geben jedoch keine Auskunft über die Bildung eines Giftstoffs, sondern lediglich über das Vorhandensein von einer bzw. zwei Komponenten des heteromeren Toxinmoleküls. Daraus ergibt sich, dass die Resultate dieser Untersuchungen keine Aussage über die Pathogenität der analysierten Stämme zulassen.



**Abb. 14:** Clusteranalyse von ca. 500 in der Datenbank enthaltenen *B. cereus*-Spektren. Die Heterogenität der *B. cereus*-Isolate CIP 5832 und der „wild“-Typ ist deutlich geringer, als die der probiotischen Varietäten *toyoi* und CIP 5832 untereinander. Datenvorbehandlung: erste Ableitung und Vektornormierung; „Average Linkage“, „scaling to the 1st range“. Frequenzbereich und Wichtung: 1200-900 (0,8), 3000-2800 (0,6) und 900-700 (0,6)  $\text{cm}^{-1}$ .

Ein Nachweis einzelner Komponenten des Toxinmoleküls durch sowohl das Testsystem von Oxiod® als auch von Tecra® erfolgte nicht nur bei den analysierten „wild“-Typ-Isolaten, sondern auch bei einigen *B. cereus* var. *toyoi*- und CIP 5832-Stämmen.

Die Analyseergebnisse können daher weder zur Klärung der „nahen“ Verwandtschaft von „wild“-Typ- und CIP 5832-Isolaten beitragen noch die Aufspaltung der „wild“-Typ-Fraktion erklären.

Auch kann z.Z. aus der vorgenommenen Clusterung der „wild“-Stämme keine Aussage über die Zugehörigkeit des jeweiligen Stammes zur Spezies *cereus* oder *thuringiensis* getroffen werden (siehe 7.1.1). Vier *B. thuringiensis*-Stämme der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, die aus kommerziellen Insektiziden reisoliert wurden sowie der *B. thuringiensis*-Stamm ATCC 10792 (DSMZ) clusterten durchgängig in die „wild“-Stamm-Gruppe, die am weitesten von den Probiotika entfernt ist. Diese Gruppe umfasst außerdem insgesamt 217 präsumptive *B. cereus*-„wild“-

Stamm-Isolate sowie die vermessenen *B. weihenstephanensis*-Stämme.

Parasporale Kristallkörper sind derart strukturbestimmende Gebilde, die die chemische Zusammensetzung einer Bakterienzelle massiv beeinflussen müssten. In weitergehenden Studien an der vorhandenen Stammsammlung der Wildstammisolate könnten die vermessenen Spektren mit dem mikroskopischen Nachweis vorhandener parasporaler Kristalle verglichen werden. Möglicherweise ergibt sich bei der Auswahl anderer Frequenzbereiche und einer veränderten Wichtung eine Trennungsmöglichkeit zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis* – vorausgesetzt, die Stämme sind genetisch stabil.

#### 10 Kurzer Exkurs zur Frage nach der Ausbreitung probiotischer *B. cereus*-Isolate in der Umwelt

Nach der Beobachtung, dass etliche Futtermittel ohne den gezielten Zusatz von Bioregulatoren einen erheblichen Anteil probiotischer *B. cereus*-Keime, die offenbar aus einer Ver

schleppung aus den Mischfutterwerken stammen, enthalten (siehe 9.1.), liegt auch die Frage nach einer möglichen Ausbreitung probiotischer *B. cereus*-Keime in der Umwelt nahe.

Durch die Gabe von Futtermitteln mit probiotischen Zusätzen ist das Vieh einem extrem hohen Keimgehalt ausgesetzt. Ca.  $10^{10}$  Keime der „direct fed microbials“ werden pro Tier und Tag aufgenommen. Diese probiotischen Mikroorganismen werden mit dem Kot ausgeschieden, so dass Tiere in Stallhaltung permanent mit den Keimen in Kontakt sind.

Um der Frage nachzugehen, ob probiotische *B. cereus*-Isolate als Kontaminanten bereits in Rohmilch oder Milchprodukten nachzuweisen sind, wurden 83 *B. cereus*-Isolate aus der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg FT-IR-spektroskopisch auf ihre Subspezies-Identität hin untersucht. Acht Isolate stammen aus Milchprodukten, die übrigen wurden aus Rohmilch isoliert. Zur Erhebung, ob probiotische *B. cereus*-Keime bereits als „Umgebungs-Keime“ auftreten, wurden ca. 350 *B. cereus*-Isolate aus der Umwelt, Lebensmitteln und Gewürzen mittels FT-IR-Technik und / oder Antibioogramm analysiert.

Durch die FT-IR-spektroskopische Betrachtung wurden sämtliche *B. cereus*-Isolate aus der Milchwirtschaft eindeutig als „wild“-Typ-Stämme identifiziert.

Unter den Umgebungs-Isolaten wurde laut Analyse lediglich ein Stamm als probiotischer *B. cereus*-Keim der Varietät *toyoi* identifiziert. Der Stamm (Nr. 17) stammt aus der Gülle eines Rinderbestandes. Alle übrigen Keime wurden ausschließlich als „wild“-Typ-Stämme identifiziert.

Eine generelle Aussage über die Ausbreitung bzw. in diesem Falle Nicht-Verbreitung von probiotischen *B. cereus*-Isolaten in der Umwelt ist jedoch durch diese Ergebnisse noch nicht möglich.

Für eine begründete Aussage zur Expansion probiotischer Keime in der Umgebung wäre die genaue Kenntnis der Herkunft der *B. cereus*-Isolate von Bedeutung. Proben, für die ein berechtigter Verdacht auf probiotische „Verschleppungen“ besteht, sollten analysiert werden. Solche Proben könnten z. B. Milch, Fleisch oder Gülle sein, die aus Ställen, in denen Tiere mit Probiotika gefüttert wurden, stammen sowie Agrarprodukte, die mit organischen Düngern aus Ställen, in denen Probiotika verfüttert werden, in Berührung kamen.

## 11 Bioregulatoren: Probleme des Einsatzes und die Bedeutung der Kontrolle

Mit dem Auslaufen der Genehmigung des probiotischen *B. cereus*-Stammes *CIP 5832* als Futtermittelzusatz, bzw. dem Verbot des Produktes Paciflor<sup>®</sup>, aufgrund des begründeten Verdachtes der Pathogenität, stellt sich die

Frage, ob Probiotika dennoch als für Mensch und Tier unbedenklich eingestuft werden können, zumal der Stamm *CIP 5832* weiterhin als Humantherapeutikum zugelassen ist.

Einen vergleichbaren Diskussionsverlauf bzgl. der „Gefahrlosigkeit“ hat es bereits vor einigen Jahren in Bezug auf den Einsatz von Antibiotika gegeben. Zunächst wurde auch hier die prophylaktische Gabe als Futtermittelzusatz und die Harmlosigkeit für Mensch und Tier propagiert, später stellten sich erhebliche Bedenken heraus, die dazu führten, dass Antibiotika heute fast ausschließlich nur therapeutisch angewendet werden dürfen.

Kritiker der prophylaktischen Anwendung von Probiotika legen dar, dass das derzeitige Verständnis von der menschlichen Darmflora und ihren Auswirkungen auf den Gesamtorganismus noch nicht ausreichend sei, um konkrete und auf das Individuum bezogene Aussagen über die Einflüsse von Probiotika auf die Darmflora und den gesamten Organismus machen zu können.

Es liegen keine Kenntnisse darüber vor, ob eine extern zugeführte Keimgruppe die optimal angepasste Darmflora eines gesunden Menschen bzw. eines gesunden und unter optimalen Bedingungen gehaltenen Tieres noch „verbessern“ kann und so protektive Wirkung entfaltet (Kreusemann und Krewer, 2000).

Für die Gesundheitswirkung von Probiotika ist ferner zu betonen, dass Studienergebnisse nur genau für den probiotischen Bakterienstamm gelten, an dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. Eine Verallgemeinerung der jeweiligen positiven Eigenschaften ist nicht möglich, da sie von Stamm zu Stamm verschieden sind und kein Stamm alle probiotischen Wirkungen in sich vereint. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die individuelle Konstitution des Konsumenten, die eine unterschiedliche Gesundheitswirkung durch Probiotika erwarten lässt.

Nach einer umfangreichen Studie von Gritzer und Leitgeb (1998) zur Überprüfung der Wirksamkeit antibiotischer und mikrobieller Leistungsförderer in der Rindermast stellt sich die Frage, ob der prophylaktische Einsatz von Probiotika sinnvoll erscheint. Das Probiotikum Toyocerin<sup>®</sup> erbrachte unter heute üblichen Fütterungs-, Hygiene- und Handlungsstandards in der Rindermast nur noch tendenzielle Vorteile der Mastleistung.

Neben der Tatsache, dass eine Leistungserhöhung durch Futtermittelzusätze in der Tierproduktion, bzw. eine Gesundung der Konsumenten durch mikrobielle Zusatzstoffe, zweifelhaft ist, stellt sich generell die Frage, ob im Zeitalter von Überproduktion eine Leistungssteigerung in der Tiermast erstrebenswert ist.

Einen augenscheinlichen „Erfolg“ bezogen auf probiotische Bestandteile in Lebens- und Futtermitteln hat sicher die Industrie. Probiotische

Mikroorganismen sind „Transienten“, die sich nicht dauerhaft im Darm ansiedeln. Deshalb wird von den Herstellern eine kontinuierliche (täglich und „lebenslänglich“) Gabe dieser Substanzen angeraten, wodurch sich für die Konsumenten eine dauerhafte Abhängigkeit von den Produzenten und für diese ein großer und beständiger Absatzmarkt ergibt.

Bedenklich stimmt der Umgang der pharmazeutischen Industrie mit aeroben Sporenbildnern für den therapeutischen Einsatz als Darmregulativum. Trotz des Verdachtes, daß *B. cereus* CIP 5832 unter bestimmten Bedingungen Toxine produzieren kann, wird der Stamm weiterhin in dem pharmazeutischen Produkt Bactisubtil® als Biologisches Darmtherapeutikum angeboten. Der Name „Bactisubtil“ vermittelt dem Anwender den Eindruck, dass der „Heubazillus“ *B. subtilis* im Präparat enthalten ist. Die beiliegende Gebrauchsinformation beschreibt den Wirkstoff lediglich mit „Keimfähige Sporen des Bazillus IP 5832“. Der Speziesname *B. cereus*, der beim Verbraucher eine Assoziation zu Lebensmittelvergiftungen erwecken könnte, wird nicht erwähnt. Der Stamm erweist sich in der eigenen Diagnostik eindeutig als probiotischer *B. cereus*-Stamm, der mit dem Futtermittelzusatzstoff Paciflor® übereinstimmt. Das als „Umstimmungsmittel / Immunstimulanzium“ eingruppierte Produkt Latensin® soll den Patentstamm *Bacillus cereus* M.U. 345a (DSM 5194) enthalten. Der reisolierte Stamm wurde allerdings kulturmorphologisch sowie nach biochemischer Testung mit dem System API 50 CHB (bioMérieux; Frankreich) eindeutig als der Spezies *B. licheniformis* zugehörig erkannt.

Trotz dieser Kritiken am prophylaktischen und therapeutischen Einsatz von Bioregulatoren und obwohl die Zulassung von probiotischen *B. cereus*-Futtermittel-Zusätzen mittlerweile auf einen Stamm beschränkt wurde, bleibt die eindeutige Differenzierung separierter *B. cereus*-Isolate und die Etablierung eines eindeutigen, kostengünstigen und in der Routinediagnostik einsetzbaren Identifizierungssystems, wie es die FT-IR-Technik bietet, von entscheidender Bedeutung. Verdeutlicht wird dieses durch die Tatsache, dass in der Sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Leipzig, bereits Futtermittelproben auffielen, die laut FT-IR-Analyse den bereits seit Februar 2001 nicht mehr zugelassenen *B. cereus*-Stamm CIP 5832 enthielten.

Auch wurden Futtermittelproben aufgefunden, die eine falsche Deklaration probiotischer *B. cereus*-Keime bargen.

Der Aufbau der FT-IR-Analytik zur Subspezies-Identifizierung von *B. cereus*-Isolaten und die Etablierung einer umfangreichen Datenbank bietet heute der Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft die Handhabe, ihrer Kontroll- und Überwachungsfunktion bezogen auf den

ubiquitären Keim *B. cereus* in schneller und einfacher Weise nachzukommen.

## 12 Zusammenfassung

In der Tierernährung werden zunehmend lebende Mikroorganismen als Probiotika zur Absicherung hoher Leistungen eingesetzt. Maßgebliche Beweggründe hierfür sind die angebliche Vermeidung ernährungsbedingter Verdauungsprobleme und daraus resultierende Verluste sowie die vermeintliche Verbesserung der Nährstoffverwertung. Auch in der menschlichen Ernährung gewinnt der prophylaktische Einsatz von Probiotika zunehmend an Bedeutung. Probiotische Lebensmittel versprechen Fitness, Gesundheit und Wohlbefinden und suggerieren dem Konsumenten, Krankheiten und Altersbeschwerden vorzubeugen oder gar heilen zu können.

Probiotika werden als getrocknete Kulturen vegetativer Zellen oder Sporen verabreicht. Sie wirken im Darm und sollen das mikrobielle Gleichgewicht des Verdauungstraktes stabilisieren.

Die meisten dieser Probiotika-Stämme sind kulturmorphologisch und biochemisch nicht eindeutig von häufig pathogenen Wildformen zu unterscheiden, wodurch sich mikrobiologische Bewertungsprobleme bzgl. der Unbedenklichkeit von Futter- und Lebensmitteln ergeben können.

Der Sporenbildner *Bacillus cereus* spielt in der Produktpalette der Probiotika der Futtermittelindustrie die dominierende Rolle. Das Präparat Toyocerin® der Firma Lohmann enthält die *B. cereus* Varietät *toyoi*, das Erzeugnis Paciflor® der Firma Hoechst den Stamm *B. cereus* CIP 5832. CIP 5832 ist als Futtermittelzusatz seit Februar 2001 nicht mehr zugelassen, findet jedoch weiterhin als Humantherapeutikum Anwendung.

Aerobe Sporenbildner sind sehr widerstandsfähig und spielen im Stoffkreislauf der Natur aufgrund ihres großen Enzymspektrums eine bedeutende Rolle. Bestimmte *B. cereus*-Stämme sind starke Toxinbildner und Lebensmittelvergifter. Sie gelten in der mikrobiellen Diagnostik als Verderbanzeiger.

Durch den Einsatz von *B. cereus*-Sporen als Probiotika wurde in den letzten Jahren im Rahmen der amtlichen Futtermittelkontrolle ein stetiges Ansteigen von *B. cereus*-Kolonien unbekannter Herkunft beobachtet.

Inhalt des Forschungsprojektes „Charakterisierung von *Bacillus cereus*-Isolaten aus Futtermitteln und Lebensmitteln“ war die Evaluierung des Potentials der physikalischen Methode der Fourier-Transform-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie zur *B. cereus*-Differenzierung sowie der Aufbau einer FT-IR-Datenbank zur schnellen und eindeutigen Subspezies-Identifizierung von *Bacillus cereus*-Isolaten.



Für die Entwicklung einer FT-IR-Datenbank müssen zunächst auf Subspeziesebene identifizierte Keime, die sich durch z. B. ihre Zugehörigkeit zu einer bestimmten Varietät in sinnvolle Klassen gruppieren, zur Verfügung stehen. Die FT-IR-Spektren dieser Stämme dienen folgend als Referenz für alle weiteren FT-IR-Analysen.

Zum Aufbau der *B. cereus*-Datenbank wurden zunächst in Mehrfachmessungen die Typ-Stämme *B. cereus* var. *toyoi* (Toyocerin<sup>®</sup>, Lohmann), *B. cereus* CIP 5832 (Paciflor<sup>®</sup>, Hoechst) sowie der „wild“-Stamm ATCC 11778 (DSMZ) mittels FT-IR-Technik analysiert.

Die entsprechenden Mittelwertspektren der drei Typ-Stämme werden in der entstehenden Datenbank abgelegt.

Für die Trennung der drei untersuchten *B. cereus*-„Gruppen“ zeigt der Wellenzahlbereich von 1000 bis 940 cm<sup>-1</sup>, der in der Polysaccharid-Region liegt, die deutlichste Divergenz der Subspezies und geht mit einer Wichtung von 0,3 in die Analyse ein.

Folgend wurden weitere *B. cereus*-Isolate der Varietäten *toyoi* und CIP 5832 bzw. „wild“-Typ analysiert. Um die Ergebnisse der FT-IR-Subspezies-Identifizierung der untersuchten Isolate zu verifizieren, wurden die FT-IR-Resultate mit PCR-Befunden verglichen. Die FT-IR- und PCR-Ergebnisse stimmten bei allen Isolaten überein, so dass die Mittelwertspektren der *B. cereus*-Stämme in die entstehende Datenbank aufgenommen werden konnten.

Um neben der arbeitstechnisch und apparativ aufwendigen Methode der PCR eine Möglichkeit zu haben, die Ergebnisse der FT-IR-Analysen zu beurteilen, wurde ein spezielles Antibiogramm entwickelt. Die Untersuchung von *B. cereus*-Isolaten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Cefamandole, Penicillin G und Tetracyclin zeigt ein differierendes Resistenzverhalten von probiotischen *B. cereus*-Isolaten und „wild“-Typ-Stämmen.

Das Antibiogramm eines *B. cereus*-Isolates bietet daher die Möglichkeit, das Resultat der FT-IR-Analyse zu überprüfen und eine Auf-

nahme des entsprechenden Mittelwertspektrums in die Datenbank zu begründen.

Für über 600 *B. cereus*-Isolate, die zuvor mittels FT-IR-Spektroskopie analysiert wurden, ist eine solche Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt worden. Die Korrelationsrate der Ergebnisse der FT-IR-Analysen und der Antibiogramme liegt bei ca. 95 %. Die Resultate der FT-IR-Analyse und der Antibiogramme aller in die Datenbank eingegangenen Spektren, stimmen ausnahmslos überein.

Die existierende *B. cereus*-FT-IR-Bibliothek enthält über 500 Spektren. Durch die Auswahl der *B. cereus*-Stämme aus unterschiedlichen geographischen Gebieten sowie verschiedenen Proben aus Lebensmitteln, Futtermitteln und auch Arzneimitteln ist die breite Varianz des Umweltkeimes *B. cereus* in der Datenbank repräsentiert.

Mit der Datenbank ist eine eindeutige Unterscheidung probiotischer, apathogener *B. cereus*-Isolate von potentiell toxinbildenden „wild“-Typ-Stämmen möglich sowie eine Identifizierung probiotischer *B. cereus*-Stämme auf Subspeziesebene praktikabel.

Dank der Bibliothek ist die Beurteilung von Futter- und Lebensmitteln bzgl. der Umweltkeimes *B. cereus* durchführbar.

Aerobe Sporenbildner, die nicht zur Spezies *B. cereus* gehören, werden in der FT-IR-Analyse anhand einer hohen „Hit Quality“ auffällig und dadurch als „Nicht-*B. cereus*-Stämme“ erkannt.

Die Spezifität der FT-IR-Datenbank lässt es zu, dass Kolonien der probiotischen Keimzahl-erfassung auf Caso-Agar bei 37 °C über 24 h direkt ohne weitere Subkultivierung im Infrarot-Spektrometer mit hinreichender Genauigkeit identifiziert werden können. Dadurch verringert sich die Gesamt-Analysezeit einer Probe auf 24 h. Mit der FT-IR-Technik steht eine schnelle, kostengünstige und zum Großteil automatisierbare zuverlässige Methode zur Verfügung, die direkt mit dem quantitativen Probiotikanachweis gekoppelt werden kann.

### 13 Literatur

- Battisti, L.; Green, B.D.; Throne, C.B., 1985: Mating System for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 162, 543 ff.
- bgvv 2001: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen. L 00.00-25 Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung präsumtiver *B. cereus* in Lebensmitteln. Koloniezählverfahren. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Dezember 1992
- www.BIOWB.CH, 2002. Kritische Bemerkungen zum Konzept der Probiotika und Präbiotika (1999) und Probiotische und präbiotische Lebensmittel: Alternativen zu Medikamenten oder leere Versprechungen der Werbung? (1999).
- Bruker<sup>®</sup> Analytik GmbH: Charakterisierung von Mikroorganismen mit der FT-IR-Spektroskopie, Arbeitsanleitung zum IFS 28/B.
- Busch, A., Herrmann, H.-H., Kühn, I., Simon, O., Struck, J., Süphke, E. 1999: Probiotika in der Tierernährung. AWT Schriftenreihe, Buchedition Agrimedia GmbH, Bergen 1999.
- Europäische Kommission, 13/06/01. Assessment by the Scientific Committee of Animal Nutrition of the safety of product Paciflor<sup>®</sup> for the use as feed additive (Adopted on 16 may 2001).
- Fehlhaber, K. und Kunze, A., 1999: Vermehrungsverhalten aerober Sporenbildner aus Fleischerzeugnissen im unteren Temperaturbereich; Arch. Lebensmittelhyg. 50, 121ff.
- Fuller, R., 1989: Probiotics in man and animals; J. Appl. Bacteriol. 66, 365ff.
- Gedek, B., 1986: Probiotika in der Tierernährung: Wirkung auf Leistung und Tiergesundheit; Krafffutter 3, 80ff.
- Gedek, B., 1990: Zum Einsatz von Probiotika beim Kalb; Tierärztl. Rundschau 45, 45-46.
- Gibson, T. und Gordon, R. E., 1974: Bacillus, in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Edited by R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, Williams und Wilkins, Baltimore, 529ff.
- Gonzales, J.M., Brown, B.J., Carlon, B.C., 1982: Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for  $\delta$ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6951 ff.
- Gritzer, K. und Leitgeb, R., 1998: Überprüfung der Wirksamkeit antibiotischer und mikrobieller Leistungsförderer in der Rindermast; Bodenkultur 49, 51ff.
- Haynes, W. C., Melvin, E. H., Locke, J. M., Glass, C. A., Senti, F. R., 1958: Certain factors affecting the infrared spectra of selected microorganisms; Appl. Microbiol. 6, 298 ff.
- Hoechst, Roussel Vet., 1999: Die 6-fach-Wirkung von Paciflor<sup>®</sup>. Produktinformation. Wiesbaden, 1999.
- Kenner, B. A., Riddle, J. W., Rochwood, S. W., Bordner, R. H., 1958: Bacterial identification by infrared spectrophotometry. II. Effect of instrumental and environmental variables, J. Bacteriol. 57, 16 ff.
- Keusemann, S., Krewer, G. 2000: Probiotische Milchprodukte. aid spezial 3469, Bonn 2000.
- Kozasa, M., 1986: Toyocerin (*Bacillus Toyoi*) as growth Promotor for Amino Acid Feeding. Microbiology-Aliments-Nutrition 4, 121ff.
- Kühn, I., 1998: Neue Erkenntnisse über die Wirkung von Probiotika in der Tierernährung; Krafffutter/ Feed Magazine 4, 140ff.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, B. M., Kaplan, T., Weißner-Gunkel, E., Stewart, G. S. A. B., Scherer, S., 1998: *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group; Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1373ff.
- Lilly, D. M. & Stillwell, R. H., 1965: Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms, Science 147, 747ff.
- Mayr, R., Stetten von, F., Francis, K. F., Scherer, S., 1999: Significance of Psychrotolerant Aerobic Sporeformers in Food Spoilage and Methodologies for their Detection and Identification; Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 42ff.
- Naumann, D., Helm, D., Labschinski, H., 1990: Einsatzmöglichkeiten der FT-IR-Spektroskopie in Diagnostik und Epidemiologie. Bundesgesundhbl. 9/90, 387ff.
- Naumann, D., Helm, D., Schultz, C., 1994: Characterisation and identification of Microorganisms by FT-IR Spectroscopy and FT-IR Microscopy, in Bacterial Diversity and Systematics, 67ff. Edited by F. G. Priest et al., Plenum Press, New York.
- Naumann, D., Labschinski, H., Giesbrecht, P., 1990: The characterisation of microorganisms by Fourier-Transform infrared spectroscopy (FT-IR) in Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis, 43ff. Edited by W. H. Nelson, Weinheim & New York: VCH Verlag Chemie.
- Oberreuther, H., Seiler, H., Scherer, S., 2000: Identification of Coryneform Bacteria and Related Taxa by FT-IR Spectroscopy. Robert Koch-Institut Berlin, Proceedings of the Workshop FTIR Spectroscopy in microbiological and Medical Diagnostic, Berlin, Oktober 2000.

- Parker, R. B., 1974: Probiotics, the other half of the antibiotics story; *Animal Nutr. Health* 29, 4ff.
- Pecoraro, S. and Bucher, E., 2002: Rapid identification of closely related probiotic *Bacillus cereus* strains and differentiation from wild type bacilli. *Arch. Lebensmittelhyg.* 53,49ff.
- Rolle und Mayr, A., 1993: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*; Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 533ff.
- Schraft, H. and Griffiths, M. W., 1995: Specific Oligonucleotide Primers for Detection of Lecithinase-Positive *Bacillus* spp. by PCR; *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 98 ff.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. und Holt, J. G., 1986: Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, in: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol 2, Edited by Williams and Wilkins, Baltimore, London, Los-Angeles, Sydney, 1104 ff.
- Steffen, Maïke, 1996: Identifizierung von Stämmen der Gattung *Burkholderia* mit Hilfe von FT-IR-Spektroskopischen Untersuchungen, Analysen der zellulären Fettsäuren und dem Biolog-System. Dipl.-Arbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät Carolo-Wilhelmina, Braunschweig 1996.
- Stetten, F. von, Francis, K. P., Lechner, S., Neuhaus, K., Scherer, S., 1998: Rapid discrimination of the psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA; *J. Microbiol. Meth.* 34, 99ff.

## **14 Anhang**

Gesamtübersicht aller im Forschungsbericht analysierten Bakterien-Stämme.

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibiogramm	FT-IR-Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/Práz.	Oxoid blau/Práz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
1	1	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
2	2	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
3	3	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
4	4	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
5	5	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
6	6	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
7	7	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
8	8	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
9	9	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
10	10	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
11	11	CIP 5832	Deklaration entspricht nicht FT-IR-Ergebnis	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
12	13	CIP 5832	C10 Referenzstamm Hoechst	ja	PB	CIP 5832	++	++	+	+
13	14	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
14	15	wild		ja	wild	wild	++	++	+	+
15	16	toyoi	C10 Referenzstamm Lohmann	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
16	17	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	+
17	18	classic	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
18	19	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	+
19	20	KMAT	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
20	21	ATTC 11778		ja	wild	wild	++	++	+	+
21	22	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
22	23	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
23	24	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
24	25	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
25	26	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
26	27	"wild"	Einzelmessungen im FT-IR 3x toyoi, 4x CIP 5832!	nein	PB		++	++	t/w	+
27	28	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
28	33	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
29	34	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
30	35	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
31	36	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
32	37	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
33	38	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
34	39	"wild"	Hit Quality > 115 / API unakzeptables Profil	nein	-	wild/ toyoi	%	%	+	t/w
35	40	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
36	41	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
37	42	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
38	43	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
39	44	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
40	45	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
41	46	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
42	47	"wild"	Hit Quality > 112 / API <i>B. sphaericus</i> , Kolonie mit Füßchen	nein	??	toyoi	%	%	-	-
43	48	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
44	49	"wild"	Hit Quality > 150 / API unakzeptables Profil, verunreinigt	nein	PB	wild	++	++	+	+
45	50	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
46	51	"wild"	schleimig	g.E.	wild	wild	-+	++	+	+
47	52	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
48	55	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
49	56	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
50	57	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
51	58	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
52	59	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
53	60	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
54	61	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
55	64	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
56	65	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
57	66	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
58	67	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	+	+
59	68	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
60	69	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
61	70	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
62	71	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
63	72	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
64	73	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
65	74	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
66	75	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
67	76	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
68	77	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
69	78	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
70	79	"wild"		ja	wild	wild	+ -	- -	t/w	w
71	80	"wild"		ja	wild	wild	++		+	+
72	81	"wild"	FT-IR ungleich AB, verunreinigt	nein	wild	toyoi	++	++	+	+
73	82	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
74	83	"wild"	FT-IR ungleich AB, verunreinigt	nein	wild	CIP 5832	++	++	+	+
75	84	"wild"		ja	wild	wild	++	- -	+	+
76	85	"wild"	schlecht gewachsen! <i>B.</i> <i>weihenstephanensis</i> ?	g.E.	wild	wild	++	++	+	+
77	86	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
78	87	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
79	88	"wild"	1-2 Hit wild, 3-10 Hit CIP 5832	nein	wild	wild/ CIP 5832	++	++	+	+
80	89	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
81	90	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
82	91	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
83	92	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
84	93	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
85	94	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
86	95	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
87	96	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
88	97	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
89	98	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
90	100	"wild"		ja	???	wild	++	++	+	+
91	101	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
92	102	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
93	103	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	+
94	104	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
95	105	"wild"- Verdacht		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
96	106	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
97	107	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
98	108	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
99	109	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
100	110	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
101	111	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
102	112	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
103	113	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
104	114	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
105	115	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
106	116	"wild"		ja	wild	wild	- -	- -	+	+
107	117	Verdacht		ja	wild	wild	++	++	+	+
108	118	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	"wild"	CIP 5832	++	++	+	+
109	119	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
110	120	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
111	121	"wild"- Verdacht		ja	wild	wild	++	++	+	+
112	122	"wild"- Verdacht		ja	wild	wild	++	++	+	+
113	123	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
114	124	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
115	125	"wild"		ja	wild	wild	- -	- -	+	+
116	126	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
117	127	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
118	128	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
119	129	"wild"	FT-IR ungleich AB, verunreinigt	nein	"wild"	CIP 5832	- +	- +	+	t/w
120	130	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
121	131	"wild"		ja	wild	wild	- +	- -	+	+
122	132	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
123	133	"wild"		ja	w ???	wild	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
124	134	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
125	135	"wild"- Verdacht	FT-IR ungleich AB; nochmal gemessen (3365= toyoi)	nein	PB	wild	++	++	+	t/w
126	136	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
127	137	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
128	138	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
129	139	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
130	140	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
131	141	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
132	142	"wild"		nein	wild	wild	++	-	+	+
133	143	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
134	144	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	t/w
135	145	"wild"	Hit Quality sehr hoch! API <i>B. mycoides</i> ?	nein	wild	wild	++	++	w	w
136	146	"wild"	Hit Quality sehr hoch! API <i>B. mycoides</i> ?	nein	wild	wild	++	++	w	w
137	147	"wild"	Hit Quality sehr hoch! API <i>B. mycoides</i> ?	nein	wild	wild	++	++	w	w
138	148	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
139	149	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
140	150	"wild"		ja	wild	wild	-	+	+	+
141	151	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
142	152	"wild"	Hit > 68! API geringe Selektivität, keine gute Identifizierung	nein	wild	wild	++	++	t/w	t/w
143	153	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
144	154	"wild"		ja	wild	wild	++	+	+	+
145	155	"wild"		ja	wild	wild	++	++	w	w
146	156	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
147	157	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
148	158	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
149	159	"wild"	Hit Quality > 150; kein <i>B. cereus</i> ?	nein	???	wild	-	-	-	-
150	160	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
151	161	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
152	162	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
153	163	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
154	164	Verdacht		ja	wild	"wild"	++	++	+	t/w
155	165	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	
156	166	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	
157	167	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
158	168	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
159	169	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
160	170	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
161	171	"wild"- Verdacht		ja	wild	wild	++	++	+	+
162	172	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
163	173	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	w



Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Biblio- thek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Práz.	Oxoid blau/ Práz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
164	174	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	CIP 5832	++	++	w	t/w
165	175	"wild"- Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	w
166	176	wild	API B. megaterium; Hit 10-37	nein	wild	wild	- -	- -	+	t/w
167	178	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
168	179	"wild"- Verdacht	API B. coagulans; noch keine FT-IR- Messungen durchgeführt, verunreinigt	g.E.	??		- -	- -	w	w
169	180	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
170	181	"wild"- Verdacht		g.E.	wild	wild	++	++	+	+
171	182	"wild"	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	w
172	183	Bio-mycin	AB ungleich FT-IR	g.E.	wild	toyoi	++	++	+	t/w
173	184	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
174	185	toyoi	Hit Quality 1-13; PCR = wild	nein	wild	wild	++	++	+	+
175	186	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
176	187	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
177	194	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	t/w
178	203	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
179	204	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
180	226	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
181	227	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
182	228	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
183	230	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
184	233	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	+
185	235	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	t/w
186	239	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
187	241	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
188	246	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
189	248	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
190	249	CIP 5832	Deklaration entspricht nicht FT-IR- Ergebnis	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
191	252	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
192	261	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
193	276	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
194	277	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
195	278	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	w	w
196	279	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
197	282	B. weih.	erst als Bib. 500 Stämme enthielt, gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	w
198	283	B. weih.	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	t/w	w
199	284	B. weih.	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	+
200	288	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibiogramm	FT-IR-Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/Práz.	Oxoid blau/Práz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
201	295	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
202	296	CIP 5832	Deklaration entspricht nicht FT-IR-Ergebnis	ja	PB	toyoi	++	++	+	+
203	297	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
204	301	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
205	302	"wild"-Verdacht	AB ungleich FT-IR! API unakzeptables Profil, verunreinigt	nein	???	ist laut FT-IR toyoi	- +	- +	+	+
206	304	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
207	305	"wild"-Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	g.E.	PB	toyoi	++	++	+	+
208	307	"wild"		ja	wild	wild	- +	- +	+	+
209	308	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	w
210	309	PB		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
211	310	PB		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
212	312	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	t/w
213	313	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	+
214	314	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	t/w	t/w
215	321	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
216	322	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
217	324	"wild"		ja	wild	wild	- +	- +	+	+
218	325	"wild"		ja	wild	wild	- +	- +	+	+
219	326	"wild"	AB ungleich FT-IR	g.E.	wild	CIP 5832	++	++	+	+
220	327	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
221	328	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
222	329	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
223	330	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
224	331	"wild"		ja	wild	wild	- +	++	+	+
225	332	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
226	333	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
227	340	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
228	341	"wild"		ja	??	wild	++	++	+	+
229	342	"wild"		ja	??	wild			?	?
230	345	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
231	347	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
232	348	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
233	349	CIP 5832		ja	PB	CIP 5832	++	++	+	w
234	361	"wild"-Verdacht	keine Probiotika-Deklaration	ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
235	363	"wild"		ja	wild	wild	- +	++	t/w	t/w
236	364	"wild"		ja	wild	wild	- -	- -	+	+
237	365	"wild"		g.E.	wild	wild	++	- -	+	+
238	367	"wild"		g.E.	??	wild	++	++	+	+
239	368	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
240	369	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
241	370	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
242	371	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
243	376	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
244	377	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	+
245	378	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
246	379	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
247	380	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
248	384	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
249	387	toyoi		ja	PB	toyoi	++	++	+	t/w
250	394	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
251	395	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
252	396	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
253	397	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
254	398	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
255	401	"wild"		ja	??	wild	++	++	+	+
256	418	"wild"		ja	??	wild	++	++	+	+
257	421	"wild"		ja	??	wild	++	++	+	t/w
258	422	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
259	424	"wild"		g.E.	wild	wild	++	++	+	?
260	425	"wild"		ja	???	wild	+ -	+ -	+	+
261	426	"wild"		g.E.	wild	wild	- -	- -	+	?
262	427	DSMZ "wild"	Hit Quality > 60	nein	wild	wild	++	++	+	?
263	428	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	?
264	434	"wild"		ja		wild	++	++	+	+
265	435	"wild"	FT-IR ungleich AB; API B. cereus/ mycooides (1. Hit "wild", 2-9 toyoi)	nein	wild	toyoi	++	++	+	w
266	436	"wild"	1-2 Hit "wild", 3-10 toyoi; Hit Quality > 40	nein	???	toyoi/ wild	++	++	+	+
267	437	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
268	438	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
269	439	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
270	440	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
271	441	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
272	442	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
273	443	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
274	444	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
275	445	"wild"		ja	wild	wild	- -	- -	t/w	w
276	446	"wild"	API geringe Selektivität, kein B. cereus; Hit Quality 30-60, glatte Kolonie	nein	wild	wild	++	++	?	+
277	447	"wild"		ja	???	wild	++	++	t/w	t/w
278	448	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
279	449	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
280	450	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
281	451	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
282	452	"wild"		ja	wild	wild	++	++	w	w

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibiogramm	FT-IR-Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
283	453	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
284	454	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
285	455	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
286	456	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
287	457	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
288	458	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
289	459	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
290	460	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
291	461	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
292	462	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
293	463	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
294	464	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
295	465	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
296	466	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild	wild/ toyoi	++	++	+	+
297	467	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	???	wild/ toyoi	++	++	+	+
298	468	"wild"	FT-IR ungleich AB; API unakzeptables Profil, kein <i>B. cereus</i> , glänzende Kolonie	nein	???	wild/ toyoi	++	++	+	+
299	469	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	w
300	470	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	t/w
301	471	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	t/w
302	472	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
303	473	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	+
304	474	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
305	475	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	w
306	476	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	w
307	477	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
308	478	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
309	479	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
310	480	"wild"	häufig schlecht gewachsen; API uneindeutig, <i>B. cereus</i> / <i>B. anthracis</i>	nein	"wild"	wild	++	++	t/w	w
311	481	"wild"		ja	???	wild	++	++	t/w	+
312	482	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	wild	++	++	+	+
313	483	"wild"	häufig schlecht gewachsen API Zweifelhafte Profil, <i>B. mycoides</i> / <i>cereus</i>	nein	"wild"	wild	++	++	w	w
314	484	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
315	485	"wild"		ja	wild	wild	- +	++	t/w	+
316	486	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
317	487	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
318	488	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	w
319	489	"wild"		g.E.	wild	wild	++	++	+	+
320	490	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
321	491	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	??	wild	- -	- -	w	w

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
322	492	"wild"	API <i>B. sphaericus</i> ! Hit Quality > 150, glänzende Kolonie	nein	???	toyoi	+ -	+ -	w	w
323	493	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
324	494	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
325	495	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
326	496	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild ?	toyoi	++	++	+	+
327	497	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
328	498	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
329	499	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
330	500	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
331	501	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
332	502	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
333	503	"wild"		ja	wild	wild	++	++	+	+
334	504	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
335	505	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
336	506	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
337	507	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
338	508	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
339	509	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
340	510	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
341	511	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bibliothek	ja	wild	"wild"	++	++	+	+
342	512	"wild"		ja	???	"wild"	++	++	+	w
343	513	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
344	514	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
345	515	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
346	516	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
347	517	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
348	518	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
349	519	"wild"		ja	wild	"wild"	- -	- -	+	+
350	520	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
351	521	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
352	522	"wild"	1-9 Hit wild, 10 Hit toyoi	nein	"wild"	wild/ toyoi	++	++	+	t/w
353	523	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	??	IP 5832	++	++	+	+
354	524	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
355	525	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
356	526	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
357	527	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	t/w
358	528	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
359	529	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	t/w	w
360	530	"wild"	1.-8. Hit wild, 9. Hit CIP 5832, 10. Hit wild	nein	wild	wild/ CIP5832	++	++	+	+
361	531	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild	IP 5832	++	++	+	+
362	532	"wild"	Hit Quality > 47-106	nein	wild	wild	++	++	+	+
363	533	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
364	534	"wild"		g.E.	w?	wild	++	++	+	+
365	535	"wild"	Hit Quality 59-99	nein	wild	wild	++	++	+	+
366	536	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	t/w	w
367	537	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	t/w	w
368	538	"wild"		ja	wild	"wild"	--	--	+	+
369	539	"wild"		ja	wild	"wild"	--	--	+	+
370	540	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
371	541	"wild"		ja	wild	"wild"	--	--	+	+
372	542	"wild"		ja	wild	"wild"	--	--	+	+
373	543	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild	IP 5832	++	++	+	+
374	544	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
375	545	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
376	546	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
377	547	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
378	548	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
379	549	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
380	550	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
381	551	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
382	552	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
383	553	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
384	554	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
385	555	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
386	556	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
387	557	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
388	558	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
389	559	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
390	560	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
391	561	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
392	562	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
393	563	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
394	564	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
395	565	"wild"	FT-IR ungleich AB; API zweifelhaftes Profil, B. mycoides/ B. cereus	nein	wild	toyoi/ wild	++	++	w	w
396	566	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
397	567	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
398	568	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
399	569	"wild"	FT-IR ungleich AB; Hit Quality 5-11	nein	wild	CIP 5832	++	++	+	+
400	570	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
401	571	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
402	572	"wild"		ja	wild	"wild"	- +	++	+	+
403	573	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
404	574	"wild"	FT-IR ungleich AB; Hit Quality 48-72	nein	wild	CIP5832/ toyoi	++	++	+	+
405	575	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
406	576	"wild"		ja	wild	"wild"	++	- +	+	+
407	577	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
408	578	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
409	579	"wild"	Hit Quality 33-51	nein	wild	wild/ toyoi	++	++	+	+
410	580	"wild"		g.E.	wild	wild	++	++	+	w
411	581	"wild"	Stamm schlecht gewachsen; evt. <i>B. weihenstephanensis</i>	g.E.	wild	wild	++	++	+	w
412	582	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
413	583	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
414	584	"wild"		ja	wild	"wild"	- +	++	+	+
415	585	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
416	586	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
417	587	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
418	588	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
419	589	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
420	590	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
421	591	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
422	592	"wild"		ja	??	"wild"	++	++	+	+
423	593	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
424	594	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
425	595	"wild"		ja	wild	"wild"	- +	++	+	+
426	596	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
427	597	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
428	598	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
429	599	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
430	600	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
431	601	"wild"		ja	wild	"wild"	- -	- -	+	+
432	602	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
433	603	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
434	604	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++		+	+
435	605	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
436	606	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
437	607	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
438	608	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
439	609	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
440	610	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
441	611	"wild"	Hit Quality über 50; API <i>B. mycoides</i> ?	nein	wild	"wild"	++	++	+	+
442	612	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
443	613	"wild"	Hit Quality über 90; API <i>B. mycoides</i> ?	nein	wild	"wild"	++	++	+	+
444	614	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
445	615	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
446	616	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
447	617	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibiogramm	FT-IR-Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/Práz.	Oxoid blau/Práz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
448	618	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
449	619	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild	CIP 5832	++	++	+	+
450	620	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
451	621	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
452	622	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
453	623	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
454	624	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
455	625	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
456	626	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
457	627	"wild"		g.E.	wild	wild	++	++	+	+
458	628	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
459	629	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
460	630	"wild"		ja	wild	"wild"	- -	- -	+	+
461	631	"wild"	FT-IR ungleich AB	nein	wild	CIP 5832	++	++	+	+
462	632	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
463	633	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
464	634	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
465	635	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
466	636	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
467	637	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme enthielt gute Identifizierung und Aufnahme in Bib.	ja	wild	"wild"	++	++	+	+
468	638	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
469	639	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
470	640	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
471	641	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
472	642	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
473	643	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
474	644	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
475	645	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
476	646	"wild"		ja	wild	"wild"	- +	- +	+	+
477	647	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
478	648	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
479	649	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
480	650	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
481	651	"wild"	Hit Quality riesig, z.T. > 300	g.E.	wild	"wild" Hit > 100	++	++	+	+
482	652	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
483	653	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
484	654	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
485	655	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
486	656	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
487	657	"wild"		ja	wild	"wild"	- -	- -	+	+
488	658	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
489	659	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+



Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
490	660	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
491	661	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
492	662	"wild"	Hit Quality > 50; Api B. cereus	nein	wild	"wild"	++	++	+	+
493	663	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
494	664	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
495	665	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	+	+	t/w
496	666	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	t/w
497	667	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
498	668	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
499	669	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	t/w	w
500	670	"wild"		ja	wild	"wild"	++	- +	t/w	t/w
501	671	"wild"		ja	wild	"wild"	- -	- -	+	+
502	692	"wild"		ja	??	wild	++	++	+	+
503	737	"wild"	Hit Quality > 70; Api B. megaterium	nein	???	wild	- -	- -	w	w
504	747	Latensin	Hit Quality > 140; Api B. licheniformis, Kolonie schleimig	nein	???	wild	- -	- -	w	w
505	748	"wild"		g.E.	???	wild	- -	- -	w	w
506	749	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
507	750	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
508	751	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
509	752	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	t/w	w
510	753	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
511	754	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	t/w
512	755	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
513	756	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
514	757	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
515	758	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
516	759	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
517	760	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
518	761	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
519	762	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
520	763	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
521	764	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	t/w
522	765	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
523	766	"wild"		ja	wild	"wild"	+ -	+ -	+	+
524	767	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
525	768	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
526	769	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
527	770	"wild"		ja	? wild	"wild"	++	++	+	+
528	771	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
529	772	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
530	773	"wild"	Hit Quality > 140; kein B. cereus	nein	???	"wild"	- -	- -	-	-
531	774	"wild"		ja	wild	"wild"	+ -	+ -	w	w
532	775	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibio- gramm	FT-IR- Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/ Präz.	Oxoid blau/ Präz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
533	776	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
534	777	"wild"		nein	wild	wild/ toyoi	++	++	+	+
535	778	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	t/w
536	779	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
537	780	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
538	781	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	-	w
539	782	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	w
540	783	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	t/w
541	784	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	t/w
542	785	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	+
543	786	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	+
544	787	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
545	788	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	t/w
546	789	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
547	790	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
548	791	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
549	792	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	t/w
550	793	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme, gute Ident. und Aufnahme in Bibliothek, API <i>B. cereus</i>	ja	wild	"wild"	++	++	+	+
551	794	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
552	795	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
553	796	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
554	797	"wild"		ja	?	"wild"	++	++	+	+
555	798	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	w	w
556	799	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
557	800	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
558	801	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	t/w	w
559	802	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
560	803	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
561	804	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	w	w
562	805	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
563	806	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
564	807	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
565	808	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme, gute Ident. und Aufnahme in Bibliothek, API <i>B. cereus</i>	ja	wild	"wild"	++	++	+	+
566	809	"wild"	erst als Bib. 500 Stämme, gute Ident. und Aufnahme in Bibliothek, API <i>B. cereus</i>	ja	wild	"wild"	++	++	+	+
567	810	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
568	811	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
569	812	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
570	813	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
571	814	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
572	815	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
573	816	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
574	817	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+

Lfd. Nr.	Stamm Nr.	Organismus B. cereus	Besonderheiten	FT-IR Bibliothek 37 °C	Antibiogramm	FT-IR-Ergebnis	Selektivnährböden			
							Merck pink/Práz.	Oxoid blau/Práz.	BCM türkis 30°C	BCM türkis 37°C
575	818	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
576	819	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
577	820	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
578	821	"wild"		ja	wild	"wild"	+ -	- -	+	t/w
579	822	"wild"		ja	wild	"wild"	+ -	- -	+	t/w
580	823	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
581	824	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
582	825	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
583	826	"wild"	Hit Quality > 80; API <i>B. cereus</i>	nein	wild	"wild"	++	++	+	+
584	827	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
585	828	"wild"		ja	wild	"wild"	++	++	+	+
586	829	"wild"		g.E.	wild	"wild"	++	++	+	+
587	830	"wild"	Hit Quality > 50, API unakzeptables Profil, sehr helle, sehr kleine Kolonien		nicht gew.	toyo???	- -	- -	t/w	-
588	831	"wild"		ja	wild	"wild"	+ +	++	-	w
589	832	DSMZ "wild"	Toxinbildner	ja	wild	"wild"	++	++	+	+

g.E.= gute Einzelmessungen, noch keine Mittelwertbildung, daher noch keine Aufnahme in Bibliothek

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung zahlreicher Stämme aus Lebensmitteln und der Umwelt und die freundliche fachliche Unterstützung danke ich besonders Herrn Dr. Philipp Hammer von der Bundesanstalt für Milchwirtschaft Kiel sowie Herrn Dr. Helmut Pöhle vom Lebensmittelinstitut **Kompetenz In Nahrungsmitteln** Neumünster.

Mehr als 80 Stämme aus Rohmilch und Milchprodukten erhielt ich von der Milchwirtschaftlichen Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg. Frau Brigitte Bartel und Frau Dr. Riemelt sei für ihr großes Interesse und Entgegenkommen gedankt.

Herrn Dr. Sven Pecoraro vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, München, danke ich für kollegiale Zusammenarbeit und die Durchführung der PCR-Analysen.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Rolf Reissbrodt und Herrn Dr. Wieland Beer vom Robert Koch-Institut Wernigerode für die nette Gastfreundschaft und die ungezählte fachliche Hilfe bei der Etablierung der FT-IR-Technik.

## Impressum

- Herausgeber:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Öffentlichkeitsarbeit  
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden  
**Internet:** WWW.LANDWIRTSCHAFT.SACHSEN.DE/LFL
- Redaktion:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Fachbereich 10 Landwirtschaftliche Untersuchungen  
Frau Dipl.-Biol. Julia Schleif  
Frau Dr. Henriette Mietke  
Gustav-Kühn-Str.8  
04159 Leipzig  
Telefon: 0341 / 9174 - 248    Telefax: 0341 / 9174 - 211  
E-Mail: henriette.mietke@leipzig.lfl.smul.sachsen.de
- Endredaktion:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Öffentlichkeitsarbeit  
Thomas Freitag, Gisela Hauptmann
- Redaktionsschluss:** April 2003
- Bildnachweis:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
- Satz:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft
- Druck:** Sächsisches Digitaldruck Zentrum GmbH Dresden
- Auflage:** 1. Auflage, 180 Stück
- Bezug:** Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft  
Öffentlichkeitsarbeit  
August-Böckstiegel-Straße 1, 01326 Dresden-Pillnitz  
Telefax: 03 51 / 26 12 - 151  
E-Mail: Gisela.Hauptmann@pillnitz.lfl.smul.sachsen.de
- Schutzgebühr:** 12,78 EUR

### Rechtshinweis

Alle Rechte, auch die der Übersetzung sowie des Nachdruckes und jede Art der phonetischen Wiedergabe, auch auszugsweise, bleiben vorbehalten. Rechtsansprüche sind aus vorliegendem Material nicht ableitbar.

### Verteilerhinweis

Diese Informationsschrift wird von der Sächsischen Staatsregierung im Rahmen ihrer verfassungsmäßigen Verpflichtung zur Information der Öffentlichkeit herausgegeben. Sie darf weder von Parteien noch von deren Kandidaten oder Helfern im Zeitraum von sechs Monaten vor einer Wahl zum Zwecke der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für alle Wahlen. Erlaubt ist jedoch den Parteien, diese Informationsschrift zur Unterrichtung ihrer Mitglieder zu verwenden.