

# Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Trockenmilcherzeugnissen

**SIMONE WÜNSCHE**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde  
Professur für Milchwissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber

# **Untersuchungen zur mikrobiologischen Qualität von Trockenmilcherzeugnissen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**SIMONE WÜNSCHE**  
Tierärztin aus Dormagen

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber  
Prof. Dr. Dr. habil. H. Eisgruber

Tag der Disputation: 23.02.2010

*Meiner Familie*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
----------	-------------------------	----------

<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>2</b>
----------	---------------------------------	----------

<b>2.1</b>	<b>Trockenmilch, Trockenmilch- und Molkenerzeugnisse</b> .....	<b>2</b>
------------	--	----------

2.1.1	Allgemeines und Definitionen .....	2
-------	------------------------------------	---

2.1.2	Herstellung und Eigenschaften von Trockenmilcherzeugnissen .....	5
-------	--	---

2.1.2.1	Übersicht über die Herstellungsweise von Trockenmilchpulvern .....	5
---------	--	---

2.1.2.2	Bedeutung und Verwendung von Trockenmilcherzeugnissen .....	9
---------	---	---

2.1.2.3	Mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen in Abhängigkeit von der Verarbeitung .....	10
---------	--	----

2.1.3	Rechtliche Anforderungen an die mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen .....	15
-------	---	----

<b>2.2</b>	<b><i>Enterobacteriaceae</i></b> .....	<b>18</b>
------------	--	-----------

2.2.1	Allgemeines .....	18
-------	-------------------	----

2.2.2	<i>Enterobacter sakazakii</i> .....	21
-------	-------------------------------------	----

2.2.3	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Trockenmilcherzeugnissen .....	25
-------	---	----

2.2.3.1	Kontaminationsquellen von Trockenmilcherzeugnissen mit <i>Enterobacteriaceae</i> .....	25
---------	---	----

2.2.3.2	Untersuchungen zum Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Trockenmilcherzeugnissen .....	26
---------	---	----

<b>2.3</b>	<b>Aerobe Sporenbildner .....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Allgemeines .....	33
2.3.2	<i>Bacillus cereus</i> .....	40
2.3.2.1	Emetisches Syndrom durch <i>B. cereus</i> .....	42
2.3.2.2	Diarrhö-Syndrom durch <i>B. cereus</i> .....	44
2.3.3	Vorkommen von aeroben Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen ....	48
2.3.3.1	Kontaminationsquellen von Trockenmilcherzeugnissen mit aeroben Sporenbildnern .....	48
2.3.3.2	Untersuchungen zum Vorkommen von aeroben Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen .....	50
<b>2.4</b>	<b>Aerobe mesophile Keimzahl .....</b>	<b>63</b>
2.4.1	Allgemeines .....	63
2.4.2	Aerobe mesophile Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen .....	63
2.4.2.1	Untersuchungen zur aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen .....	65
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>67</b>
3.1.1	Probenmaterial .....	67
3.1.2	Nährmedien und Chemikalien .....	72
3.1.3	Bakterien-Referenzstämme .....	75
3.1.4	Geräte und Sonstiges .....	76
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>78</b>
3.2.1	Probennahme .....	78
3.2.2	Untersuchungsverfahren .....	79
3.2.3	Probenvorbereitung .....	79
3.2.4	Bestimmung von <i>Enterobacteriaceae</i> .....	81
3.2.5	Bestimmung von <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	82
3.2.6	Bestimmung aerober Sporenbildner .....	84

3.2.7	Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl .....	86
3.2.8	Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung der Trockenmilcherzeugnisse .....	87
3.2.9	Bestimmung des <i>B. cereus</i> -Enterotoxinbildungsvermögens .....	89
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des untersuchten Probenmaterials .....</b>	<b>92</b>
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Trockenmilch- erzeugnissen .....</b>	<b>93</b>
4.2.1	Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung .....	93
4.2.2	<i>Enterobacteriaceae</i> .....	95
4.2.2.1	Erstuntersuchung .....	95
4.2.2.2	Nachuntersuchung .....	97
4.2.3	<i>Enterobacter sakazakii</i> .....	100
4.2.4	Aerobe Sporenbildner .....	102
4.2.4.1	<i>Bacillus cereus</i> .....	104
4.2.4.2	Sonstige Sporenbildner .....	108
4.2.5	Aerobe mesophile Keimzahl .....	112
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von Trockenmilch- erzeugnissen .....</b>	<b>114</b>
<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchung auf <i>B. cereus</i>-Enterotoxinbildungs- vermögen .....</b>	<b>119</b>

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>121</b>
<b>5.1</b>	<b>Allgemeines</b>	<b>121</b>
<b>5.2</b>	<b>Betrachtung nach Untersuchungskriterium</b>	<b>122</b>
5.2.1	<i>Enterobacteriaceae</i> und <i>Enterobacter sakazakii</i>	122
5.2.1.1	Vorkommen	122
5.2.1.2	Vergleich der Nährmedien	124
5.2.1.3	Verhalten bei Rekonstitution	125
5.2.1.4	Beurteilung	125
5.2.2	Aerobe Sporenbildner	126
5.2.2.1	Vorkommen und Enterotoxinkomponenten-Nachweis	126
5.2.2.2	Vergleich der Nährmedien	129
5.2.2.3	Verhalten bei Rekonstitution	129
5.2.2.4	Beurteilung	130
5.2.3	Aerobe mesophile Keimzahl	131
5.2.3.1	Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen	131
5.2.3.2	Verhalten bei Rekonstitution	132
5.2.3.3	Beurteilung	133
<b>5.3</b>	<b>Betrachtung nach Produktgruppe</b>	<b>133</b>
5.3.1	Nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte	133
5.3.2	Aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte	134
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>143</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>146</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1:</b>	Übersicht einiger Begriffsdefinitionen nach Spreer (1995) .....	3
<b>Tab. 2:</b>	Einteilung einiger Trockenmilch- und Molkenerzeugnisse in Standardsorten nach MilchErzV, Anlage 1 .....	4
<b>Tab. 3:</b>	Auszug aus der VO (EG) Nr. 2073/2005, Anhang I, Kapitel 1 + 2 (Stand: Änderungsverordnung Verordnung (EG) Nr. 1441/2007) .....	16
<b>Tab. 4:</b>	Die Familie der <i>Enterobacteriaceae</i> : ausgewählte Vertreter, deren Vorkommen und Bedeutung (FEHLHABER et al., 2005a) .....	20
<b>Tab. 5:</b>	Überblick über das in verschiedenen Studien ermittelte Spektrum an <i>Enterobacteriaceae</i> in unterschiedlichen Milcherzeugnissen .....	28
<b>Tab. 6:</b>	Ausgewählte Studien zu den in Milch und Milchprodukten am häufigsten nachgewiesenen <i>Enterobacteriaceae</i> .....	30
<b>Tab. 7:</b>	Übersicht über einige durch <i>Bacillus</i> -Spezies ausgelöste, nicht gastro-intestinale Infektionen .....	35
<b>Tab. 8:</b>	Übersicht über das Vorkommen von Toxin bildenden <i>Bacillus</i> -Spezies (ohne <i>B. cereus</i> ) und deren Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen .....	38
<b>Tab. 9:</b>	Überblick über die in verschiedenen Studien ermittelten <i>Bacillus</i> -Spezies in unterschiedlichen Milchprodukten .....	51
<b>Tab. 10:</b>	Übersicht über die am häufigsten aus Milch und Milcherzeugnissen isolierten <i>Bacillus</i> -Spezies .....	52
<b>Tab. 11:</b>	Überblick über die Inzidenz und die Kontaminationshöhe von <i>B. cereus</i> in Trockenmilcherzeugnissen, modifiziert nach BECKER et al. (1994) .....	55
<b>Tab. 12:</b>	Weitere Studien zu Inzidenz und Kontaminationshöhe von <i>B. cereus</i> in Trockenmilcherzeugnissen .....	56
<b>Tab. 13:</b>	Vorkommen von Virulenzfaktoren bzw. deren Kombinationen bei aus Milch und Milchprodukten isolierten <i>B. cereus</i> -Stämmen, modifiziert nach WIJNANDS et al. (2006) .....	57
<b>Tab. 14:</b>	Übersicht der Ergebnisse einiger Studien zum Vorkommen von Enterotoxin produzierenden <i>B. cereus</i> mittels kommerzieller Testkits ...	59
<b>Tab. 15:</b>	Untersuchungen zur Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen .....	66

<b>Tab. 16:</b>	Übersicht über die Anzahl unterschiedlicher Hersteller sowie Herstellungsländer der untersuchten Trockenmilcherzeugnisse .....	71
<b>Tab. 17:</b>	Aufstellung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme .....	75
<b>Tab. 18:</b>	Übersicht über Art und Anzahl der unterschiedlichen, zur Probenbeschaffung genutzten Warenhäuser .....	78
<b>Tab. 19:</b>	Aufstellung der den jeweiligen mikrobiologischen Untersuchungen zugrunde liegenden Methoden .....	79
<b>Tab. 20:</b>	Übersicht zu Zeitpunkt und Art der durchgeführten Untersuchungsgänge an fünf haushaltsüblich zubereiteten Proben .....	88
<b>Tab. 21:</b>	Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen (Erst-) Untersuchung der Trockenmilcherzeugnisse .....	94
<b>Tab. 22:</b>	Vorkommen von <i>Enterobacteriaceae</i> in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105) .....	95
<b>Tab. 23:</b>	Vergleich der zum <i>Enterobacteriaceae</i> -Nachweis verwendeten Nährmedien .....	96
<b>Tab. 24:</b>	Ergebnis der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungen auf das Vorhandensein von <i>Enterobacteriaceae</i> .....	98
<b>Tab. 25:</b>	Vergleich der bei der Nach- und Erstuntersuchung von 13 Pulvernahrungen zum <i>Enterobacteriaceae</i> -Nachweis verwendeten Nährmedien .....	99
<b>Tab. 26:</b>	Übersicht über die mittels der Untersuchung auf das Vorhandensein von <i>Enterobacter sakazakii</i> isolierten <i>Enterobacteriaceae</i> -Spezies; Vergleich zu den Ergebnissen der Erstuntersuchung auf das Vorhandensein von <i>Enterobacteriaceae</i> .....	101
<b>Tab. 27:</b>	Übersicht über das Vorkommen von <i>B. cereus</i> sowie sonstigen Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105) .....	103
<b>Tab. 28:</b>	Übersicht über das Vorkommen sowie die Kontaminationshöhe von <i>B. cereus</i> in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105) .....	105
<b>Tab. 29:</b>	Vergleich der parallel eingesetzten Nährmedien PEMBA und BCC zum Nachweis von <i>B. cereus</i> in Trockenmilcherzeugnissen .....	106
<b>Tab. 30:</b>	Vorkommen und Kontaminationshöhe von aeroben Sporenbildnern (ohne <i>B. cereus</i> ) in Trockenmilcherzeugnissen (n= 105), sortiert nach Produktgruppen .....	110

<b>Tab. 31:</b>	Verteilung des Vorkommens von sonstigen Sporenbildnern ausser <i>B. cereus</i> (mit <i>B. lich.</i> = <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. subt.</i> = <i>B. subtilis</i> ; <i>B. myc.</i> = <i>B. mycooides</i> ; <i>B. pum.</i> = <i>B. pumilus</i> ; <i>B. firm.</i> = <i>B. firmus</i> ; <i>B. circ.</i> = <i>B. circulans</i> ; A = andere Sporenbildner) in Trockenmilcherzeugnissen, sortiert nach Produktgruppen .....	111
<b>Tab. 32:</b>	Übersicht über die Ergebnisse der Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen (n = 105) .....	113
<b>Tab. 33:</b>	Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von fünf Trockenmilcherzeugnissen; Vergleich zu den mittels der mikrobiologischen Erstuntersuchung (Erst-Unters.) ermittelten Ergebnissen der Proben (Werte für <i>B. cereus</i> ermittelt mittels PEMBA) .....	115
<b>Tab. 34:</b>	Übersicht über die Verteilung von mittels Duopath® Cereus Enterotoxins Test negativ und positiv auf Nhe- und Hbl-Komponentenbildung getesteten <i>Bacillus</i> spp.-Isolaten (n gesamt = 69) .....	119

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b>	Schematische Darstellung der Milchpulvererzeugung (nach SPREER, 1995) .....	8
<b>Abb. 2:</b>	Fließschema der Herstellung von Sprühmilchpulvern mit den wichtigsten mikrobiologischen Einflussfaktoren nach HELLER (1996) .....	12
<b>Abb. 3:</b>	Effekt der Inkubation bei 20 °C auf die Anzahl von zwei <i>Bacillus</i> - Spezies in aus Pulver rekonstituierten Säuglingsnahrungsmitteln, modifiziert nach CRIELLY et al. (1994) .....	61
<b>Abb. 4:</b>	Keimzahlen von der <i>Bacillus</i> -Spezies in einem nicht-aromatisierten Säuglingsnahrungspulver aus dem Einzelhandel nach Rekonstitution im Labor und Inkubation bei 20 °C und 26 °C, modifiziert nach CRIELLY et al. (1994) .....	62
<b>Abb. 5:</b>	Verwendung von Milch und Milchbestandteilen zur Herstellung einiger Trockenmilcherzeugnisse .....	68
<b>Abb. 6:</b>	Übersicht über die Probenverteilung innerhalb der Gruppe 1 (Produkte, die nur aus Milch oder Milcherzeugnissen hergestellt sind); n = 18 .....	69
<b>Abb. 7:</b>	Übersicht über die Probenverteilung innerhalb der Gruppe 2 (Produkte, die aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzt sind); n = 87 .....	70
<b>Abb. 8:</b>	Verlauf der aeroben mesophilen Keimzahl (GKZ) bei haushalts- üblicher Zubereitung und Behandlung von fünf verschiedenen Trockenmilcherzeugnissen in Abhängigkeit vom Untersuchungs- zeitpunkt ( $t_0$ bis $t_{24}$ in Stunden nach Rekonstitution) .....	116
<b>Abb. 9:</b>	Gehalt an <i>B. cereus</i> /g in drei verschiedenen Trockenmilch- erzeugnissen bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt ( $t_0$ und $t_{24}$ in Stunden nach Rekonstitution) .....	117
<b>Abb. 10:</b>	Gehalt an <i>B. cereus</i> /g in zwei verschiedenen Trockenmilch- erzeugnissen bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt ( $t_0$ und $t_{24}$ in Stunden nach Rekonstitution) .....	117
<b>Abb. 11:</b>	Beispiele für mittels des Duopath® Cereus Enterotoxins Test negativ getestete <i>Bacillus</i> spp. (links), Nhe-positive <i>Bacillus</i> spp. (Mitte) sowie Nhe- und Hbl-positive <i>Bacillus</i> spp. (rechts) .....	120

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
α	Alpha
β	Beta
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
a <sub>w</sub>	Activity of water, Wasseraktivität; für mikrobielle Aktivität in einem Milieu zur Verfügung stehende Flüssigkeit
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BCC	<i>Bacillus-cereus</i> -Chromogen Selektivnährboden
BCET-RPLA	<i>B. cereus</i> Enterotoxin (diarrheal type) Reversed Passive Latex Agglutination Kit
BDE-VIA	<i>Bacillus</i> Diarrheal Enterotoxin (BDE) Visual Immunoassay
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BPW	Buffered Peptone Water, gepuffertes Peptonwasser
bzw.	beziehungsweise
c	Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe, deren Werte über m oder zwischen m und M liegen
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton Agar
CGY-Bouillon	Caseinhydrolysat-Glucose-Hefeextrakt Bouillon Basis mit 1 % Glucose
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CytK	Cytotoxin K von <i>Bacillus cereus</i>
D <sub>100°C</sub>	Dezimale Reduktionszeit bei 100 °C; erforderliche Zeit in Minuten zur Reduzierung der Ausgangskeimzahl einer bestimmten Population von Mikroorganismen um 90 %

DFI	<i>Enterobacter-Sakazakii</i> -Chromogen Agar
DiätV	Verordnung über diätetische Lebensmittel
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECC	Selektiver <i>E. coli</i> /chromogener Coliformen Agar
EEB	<i>Enterobacteriaceae</i> -Enrichment-Broth
EFSA	European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
EG	Europäische Gemeinschaft
ELISA	Sandwich Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EN	Europäische Norm
ESIA	<i>Enterobacter-sakazakii</i> -Isolation Agar
et al.	et alii, und Mitarbeiter
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Welternährungsorganisation
FDA	U.S. Food and Drug Administration, Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten
Fett i. Tr.	Fett in der Trockenmasse
g	Gramm
GLISA	Gold Labelled ImmunoSorbent Assay
h	hora, Stunde
Hbl	Hämolysin BL von <i>Bacillus cereus</i>
H-Milch	haltbare Milch
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Hochleistungsflüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
ISO	International Organization for Standardization
JLU	Justus-Liebig-Universität
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
kDa	kiloDalton

kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LM	Lebensmittel
Log <sub>10</sub>	Logarithmus zur Basis 10
m	Schwellenwert
M	Grenzwert
max.	höchstens
mg	Milligramm
MilchErzV	Milcherzeugnisverordnung, Verordnung über Milcherzeugnisse
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mLST-Vancomycin	modifizierte Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon mit Vancomycin
mm	Millimeter
MYP	Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin Agar
n	Anzahl der Probeneinheiten einer Stichprobe; Anzahl der untersuchten Proben
n.b.	nicht bekannt
n.n.	nicht nachweisbar
N <sub>2</sub>	Stickstoff
ng	Nanogramm
Nhe	Nicht-hämolytisches Enterotoxin von <i>Bacillus cereus</i>
Nr.	Nummer
Ø	Durchschnitt, durchschnittlicher Gehalt
PC	Plate-Count Agar mit Magermilchzusatz
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau Agar

pH	Pondus Hydrogenii, negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration in Mol pro Liter
Pr.	Probe
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed, europäisches Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel
S.	Seite
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
t	Zeitpunkt der Untersuchung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UHT-Milch	ultraheißerhitzte Milch
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vgl.	vergleiche
VO	Verordnung
VRBG	Violet Red Bile Glucose Agar
vs.	versus, gegen
VTEC	Vero-Toxin bildende <i>Escherichia coli</i>
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 1 EINLEITUNG

Trockenmilcherzeugnisse finden sich in unterschiedlicher Form in einer Vielzahl von Lebensmitteln. Ein in den letzten Jahren stetig wachsender Bereich ist durch die Nachfrage nach als „gesundheitsfördernd“ oder „wohltuend“ beworbenen Produkten bedingt. Da auch unter Umständen sehr sensible Verbraucher Trockenmilcherzeugnisse konsumieren, ist die mikrobiologische Qualität der Erzeugnisse speziell für diese Konsumenten von großer Bedeutung.

Trockenmilcherzeugnisse werden immer wieder mit dem Vorkommen von potentiell pathogenen Keimen wie zum Beispiel *Enterobacter sakazakii* und *Bacillus cereus* in Verbindung gebracht. Die meisten bisher veröffentlichten Studien beziehen sich jedoch auf getrocknete Säuglingsnahrungsmittel; publizierte Daten zur mikrobiologischen Qualität von anderen Trockenmilcherzeugnissen sind, besonders im Bereich von aus mehreren Komponenten bestehenden Produkten, zurzeit kaum verfügbar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen Überblick über die mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen, die vor allem im Bereich „Wellness“, Convenience und Leistungsförderung angesiedelt sind, zu erhalten. Hierbei sollte unter Berücksichtigung einiger relevanter mikrobiologischer Parameter auch erörtert werden, ob und inwieweit unter Berücksichtigung der häuslichen Zubereitung ein Risiko für den Verbraucher gegeben sein könnte.

Da es sich bei der zu untersuchenden Produktpalette sowohl hinsichtlich ihrer Zusammensetzung bzw. Herstellungsweise als auch ihres Verwendungszweckes um eine sehr heterogene Gruppe unterschiedlichster Erzeugnisse handelt, sollte zudem eine Übersicht über allgemeine Charakteristika dieser oft relativ „neuen“ Produkte gegeben werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Trockenmilch, Trockenmilch- und Molkenerzeugnisse

#### 2.1.1 Allgemeines und Definitionen

Trockenmilch und Trockenmilcherzeugnisse werden zu der Übergruppe der Dauermilcherzeugnisse gezählt. Nach SPREER (1995) sind **Dauermilcherzeugnisse** „aus Milch, Sahne, Molke oder Erzeugnissen auf Milchbasis hergestellte Produkte, die durch Wärmezufuhr und meistens Wasserentzug haltbar gemacht wurden“. Die Herstellung von getrockneten, pulverförmigen Produkten wie Milch- und Molkepulvern sowie Trockenmilchzubereitungen geschieht mittels Trocknung der Ausgangsstoffe.

Unter dem Begriff der **Rekonstitution** wird das Wiederbefeuchten eines Trockenpulvers, meist mit der ursprünglichen Wassermenge, verstanden. **Instantisieren** bezeichnet Verfahren, die einem Trockenprodukt gute Wiederbefeuchtungseigenschaften verleihen. Dies kann in der Regel durch Agglomerieren der kleinen Pulverteilchen zu 1-3 mm großem Granulat erfolgen (KESSLER, 1996). Eine Auflistung weiterer relevanter Definitionen gibt Tabelle 1.

**Tab. 1:** Übersicht einiger Begriffsdefinitionen nach SPREER (1995)

Begriff	Bedeutung
Trockenmilch (Milchpulver)	aus molkereinmäßig bearbeiteter Milch oder Sahne über weitgehenden Wasserentzug durch Verdampfen und Verdunsten getrocknetes Erzeugnis; Wassergehalt $\leq 5\%$
Trockenmilcherzeugnisse	aus Milch, Sahne und Erzeugnissen auf Milchbasis hergestellt wie Trockenmilch; Wassergehalt $< 5\%$
Trockenmilchzubereitungen	Mischungen von Trockenmilch und/oder Trockenmilcherzeugnissen mit anderen Lebensmitteln; Milchtrockenmasse muss mind. 51 % betragen
Molke	Milchserum, das während der Herstellung von Käse nach Abscheiden des Käsestoffes (Casein) und des Fettes bei der Gerinnung der Milch anfällt, auch unter Verwendung von Lactase; Unterscheidung in Sauer- und Süßmolke
Sauermolke (Quarkmolke)	bei überwiegender Säureeinwirkung gewonnenes Milchserum, enthält Calciumlactat
Süßmolke (Labmolke)	bei der enzymatischen Fällung des Caseins gewonnenes Milchserum; im Wesentlichen frei von Calcium

Gemäß der Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung, MilchErzV) können zur Herstellung von Trockenmilcherzeugnissen auch mit Milchsäurebakterienkulturen, spezifischen Milchsäurebakterienkulturen (Joghurtkulturen) oder Kefirkulturen gesäuerte Milch oder Sahneerzeugnisse verwendet werden. Bei Verwendung als Zusatz zu Getränken können Milchzuckererzeugnisse bis zu 32 % des Gesamterzeugnisses zugesetzt werden. Weiterhin ist der Zusatz von Eiweiß, Mineralstoffen und Vitaminen möglich, sofern diese originär in Milch vorkommen. Darüberhinaus kann Lactose enzymatisch in Glucose und Galactose gespalten werden.

Eine Einteilung der Dauermilcherzeugnisse in Sorten erfolgt anhand der Ausgangsstoffe sowie - bei Trockenmilchprodukten - des Fettgehaltes. Nach Maßgaben der MilchErzV lassen sich unter anderem die in Tabelle 2 dargestellten Standardsorten unterscheiden.

**Tab. 2:** Einteilung einiger Trockenmilch- und Molkenerzeugnisse in Standardsorten nach MilchErzV, Anlage 1

Gruppe	Bezeichnung der Standardsorte	Besondere Merkmale	Fettgehalt in 100 Gewichtsteilen
Trockenmilch- erzeugnisse*	Milchpulver (Vollmilchpulver)	aus ungesäuerter Milch und/oder Sahneerzeugnissen	mind. 26,0
	Joghurtpulver	aus Joghurt	mind. 26,0
	Kefirpulver	aus Kefir	mind. 26,0
	Magermilchpulver	wie Vollmilchpulver	max. 1,5
	Buttermilchpulver	aus Buttermilcherzeugnissen, mit höchstens 7 % Wassergehalt	max. 15,0
Molken- erzeugnisse**	Süßmolkenpulver	durch weitgehenden Entzug des Wassers aus Süßmolke, mit höchstens 5 % Wasser, Gehalt an Milchzucker mindestens 70 %	-
	Sauermolkenpulver	durch weitgehenden Entzug des Wassers aus Sauermolke oder nachgesäuerter Süßmolke, mit höchstens 6 % Wasser, Gehalt an Milchzucker mindestens 60 %	-

\* Herstellung aller hier aufgeführten Trockenmilcherzeugnisse ohne Verwendung von Milchzuckererzeugnissen und Lactase; höchstens 5 % Wassergehalt

\*\* Herstellung der Molkenerzeugnisse auch unter Verwendung von Lactase

Ferner wird in Anlage 1 der MilchErzV **Milcheiweiß** definiert als „hergestellt aus entrahmter Milch nach Verfahren, die das Milcheiweiß in seiner Gesamtheit weitgehend von den übrigen Bestandteilen trennen; Eiweißgehalt mindestens 70 %, Wassergehalt höchstens 6 %, Aschegehalt höchstens 7 %, Milchzuckergehalt höchstens 15 %“. Als **Molkeneiweiß** werden hiernach Produkte bezeichnet, die hergestellt sind aus Süß- oder Sauermolke nach Verfahren, die das Molkeneiweiß anreichern. Im Endprodukt müssen folgende Vorgaben eingehalten werden: Eiweißgehalt mindestens 70 %, Wassergehalt höchstens 7 %, Aschegehalt höchstens 8 % und Milchzuckergehalt höchstens 15 %.

Unter dem Begriff der **diätetischen Lebensmittel** werden Lebensmittel für besondere Ernährungszwecke zusammengefasst. Hierunter fallen auch Lebensmittel für kalorienarme Ernährung zur Gewichtsverringerung. Diese Erzeugnisse sind als Ersatz für eine ganze Tagesration oder als Ersatz für eine oder mehrere Mahlzeiten im Rahmen der Tagesration bestimmt und weisen einen begrenzten Energiegehalt und eine besondere Zusammensetzung auf (Verordnung über diätetische Lebensmittel, DiätV).

## 2.1.2 Herstellung und Eigenschaften von Trockenmilcherzeugnissen

### 2.1.2.1 Übersicht über die Herstellungsweise von Trockenmilchpulvern

Die Herstellung von Milchpulver gliedert sich in mehrere Verfahrensschritte, welche sowohl die physikalische als auch die mikrobiologische Qualität des Enderzeugnisses beeinflussen. Die Herstellungsverfahren unterscheiden sich in der Art des Trocknens, wobei meistens Walzen- oder Sprüh- bzw. Zerstäubungstrocknung zum Einsatz kommen (SPREER, 1995). Heutzutage stellt die Sprühtrocknung die gebräuchlichste Methode dar, sie bietet verbesserte Löslichkeitseigenschaften der Endprodukte bei der Rekonstitution und wird - trotz einer geringeren mikrobiologischen Qualität der Erzeugnisse im Vergleich zur Walzentrocknung - bei der Produktion von Milchpulvern für Ernährungszwecke nahezu ausschließlich verwendet (LOVELL, 1983; HELLER, 1996; KESSLER, 1996; EARLY, 1998; ANONYM, 2008). Aus diesem Grund wird im Folgenden auf die Beschreibung anderer Trocknungsverfahren verzichtet.

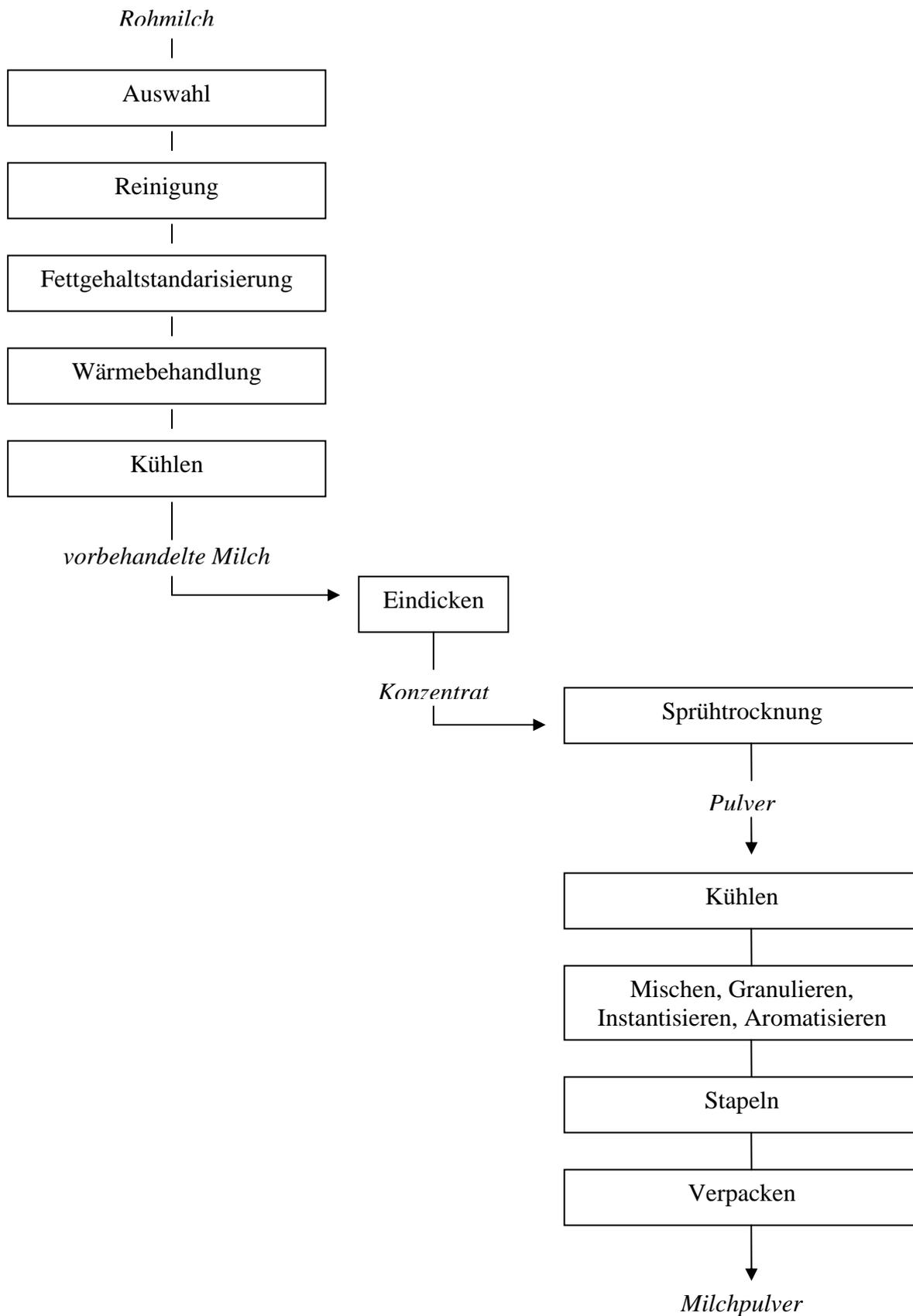
Nach SPREER (1995) werden folgende Schritte bei der Herstellung von Milchpulvern unterschieden: Milchauswahl und -vorbehandlung, Konzentratgewinnung, Homogenisieren, Trocknen und Verpacken. Bei der **Auswahl** der Rohmilch ist zunächst auf eine gute Casein-Stabilität gegenüber hohen Temperaturen (pH 6,4 bis 6,7) sowie einen möglichst geringen Gehalt an thermoresistenten Mikroorganismen und aeroben Sporenbildnern zu achten. Das **Reinigen** der Milch erfolgt zumeist mittels Zentrifugation in Separatoren; bei der Herstellung von Produkten mit besonders hoher Qualität erfolgt zusätzlich eine Baktufugation.

Die Ausgangsmilch wird vor der weiteren Verarbeitung bezüglich ihres Fettgehaltes eingestellt, sodass das Endprodukt nach Eindicken und Trocknen den gewünschten Wert aufweist (**Fettgehaltstandardisierung**). Die Vorbehandlung der Milch wird mit einem **Wärmebehandlungsverfahren** abgeschlossen. Hierzu werden zugelassene, möglichst schonende Pasteurisierungsmethoden verwendet.

Die **Konzentratgewinnung** erfolgt mittels Eindicken der vorbehandelten Milch in Eindampfanlagen und Einstellung auf eine Trockensubstanz von 40-50 %. Zur besseren Fettverteilung - besonders bei Vollmilchpulvern - erfolgt anschließend eine **Homogenisierung** des gewonnenen Konzentrats. Bei der folgenden **Sprühtrocknung** wird das Konzentrat in einem mit heißer Luft gefüllten oder durchströmten Raum (Trocknungsturm) fein vernebelt. Durch die so erzeugte Oberflächenvergrößerung gelingt ein rascher Austausch von Wärme und Feuchtigkeit und die Gewinnung von getrockneten Pulverteilchen. Die einströmende Trocknungsluft weist nach SPREER (1995) Temperaturen zwischen 170 °C und 250 °C auf, das Milchkonzentrat weniger als 100 °C. Nach HELLER (1996) beträgt die Temperatur der Eingangsluft 180 °C bis 240 °C, die der Milchpartikel 65-75 °C. Durch diese Temperaturdifferenzen wird eine schnelle und somit produktschonende Trocknung erzielt. Um Hitzedenaturierungen des Konzentrats zu vermeiden, kann der Trocknungsprozess mehrstufig erfolgen. Hierbei entstehen im Trocknungsturm als erster Stufe Agglomerate von Pulverteilchen die noch 10-20 % Feuchte, also nicht die angestrebte Endfeuchte, aufweisen. Diese werden in einem **Nachtrocknungsprozess** weiter stabilisiert und getrocknet. Dazu gelangen die Produktteilchen in ein dem Trocknungsturm nachgeschaltetes Vibrationsfließbett mit einem weniger heißen Luftstrom. Gleichzeitig können in den Nachtrocknungseinrichtungen verschiedene Vorgänge wie **Mischen**, **Granulieren**, **Instantisieren** und **Aromatisieren** der Agglomerate erfolgen. In einer dritten Bearbeitungsstufe, auch **Endtrocknungszone** genannt, wird Warmluft mit Temperaturen von weniger als 100 °C eingeleitet und so das Pulver auf seinen Endfeuchtegehalt eingestellt. Abschließend wird das fertige Produkt durch Zuführen entfeuchteter Kaltluft in einem separaten **Kühlbereich** abgekühlt.

Das **Verpacken** des Pulvers kann entweder sofort oder nach Zwischenlagerung in Siloanlagen erfolgen. Für den Versand werden mit Kunststoff ausgekleidete Behältnisse verwendet, deren Kopfräume zudem mit inerten Gasen ( $N_2$ ,  $CO_2$ ) befüllt werden können, um vorhandenen Luftsauerstoff zu verdrängen. Eine schematische Übersicht über die Herstellungsweise von Milchpulvern mittels Sprühtrocknung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Für die Herstellung von Molkenpulvern ist es nach SPREER vorteilhaft, Lab- und Quarkmolke getrennt voneinander und möglichst frisch zu verarbeiten. Um einem schnellen Verderb der Molke vorzubeugen, kann durch sofortiges Kühlen auf  $< 4\text{ °C}$  eine Lagerung bis zu 24 Stunden ermöglicht werden. Wärmebehandeln bei  $71\text{-}74\text{ °C}$  für mindestens 15 Sekunden sowie Zugabe von Konservierungsstoffen nach dem Entrahmen sind weitere Möglichkeiten der Qualitätsstabilisierung. Ist eine Entrahmung erforderlich, hat diese direkt nach dem Gewinnen der Molke, noch vor einer eventuellen Kühlung, zu erfolgen. Hierbei kommen spezielle Separatoren zum Einsatz, mit deren Hilfe Eiweiß und Fette vom Rahm getrennt werden. Ist eine Rückgewinnung von Casein-Feinstoffen, die als Agglomerate nach dem Trennen von Käsebruch und Molke im Käsefertiger in der Molke verblieben sind gewünscht, kann diese mittels Hydrozyklonen oder Siebtrennung erfolgen. Die so vorbehandelte Molke wird zunächst durch Eindampfen in Fallstromverdampfern oder durch Membranfiltration konzentriert und dabei auf eine Trockensubstanz von zumeist 40-60 % eingestellt. Frisches Molkenkonzentrat wird vor dem Trocknen bei  $30\text{ °C}$  etwa sechs bis acht Stunden unter ständigem Rühren vorkristallisiert. Anderenfalls würde die bei hoher Konzentrierung vorliegende übersättigte Lactoselösung zur Entstehung von stark hygroskopischen Pulvern führen. Die Herstellung von hochwertigen Molkenpulvern mittels Sprühtrocknung erfolgt analog der Milchpulverherstellung, eine Instantisierung ist möglich.



**Abb.1** : Schematische Darstellung der Milchpulvererzeugung (nach SPREER, 1995)

### 2.1.2.2 Bedeutung und Verwendung von Trockenmilcherzeugnissen

Die Herstellung von pulverförmigen Milch- und Molkenerzeugnissen bietet mehrere Vorteile. Die Produkte werden in eine leichte und unter Umgebungstemperaturen lagerfähige Form überführt (KESSLER, 1996). Die Haltbarkeit verlängert sich (mindestens vier Wochen ungekühlt) und wichtige Inhaltsstoffe werden konserviert. Durch Hitze einwirkung aktivierte Sulfhydrylgruppen vermindern die Oxidation von Fetten sowie geschmackliche Veränderungen. Neben der wirtschaftlichen Bedeutung z.B. für die industrielle Herstellung verschiedener Lebensmittel, sowie unter Verpackungs- und Lagerungsaspekten, spielen Milchpulver auch im Welthandel eine wichtige Rolle. Aufgrund ihres geringen spezifischen Gewichts und der guten Rekonstituierbarkeit werden sie unter anderem im Falle von Hungersnöten zur Versorgung mit Proteinen eingesetzt (HELLER, 1996; EARLY, 1998). Nach EARLY (1998) ist Trocknen eine der wichtigsten Methoden zur Konservierung von Milch. Bereits der Entdecker Marco Polo beschrieb die Herstellung von sonnengetrocknetem Milchpulver aus Magermilch (LOVELL, 1983). Im Jahre 1915 wurde in der englischen Zeitschrift „The Lancet“ postuliert, dass, sofern Vorkehrungen gegen eine Rekontamination von Kondensmilch und getrockneten Milchprodukten getroffen würden, diese bezüglich ihrer bakteriologischen Qualität sicherer eingesetzt werden könnten als rohe Milch (ANONYM, 1915).

Einsatzgebiete für Milch- und Molkenpulver im Bereich der Lebensmittelindustrie sind z.B. Instantpulver für eine Rekonstitution von Trinkmilch und Molkengeränten, Speiseeisherstellung, Säuglingsfertiernahrung, Kaffeezusatz, Back- und Süßwaren, Schokolade, Fleisch- und Wurstwarenherstellung, diätetische Produkte und Sportlernahrungen (GRAVERT, 1983; SPREER, 1995; HELLER, 1996; ANONYM, 2008).

Die Lebensmittelindustrie wird von dem Wunsch der Verbraucher nach gesunder Ernährung und Wohlbefinden beeinflusst. Hierbei sind Geschmack, Nährwert, Sicherheit, Qualität, Verderblichkeit, Verpackung und Verbraucherfreundlichkeit des Erzeugnisses von Interesse (DUNCAN, 1998).

### 2.1.2.3 Mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen in Abhängigkeit von der Verarbeitung

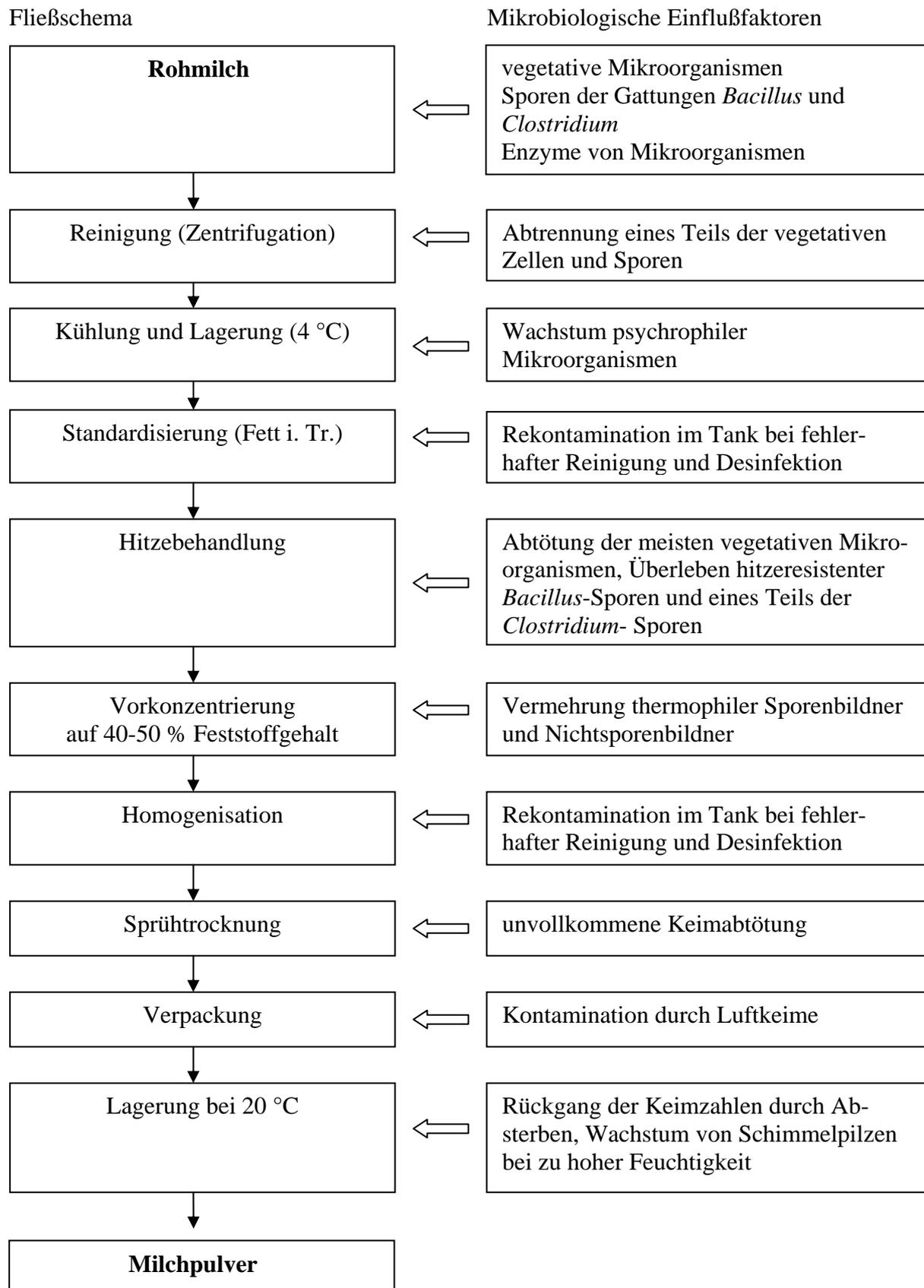
Die mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen ist in Abhängigkeit von ihrer Verarbeitung zu betrachten. Durch die bei der Herstellung von pulverförmigen Milch- und Molkenprodukten angewendeten schonenden Verfahren (vgl. Kapitel 2.1.2.1) werden vorhandene Mikroorganismen nicht sicher abgetötet. Die in den Trockenmilcherzeugnissen schließlich noch vorhandenen Mikroorganismen sind gegebenenfalls nur subletal geschädigt und können sich durch nachträgliche Wasserzufuhr erholen. Dies kann bei unsachgemäßer Lagerung oder Fehlern im Umgang zu Risiken durch Verderb und Lebensmittelvergiftungen führen (KRÄMER, 2002a). Da eine Keimfreiheit nicht gewährleistet werden kann, ist die mikrobiologische Qualität der zur Trocknung verwendeten Rohmilch die wichtigste Einflussgröße auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Endproduktes (LOVELL, 1983; HELLER, 1996). Sowohl Anzahl als auch Art der in der Ausgangsmilch vorhandenen Mikroorganismen sowie nachträgliche Kontaminationen sind von Bedeutung (CELESTINO et al., 1997).

Die Belastung von Milch und Milcherzeugnissen mit Mikroorganismen kann auf unterschiedliche Weise entstehen. Bei der primären (sekretorischen) Kontamination werden die Erreger bereits mit der Milch ausgeschieden; bei der sekundären Kontamination gelangen Keime bei oder nach dem Melken in die Milch. Als klassisches Beispiel für eine sekundäre Kontamination kann der Eintrag von aeroben Sporenbildnern wie *Bacillus*-Arten aus Einstreu, Heu, Kuhkot, Staub, Niederschlägen und ungenügend gereinigten Gerätschaften am Ort der Milchgewinnung betrachtet werden (KIELWEIN, 1994b). Tertiäre Kontaminationen (Rekontaminationen) erfolgen durch nach der Wärmebehandlung in die Milch gelangende, zumeist vom Menschen abstammende Erreger. Hierbei treten besonders *Enterobacteriaceae* in den Vordergrund (KIELWEIN, 1994a; KIELWEIN, 1994b).

Die Überlebensfähigkeit der einzelnen Gruppen von Mikroorganismen im Hinblick auf die Herstellungsprozesse bei der Produktion von Trockenmilcherzeugnissen ist unterschiedlich und erklärt die abweichende Form der (Re-)Kontamination. So sind hitzeresistente Mikroorganismen wie z.B. aerobe Sporenbildner im Gegensatz zu *Enterobacteriaceae* widerstandsfähig gegenüber Pasteurisierungsverfahren; sie überstehen nach LOVELL (1983) teilweise sogar Eingangs-Lufttemperaturen im Sprühturm von mehr als 200 °C. Anaerobe Sporenbildner hingegen finden, auch nach Rekonstitution, kaum geeignete Lebensbedingungen. Als Rekontaminanten nach der Wärmebehandlung können prinzipiell alle Arten von Bakterien auftreten.

Bei der Herstellung von Trockenmilcherzeugnissen mittels Sprühtrocknung werden also Arbeitsschritte durchgeführt, die geeignet sind, einen Teil der vorhandenen Mikroorganismen zu inaktivieren (Abbildung 2). Im Zuge der Reinigung und besonders der Baktofugation der Rohmilch werden Sporen reduziert, während durch die Wärmebehandlungsverfahren vor allem vegetative Keime wie *Enterobacteriaceae* abgetötet werden. Nach Gewinnung des Konzentrates ist aufgrund des deutlich verminderten  $a_w$ -Wertes eine Reduktion der Wachstumsfähigkeit erreicht. Schließlich sind die Wärmebehandlungsverfahren bei Konzentrierung und Trocknung des Erzeugnisses für eine weitere Verringerung der Keimbelastung geeignet. Rekontaminationen der Milch bzw. des Milchtrockenerzeugnisses können jedoch auf allen Verarbeitungsstufen aufgrund z.B. fehlerhafter Reinigung und Desinfektion erfolgen (HELLER, 1996).

Nach LOVELL (1983) sind vor allem Vorgänge, bei denen die Milch bzw. das Trockenmilcherzeugnis Kontakt zu Luft, Wasser oder den Mitarbeitern der Fabrik ausgesetzt ist, riskant im Hinblick auf mikrobielle Verunreinigungen. Während des Herstellungsprozesses durchläuft das Produkt zudem Temperaturbereiche, die mikrobielles Wachstum fördern können. Weiterhin stellen Nachbearbeitungsschritte wie die Instantisierung und insbesondere das Mischen des Pulvers mit anderen, unter Umständen kontaminierten Zutaten, mikrobiologische Risikofaktoren dar. Das hygroskopische Endprodukt schliesslich muss vor Feuchtigkeit geschützt gelagert werden, um das Wachstum von Schimmelpilzen und die Aktivierung von mikrobiellen Enzymen zu vermeiden (HELLER, 1996; FEHLHABER et al., 2005b).



**Abb. 2:** Fließschema der Herstellung von Sprühmilchpulvern mit den wichtigsten mikrobiologischen Einflussfaktoren nach HELLER (1996).

Die wichtigsten in Trockenmilcherzeugnissen vorhandenen Mikroorganismen stellen coliforme Keime und *Escherichia coli* als Hygieneindikatoren sowie pathogene Keime wie z.B. *Salmonella* spp., *Enterobacter sakazakii* und *Bacillus cereus* dar (LOVELL, 1983; EARLY, 1998; FEHLHABER et al., 2005b). Auf sie wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. Der Eintrag von *Staphylococcus aureus* in Trocknungsanlagen über Kontakt des Pulvers mit Umgebungsluft, Gerätschaften, Personal und Schädlingen (LOVELL, 1983; EARLY, 1998) ist zwar ebenfalls problematisch, spielt aber nach FEHLHABER et al. (2005b) aufgrund technischer Weiterentwicklungen heute keine Rolle mehr. Allerdings zeigte ein Krankheitsausbruch durch Staphylococcal Enterotoxin A in Japan, dass ein Gesundheitsrisiko nicht generell auszuschliessen ist (ASAO et al., 2003).

Ein klassisches Problem einer mikrobiellen Kontamination von Milch und Milcherzeugnissen stellen Salmonellen in Milchpulverwerken dar. Hierbei bieten Trockenmilch erzeugende Betriebe den einmal eingeschleppten Keimen nicht nur günstige Überlebensbedingungen sondern sind zudem schwer zu dekontaminieren. Der Eintrag der Salmonellen erfolgt vor allem über die Sprühtrocknungsanlagen, die inhomogene Verteilung der Erreger im Endprodukt erschwert den Nachweis (EARLY, 1998; FEHLHABER et al., 2005b). Seit Jahrzehnten wird die Kontrolle der Erzeugnisse durch verschiedene Untersuchungsvorgaben und Maßnahmen geregelt und wenn auch die Salmonellen nicht eliminiert werden konnten, so ist die Kontaminationsrate doch zurückgegangen. Häufiger aber dennoch in geringen Mengen sind andere *Enterobacteriaceae* und aerobe Sporenbildner in Trockenmilcherzeugnissen zu finden.

Aufgrund der circa zehnfachen Aufkonzentrierung der Ausgangsmilch bei der Herstellung von Trockenmilcherzeugnissen erfolgt eine Verdichtung der Keimzahlen während des Produktionsvorganges (HAMMER et al., 2001; RÜCKERT et al., 2004), wobei jedoch durch Mischen der Pulver mit anderen Zutaten im Rahmen der Weiterverarbeitung ebenso eine Verdünnung resultieren kann (HAMMER et al., 2001). Eine Rekonstitution der Pulver und Lagerung bei Raumtemperatur kann zur Germination vorhandener Endosporen und nachfolgender Proliferation vegetativer Zellen mit eventueller Toxinbildung führen (REYES et al., 2007).

Nach HELLER (1996) ist eine Kontamination von Trockenmilcherzeugnissen mit Krankheitserregern oder Toxinbildnern besonders kritisch zu sehen, da bei Rekonstitution mit warmem Wasser eine Vermehrung der Mikroorganismen über eine kritische Grenze hinaus erfolgen kann. Weiterhin können hitzestabile Toxine die Trocknungstemperaturen überstehen, während die Toxinproduzenten abgetötet werden. So schliesst die Nicht-Nachweisbarkeit von Krankheitserregern im fertigen Produkt die Gefahr einer Lebensmittelvergiftung nicht aus. In jedem Fall kann die Belastung von Milchpulvern mit Krankheitserregern besonders bei Anwendung ohne weitere Erhitzung verheerende Folgen haben (EARLY, 1998). Besonders immunschwache und ältere Personen sowie durch gesundheitliche Probleme geschwächte Patienten haben ein erhöhtes Risiko, schwer an durch Lebensmittel übertragenen Krankheiten zu erkranken (OLSVIK et al., 1991; ANONYM, 2004a). Nur ein geringer Anteil aller Krankheitsausbrüche kann auf kommerzielle Erzeugnisse zurückgeführt werden, maßgebend ist zumeist unsachgemäßer Umgang mit den Lebensmitteln (ANONYM, 2004a).

### 2.1.3 Rechtliche Anforderungen an die mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen

Bezüglich der Anforderungen an die mikrobiologische Qualität von Trockenmilcherzeugnissen gilt nach den Bestimmungen des europäischen Lebensmittelrechts zunächst, dass zur Herstellung von Milcherzeugnissen verwendete rohe Kuhmilch unmittelbar vor der Verarbeitung bei 30 °C eine Keimzahl von weniger als 300.000 Kolonie bildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter aufweisen muss. Ein spezifischer Nachweis von einzelnen Erregern oder Erregergruppen in Rohmilch zur oben genannten Verwendung ist nicht gesetzlich vorgeschrieben. Die verwendete Milch muss, wenn sie nicht unmittelbar nach dem Melken oder innerhalb von vier Stunden nach der Anlieferung verarbeitet wird, auf eine Temperatur von mindestens 6 °C gekühlt werden. Verarbeitete Kuhmilch darf zur Herstellung von Milcherzeugnissen bei 30 °C eine Keimzahl von höchstens 100.000 KbE/ml aufweisen (Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs, VO (EG) Nr. 853/2004). Die Pasteurisierung muss die Wirksamkeit der Verfahren für Kurzzeiterhitzung (mind. + 72 °C für 15 Sekunden) bzw. Dauererhitzung (+ 63 °C für 30 Minuten) erfüllen (Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene, VO (EG) Nr. 852/2004).

Für Trockenmilcherzeugnisse sind eine Reihe von mikrobiologischen Kriterien gemäß der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (VO (EG) Nr. 2073/2005) festgelegt. Demnach dürfen Lebensmittel im Allgemeinen keine Mikroorganismen oder deren Toxine oder Metaboliten in Mengen enthalten, die ein für die menschliche Gesundheit unannehmbares Risiko darstellen. Einen Überblick über die konkreten, für pulverförmige Milchprodukte relevanten Grenzwerte der Verordnung gibt Tabelle 3.

**Tab. 3:** Auszug aus der VO (EG) Nr. 2073/2005, Anhang I, Kapitel 1 + 2  
(Stand: Änderungsverordnung Verordnung (EG) Nr. 1441/2007)

Lebensmittelkategorie	Mikroorganismen	Probenahmeplan		Grenzwerte	
		n	c	m	M
Verzehrfertige LM für Säuglinge oder besondere medizinische Zwecke*	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	in 25 g n.n.	
Verzehrfertige LM, die die Vermehrung von <i>L. monocytogenes</i> begünstigen können**	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 KbE/g	
Käse, Milch- und Molkepulver	Staphylokokken-Enterotoxine	5	0	in 25 g n.n.	
Milch- und Molkepulver	<i>Salmonella</i>	5	0	in 25 g n.n.	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10 KbE/g	
	Koagulasepositive Staphylokokken	5	2	10 KbE/g	100 KbE/g
Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung***	<i>Enterobacter sakazakii</i>	30	0	in 10 g n.n.	
	Präsumtiver <i>Bacillus cereus</i>	5	1	50 KbE/g	500 KbE/g

n.n. nicht nachweisbar

\* Verzehrfertige Lebensmittel, die für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmt sind

\*\* andere als für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmte verzehrfertige Lebensmittel, die die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* begünstigen können

\*\*\* getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind

Die in Tabelle 3 aufgeführten Vorschriften bezüglich *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* sind den Lebensmittelsicherheitskriterien zuzuordnen und gelten für in Verkehr gebrachte Erzeugnisse während der Haltbarkeitsdauer. Die Testergebnisse geben Auskunft über die mikrobiologische Qualität des Erzeugnisses und sind befriedigend, wenn alle Werte auf das Nichtvorhandensein des jeweiligen Erregers hinweisen. Die Vorschriften für *Salmonella* gelten nicht, wenn nachgewiesen ist, dass aufgrund des  $a_w$ -Wertes des Erzeugnisses kein Salmonellenrisiko besteht. Die Bestimmungen zu *Enterobacteriaceae* und Koagulase-positiven Staphylokokken gehören den Prozesshygienekriterien an und gelten bei Untersuchung am Ende des Herstellungsprozesses. Sie gelten nicht für Milch- und Molkenpulver, die zur weiteren Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt sind.

Somit ist für Milch- und Molkenpulver für den direkten Verzehr derzeit nur anhand des Salmonellen-Nachweises ein Lebensmittelsicherheitskriterium definiert, eine Festlegung bezüglich anderer pathogener Keime wie *Enterobacter sakazakii* und *Bacillus cereus* ist nur in einem kleinen Bereich der Trockenmilcherzeugnisse (Säuglingsnahrung) gegeben. Die rechtlichen Bestimmungen für das Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* existieren derzeit ausschließlich für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind. Hierbei wird der Mikroorganismus den Lebensmittelsicherheitskriterien zugeordnet und darf bei keiner der 30 Probeneinheiten der Stichprobe in 10 g nachweisbar sein. Bezüglich des Nachweises von präsumtiven *Bacillus cereus* als Prozesshygienekriterium wurden ebenfalls Grenzwerte für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, festgesetzt. Hierbei darf eine von fünf Probeneinheiten der Stichprobe Werte zwischen 50 KbE/g und 500 KbE/g aufweisen (VO (EG) 1441/2007).

## 2.2 *Enterobacteriaceae*

### 2.2.1 Allgemeines

Die Familie der *Enterobacteriaceae* stellt eine Untergruppe der fakultativ anaeroben, Gram-negativen Stäbchenbakterien dar. Bis auf wenige Ausnahmen sind alle Vertreter Oxidase-negativ, Katalase-positiv und reduzieren Nitrat zu Nitrit. Die Bakterien dieser Gruppe bilden keine Endosporen, sind 0,3-1,0 x 1,0-6,0 µm groß und durch peritriche Begeißelung beweglich oder unbeweglich. Es sind bisher 44 Gattungen und mehr als 176 Spezies und Subspezies innerhalb der Familie bekannt (BRENNER & FARMER III, 2005).

Nach BRENNER & FARMER III (2005) und HOLT (1994a) erstreckt sich das Vorkommen der *Enterobacteriaceae* weltweit über Erdboden, Wasser, Früchte, Eier, Gemüse, Getreide, Zierpflanzen und -bäume sowie den Darmtrakt von Tieren und Menschen. Vertreter der Familie bilden einerseits den Großteil der normalen Intestinalflora des Menschen, andererseits sind sie für über 50 % aller nosokomialen Infektionen verantwortlich. Man unterscheidet obligat pathogene Vertreter, welche zumeist Durchfallerkrankungen auslösen, von fakultativ pathogenen Keimen.

Als obligat pathogen gelten Spezies der Gattungen *Salmonella* und *Shigella* sowie die Arten *Yersinia pestis* und *Yersinia pseudotuberculosis*. Fakultativ pathogene Gattungen sind z.B. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia*, *Edwardsiella* und *Yersinia*. Viele der pathogenen Spezies können extraintestinale Erkrankungen wie Sepsis, Meningitis, Harnwegs- und Wundinfektionen verursachen (FARMER & KELLEY, 1991; KRÄMER, 2002c; BRENNER & FARMER III, 2005). In Lebensmitteln vorkommende *Enterobacteriaceae* können besonders bei immunsupprimierten Konsumenten als opportunistische Pathogene fungieren (LINDBERG et al., 1998). Weitere bedeutsame Faktoren sind der Ernährungszustand und die Infektionsdosis (OLSVIK et al., 1991).

Als sogenanntes „Prozesshygienekriterium“ stellen *Enterobacteriaceae* Markerorganismen für die mikrobielle Verunreinigung eines Lebensmittels dar. Sie sind Indikatoren für mangelhafte Verarbeitungs- und Betriebshygiene sowie Lagerung und werden in der VO (EG) Nr. 1441/2007 als Prozesshygienekriterien aufgeführt. Darüber hinaus weist *Escherichia coli* Indexkeim-Charakter für potentielle Gesundheitsgefährdungen, die von dem untersuchten Lebensmittel ausgehen können, auf (FEHLHABER et al., 2005a; VO (EG) Nr. 1441/2007). Während das Vorkommen von *Escherichia coli* charakteristisch für fäkale Verunreinigungen ist, muss der allgemeine Nachweis von coliformen Keimen in dieser Hinsicht kritisch betrachtet werden, da sie im Zusammenhang mit Milcherzeugnissen in der Regel nicht nur fäkalen Ursprungs sind. Unter dem Begriff der coliformen Keime werden die Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter* zusammengefasst, welche bei Temperaturen von 30 °C und 37 °C Lactose unter Gas- und Säurebildung spalten. (OLSVIK et al., 1991; FEHLHABER et al., 2005a; DAUERER, 2008a).

*Enterobacteriaceae* bauen Kohlenhydrate zu Säuren und Gas ab und führen so zum Verderb von Lebensmitteln. Einige Arten können darüber hinaus proteolytisch wirken (HOLT, 1994a; KRÄMER, 2002d; DAUERER, 2008a). Die meisten Spezies sind mesophil und zeigen gutes Wachstum bei 37 °C. Für einige Vertreter ist besseres Wachstum bei 25-30 °C nachgewiesen, bei diesen Temperaturen liegt häufig auch eine höhere metabolische Aktivität vor (HOLT, 1994a; KRÄMER, 2002d). Einzelne psychrotrophe Arten sind in der Lage, sich auch in gekühlten Lebensmitteln zu vermehren (LINDBERG et al., 1998). *Enterobacteriaceae* überleben Pasteurisierungsverfahren nicht (KIELWEIN, 1994b; DAUERER, 2008a), dennoch kann die Produktion von hitzestabilen extrazellulären Enzymen zu Lebensmittelverderb führen (COUSIN, 1982). Tabelle 4 gibt einen Überblick über verschiedene für den Lebensmittelbereich wichtige Gattungen und Spezies aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, deren Vorkommen sowie Bedeutung.

**Tab. 4:** Die Familie der *Enterobacteriaceae*: ausgewählte Vertreter, deren Vorkommen und Bedeutung (FEHLHABER et al., 2005a)

Genus	Spezies-Beispiele	Reservoir	Bedeutung
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> , <i>amalonaticus</i> , <i>koseri</i>	Darmkanal	Durchfallerkrankungen durch Verotoxine von <i>C. freundii</i> beschrieben, nicht alle Stämme pathogen
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i> , <i>hoshinae</i>	Darmkanal	<i>E. tarda</i> soll zu Durchfallerkrankungen führen
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i> , <i>cloacae</i> , <i>sakazakii</i>	Pflanzen	Verderb von Lebensmitteln
<i>Erwinia</i>	<i>carotovora</i> , <i>amylovora</i>	Pflanzen	Verderb pflanzlicher Lebensmittel durch Pectinabbau
<i>Escherichia</i>	wichtigste Spezies: <i>E. coli</i>	Darmkanal	Verderb von Lebensmitteln, Hygieneindikator, „Lebensmittelvergiftungen“ (verschiedene Serovare)
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>	Darmkanal, Erdboden, Wasser	Verderb eiweißreicher Lebensmittel, Histaminbildung bei Fischen
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> , <i>oxytoca</i>	Darmkanal von Mensch u. Tier	Verderb von Lebensmitteln, <i>Kleb. pneumoniae</i> ist pathogen
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	Erdboden, Wasser, Darmkanal	Verderb eiweißreicher Lebensmittel
<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i> , <i>dispersa</i>	weit verbreitet in der Natur	Verderb von Frischfleisch ( <i>P. agglomerans</i> )
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i> , <i>mirabilis</i> , <i>myxofaciens</i>	Erdboden, Wasser, Darmkanal	Verderb eiweißreicher Lebensmittel
<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i> , <i>stuartii</i>	Erdboden, Wasser, Darmkanal	Verderb eiweißreicher Lebensmittel
<i>Salmonella</i>	über 2000 Serovare	Darmkanal	Infektionen ( <i>S. typhi/paratyphi</i> ), „Lebensmittelvergiftung“
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	Pflanzen, Erdboden, Darmkanal	Verderb tierischer Lebensmittel
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> , <i>flexneri</i>	Darmkanal	Durchfallerkrankungen
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i> , <i>pestis</i> , <i>pseudotuberculosis</i>	Darmkanal	„Lebensmittelvergiftung“ durch <i>Yer. enterocolitica</i>

Im Jahre 2007 wurden nach Angaben der European Food Safety Authority (EFSA) in 22 europäischen Mitgliedsstaaten 2201 Salmonellen-Ausbrüche gemeldet, wobei das Serovar *Salmonella* Enteritidis am häufigsten ermittelt wurde. Salmonellen-Infektionen stellten somit die häufigste gemeldete Ursache lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche dar, die Mehrzahl der Fälle wurde allerdings mit Eiern und Eierzeugnissen in Zusammenhang gebracht. Milchprodukte ausser Käse waren in 3 % der Fälle beteiligt. Weiterhin wurden 65 von pathogenen *Escherichia coli* verursachte Ausbrüche (14 Mitgliedsstaaten) gemeldet, eine Beteiligung von Milchprodukten wurde in 4,2 % der Fälle angegeben. Von sieben Mitgliedsstaaten wurden insgesamt 22 *Yersinia*-Ausbrüche übermittelt, wobei kein Zusammenhang mit Milchprodukten bestand. Meldungen bezüglich Ausbrüchen von *Enterobacter* spp. (2 Ausbrüche; 1 Mitgliedsstaat), *Citrobacter* spp. (1;1) sowie *Shigella* spp. (13;8) waren selten und standen ebenfalls nicht im Zusammenhang mit Milchprodukten (EFSA, 2009).

Rechtliche Bestimmungen für das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* und speziell von Salmonellen in Milch- und Molkenpulvern sind durch die VO (EG) Nr. 1441/2007 gegeben (vgl. Kap. 2.1.3).

### 2.2.2 *Enterobacter sakazakii*

Innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* ist dem Vertreter *Enterobacter sakazakii* eine besondere Bedeutung beizumessen. Der zuvor als "gelb pigmentierter *Enterobacter cloacae*" bekannte Keim wurde 1980 von FARMER et al. aufgrund molekulargenetischer und phänotypischer Eigenschaften als eigene Spezies innerhalb der Gattung *Enterobacter* eingeordnet und zu Ehren des japanischen Bakteriologen Riichi Sakazaki benannt. Dabei wurde unter anderem eine genotypische Verwandtschaft von 41 % mit *Citrobacter freundii* sowie 51 % mit *Enterobacter cloacae* festgestellt. In seiner phänotypischen Ausprägung ähnelt der Keim am ehesten der Morphologie von *Enterobacter cloacae*. Aufgrund der geno- und phänotypischen Diversität von *Enterobacter sakazakii* wurde von IVERSEN et al. (2007) eine taxonomische Reklassifizierung als neues Genus *Cronobacter* vorgeschlagen. Diese neue Nomenklatur hat sich zwar mittlerweile weitgehend durchgesetzt, wobei zu beachten ist, dass hier *Enterobacter sakazakii* korrekterweise als *Cronobacter* spp. bezeichnet werden muss, da

*Cronobacter sakazakii* nur eine von mehreren „neuen“ Spezies aus der „alten“ Spezies *Enterobacter sakazakii* ist und da aufgrund der üblichen biochemischen Merkmale eine weitere Differenzierung nicht möglich ist. In dieser Arbeit wird jedoch der Name *Enterobacter sakazakii* beibehalten, zum einen weil die verwendete Methode auf diese alte Spezies optimiert ist und keine weitere Differenzierung zulässt, zum anderen da die einschlägigen Rechtsvorschriften sich auf *Enterobacter sakazakii* beziehen.

*Enterobacter sakazakii* kommt ubiquitär vor und wird als opportunistischer Krankheitserreger eingestuft. Aufgenommen mit kontaminierter pulverförmiger Säuglingsnahrung auf Milchbasis ist er in der Lage lebensgefährliche Erkrankungen, insbesondere Meningitis, Septikämie und nekrotisierende Enterokolitis mit bleibenden Gesundheitsschäden bei Säuglingen und Kleinkindern auszulösen (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997c; IVERSEN & FORSYTHE, 2003; KANDHAI et al., 2004; LEHNER & STEPHAN, 2004; ANONYM, 2007b; FRIEDEMANN, 2008). Aufgrund weltweiter Krankheitsausbrüche, der Schwere der Infektionen und Produktrücknahmen wurde die Problematik ins Bewusstsein der Öffentlichkeit gerufen (IVERSEN & FORSYTHE, 2003). Die Angaben zur Mortalitätsrate von durch *Enterobacter sakazakii* ausgelösten Erkrankungen variieren. Bezüglich der nekrotisierenden Enterokolitis bei Säuglingen und Kleinkindern wird eine Mortalität von 10 % bis 55 %, bezüglich Meningitis von 40 % bis 80 % angegeben (IVERSEN & FORSYTHE, 2003; BOWEN & BRADEN, 2006). Die Anzahl der veröffentlichten Fälle von neonatalen Infektionen mit *Enterobacter sakazakii* ist mit weniger als 100 Fällen in der Literatur beschrieben (ANONYM, 2007a; FRIEDEMANN, 2008). Die im Jahr 2007 verzeichnete Zunahme von im europäischen Schnellwarnsystem für Lebens- und Futtermittel (RASFF) gemeldeten, mit *Enterobacter sakazakii* kontaminierten Säuglingsnahrungsmitteln ist nach FRIEDEMANN (2008) Folge der Umsetzung der VO (EG) Nr. 2073/2005. Wünschenswert wäre eine schnelle Berichterstattung über Infektionsfälle aus der Praxis, um die Sammlung von Daten zu vervollständigen und offene Fragen zu klären. Zu diesem Schluss kommen auch BOWEN & BRADEN (2006).

Obwohl *Enterobacter sakazakii* in unterschiedlichsten Nahrungsmitteln vorkommen kann, standen die bisher berichteten Krankheitsfälle nur mit kontaminierten Säuglingsnahrungen in Zusammenhang. Erkrankungen bei erwachsenen Patienten sind zumeist postoperativer Natur und zeigen deutlich mildere Verläufe, es wurden bisher keine Infektionen bei immu-

kompetenten Personen beschrieben (LAI, 2001; LEHNER & STEPHAN, 2004; ANONYM, 2004b; FRIEDEMANN, 2008).

*Enterobacter sakazakii* überlebt Pasteurisierungsverfahren nicht (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997a; BREEUWER et al., 2003; KANDHAI et al., 2004); in einer Studie von ARKU et al. (2008) wurde jedoch für vier Stämme experimentell nachgewiesen, dass sie den Prozess der Sprühtrocknung überstehen. Durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die intrazelluläre Ansammlung von Trehalose, erlangen *Enterobacter sakazakii*-Zellen im Zustand der stationären Phase größere Widerstandsfähigkeit gegenüber osmotischem Stress und Austrocknung als andere *Enterobacteriaceae*. Das Vermögen, bei Temperaturen bis zu 47 °C zu wachsen, sowie die Ausbildung von Biofilmen verleiht dem Bakterium zusätzlich eine gute Anpassung an das Überleben in Trocknungsanlagen (BREEUWER et al., 2003; FRIEDEMANN, 2008).

Die Herkunft von im Endprodukt vorgefundenen Keimen ist auf einen Eintrag über hitzelabile Zutaten wie Vitaminmischungen (intrinsische Kontamination), die Produktionsumgebung sowie Verpackungs- oder Zubereitungsprozesse (extrinsische Kontamination) zurückzuführen (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997a; BREEUWER et al., 2003; KANDHAI et al., 2004; ARKU et al., 2008; FRIEDEMANN, 2008). Hierbei kommt auch die Übertragung durch Ratten und Fliegen als Kontaminationsquelle in Betracht (IVERSEN & FORSYTHE, 2003).

Untersuchungen zum Überleben von *Enterobacter sakazakii* in pulverförmigen Milchprodukten ergaben, dass der Keim über längere Zeit im Endprodukt nachgewiesen werden konnte. In einer Studie von EDELSON-MAMMEL et al. (2005) wurden pulverförmige Säuglingsnahrungsmittel über zwei Jahre bei Raumtemperatur gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen untersucht; ARKU et al. (2008) verwendeten Magermilchpulver und verkürzten den Untersuchungszeitraum auf zwölf Wochen. In beiden Fällen konnte bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes das Vorhandensein von zuvor zugesetzten *Enterobacter sakazakii* bestätigt werden. Lagerungstemperaturen von 4 °C führen zum Absterben des Keims (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997b).

*Enterobacter sakazakii* ist in der Lage, sich in rehydriertem Säuglingsnahrungspulver mit einer Generationszeit von 40 Minuten bei 23 °C rasch zu vermehren (NAZAROWEC-WHITE & FARBER, 1997b). Generell ist Wachstum bei Temperaturen zwischen 6 °C und 47 °C, also auch bei üblichen Kühlschrankschranktemperaturen, möglich. Obwohl die infektiöse Dosis noch nicht bekannt ist und bisherige Kontaminationsraten von untersuchten Produkten eher gering waren wird davon ausgegangen, dass Krankheitsausbrüche in Zusammenhang mit *Enterobacter sakazakii* auf mangelnde Hygiene und falsche Aufbewahrungstemperaturen und -zeiten bei der Zubereitung von Säuglingsnahrungsmitteln zurückzuführen sind. Rekonstituiertes Pulver sollte sofort verwendet oder auf Temperaturen unter 4 °C gekühlt werden. Die Lagerung bei Raumtemperaturen muss vermieden werden (IVERSEN & FORSYTHE, 2003; IVERSEN et al., 2004a; ANONYM, 2007a; ANONYM, 2007b). Die Verwendung von mehr als 70 °C heißem Wasser zur Rekonstitution von Trockenmilcherzeugnissen erscheint geeignet, um die Gefahr von *Enterobacter sakazakii* in den Produkten zu reduzieren (OSAILI et al., 2009).

Spezielle Empfehlungen für den sicheren Umgang bei der Verwendung von pulverförmigen Säuglingsnahrungsmitteln sind durch eine Richtlinie der World Health Organisation (WHO) und der Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) gegeben. Hierbei wird zudem auf die Notwendigkeit der Information und Schulung von Eltern und Personal in Pflegeeinrichtungen bezüglich der sicheren Zubereitung hingewiesen (WHO & FAO, 2007).

Rechtliche Bestimmungen für das Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* sind derzeit nur für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind gegeben (VO (EG Nr. 1441/2007, vgl. Kap. 2.1.3).

## 2.2.3 Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Trockenmilcherzeugnissen

### 2.2.3.1. Kontaminationsquellen von Trockenmilcherzeugnissen mit *Enterobacteriaceae*

Bei dem Eintrag von *Enterobacteriaceae* in Trockenmilcherzeugnisse spielt die primäre oder sekundäre Kontamination aufgrund der bereits erwähnten Abtötung durch Pasteurisierungsverfahren nur eine untergeordnete Rolle. Vielmehr erfolgt eine Rekontamination durch das Molkereiumfeld sowie durch Zufuhr von hitzelabilen Zutaten und Misch- und Instantisierungsvorgänge nach den Wärmebehandlungsverfahren. Insbesondere Lactose verwertende Spezies weisen Selektionsvorteile für die Etablierung im Milieu der Trockenmilcherzeugnis herstellenden Betriebe auf. Kritisch sind vor allem Kontaminationen mit coliformen Keimen (Hygieneindikatoren) und, aufgrund der allgemein sensiblen Konsumentengruppe von Trockenmilcherzeugnissen, die Belastung mit Salmonellen. Die bei der Herstellung von Trockenmilcherzeugnissen mittels Sprühtrocknung verwendete Umgebungsluft bzw. Luftströmungen während des Trocknungsprozesses stellen ein zusätzliches Risiko für eine Kontamination mit Salmonellen dar. Verschiedene Studien haben den Nachweis erbracht, dass *Salmonella* spp. in Abhängigkeit von Temperatur, Feuchtigkeit, Partikeldichte und Fettgehalt des Produktes in der Lage sind, den Sprühtrocknungsprozess zu überstehen (MCDONOUGH & HARGROVE, 1968; LICARI & POTTER, 1970; MILLER et al., 1972; LOVELL, 1983). Weiterhin entstehen während der Nachrocknungsphase auf Vibrationsfließbetten durch Kondensation von Wasser Feuchtigkeitsherde, in denen die Ansiedlung und Vermehrung von Salmonellen begünstigt wird (KIELWEIN, 1994a). Die inhomogene Verteilung und Nesterbildung der Erreger erschwert die Dekontamination der ohnehin schwer zugänglichen Produktionsstätten und den Nachweis im Endprodukt (FEHLHABER et al., 2005b). Da die Kontrolle von Trockenmilcherzeugnissen seit Jahrzehnten durch verschiedene Untersuchungsvorgaben und Maßnahmen geregelt wird, ist ein Rückgang der Kontaminationshäufigkeit mit *Salmonella* spp. erzielt worden. Häufiger, aber dennoch in geringen Mengen, sind andere *Enterobacteriaceae* in den Produkten nachweisbar.

### 2.2.3.2 Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Trockenmilcherzeugnissen

Untersuchungen zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Milch und Trockenmilcherzeugnissen werden im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrollen routinemäßig von den herstellenden Betrieben vorgenommen, wobei in der Regel die Ergebnisse aber nicht öffentlich bekannt gemacht werden. Über die von den Untersuchungsämtern durchgeführten Untersuchungen und etwaige Beanstandungen sind - abgesehen von dem durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) jährlich herausgegeben Zoonosebericht - ebenfalls keine näheren Informationen erhältlich. Vor dem Hintergrund der ernährungsphysiologischen, gesundheitlichen und wirtschaftlichen Bedeutung der Produkte ist es umso erstaunlicher, dass auch international wenig über das Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Trockenmilcherzeugnissen publiziert worden ist. Angaben zur Kontaminationshöhe werden in der Literatur nur vereinzelt gemacht.

Einen Überblick über das Spektrum von in verschiedenen Milch- und Trockenmilcherzeugnissen vorkommenden *Enterobacteriaceae* liefert Tabelle 5. Die von verschiedenen Autoren aus Umfeldproben einer Molkerei, Rohmilch sowie pasteurisierter Milch und Sahne am häufigsten isolierten Spezies sind *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* und *Hafnia alvei* sowie verschiedene Spezies der Gattungen *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Pantoea* und *Yersinia* (WESSELS et al., 1988; TERNSTRÖM et al., 1993; LINDBERG et al., 1998; WÖRNER et al., 2003; IVERSEN & FORSYTHE, 2004b).

Die nachgewiesenen Isolate stellen nur einen kleinen Teil der innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* vorkommenden Spezies dar. Dies bestätigen auch die Untersuchungsergebnisse von WÖRNER et al. (2003), denen zufolge lediglich Vertreter von elf Gattungen bzw. 21 Arten in insgesamt 45 positiv getesteten Rohmilchproben nachzuweisen waren. Die mengenmäßige Verteilung der Isolate innerhalb der untersuchten Produkte differiert je nach Studie (Tab. 6). Die Kontaminationshöhe in Rohmilch bzw. pasteurisierter Milch und Sahne wird mit  $7,8 \times 10^2$  bzw.  $10^4 - 10^8$  Kbe/ml angegeben (WESSELS et al., 1988; LINDBERG et al., 1998).

In einer von IVERSEN & FORSYTHE (2004b) durchgeführten Studie an 72 Milchpulvern enthielten insgesamt 36 Proben Vertreter von elf *Enterobacteriaceae*-Spezies, wobei *Enterobacter cloacae* (in 13 Proben nachgewiesen), *Enterobacter amnigenus* (vier Proben) sowie *Pantoea* spp. (vier Proben) die am häufigsten nachgewiesenen Isolate waren. Bemerkenswert ist, dass der Nachweis erst nach Anreicherung mittels *Enterobacteriaceae*-Enrichment Broth (EEB) erfolgen konnte. Die Untersuchungsmenge betrug jeweils 25 g Pulver. WESSELS et al. (1988) untersuchten unter anderem 39 Milchpulver aus Südafrika, konnten jedoch im Gegensatz zu den ebenfalls untersuchten Rohmilchproben in keinem Pulver *Enterobacteriaceae* nachweisen. Sie führen dies auf die Anwendung effektiver Prozesstemperaturen und strenger Qualitätskontrollen zurück. Eine Untersuchung von SHAKER et al. (2007) an Vollmilchpulvern speziell auf das Vorhandensein von *Enterobacter* spp. ergab, dass bei zwei von zehn Proben in 10 g Pulver *Enterobacter agglomerans* isoliert werden konnten. Andere *Enterobacter* spp. wurden nicht nachgewiesen. Alle in der Studie von SITHOLE et al. (2006) untersuchten kommerziell erhältlichen Süßmolkenpulver waren negativ bezüglich des Vorkommens von coliformen Keimen. Hierbei wurden je 11 g Pulver untersucht, es erfolgte keine Anreicherung mittels EEB.

**Tab. 5:** Überblick über das in verschiedenen Studien ermittelte Spektrum an *Enterobacteriaceae* in unterschiedlichen Milcherzeugnissen

Spezies	untersuchte Produkte				
	Molkereiumfeld <sup>a)*</sup>	Rohmilch <sup>b)</sup>	Rohmilch, pasteurisierte Milch <sup>c)</sup>	Pasteurisierte Milch, Sahne <sup>d)</sup>	Milchpulver <sup>e)</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	n.n.	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	n.n.	+	n.n.
<i>Hafnia alvei</i>	n.n.	n.n.	+	+	n.n.
<i>Enterobacter agglomerans</i>	n.n.	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Enterobacter amnigenus</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	+
<i>Enterobacter sakazakii</i>	n.n.	+	n.n.	n.n.	+
<i>Escherichia hermanii/ vulneris</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n.n.	+	n.n.	n.n.	+
<i>Klebsiella terrigena</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Serratia liquefaciens</i>	n.n.	n.n.	+	+	n.n.
<i>Pantoea agglomerans</i>	n.n.	n.n.	+	+	n.n.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	n.n.	+	n.n.	n.n.
<i>Klebsiella planticola</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	n.n.
<i>Klebsiella ozaenae</i>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	n.n.
<i>Enterobacter asburiae</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Fortsetzung **Tab. 5:** Überblick über das in verschiedenen Studien ermittelte Spektrum an *Enterobacteriaceae* in unterschiedlichen Milch-erzeugnissen

Spezies	untersuchte Produkte				
	Molkereiumfeld <sup>d)*</sup>	Rohmilch <sup>b)</sup>	Rohmilch, pasteurisierte Milch <sup>c)</sup>	Pasteurisierte Milch, Sahne <sup>d)</sup>	Milchpulver <sup>e)</sup>
<i>Serratia fonticola</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	n.n.
<i>Serratia rubidae</i>	n.n.	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Serratia ficaria, Pantoea</i> sp.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+
<i>Hafnia protea</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Rahnella aquatilis</i>	n.n.	n.n.	n.n.	+	n.n.
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	+
<i>Yersinia frederiksenii/intermedia</i>	n.n.	n.n.	+	n.n.	n.n.
<i>Aeromonas hydrophila, Erwinia</i> sp.	n.n.	n.n.	+	n.n.	n.n.
<i>Rahnella</i> sp., <i>Escherichia coli</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Referenzen: a) WÖRNER et al. (2003), b) WESSELS et al. (1988), c) TERNSTRÖM (1993), d) LINDBERG et al. (1998),

e) IVERSEN & FORSYTHE (2004b)

n.n. nicht nachweisbar

\* untersuchte Proben umfassten Rohmilch, Rohrahm, Molkenkonzentrat, Rahm erhitzt, Komponentenmilch, Eiswasser, Reinigungsretourwasser, Wasser für Erhitzer, Kühlwasser, Weichwasser, Luft, Frischjoghurt

**Tab. 6:** Ausgewählte Studien zu den in Milch und Milchprodukten am häufigsten nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*

Material	Anzahl Proben	Anzahl positive Proben	Anzahl Isolate gesamt	Häufigste Spezies (% der Isolate)	Referenz
Molkerei- umfeld*	k.A.	109	220	<i>Escherichia coli</i> (20) <i>Hafnia protea</i> (10,5) <i>Klebsiella oxytoca</i> (8,2) <i>Enterobacter asburiae</i> (6) <i>Enterobacter cloacae</i> (5) <i>Citrobacter freundii</i> (4) <i>Hafnia alvei</i> (3,6) <i>Yersinia enterocolitica</i> (3,6) <i>Rahnella</i> sp. (3,2)	WÖRNER et al. (2003)
Rohmilch	65	30	65	<i>Citrobacter freundii</i> (35,5) <i>Klebsiella oxytoca</i> (16,1) <i>Serratia rubidae</i> (12,9) <i>Enterobacter cloacae</i> (12,9) <i>Enterobacter sakazakii</i> (12,9)	WESSELS et al. (1988)
Pasteurisierte Milch, Sahne	430	26	52	<i>Serratia liquefaciens</i> (21), <i>Hafnia alvei</i> (14), <i>Rahnella aquatilis</i> (12)	LINDBERG et al. (1998)
Milchpulver	72	36	k.A.	<i>Enterobacter cloacae</i> [13 Pr.] <i>Enterobacter amnigenus</i> [4 Pr.] <i>Pantoea</i> spp. [4 Pr.]	IVERSEN & FORSYTHE (2004b)
Vollmilch- pulver**	10	2	k.A.	<i>Enterobacter agglomerans</i> [2 Pr.]	SHAKER et al. (2007)

k.A. = keine Angabe; Pr. = Probe

\* untersuchte Proben umfassten Rohmilch, Rohrahm, Molkekonzentrat, Rahm erhitzt, Komponentemilch, Eiswasser, Reinigungsretourwasser, Wasser für Erhitzer, Kühlwasser, Weichwasser, Luft, Frischjoghurt

\*\* Untersuchung nur auf das Vorhandensein von *Enterobacter sakazakii* u.a. *Enterobacter* spp.

Seit der Erstbeschreibung von *Enterobacter sakazakii* von FARMER et al. (1980) und dem Nachweis in einer ungeöffneten Dose Trockenmilch sind Untersuchungen zum Vorkommen des Erregers stark von der Verwendung des Rohstoffes in der Säuglingsnahrungsmittelindustrie geprägt. Dennoch gelang es verschiedenen Autoren, *Enterobacter sakazakii* auch aus anderen Milch- und Trockenmilcherzeugnissen zu isolieren. Bei der Auswertung der Ergebnisse ist immer die Abhängigkeit eines erfolgreichen Nachweises von der untersuchten Probenmenge sowie der angewendeten Untersuchungsmethode (ANONYM, 2004a) zu berücksichtigen. Generell kommt *Enterobacter sakazakii* in Trockenmilcherzeugnissen sporadisch vor. WESSELS et al. (1988) wiesen in 12,9 % der untersuchten Rohmilchproben *Enterobacter sakazakii* nach, wobei keine Milchpulverprobe positiv war. IVERSEN & FORSYTHE (2004b) konnten nach Anreicherung mit EEB bei drei von 72 Milchpulvern *Enterobacter sakazakii* in 25 g Probenmaterial isolieren. Der Nachweis gelang nur auf dem Selektivmedium *Enterobacter-Sakazakii*-Chromogen Agar (DFI). Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, konnte aus keinem der zehn von SHAKER et al. (2007) untersuchten Vollmilchpulver *Enterobacter sakazakii* isoliert werden. Auf die Situation bezüglich *Enterobacter sakazakii* in Säuglingsnahrung sei auf eine kürzlich am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigte Dissertation verwiesen (KURZ, 2009).

IVERSEN et al. (2004a) stellen in ihrer Untersuchung fest, dass Hygienekontrollen für Milchprodukte alleine anhand des Nachweises von *Salmonella* und der Auszählung von *Enterobacteriaceae* nicht ausreichen, um eine Kontamination mit *Enterobacter sakazakii* zu überwachen. Umgekehrt ist auch der fehlende Nachweis von *Enterobacter sakazakii* nicht beweisend für die Abwesenheit von Salmonellen oder anderen *Enterobacteriaceae* im Endprodukt.

Das BfR ermittelte im Jahre 2006, dass alle routinemäßig von den Ländern untersuchte Proben an Vorzugmilch (229 untersuchte Proben aus 9 Bundesländern), Rohmilch (558/9), pasteurisierter Milch (915/13), Trockenmilch (163/8) sowie Diätahrung (291/10) frei von Salmonellen waren. Sonstige Milchprodukte (4268/15) waren zu 0,02 % bis 0,05 % mit *Salmonella* spp. belastet. Die Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von *Escherichia coli* VTEC erbrachten Prävalenzen von 0,82 % bis 1,35 % innerhalb der untersuchten Vorzugsmilch- (148/7) und Rohmilchproben (977/4). Keine der untersuchten pasteurisierten Milchproben (20/2) oder sonstigen Milchprodukte (99/5) wies *Escherichia coli* VTEC auf,

Planproben-Untersuchungen an Trockenmilch und Diätnahrungen wurden nicht durchgeführt. Planmässige Untersuchungen auf das Vorhandensein von *Yersinia enterocolitica* wurden nur an Vorzugsmilch (98/6) und Rohmilch anderer Tierarten (16/2) vorgenommen, wobei keine der Proben positiv war. Die Erhebung der Daten bezüglich *Enterobacter sakazakii* in Milcherzeugnissen und Kindernahrung wurde im Jahre 2006 nach Maßgabe der European Food Safety Authority (EFSA) erstmalig durchgeführt. In Trockenmilch (7/1) und Molkenpulver (1/1) waren keine *Enterobacter sakazakii* nachweisbar (BFR, 2008).

## 2.3 Aerobe Sporenbildner

### 2.3.1 Allgemeines

Unter dem Begriff der „Sporenbildner“ werden Endosporen bildende, in der Regel Gram-positive Stäbchen und z.T. Kokken verstanden. Da aus Gründen der Vereinfachung eine inhomogene Gruppe von Bakterien zusammengefasst wurde, ist das Vorhandensein von Endosporen von großer Bedeutung. Diese sind stark lichtbrechend und bestehen aus drei den Inhalt umgebenden Schichten. Auf eine dünne äußere Sporenhülle folgen ein dicker Kortex und eine innere Sporenmembran. Die Endosporen sind aufgrund ihrer vielfältigen Resistenzen gegenüber z.B. Hitze, Austrocknung und diversen Desinfektionsmitteln sehr widerstandsfähig und überleben im Ruhezustand lange Zeit in der Umwelt (SNEATH, 1986). Als aerobe Sporenbildner bezeichnet man üblicherweise Vertreter des Genus *Bacillus* (*B.*). Dieses gehört, ebenso wie die strikt anaerobe Gattung *Clostridium*, der Familie *Bacillaceae*, deren Name sich von dem lateinischen Wort „Bacillus“ = kleines Stäbchen ableitet, an (TURNBULL & KRAMER, 1991; STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Bei einer Größe von 0,5-2,5 x 1,3-10 µm enthalten die überwiegend peritrich begeißelten, in Paaren oder Ketten auftretenden Zellen des Genus *Bacillus* jeweils eine ovale bis runde oder zylindrische Endospore. Die Endosporen liegen zentral oder endständig und sind, je nach Spezies, die Mutterzelle auftreibend oder nicht auftreibend. Die Vertreter der Gattung *Bacillus* sind aerob oder fakultativ anaerob, reagieren in der Regel Katalase-positiv und sporulieren auch bei aeroben Verhältnissen (TURNBULL & KRAMER, 1991; HOLT, 1994b). Nach FRITZE (2004) waren bis zum Jahr 2003 insgesamt 88 Spezies sowie zwei Subspezies innerhalb des Genus *Bacillus* beschrieben, im Jahre 2007 waren bereits 147 Spezies bekannt (COOREVITS et al., 2008). Anhand der Morphologie von Sporen und Sporangien wurden die *Bacillus*-Spezies von GORDON et al. (1973) in drei Gruppen eingeteilt, eine vierte Gruppe beinhaltet nicht einzuordnende Spezies. Bemerkenswert ist die heutige Einordnung von *B. cereus* sensu stricto, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis* aufgrund ihrer genetischen Homologie in einer gemeinsamen, der „*Bacillus cereus* Gruppe“ (RASKO et al., 2005; GUINEBRETIERE et al., 2008; STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Die Ausbildung von Endosporen als Dauerform prägt den Lebenszyklus der *Bacillus*-Spezies. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase oder bei Konfrontation der vegetativen Zellen mit ungünstigen Lebensbedingungen beginnt ein mehrstufiger Prozess, währenddessen sich DNA-Material der Mutterzelle separiert und in einen Ruhezustand verfällt. Die Widerstandsfähigkeit der Endosporen gegenüber Umwelteinflüssen ist abhängig von den Bedingungen, unter denen sie ausgebildet wurden. Ebenso ist auch die Rückwandlung in vegetative Zellformen von verschiedenen Faktoren und der jeweiligen Spezies abhängig. Das Auskeimen der Sporen unter Wiederaufnahme der metabolischen Aktivität kann bereits innerhalb von Minuten geschehen (CLAUS & BERKELEY, 1986).

Aerobe Sporenbildner sind größtenteils Saprophyten mit vielen natürlichen Habitaten und aufgrund der ausgeprägten Widerstandsfähigkeit ihrer Endosporen ubiquitärem Vorkommen. Das Hauptreservoir der Bakterien stellt der Erdboden dar, von dort aus erfolgt die Weiterverbreitung z.B. mittels Staub und Wasser in nahezu alle Bereiche. Bezüglich ihrer Ansprüche an die Wachstumstemperatur herrscht große Diversität. Es existieren sowohl mesophile und thermophile als auch thermotolerante und psychrotrophe *Bacillus*-Spezies. Die Endosporen können, je nach Spezies, Temperaturen bis zu 120 °C, Trocknungsprozesse und Salzgehalte von 5-15 % überdauern (CLAUS & BERKELEY, 1986; SNEATH, 1986; TURNBULL & KRAMER, 1991; HOLT, 1994b; KOTIRANTA et al., 2000; NIEMINEN et al., 2007; DAUERER, 2008b).

Die Pathogenität der Vertreter des Genus *Bacillus* variiert stark. Als bekanntester krankheitsauslösender Keim, auch aufgrund seines potentiellen bioterroristischen Einsatzes, ist *B. anthracis* zu nennen. Infektionen spielen vor allem bei Farmtieren eine Rolle. Eine Übertragung des Erregers auf den Menschen mittels Milch oder Milchprodukten ist bisher nicht beschrieben (NOVAK et al., 2005; KEIM et al., 2006). Neben insektenpathogenen Stämmen wie z.B. *B. thuringiensis* kommen auch andere, für Säugetiere und Mensch pathogene Bazillen vor. Das Spektrum der nicht gastrointestinalen Erkrankungen reicht, wie in Tabelle 7 dargestellt, von Sepsis, Bakteriämie, Meningitis und Endokarditis über Infektionen des Respirations- und Urogenitaltraktes bis hin zu Wundinfektionen. Hierbei sind vor allem immunkompromittierte und andere geschwächte Patienten betroffen.

**Tab. 7:** Übersicht über einige durch *Bacillus*-Spezies ausgelöste, nicht gastrointestinale Infektionen\*

Spezies	Art der Infektion
<i>B. alvei</i>	Septikämie, Meningitis
<i>B. anthracis</i>	Milzbrand
<i>B. brevis</i>	Bakteriämie
<i>B. cereus</i>	Wundinfektion, Bakteriämie, Septikämie, Pneumonie, Meningitis, Endokarditis, Osteomyelitis, Pan-, Endophthalmitis; Mastitis und Abort beim Rind
<i>B. circulans</i>	Meningitis, Septikämie
<i>B. coagulans</i>	Bakteriämie, Septikämie
<i>B. licheniformis</i>	Bakteriämie, Septikämie, Peritonitis, Ophthalmitis, septische Arthritis
<i>B. macerans</i>	Bakteriämie, Septikämie
<i>B. pumilus</i>	Rektalfistel, Fasciitis
<i>B. sphaericus</i>	Bakteriämie, Endokarditis, Meningitis, Septikämie, Endokarditis
<i>B. subtilis</i>	Bakteriämie, Septikämie, Endokarditis, Infektionen des Respirationstraktes
<i>B. thuringiensis</i>	Septikämie, Wund- und Augeninfektionen; Mastitis beim Rind

\* Referenzen: CLAUS & BERKELEY (1986), SNEATH (1986), TURNBULL & KRAMER (1991), DROBNIEWSKI (1993), KOTIRANTA et al. (2000), NIEMINEN et al. (2007)

Im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen wird anderen *Bacillus*-Spezies als *B. cereus* nur eine geringe Bedeutung zugeschrieben (TURNBULL & KRAMER, 1991; DROBNIEWSKI, 1993; ROWAN et al., 2001). Einige wenige Berichte liegen vor zu *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* und *B. thuringiensis* (TURNBULL & KRAMER, 1991; JACKSON et al., 1995; SALKINOJA-SALONEN et al., 1999; KRÄMER, 2002c; EFSA, 2005). Da *B. cereus* aufgrund der vergleichsweise hohen Häufigkeit und der Schwere der Infektion im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen eine besondere Bedeutung zukommt, wird auf diesen Erreger im nächsten Kapitel (Kap. 2.3.2) gesondert eingegangen.

Einige aerobe Sporenbildner ausserhalb der *B. cereus* Gruppe weisen toxinogene Eigenschaften auf. Die Bildung von hitzestabilen Toxinen wurde bisher nachgewiesen bei z.B. *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, *B. firmus*, *B. simplex* und *B. megaterium* (SALKINOJA-SALONEN et al., 1999; MIKKOLA et al., 2000; SUOMINEN et al., 2001; FROM et al., 2005; TAYLOR et al., 2005; NIEMINEN et al., 2007). Alle beschriebenen Toxine weisen zwar physikalisch-chemische Ähnlichkeiten mit dem von *B. cereus* gebildeten emetischen Toxin (Cereulid) auf, sind jedoch nicht mit ihm identisch. Das bisher am besten untersuchte und als Lichenysin A identifizierte hitzestabile Toxin von *B. licheniformis* zum Beispiel stellt zwar ein cyclisches Lipopeptid dar, weicht aber in Bezug auf seine biologische Aktivität und Zytotoxizität von der des Cereulids ab (SALKINOJA-SALONEN et al., 1999; MIKKOLA et al., 2000). So liegt der toxische Grenzwert für toxinproduzierende *B. licheniformis*-Stämme mehr als hundertmal höher als der für Cereulid-produzierende *B. cereus* (SALKINOJA-SALONEN et al., 1999). Auch liegt das Temperaturoptimum zur Toxinproduktion bei *B. licheniformis* mit ca. 28 °C um einiges höher als bei *B. cereus* (FROM et al., 2005). Einen Überblick über das Vorkommen von hitzestabilen Toxinen bei anderen *Bacillus* spp. als *B. cereus* gibt Tabelle 8.

Ferner wurde das Vorkommen von hitzelabilen Toxinen, die den *B. cereus*-Enterotoxinen sehr ähnlich sind, bei *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. lentimorbus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* und *B. thuringiensis* beschrieben (BEATTIE & WILLIAMS, 1999; ROWAN et al., 2001; PHELPS & MCKILLIP, 2002; ROWAN et al., 2003). Da sich die genannten Untersuchungen zum Vorkommen von *B. cereus*-Enterotoxinen nicht auf DNA-basierte Speziesdiagnosen stützen, sind die Ergebnisse dieser Studien nach FROM et al. (2005) bezüglich der Speziesidentitäten jedoch als kritisch anzusehen. Kontrovers diskutiert wird zudem die Aussagekraft der Studien bezüglich der tatsächlichen Toxizität anderer *Bacillus*-Spezies als *B. cereus*. Dies resultiert aus dem komplexen Aufbau der dreiteiligen *B. cereus*-Enterotoxine Hämolyysin BL (Hbl) und nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) auf die im Kapitel 2.3.2 ausführlicher eingegangen wird. Die kommerziell erhältlichen Immunoassay-Testkits für den Nachweis von *B. cereus*-Enterotoxinen, die in oben genannten Studien verwendet wurden (BCET-RPLA (*B. cereus* enterotoxin (diarrheal type) reversed passive latex agglutination kit, Firma Oxoid); BDE-VIA (*Bacillus* diarrheal enterotoxin (BDE) visual immunoassay, Firma Tecra)), sind nur für jeweils eine Komponente des Toxinkomplexes spezifisch. Um die maximale biologische Aktivität entfalten zu können müssen jedoch alle drei Komponenten des jeweiligen

Toxinkomplexes vorhanden sein (BEECHER & MACMILLAN, 1991; LINDBÄCK et al., 2004). Zwar kann mittels PCR (Polymerase-Chain-Reaction) das Vorhandensein der kodierenden Gene innerhalb der als toxisch beschriebenen Stämme nachgewiesen werden, jedoch treten Unstimmigkeiten im Hinblick auf die Genexpression auf („low producer“ vs. „high producer“). So berichten ROWAN et al. (2001; 2003) von einer guten Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von PCR (Nachweis der kodierenden Gene) und BCET-RPLA-Testkit (Nachweis der Komponente L<sub>2</sub> des Hbl-Enterotoxins); PHELPS & MCKILLIP (2002) hingegen stellten Abweichungen fest.

Durch herkömmliche Nachweismethoden, auch gestützt durch Cytotoxizitäts- und PCR-Untersuchungen, lässt sich somit nur feststellen, dass bestimmte *Bacillus*-Spezies in der Lage sind, Proteine zu produzieren, die große Ähnlichkeiten mit den Komponenten der *B. cereus*-Enterotoxine aufweisen bzw. deren kodierende Gene besitzen. Rückschlüsse auf vollständig vorliegendes, aktives Toxin anhand kommerzieller Testkits sind nicht möglich (ROWAN et al., 2001; PEDERSEN et al., 2002). ROWAN et al. (2001) haben in ihren Untersuchungen zudem festgestellt, dass ein Zusammenhang zwischen Umweltsignalen und Virulenz einiger *Bacillus*-Spezies besteht. So kam es z.T. erst nach Anzucht in bestimmten Nährmedien (u.a. rekonstituiertes Säuglingsnahrungsmittel) zur Genexpression in Form von *B. cereus*-Enterotoxinkomponentenbildung. Eine übersichtliche Darstellung der Daten hinsichtlich des Auftretens von hitzelabilen Toxinen bei verschiedenen *Bacillus* spp. liefert Tabelle 8.

**Tab. 8:** Übersicht über das Vorkommen von Toxin-bildenden *Bacillus*-Spezies  
(ohne *B. cereus*) und deren Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen\*

Spezies	Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen	Hitzestabiles Toxin	Hbl**	Nhe**
<i>B. amyloliquefaciens</i>	n.b.	n.b.	+	+
<i>B. brevis</i>	+	n.b.	n.b.	n.b.
<i>B. circulans</i>	n.b.	n.b.	++	++
<i>B. coagulans</i>	n.b.	n.b.	+	n.b.
<i>B. firmus</i>	n.b.	+	n.b.	n.b.
<i>B. lentimorbus</i>	n.b.	n.b.	+	+
<i>B. lentus</i>	n.b.	n.b.	+	+
<i>B. licheniformis</i>	++	++	++	+
<i>B. megaterium</i>	n.b.	+	+	n.b.
<i>B. mojavensis</i>	n.b.	+	n.b.	n.b.
<i>B. mycoides</i>	n.b.	n.b.	+	n.b.
<i>B. pasteurii</i>	n.b.	n.b.	+	+
<i>B. polymyxa</i>	n.b.	n.b.	+	n.b.
<i>B. pumilus</i>	++	++	n.b.	n.b.
<i>B. simplex</i>	n.b.	+	n.b.	n.b.
<i>B. sphaericus</i>	+	n.b.	n.b.	n.b.
<i>B. subtilis</i>	++	+	+	n.b.
<i>B. thuringiensis</i>	++	n.b.	+	++

\* Daten zusammengestellt nach: CLAUS & BERKELEY (1986); TURNBULL & KRAMER (1991); JACKSON et al. (1995); BEATTIE & WILLIAMS (1999); SALKINOJA-SALONEN et al. (1999); MIKKOLA et al. (2000); ROWAN et al. (2001); SUOMINEN et al. (2001); PHELPS & MCKILLIP (2002); KRÄMER (2002c); ROWAN et al. (2003); FROM et al. (2005); TAYLOR et al. (2005); NIEMINEN et al. (2007)

\*\* Nachweis der Enterotoxin-Komponenten mittels BCET-RPLA (Hbl) bzw. BDE-VIA (Nhe)

n.b. nicht bekannt

+ Vorkommen wird in der Literatur beschrieben

++ Vorkommen wird in der Literatur häufig beschrieben

Obwohl nach FROM et al. (2005) andere toxinproduzierende *Bacillus*-Spezies als *B. cereus* in Wasser, Lebensmitteln und der Lebensmittelumgebung nur selten vorkommen, bleibt aufgrund der Hitzestabilität der Sporen und einiger Toxine besonders im Bereich der Trockenmilcherzeugnisse ein potentiell Gesundheitsrisiko bestehen (SALKINOJA-SALONEN et al., 1999; SUOMINEN et al., 2001; NIEMINEN et al., 2007). Sowohl die Endosporen als auch die Toxine überstehen Molkereiprozesse wie Pasteurisieren und Molkeindampfung (NIEMINEN et al., 2007). Weiterhin kann das Auftreten von psychrotrophen Bazillen in gekühlt gelagerten Lebensmitteln sowie das ungenügende Erhitzen von kontaminierten Speisen zur gesundheitlichen Gefährdung führen, sofern Endosporen die Bedingungen überleben, auskeimen und sich zu kritischen Keimzahlen vermehren (PHELPS & MCKILLIP, 2002; FROM et al., 2005). Das Vorkommen von *Bacillus*-Spezies, die hitzelabile, *B. cereus*-ähnliche Enterotoxine produzieren muss hierbei als potentiell Gesundheitsrisiko betrachtet werden (BEATTIE & WILLIAMS, 1999; ROWAN et al., 2001; ROWAN et al., 2003).

An Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen durch andere *Bacillus* spp. als *B. cereus* beteiligte Lebensmittel enthielten in der Regel  $10^6$  Zellen oder Sporen pro Gramm (EFSA, 2005). Da jedoch bei allen hitzestabilen und hitzelabilen Toxinen, die bisher bei anderen *Bacillus* spp. als *B. cereus* nachgewiesen wurden, nur Ähnlichkeiten mit den üblicherweise *B. cereus* zugeordneten Toxinen bestehen und keine definitive Aussage über die tatsächliche Toxizität zu treffen ist, ist ein Testsystem nötig, das sich nicht nur auf einen isolierten Virulenzfaktor stützt um das Gefährdungspotential der jeweiligen Spezies näher zu bestimmen. Zu diesem Schluss kommen auch PHELPS & MCKILLIP in ihrer Studie im Jahre 2002.

Als Lebensmittelverderbniserreger spielen aerobe Sporenbildner durch ihre Fähigkeiten zum Abbau von Kohlenhydraten, Proteinen und teilweise Fett vor allem in Vollkonserven, sterilisierter und pasteurisierter Milch sowie H-Milch und Wurst eine Rolle (CLAUS & BERKELEY, 1986; SHINAGAWA, 1993; KIELWEIN, 1994b; DAUERER, 2008b). Neben hitzeresistenten Endosporen können auch hitzestabile extra- und intrazelluläre Proteinasen und Lipasen die üblichen Prozesse der Trockenmilchherstellung überdauern und so zum Verderb der Endprodukte führen. Nach CHEN et al. (2004) ist die Bestimmung der im Milchpulver vorhandenen *Bacillus* spp. nicht ausreichend, um eine Aussage über die

Produktqualität oder Verderbniswahrscheinlichkeit zu treffen. Vielmehr wäre eine Bestimmung der Enzymaktivität vorzuziehen.

### 2.3.2 *Bacillus cereus*

*B. cereus* stellt aufgrund der Ausbildung unterschiedlicher Virulenzfaktoren und seines vergleichsweise häufigen Vorkommens in Lebensmitteln und der Produktionsumgebung einen für die Nahrungsmittelindustrie bedeutsamen Vertreter der Gattung *Bacillus* dar. *B. cereus* gilt heute als eines der wichtigsten, Lebensmittelvergiftungen auslösenden Bakterien. Die Bezeichnung „cereus“ lässt sich aus dem Lateinischen übersetzen mit „aus Wachs“ und leitet sich von der kulturellen und morphologischen Beschaffenheit des Erregers ab (STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Vegetative Zellen von *B. cereus* sind in der Regel mesophil, d.h. sie vermehren sich in Temperaturbereichen zwischen 10 °C und 50 °C. Optimale Wachstumsbedingungen liegen bei Temperaturen zwischen 30 °C und 40 °C sowie bei pH- bzw.  $a_w$ -Werten von mindestens 4,8 bzw. 0,92 vor. Aufgrund des gehäufteten Auftretens von Stämmen mit einem Temperaturoptimum von 4 °C bis 7 °C, für die bei Temperaturen von 43 °C kein Wachstum festgestellt werden konnte, wurden diese als neue, psychrotolerante Spezies *B. weihenstephanensis* in die *B. cereus*-Gruppe aufgenommen (CLAUS & BERKELEY, 1986; LECHNER et al., 1998; FEHLHABER et al., 2005c; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Die Generationszeit von *B. cereus* in Milch beträgt 17 Stunden bei 6 °C, in gekochtem Reis 26-57 Minuten bei 30 °C (FEHLHABER et al., 2005d). Die Endosporen von *B. cereus* zeichnen sich durch ihre große Hitzeresistenz mit einem  $D_{100^\circ\text{C}}$  - Wert von 2,7-3,1 Minuten in Magermilch aus und werden durch gängige Pasteurisierungsverfahren nicht sicher abgetötet (KRÄMER, 2002c; EFSA, 2005; NOVAK et al., 2005; FEHLHABER et al., 2005d). Das Kochen, milde Erhitzen oder Pasteurisieren von Lebensmitteln kann ferner zur Aktivierung der Endosporen, gefolgt von Auskeimen und weiterer Vermehrung der vegetativen Zellen führen (BECKER et al., 1994; EFSA, 2005). Die Endosporen von *B. cereus* sind, verglichen mit den vegetativen Zellen, widerstandsfähiger gegenüber niedrigen pH-Werten (CLAVEL et al., 2004).

Die Pathogenität von *B. cereus*-Stämmen variiert stark. Es sind sowohl als relativ sicher eingestufte Stämme (Probiotika) als auch hoch toxische Toxinbildner beschrieben (MAHLER et al., 1997; LUND et al., 2000; DIERICK et al., 2005; HONG et al., 2005). Generell ist im Falle von durch *B. cereus* ausgelösten Lebensmittelvergiftungen jedoch von eher milden, selbst-limitierenden Krankheitsfällen mit kurzer Dauer auszugehen (RAJKOVIC et al., 2006; STENFORS ARNESEN et al., 2008). In Abhängigkeit von den durch die beteiligten Stämme gebildeten Toxinen werden zwei gastrointestinale, toxinvermittelte Erkrankungsformen unterschieden: das emetische Syndrom sowie das Diarrhö-Syndrom. Das Auftreten beider Erkrankungsformen ist vermutlich in der Literatur stark unterschätzt, da die Patienten nicht gezwungenermaßen ärztlichen Rat einholen und keine Meldepflicht für durch *B. cereus* ausgelöste Lebensmittelvergiftungen besteht. Weiterhin erschweren klinische Ähnlichkeiten zu den durch *Staphylococcus aureus* und *Clostridium perfringens* verursachten Symptomen die korrekte Diagnose (DROBNIEWSKI, 1993; GRANUM & LUND, 1997; EFSA, 2005; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Die statistischen Erhebungen variieren zudem innerhalb verschiedener Länder und sind aufgrund unterschiedlicher Meldeverfahren nicht vergleichbar (KOTIRANTA et al., 2000; EFSA, 2005). Zwischen 1993 und 1998 sind in Deutschland zehn Fälle von Lebensmittelvergiftungen, entsprechend 1,1 % aller gemeldeten Lebensmittelvergiftungen, durch *B. cereus* verursacht worden (SCHMIDT, 2001). Nach einem Bericht der EFSA waren im Jahr 2006 in der EU sowie in Norwegen insgesamt 74 Fälle, entsprechend 1,4 %, auf Toxine von *B. cereus* zurückzuführen (EFSA, 2006). Im Jahre 2007 wurden von zehn Mitgliedsstaaten der EU insgesamt 105 durch *B. cereus*-Toxine verursachte Lebensmittelvergiftungen gemeldet. Dies entspricht einer Zunahme von 41,9 % im Vergleich zum Vorjahreszeitraum. Milch sowie Milchprodukte (ohne Käse) waren in jeweils 0,3 % der Fälle beteiligt (EFSA, 2009). Da mithilfe der Nachweismethoden ISO 7932 und ISO 21871 keine Unterscheidung zwischen *B. cereus*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis* möglich ist, könnte nach Angaben der EFSA (2005) jede der drei genannten Spezies an den überlieferten Lebensmittelvergiftungen beteiligt sein.

Mit dem Erlass der VO (EG) Nr. 1441/2007 wurden Grenzwerte für das Vorkommen von *B. cereus* in getrockneter Säuglingsanfangsnahrung und getrockneten diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind festgelegt (vgl. Kap. 2.1.3).

### 2.3.2.1 Emetisches Syndrom durch *B. cereus*

Das emetische Syndrom stellt eine Lebensmittelintoxikation durch Aufnahme von im Lebensmittel präformiertem emetischem Toxin (Cereulid) dar. Ausbrüche sind vor allem durch stärkehaltige Lebensmittel wie Reis- und Nudelgerichte bekannt (GRANUM, 1994; AGATA et al., 2002; FEHLHABER et al., 2005c; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bis sechs Stunden kommt es zu Übelkeit und heftigem Erbrechen die sechs bis 24 Stunden andauern können (EHLING-SCHULZ et al., 2004; STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Das von *B. cereus* gebildete Cereulid stellt ein zyklisches Dodekadepeptid mit einer molekularen Masse von 1,2 kDa dar (AGATA et al., 1994; AGATA et al., 1995). Das Toxin ist stabil gegenüber Hitze, extremen pH-Werten und Proteolyse. So übersteht es Temperaturen von 121 °C, pH-Werte von 2 sowie 11 und wird weder durch Trypsin noch Pepsin abgebaut (SHINAGAWA et al., 1995; SHINAGAWA et al., 1996). Der genaue Mechanismus, mittels dessen Cereulid beim Menschen Erbrechen auslöst, ist bisher nicht bekannt. Es wurde jedoch in Fütterungsversuchen an Mäusen eine Rezeptor-medierte, afferente Vagusstimulation via Bindung an 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren nachgewiesen (AGATA et al., 1995; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Weiterhin ist Cereulid als Kalium-Ionophor in der Lage, die mitochondriale Aktivität durch Blockade der Fettsäureoxidation zu verhindern und wird mit Fällen von tödlichem Leberversagen in Verbindung gebracht (MAHLER et al., 1997; MIKKOLA et al., 1999).

Der Nachweis von Cereulid kann aufgrund seiner biologischen Aktivitäten wie Vakuolisierung von HEp-2 Zelllinien und Schädigung von Mitochondrien (Ebersperma-Beweglichkeitstest) erfolgen, wobei diese Nachweismethoden nicht spezifisch sind. Mittlerweile sind weitere, für Cereulid bzw. dessen kodierende Gene spezifische Methoden wie die Flüssigchromatographie bzw. Hochleistungsflüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS bzw. HPLC-MS) und PCR-Analysen verfügbar (STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Die Produktion von Cereulid ist unabhängig vom Prozess der Sporulation, sie beginnt am Ende der logarithmischen Wachstumsphase der vegetativen Zellen von *B. cereus*. Die höchste Produktionsrate wird in der stationären Phase und bei Temperaturen von 12 °C bis 22 °C beobachtet. Cereulidproduktion ist generell möglich bei Temperaturen von 12 °C bis 37 °C (FINLAY et al., 2000; HÄGGBLÖM et al., 2002). Die Produktion des emetischen Toxins wird abgesehen von der Temperatur auch von anderen Faktoren wie pH-Wert, Vorhandensein von Luftsauerstoff, spezifischen Aminosäuren und einer bakteriellen Begleitflora sowie den jeweiligen toxinproduzierenden *B. cereus*-Stämmen beeinflusst (AGATA et al., 1999; AGATA et al., 2002; HÄGGBLÖM et al., 2002; EHLING-SCHULZ et al., 2004; RAJKOVIC et al., 2006).

Obwohl die Regulationsmechanismen noch nicht vollständig erforscht sind, ist ein Zusammenhang zwischen der Cereulidproduktion und der Art bzw. Handhabung des kontaminierten Lebensmittels bekannt. In Milchproben wurden von verschiedenen Autoren nur relativ geringe Toxinmengen von maximal 0,64 µg/ml bzw. 1,14 µg/ml nachgewiesen, wobei sich bisher unerklärliche Differenzen im Hinblick auf den Einfluss von Sauerstoffzufuhr während der Inkubationszeit ergaben. So wiesen AGATA et al. (2002) höhere Cereulidmengen in geschüttelter, nicht aber in während der Inkubation ruhend gelagerter Milch fest. RAJKOVIC et al. (2006) hingegen konnten nur in ruhend gelagerten Milchproben Cereulidproduktion nachweisen. In einer experimentellen Studie stellten SHAHEEN et al. (2006) fest, dass kontaminierte Säuglingsnahrung auf der Basis von Milchprodukten die Cereulidproduktion von *B. cereus* begünstigt und diese durch Rekonstitution ansteigt. Nach Inokulation von  $10^6$  KBE *B. cereus*/ml rekonstituierter Säuglingsnahrung wurden innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur Werte von 0,8 bis 2 µg Cereulid/ml Probe erreicht, wobei Schütteln der Proben während der Inkubation keinen Anstieg der Toxinproduktion erzielte. Die höchsten gemessenen Cereulidmengen traten bei Säuglingsnahrungsmitteln basierend auf Milchprodukten in Kombination mit Cerealien auf.

Die Infektionsdosis für das emetische Syndrom ist bisher nicht konkret ermittelt worden. In Tierversuchen wurde eine relativ hohe minimale emetische Dosis von 8-10 µg Cereulid/kg Körpergewicht festgestellt (AGATA et al., 1995; SHINAGAWA et al., 1995). In verschiedenen Studien wurden in involvierten Lebensmitteln Cereulidmengen von 0,01 bis 3 µg/g ermittelt (AGATA et al., 2002; RAJKOVIC et al., 2006). Da die Cereulidproduktion von unterschiedlichen Faktoren abhängig ist, bleibt unklar wie viele *B. cereus*-Zellen zur

Produktion von toxischen Mengen an Cereulid im Lebensmittel enthalten sein müssen (HÄGGBLUM et al., 2002; RAJKOVIC et al., 2006; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Die an Ausbrüchen beteiligten Lebensmittel enthielten zumeist  $10^5$  bis  $10^8$  KBE *B. cereus*/g. Fälle mit geringeren Kontaminationsraten sind ebenfalls aufgetreten und können auf die Abtötung von *B. cereus*-Zellen durch Hitzebehandlungen der Lebensmittel zurückzuführen sein, während Cereulid diese Prozesse übersteht (EFSA, 2005).

### 2.3.2.2 Diarrhö-Syndrom durch *B. cereus*

Das Diarrhö-Syndrom ist eine Lebensmittelinfektion, bei der vegetative *B. cereus*-Zellen im Dünndarm des Patienten Enterotoxine produzieren (GRANUM et al., 1993). Ausbrüche kommen vor allem durch proteinhaltige Lebensmittel wie Fleischgerichte, Soßen, Suppen, Milch und Milchprodukte vor. Die typischen Symptome Abdominalschmerz, wässrige Diarrhö sowie gelegentlich Übelkeit und Erbrechen treten nach einer Inkubationszeit von in der Regel acht bis 16 Stunden auf und halten im Normalfall zwölf bis 24 Stunden an (FEHLHABER et al., 2005d; STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Derzeit werden drei verschiedene Enterotoxine als Verursacher des Diarrhö-Syndroms angesehen: die beiden Dreikomponenten-Toxine Hämolyysin BL (Hbl), das nicht-hämolytische Enterotoxin (Nhe) sowie das Einkomponenten-Toxin Cytotoxin K (CytK) (BEECHER & MACMILLAN, 1991; LUND & GRANUM, 1996; LUND et al., 2000; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Der Hbl-Toxinkomplex besteht aus den drei Proteinen B (35 kDa), L<sub>1</sub> (36 kDa) und L<sub>2</sub> (45 kDa) während Nhe die drei Proteinkomponenten NheA (41 kDa), NheB (39,8 kDa) und NheC (36,5 kDa) zugeordnet werden (BEECHER & MACMILLAN, 1991; GRANUM et al., 1999). Diese sechs Proteine weisen Homologien hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen sowohl untereinander als auch innerhalb der Toxine auf (GRANUM et al., 1999; FAGERLUND et al., 2008; STENFORS ARNESEN et al., 2008). CytK stellt ein einzelnes Protein mit einer molekularen Masse von 34 kDa dar, welches Ähnlichkeiten sowohl mit dem von *Clostridium perfringens* gebildeten  $\beta$ -Toxin als auch dem  $\alpha$ -Hämolyysin von *Staphylococcus aureus* besitzt (LUND et al., 2000). Die von *B. cereus* gebildeten Enterotoxine sind hitzelabil, instabil bei pH-Werten von weniger als 4 und werden durch proteolytische Enzyme wie Pepsin und - mit Ausnahme von CytK - Trypsin und

Chymotrypsin abgebaut (KRAMER & GILBERT, 1989; GRANUM et al., 1993; LUND et al., 2000; FEHLHABER et al., 2005d).

Die Verursachung von Durchfall-Erkrankungen durch *B. cereus*-Enterotoxine wird auf die Zerstörung der Integrität der Plasmamembranen von epithelialen Zellen im Dünndarm zurückgeführt, wobei die zellulären Mechanismen der Enteropathogenität bisher nur teilweise bekannt sind (FAGERLUND et al., 2008; STENFORS ARNESEN et al., 2008). Der ursprüngliche Ansatz zur Wirkweise des Hbl stammt von BEECHER & MACMILLAN (1991) und geht davon aus, dass nach initialer Bindung des B-Proteins an die Oberfläche der Zielzelle die L-Komponenten entweder in die Zelle eingeschleust werden und die metabolische Zellaktivität beeinflussen, oder einen Komplex mit der B-Komponente bilden und zu Membranläsionen führen. Nach neueren Erkenntnissen sind alle drei Komponenten des Hbl-Toxins in der Lage, unabhängig voneinander an die Zelloberfläche von Schaferythrozyten zu binden und nach Bildung eines „membrane attack complex“ osmotische Lyse der Zielzelle durch transmembrane Porenbildung herbeizuführen (BEECHER & WONG, 1997). Das Nhe-Toxin führt ebenfalls zur Bildung von transmembranen Poren mit nachfolgender Zellyse, wobei eine direkte Bindung an die Zelloberfläche bisher nur für die Komponente NheB nachgewiesen werden konnte (LINDBÄCK et al., 2004; FAGERLUND et al., 2008). Bei beiden Toxinkomplexen ist das Vorhandensein von allen drei Komponenten essentiell zur Entfaltung der maximalen biologischen Aktivität (BEECHER & MACMILLAN, 1991; BEECHER et al., 1995; LINDBÄCK et al., 2004). CytK wurde bei seiner Erstbeschreibung in einem Fall von Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus* mit nekrotischer Enteritis und blutiger Diarrhö von LUND et al. (2000) in die Klasse der „ $\beta$ -barrel channel forming toxins“ eingeordnet, welche Ionen durchlässige Kanäle in der Zellmembran der Zielzelle bilden (MENESTRINA et al., 2001).

Anhand ihrer biologischen Aktivitäten wie Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Steigerung der Flüssigkeitsvolumina im Dünndarm von Kaninchen (Darmschlingenligationstest), Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Zelllinien sowie dermonekrotischen Eigenschaften kann ein unspezifischer Nachweis der *B. cereus*-Enterotoxine mittels Gewebe- und Zellkulturtests erfolgen (STENFORS ARNESEN et al., 2008). Ein spezifischer, immunochemischer Nachweis anhand von Antikörper-Reaktionen ist derzeit kommerziell erhältlich sowohl für die Hbl-Komponente L<sub>2</sub> als auch für die Nhe-Komponente NheA. Der BCET-RPLA Test der Firma Oxoid stellt einen semi-quantitativen Nachweis des L<sub>2</sub>-Proteins

anhand reverser, passiver Latex Agglutination dar (BECKER et al.) und kann zum Nachweis aus Lebensmitteln und Kulturfiltraten angewendet werden. Mittels eines Sandwich Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) weist der BDE-VIA Test der Firma Tecra das Vorhandensein von NheA-Proteinen in Lebensmitteln und Umgebungsproben nach. Die für den BDE-VIA Test verwendeten polyklonalen Antikörper reagieren jedoch zusätzlich auf andere Proteine, sodass die Spezifität zweifelhaft erscheint (BEECHER & WONG, 1994; LUND & GRANUM, 1996; DIETRICH et al., 2005). Beide Testkits können keine Aussage über das Vorhandensein von biologisch aktivem Toxin treffen, da jeweils nur eine Komponente des Komplexes nachgewiesen wird. Auf der Basis von monoklonalen Antikörpern wurde ein Sandwich Enzym Immunoassay zur quantitativen Analyse von L<sub>2</sub>- bzw. NheB-Proteinen entwickelt (MORAVEK et al., 2006). Ein spezifischer Nachweis der für die Enterotoxine kodierenden Gene mittels PCR ist möglich, lässt aber keine Rückschlüsse auf die produzierte Toxinmenge und damit auf die Pathogenität des untersuchten *B. cereus*-Stammes zu (STENFORS ARNESEN et al., 2008).

Mit dem Lebensmittel aufgenommene *B. cereus* müssen die Magenpassage überstehen, um sich anschließend im Intestinum zu vermehren und Enterotoxine zu produzieren (CLAVEL et al., 2004). Die Toxinproduktion bereits im Lebensmittel ist zwar möglich, wird aber aufgrund der geringen Tenazität gegenüber Säure und proteolytischen Enzymen, der relativ langen Inkubationszeit und der großen Anzahl an benötigten vegetativen Zellen als Ursache von Erkrankungsfällen ausgeschlossen (GRANUM, 1994; GRANUM & LUND, 1997). Die Produktion von Hbl und Nhe ist abhängig von dem jeweiligen involvierten *B. cereus*-Stamm. MORAVEK et al. (2006) ermittelten in einer Studie an 100 *B. cereus*-Stämmen unterschiedlichen Ursprungs, dass 99 der untersuchten Stämme Nhe kodierende Gene besaßen, 42 Stämme Hbl kodierende Gene aufwiesen und fast alle der PCR-positiven Isolate auch alle drei Komponenten des jeweiligen Toxins bildeten (95 % bei Nhe bzw. 94 % bei Hbl). Die Pathogenität der *B. cereus*-Isolate war auf das Vorhandensein von Nhe zurückzuführen. So waren *B. cereus*-Stämme, die beide Enterotoxine produzierten, nicht zytotoxischer als Stämme, die nur Nhe bildeten. Isolate, die aus Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen durch *B. cereus* stammten, produzierten höhere Mengen an Enterotoxinen und besonders an Nhe. SVENSSON et al. (2007) kamen in einer Studie an 396 *B. cereus*-Isolaten aus Milchfarmen, Silos und Molkereien zu dem Schluss, dass die psychrotrophen *B. weihenstephanensis*-Stämme geringere Toxizität aufweisen als mesophile

*B. cereus*-Stämme. Dies wurde an einer geringeren Anzahl viel NheA bzw. HblC produzierender Isolate („high producer“) fest gemacht.

Die Infektionsdosis für das Diarrhö-Syndrom wird mit  $10^5$  bis  $10^8$  *B. cereus*-Zellen oder Sporen insgesamt angegeben. Möglicherweise ist aufgrund der erhöhten Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten bereits die Aufnahme einer geringeren Anzahl an Sporen, verglichen mit vegetativen Zellen ausreichend, um zur Erkrankung zu führen (GRANUM & LUND, 1997; CLAVEL et al., 2004; EFSA, 2005; STENFORS ARNESEN et al., 2008). In der Literatur werden Fälle beschrieben, in denen bei Krankheitsausbrüchen beteiligte Lebensmittel Kontaminationsraten von weniger als  $10^5$  KBE *B. cereus*/g aufwiesen (EFSA 2005) und nach GRANUM & LUND (1997) können Lebensmittel mit einem Gehalt von  $> 10^3$  KBE *B. cereus*/g nicht als unbedenklich zum Verzehr eingestuft werden. CLAVEL et al.(2004) gehen davon aus, dass ältere Patienten oder Patienten mit verminderter Magensäureproduktion eine Risikogruppe für das Diarrhö-Syndrom darstellen, da mehr *B. cereus*-Zellen die Magenpassage überstehen. Sie stellen zudem dar, dass das Vorhandensein von Milchprodukten die Widerstandsfähigkeit von *B. cereus*-Zellen gegenüber sauren pH-Werten erhöht. Da der Ausbruch des Diarrhö-Syndroms von vielen verschiedenen Faktoren wie Art und Menge des gebildeten Enterotoxins, Empfänglichkeit des Patienten und Art des kontaminierten Lebensmittels abhängig ist, erscheint eine allgemeingültige Beurteilung von kritischen Keimzahlen in Lebensmitteln schwierig.

### 2.3.3 Vorkommen von aeroben Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen

#### 2.3.3.1 Kontaminationsquellen von Trockenmilcherzeugnissen mit aeroben Sporenbildnern

Die möglichen Quellen der Kontamination von Trockenmilcherzeugnissen mit *Bacillus* spp. sind vielfältig. Besonders bei Fehlen einer aktiven Begleitflora können sich *Bacillus* spp. in Milch und anderen Lebensmitteln durchsetzen (KIELWEIN, 1994b; RAJKOVIC et al., 2006), wobei aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens, der hohen Widerstandsfähigkeit ihrer Endosporen und dem aeroben, fakultativ anaeroben Stoffwechsel Selektionsvorteile gegenüber anderen Mikroorganismen bestehen.

Eine primäre Kontamination der Rohmilch mit *Bacillus* spp. ist prinzipiell durch subklinisch an Mastitis erkrankte Kühe möglich (NIEMINEN et al., 2007). Hauptsächlich ist die Belastung von Trockenmilcherzeugnissen mit aeroben Sporenbildnern jedoch vor allem Folge einer sekundären Kontamination der Ausgangsmilch im Zusammenhang mit dem Melkprozess. Der Eintrag erfolgt u.a. aus Erdboden, Staub, Dung, Wasser, Stroh, Heu, Silage sowie anderem Viehfutter und kontaminierten Oberflächen des Melkzeugs (BECKER et al., 1994; TE GIFFEL et al., 2002; FOLTYS & KIRCHNEROVÁ, 2006; COOREVITS et al., 2008).

Aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit der Endosporen und der Ausbildung von Biofilmen ist zudem eine Besiedlung der Trockenmilchproduktionsanlagen und von dort ausgehend eine Verunreinigung des Produktes möglich. Die ausgeprägte Hitzeresistenz der Sporen ermöglicht Kontaminationen sowohl vor als auch nach den Wärmebehandlungen einschließlich der Pasteurisierung (BECKER et al., 1994; SVENSSON et al., 1999; RÜCKERT et al., 2004; EFSA, 2005; SVENSSON et al., 2006; BANYKÓ & VYLETÉLOVÁ, 2009). Als kritischer Punkt muss die initiale Wärmebehandlung der Ausgangsmilch betrachtet werden, da sie unter Umständen nicht abgetötete Sporen aktiviert. Diese können auskeimen, sich vermehren und gegebenenfalls erneut Sporen ausbilden oder hitzestabile Toxine produzieren, welche die nachfolgenden Hitze- und Sprühtrocknungsprozesse überstehen (BECKER et al., 1994; RÜCKERT et al., 2004).

Unter Annahme einer durchschnittlichen Belastung der Rohmilch mit  $1 \times 10^1$  bis  $5 \times 10^1$  Sporen thermophiler *Bacillus* spp./ml und einer zehnfachen Aufkonzentrierung während der Pulverherstellung, ist das Vorkommen von mehr als  $5 \times 10^2$  *B. cereus*/g Milchpulver ein Indiz für Wachstum innerhalb der Produktionsanlagen. Dasselbe gilt für deutliche Abweichungen der Zusammensetzung des Keimspektrums im Vergleich zu den üblicherweise in Rohmilch vorkommenden Spezies (RONIMUS et al., 2003; RÜCKERT et al., 2004).

Eine Rekontamination des Endproduktes vor allem in Form einer Kreuzkontamination durch den Zusatz anderer getrockneter Zutaten ist ebenfalls möglich (WONG et al., 1988; BECKER et al., 1994; REYES et al., 2007). Hierbei sind besonders Trockenmilcherzeugnisse mit kohlehydratreichen und stärkehaltigen Inhaltsstoffen sowie Aromastoffen und Gewürzen gefährdet.

In Trockenmilcherzeugnissen sind aufgrund der niedrigen  $a_w$ -Werte weder eine Vermehrung der Mikroflora noch das Auskeimen von vorhandenen Sporen möglich (HAMMER et al., 2001; REYES et al., 2007). Nach Rekonstitution der Pulver und Lagerung bei Raumtemperaturen kann es jedoch zu Germination der Endosporen mit nachfolgender Proliferation der vegetativen Zellen und eventueller Toxinbildung kommen (REYES et al., 2007). Generell ist das Vorkommen von *Bacillus* spp. als solches in Trockenmilcherzeugnissen schwierig zu beurteilen, da sowohl apathogene als auch pathogene Stämme beteiligt sein können und nicht unter allen Umständen Toxine respektive Toxine in größeren Mengen gebildet werden.

### 2.3.3.2 Untersuchungen zum Vorkommen von aeroben Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen

Untersuchungen zum Vorkommen von aeroben Sporenbildnern verschiedener Autoren ergaben ein breites Keimspektrum an mesophilen, thermophilen und psychrotrophen *Bacillus* spp. in Milch und Trockenmilcherzeugnissen. Eine Übersicht zum allgemeinen Spektrum an *Bacillus* spp. und den am häufigsten aus verschiedenen Produkten isolierten Spezies ist in den Tabellen 9 und 10 gegeben.

Auffällig ist, dass trotz einer großen Vielfalt an in roher und pasteurisierter Milch vorkommender *Bacillus*-Spezies nur eine relativ kleine Gruppe als Kontaminanten in Milchpulvern auftritt. Die in Rohmilch am häufigsten nachgewiesenen Spezies sind *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. circulans* und *B. polymyxa* (CRIELLY et al., 1994; SUTHERLAND & MURDOCH, 1994; COOREVITS et al., 2008). RÜCKERT et al. (2004) wiesen in ihrer Studie an 28 Milchpulvern in 27 Proben insgesamt 280 Isolate *B. licheniformis* Stamm F nach; weniger häufig aber in der Produktpalette ebenfalls weit verbreitet traten *B. subtilis* (22 Isolate in 14 Produkten) und *B. licheniformis* Stamm G (11 Isolate in sechs Produkten) auf. In neun Produkten waren zudem *B. circulans* (neun Isolate) und *B. pumilus* (ein Isolat) vorhanden. CRIELLY et al. (1994) untersuchten das Vorkommen von *Bacillus* spp. in rekonstituierten Spezial- bzw. Flüssignahrungen und Säuglingsnahrungen aus Krankenhäusern und Einzelhandelsgeschäften und wiesen *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. sphaericus* und *B. subtilis* nach.

**Tab. 9:** Überblick über die in verschiedenen Studien ermittelten *Bacillus*-Spezies in unterschiedlichen Milchprodukten

Spezies	Untersuchte Produkte				
	Rohmilch <sup>a)</sup>	Rohmilch, pasteurisierte Milch <sup>b)</sup>	pasteurisierte Milch <sup>c)</sup>	Milch und Milchprodukte <sup>d)*</sup>	Milchpulver <sup>e)</sup>
<i>B. licheniformis</i>	+	+	+	+	+
<i>B. circulans</i>	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	n.n.
<i>B. pumilus</i>	+	+	+	n.n.	+
<i>B. coagulans</i>	n.n.	n.n.	+	+	+
<i>B. sphaericus</i>	n.n.	+	+	+	n.n.
<i>B. mycoides</i>	n.n.	+	+	+	n.n.
<i>B. lentus</i>	n.n.	+	+	+	n.n.
<i>B. firmus</i>	n.n.	+	n.n.	+	n.n.
<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. stearothermophilus</i>	n.n.	+	+	n.n.	n.n.
<i>B. megaterium</i>	n.n.	+	+	n.n.	n.n.
<i>B. macerans</i>	n.n.	+	+	n.n.	n.n.
<i>B. laterosporus</i>	n.n.	+	+	n.n.	n.n.
<i>B. polymyxa</i>	+	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. panthotenicus</i>	n.n.	+	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. clausii</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. oleronius</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. silvestris</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. thermoamylovorans</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. simplex</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. badius</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. galactosidilyticus</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. massiliensis</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. sporothermodurans</i>	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>Bacillus</i> sp. 1 bis 7 **	+	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Referenzen: a) COOREVITS et al.(2008); b) SUTHERLAND & MURDOCH (1994);

c) COSENTINO et al. (1997); d) CRIELLY et al. (1994); e) RÜCKERT et al. (2004)

n.n. nicht nachweisbar

\* untersuchte Proben umfassten Spezialnahrungen auf Milchbasis wie Säuglingsnahrung und Trinknahrung mit oder ohne Fruchtgeschmack aus Krankenhäusern sowie Einzelhandelsgeschäften

\*\* nicht weiter differenziert

**Tab. 10:** Übersicht über die am häufigsten aus Milch und Milcherzeugnissen isolierten *Bacillus*-Spezies

Art der Probe	Anzahl		Anzahl <i>Bacillus</i> spp. pos. Proben	Anzahl Isolate gesamt	Häufigste Spezies (% der Isolate)	Referenz
	Proben	Isolate				
Rohmilch	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	<i>B. licheniformis</i> <i>B. cereus</i>	CRIELLY et al. (1994)
Rohmilch	250 <sup>a)</sup>	k.A.	769	k.A.	<i>B. pumilus</i> (20,3) <i>B. licheniformis</i> (17) <i>B. subtilis</i> (16,5)	SUTHERLAND & MURDOCH (1994)
Rohmilch	200 <sup>b)</sup>	k.A.	44	k.A.	<i>B. cereus</i> (88,6) <i>B. polymyxa</i> (9) <i>B. circulans</i> (2,3)	SUTHERLAND & MURDOCH (1994)
Rohmilch	k.A.	k.A.	461	k.A.	<i>B. licheniformis</i> (53,6) <i>B. pumilus</i> (13,2)	COOREVITS et al. (2008)
Rohmilch, Joghurt, pasteurisierte Milch	684 <sup>c)</sup>	k.A.	396	k.A.	<i>B. licheniformis</i> (42,5) <i>B. cereus</i> (15,5)	BANYKÓ & VYLETÉLOVÁ (2009)
Pasteurisierte Milch	124	k.A.	k.A.	k.A.	<i>B. polymyxa</i> <i>B. cereus</i>	TERNSTRÖM et al. (1993)
Pasteurisierte Milch	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	<i>B. licheniformis</i> <i>B. cereus</i>	CRIELLY et al. (1994)

Fortsetzung **Tab. 10:** Übersicht über die am häufigsten aus Milch und Milcherzeugnissen isolierten *Bacillus*-Spezies

Art der Probe	Anzahl Proben	Anzahl <i>Bacillus</i> spp. pos. Proben	Anzahl Isolate	Anzahl Isolate gesamt	Häufigste Spezies (% der Isolate)	Referenz
Pasteurisierte Milch	90 <sup>d)</sup>	60	132		<i>B. licheniformis</i> (22,8) <i>B. subtilis</i> (18,2) <i>B. coagulans</i> (18,2) <i>B. sphaericus</i> (6,8) <i>B. cereus</i> (6,8)	COSENTINO et al. (1997)
Milchpulver	28 <sup>e)</sup>	28	328		<i>B. licheniformis</i> (88,7) <i>B. subtilis</i> (6,7)	RÜCKERT et al. (2004)
Rekonstituierte Milchpulver <sup>d)</sup>	k.A.	k.A.	k.A.		<i>B. licheniformis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. sphaericus</i> <i>B. subtilis</i>	CRIELLY et al. (1994)

k.A. keine Angabe

- a) Untersuchungsmethode angepasst an den Nachweis mesophiler *Bacillus* spp.
- b) Untersuchungsmethode angepasst an den Nachweis psychrotropher *Bacillus* spp.
- c) Proben wurden nur auf das Vorhandensein von *B. cereus* und *B. licheniformis* untersucht
- d) Probenahme erfolgte ausschließlich in Sardinien, Italien
- e) Untersuchungsmethode angepasst an den Nachweis thermophiler *Bacillus* spp.
- f) untersuchte Proben umfassten Spezialnahrungen auf Milchbasis wie Säuglingsnahrung und Trinknahrung mit oder ohne Fruchtgeschmack aus Krankenhäusern sowie Einzelhandelsgeschäften

Die durchschnittliche Belastung von Rohmilch mit aeroben Sporenbildnern ist mit 1 bis  $10^3$  Zellen oder Sporen/ml insgesamt gering. Diese Angaben beziehen allerdings teilweise auch aerobe Sporenbildner mit ein, die nicht zur *Bacillus*-Gruppe gehören. Differenzen der Untersuchungsergebnisse treten in Abhängigkeit der angewendeten Untersuchungsmethoden sowie zum Teil in Abhängigkeit des Untersuchungszeitpunktes auf und zeigen in einigen Studien saisonale Varianzen (CRIELLY et al., 1994; SUTHERLAND & MURDOCH, 1994; MCGUIGGAN et al., 2002; TE GIFFEL et al., 2002; FOLTYS & KIRCHNEROVÁ, 2006; COOREVITS et al., 2008). In den Jahren 2000 bis 2003 enthielten annähernd 99 % von insgesamt 9.961 untersuchten Milch und Milchprodukten aus den Niederlanden Keimzahlen von  $< 10^5$  KbE *B. cereus*/g (EFSA, 2005).

RÜCKERT et al. wiesen in Milchpulvern Kontaminationshöhen von  $8 \times 10^0$  bis  $5 \times 10^4$  KbE thermophiler *Bacillus* spp. pro Gramm nach. Die Studie von CRIELLY et al. (1994) zeigt eine Belastung von rekonstituierten Spezialnahrungen auf Milchbasis mit *Bacillus* spp. von durchschnittlich  $10^2$  KbE/ml. Trinknahrung auf Milchbasis mit Fruchtgeschmack war stärker kontaminiert als solche ohne Geschmackszusatz, es traten Werte von bis zu  $1,5 \times 10^4$  KbE *Bacillus* spp./ml auf. Differenzierte Werte zur Keimzahl der jeweiligen *Bacillus*-Spezies, ausser *B. cereus*, sind in der Literatur leider nur vereinzelt angegeben.

Bezüglich des Vorkommens und der Kontaminationshöhe von *B. cereus* speziell in Trockenmilcherzeugnissen werteten BECKER et al. (1994), wie in Tabelle 11 dargestellt, verschiedene Studien aus den Jahren 1963 bis 1988 aus. Die Inzidenz von *B. cereus*-positiven Proben lag zwischen 10 % und 100 %, die Kontaminationsraten variierten von  $0,2 \times 10^0$  bis  $9,6 \times 10^3$  KbE *B. cereus*/g. Dies entspricht einem hohen Prozentsatz positiver Proben bei verhältnismäßig geringen Keimzahlen und deckt sich weitgehend mit den Ergebnissen der von WONG et al. (1988), HAMMER et al. (2001) sowie REYES et al. (2007) durchgeführten Studien (Tab. 12). Sowohl WONG et al. (1988) als auch REYES et al. (2007) stellten erhöhte Inzidenzen und höhere Kontaminationsraten bei mit anderen Zutaten wie Reis, Cerealien, Hülsenfrüchten und Frucht- sowie anderen Aromen versehenen Trockenmilcherzeugnissen verglichen mit herkömmlichen Milchpulvern fest.

**Tab. 11:** Überblick über die Inzidenz und die Kontaminationshöhe von *B. cereus* in Trockenmilcherzeugnissen, modifiziert nach BECKER et al. (1994)

Land	Art der Probe	Anzahl untersuchte Proben	Anzahl positive Proben (%)	<i>B. cereus</i> /g
Ungarn	TM	52	27 (51,9)	60 - 100
Polen	TM	27	6 (22,2)	100 - 2000
Polen	TM	332	64 (19,3)	10 - 1000
USA	MMP	8	3 (37,5)	200 - 600
Deutschland	MMP; VMP	80	33 (41,3)	100 - 9600
Brasilien	MMP; VMP	40	40 (100)	≤ 1000
Belgien	MP	60	57 (95)	0,2 - 53
Finnland	TM	13	2 (15,4)	10 - 100
Brasilien	TME	k.A.	86,2 % (42,1 %)	k.A. (> 1000)
	MMP	k.A.	16,7 %	< 1000
	VMP	k.A.	34,8 %	< 1000
Südafrika	MMP	120	32 (26,7)	- 110
Japan	MMP	89	70 (78,7)	k.A.
Polen	MP	25	12 (48)	10 - 1000
Niederlande	MP (1971-78)	723	54 % 23 % 18 % 4 %	0 - 5 5 - 20 20 - 100 > 100
Japan	MMP	302	31 (10,3)	< 300
Ägypten	MP	10	7 (70)	10 - 9500
USA	MMP; VMP	8	5 (62,5)	30 - 270
Brasilien	VMP	30	24 (80)	> 1000

TM = Trockenmilch; MMP = Magermilchpulver; VMP = Vollmilchpulver; MP = Milchpulver;

TME = Trockenmilcherzeugnisse

k.A. keine Angabe

**Tab. 12:** Weitere Studien zu Inzidenz und Kontaminationshöhe von *B. cereus* in Trockenmilcherzeugnissen

Land	Art der Probe	Anzahl untersuchte Proben	Anzahl positive Proben (%)	<i>B. cereus</i> /g	Referenz
China	MP insgesamt	94	27 (29)	5 - 450	WONG et al. (1988)
	herkömmliche MP	62	9 (15)	5 - 100	
	MP mit Aroma*	32	18 (56)	10 - 450	
Deutschland	MP	1365	146 (10,7)	1 - 10	HAMMER et al. (2001)
Chile	TME insgesamt**	381	175 (45,9)	3 - 10000	REYES et al. (2007)
	MP	29	10 (34,5)	3 - 10	
	Milch mit Reis	56	35 (62,5)	3 - 10000	
	Milch-Cerealien-Reis	27	11 (40,7)	3 - 10000	

MP = Milchpulver; TME = Trockenmilcherzeugnisse

\* Produkte mit Apfel-, Frucht-, Mandel-, Schokolade- und Kaffee-Geschmack

\*\* untersuchte Produkte umfassten Milch mit Reis, Pudding, Milchpudding, Milchersatz, Milch mit Cerealien und Reis, Grieß mit Milch, Mousse und Milchpulver

Studien zum Vorkommen von toxinbildenden *Bacillus* spp. in Milch und Trockenmilcherzeugnissen beziehen sich größtenteils speziell auf *B. cereus* und variieren stark bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Aussagekraft. In einer von WIJNANDS et al. (2006) durchgeführten Studie an 17 gekühlt gelagerten Milchen und Milchprodukten aus den Niederlanden wurden 80 *B. cereus*-Isolate anhand eines Hep2-Zelltestes auf ihre Fähigkeit Cereulid-ähnliche Toxine zu produzieren untersucht, wobei keine Bestätigung mittels LC-MS erfolgte. Weiterhin wurde mittels PCR das Vorhandensein von *Nhe*, *Hbl* und *CytK* kodierenden Genen detektiert. Alle untersuchten Isolate waren in mindestens einem Test positiv, bestimmte Kombinationen traten gehäuft auf. Da jedoch nur die theoretische Möglichkeit der Toxinbildung untersucht wurde, besteht die Gefahr der Überbewertung der Ergebnisse. Die Resultate der Studie sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

**Tab. 13:** Vorkommen von Virulenzfaktoren bzw. deren Kombinationen bei aus Milch und Milchprodukten isolierten *B. cereus*-Stämmen, modifiziert nach WIJNANDS et al. (2006)

Toxine und Gene	Anzahl positive Isolate (n = 80)	% positive Isolate
Keine <sup>a)</sup>	0	0
Cer <sup>b)</sup> (alleine)	0	0
Nhe <sup>c)</sup> (alleine)	24	30
Hbl <sup>d)</sup> (alleine)	1	1,3
CytK <sup>e)</sup> (alleine)	0	0
Cer-Nhe	1	1,3
Cer-Hbl	0	0
Cer-CytK	0	0
Cer-Hbl-Nhe	11	13,8
Cer-Hbl-CytK	0	0
Cer-Nhe-CytK	0	0
Cer-Hbl-Nhe-CytK	0	0
Hbl-Nhe	19	23,8
Hbl-CytK	2	2,5
Nhe-CytK	6	7,5
Hbl-Nhe-CytK	16	20

a) weder Cereulid-ähnliche Toxinproduktion noch für Enterotoxine kodierende Gene

b) Cereulid-ähnliche Toxinproduktion

c) für Nhe kodierende Gene

d) für Hbl kodierende Gene

e) für CytK kodierende Gene

Zytotoxizitätsuntersuchungen anhand von Vero-Zellkulturtests und CHO-Zellkulturtests an 50 ausgewählten *B. cereus*-Isolaten aus diversen Milchprodukten erbrachten nach WONG et al. (1988) 98 % bzw. 68 % positive Isolate. Die zuvor erfassten Keimzahlen lagen bei  $5 \times 10^0$  bis  $8 \times 10^2$  KbE/g bzw. ml der untersuchten Produkte. HAMMER et al. (2001) ermittelten unter 329 *B. cereus*-Isolaten aus Milchpulvern und Umfeldproben eines Milchtrocknungsbetriebes anhand des Vero-Zellkulturtests 48 % (bei morphologischer Beurteilung der Vero-B4-Zellen) bzw. 58 % (bei LDH-Messung) positive Isolate. Hierbei lagen die Keimzahlen der Milchpulverproben bei  $1 \times 10^0$  bis  $1 \times 10^1$  KbE/g.

SVENSSON et al. (2006) beprobten je zehn Bauernhöfe und Molkereien in Schweden und ermittelten anhand des Ebersperma-Motilitätstests, dass 1,1 % bis 1,9 % der isolierten *B. cereus*-Stämme Cereulid produzierten. Innerhalb der auf den Höfen entnommenen Milchproben reagierten elf von 722 Isolaten, entsprechend 1,5 %, positiv. Die Keimzahlen der emetischen *B. cereus*-Stämme in den Milchproben lagen bei  $< 10^3$  Sporen/l. Aus allen positiv getesteten Isolaten wurden zehn ausgewählte Isolate mittels LC-Ionenfallen MS überprüft; alle wurden als Cereulid produzierende Stämme bestätigt. Die Menge des produzierten Cereulids lag zwischen 0,01 und 2,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  bakterieller Biomasse. In der von NIEMINEN et al. (2007) durchgeführten Studie an 100 Mastitismilchproben reagierten vier von fünf *B. pumilus*-Stämmen (80 %) sowie zwei von drei *B. licheniformis*-Stämmen (67 %), jedoch keines der sechs *B. cereus*-Isolate positiv im Ebersperma-Motilitätstest.

Die mittels kommerzieller Testkits erzielten Ergebnisse einzelner Autoren weichen, wie in Tabelle 14 dargestellt, hinsichtlich der Prävalenz positiver *B. cereus*-Isolate relativ stark voneinander ab; sie sind aber aufgrund der Verschiedenheit der untersuchten Produkte sowie der unterschiedlichen Nachweismethoden nur schwer vergleichbar. Da diese Ergebnisse jeweils nur auf der Untersuchung einzelner Komponenten der Toxinkomplexe beruhen, ist ein positives Testergebnis nicht gleichbedeutend mit tatsächlich vorhandener Toxizität. Die in den Studien einbezogenen Milchpulverproben enthielten nur geringe Keimzahlen je Gramm (HAMMER et al., 2001; REYES et al., 2007). In der Studie von HAMMER et al. (2001) wurde nicht angegeben, wie viele der BDE-VIA positiven Isolate aus den Milchpulverproben stammten.

**Tab. 14:** Übersicht der Ergebnisse einiger Studien zum Vorkommen von Enterotoxin produzierenden *B. cereus* mittels kommerzieller Testkits

Land	Produkt	Anzahl Isolate	Anzahl positive Isolate (%)	Nachweis- methode	<i>B. cereus</i> /g oder ml	Toxin- menge ng/ml	Referenz
SE	Milch	35 <sup>a)</sup>	8 (25)	BCET- RPLA	k.A.	k.A.	VAN NETTEN et al. (1990)
I	Milch- produkte <sup>b)</sup>	90	65 (72)	BCET- RPLA	10-1200	k.A.	COSENTINO et al. (1997)
CL	TME	94	28 (29,8)	BCET- RPLA	3-10000	k.A.	REYES et al. (2007)
	MP	8	2 (25)	BCET- RPLA	3-10	k.A.	
FIN	Mastitis- Milch	6	3 (50)	BCET- RPLA	k.A.	k.A.	NIEMINEN et al. (2007)
DE	MP + Umfeld <sup>c)</sup>	329	322 (98)	BDE- VIA	1-10 in MP	2,1 - 320,5 <sup>d)</sup>	HAMMER et al. (2001)
SE	Milch- proben aus Farm, Silo, Molkerei	396	293 (74)	BCET- RPLA	k.A.	k.A. <sup>e)</sup>	SVENSSON et al. (2007)
			293 (74)	BDE- VIA	k.A.	k.A. <sup>e)</sup>	

SE = Schweden; I = Italien; CL = Chile; FIN = Finnland; DE = Deutschland;

TME = Trockenmilcherzeugnisse; Produkte umfassten Milch mit Reis, Pudding, Milchpudding, Milchersatz, Milch mit Cerealien und Reis, Grieß mit Milch, Mousse und Milchpulver;

MP = Milchpulver

k.A. keine Angabe

a) nur psychrotrophe Stämme untersucht

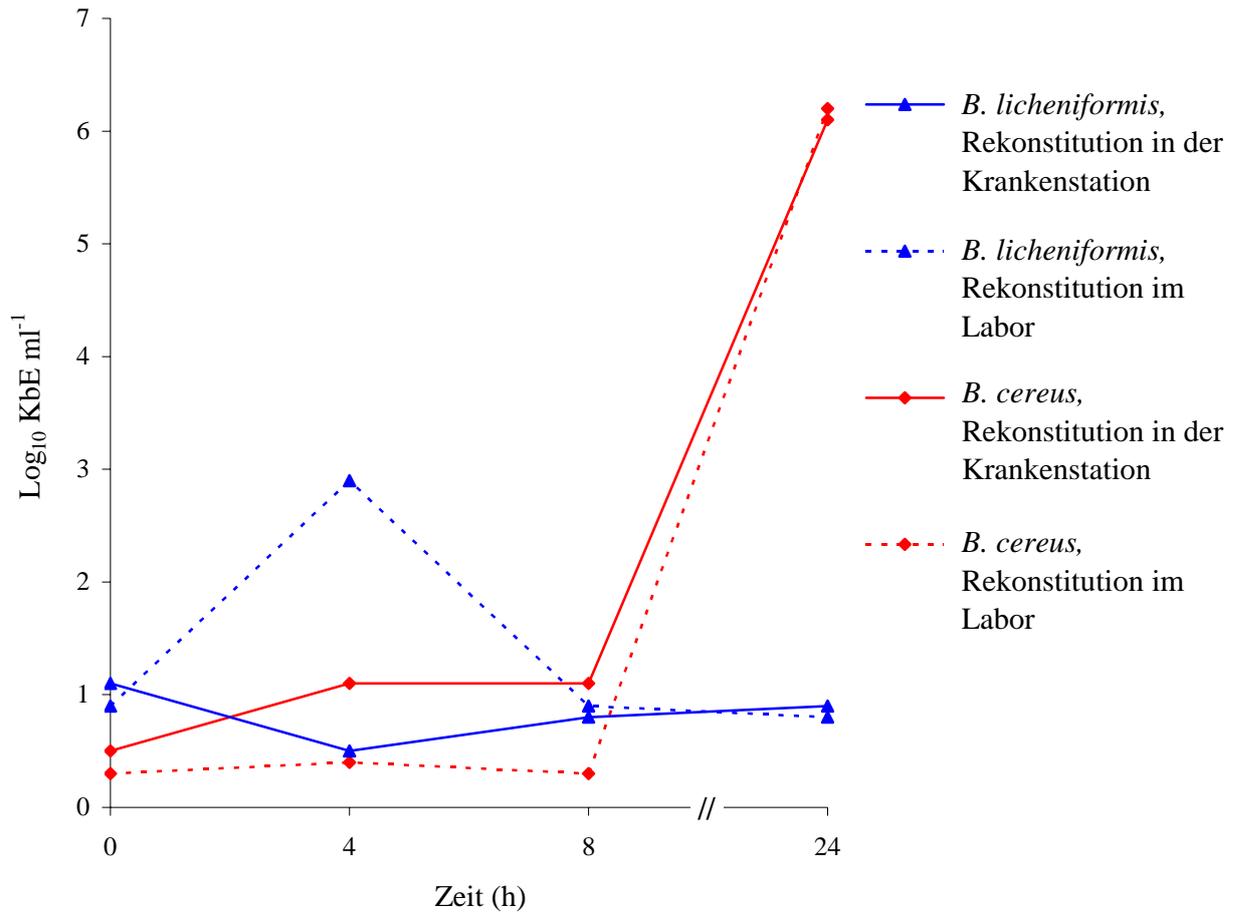
b) untersuchte Produkte umfassten pasteurisierte Milch, UHT-Milch sowie Käseprodukte

c) Probenentnahme erfolgte in einem Milchtrocknungsbetrieb

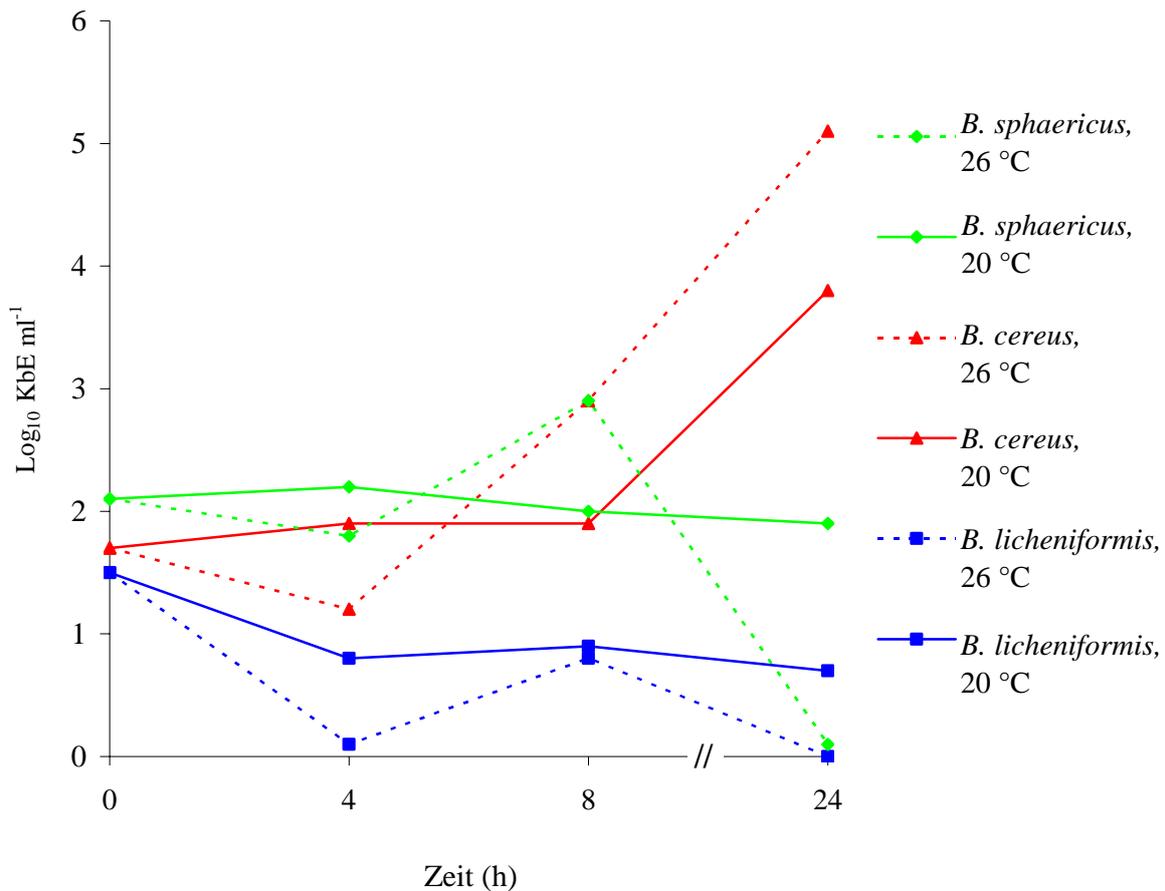
d) Toxinmenge anhand optischer Auswertung nach Farbkarte ermittelt

e) 39 % der Isolate „high producer“ für HblC, 14 % „high producer“ für NheA, 10 % „high producer“ für HblC und NheA; gemessen anhand optischer Auswertung, „high producer“ bei Index 4 - 5

Das Verhalten von *Bacillus* spp. in rekonstituierten Trockenmilcherzeugnissen in Abhängigkeit von der Aufbewahrungsdauer und -temperatur wurde in verschiedenen Studien untersucht. CRIELLY et al. (1994) lösten Pulver für Spezialnahrungen auf Milchbasis wie Säuglingsnahrung und Trinknahrung mit oder ohne Fruchtgeschmack zum Teil im Labor zu 10 % in sterilem destilliertem Wasser, zum Teil wurden in Krankenstationen angesetzte Mischungen verwendet. Bei Raumtemperatur (20 °C) inkubierte Proben von Säuglingsnahrung aus einem Krankenhaus zeigten bei Probennahme nach 0, 4, 8 und 24 Stunden, dass die Keimzahl eines *B. licheniformis*-Stammes, unabhängig von der Art der Rekonstitution, über einen Zeitraum von 24 Stunden annähernd gleich blieb (ca.  $10^1$  KbE/ml). Der ebenfalls untersuchte *B. cereus*-Stamm wies zu den Probennahme-Zeitpunkten 0, 4 und 8 Stunden jeweils  $< 10^1$  KbE/ml auf und stieg nach 24 Stunden auf  $10^6$  KBE/ml an. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Inkubation der Probe bei 26 °C. Weiterhin wurde ein im Einzelhandel erstandenes, nicht-aromatisiertes Säuglingsnahrungspulver im Labor rekonstituiert und nach 0, 4, 8 und 24 Stunden bei 20 °C sowie 26 °C auf die Höhe der Kontamination mit *B. licheniformis*, *B. cereus* und *B. sphaericus* untersucht. Die ursprünglichen Kontaminationsraten lagen bei  $2 \times 10^2$  KbE/ml (*B. licheniformis*),  $1 \times 10^2$  KbE/ml (*B. cereus*) bzw.  $4 \times 10^2$  KbE/ml (*B. sphaericus*). Bei beiden Inkubationstemperaturen dominierte nach 24 Stunden *B. cereus* mit Keimzahlen von ca.  $10^3$  KbE/ml (20 °C) bzw.  $10^5$  KbE/ml (26 °C); die Keimzahlen von *B. licheniformis* und *B. sphaericus* fielen ab auf  $10^0$  bzw.  $10^1$  KbE/ml bei 20 °C und waren nicht mehr messbar bei 26 °C (Abb. 3 und 4).



**Abb. 3:** Effekt der Inkubation bei 20 °C auf die Anzahl von zwei *Bacillus*-Spezies in aus Pulver rekonstituierten Säuglingsnahrungsmitteln, modifiziert nach CRIELLY et al. (1994)



**Abb. 4:** Keimzahlen von drei *Bacillus*-Spezies in einem nicht-aromatisierten Säuglingsnahrungspulver aus dem Einzelhandel nach Rekonstitution im Labor und Inkubation bei 20 °C und 26 °C, modifiziert nach CRIELLY et al. (1994)

WONG et al. (1988) versetzten in einer experimentellen Studie kommerzielle, rekonstituierte Milch mit Fruchtgeschmack mit jeweils  $10^4$  vegetativen Zellen bzw. Sporen *B. cereus* pro Milliliter, inkubierten die Proben bei 30 °C und untersuchten die Höhe der Keimzahlen nach 0, 4, 8, 12 und 24 Stunden. Der Gehalt an vegetativen Zellen stieg bereits nach zwölf Stunden auf  $10^6$  KbE/ml an und blieb bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt annähernd konstant; der Gehalt an Sporen erreichte erst nach 24 Stunden Werte von  $10^6$  KbE/ml.

## 2.4 Aerobe mesophile Keimzahl

### 2.4.1 Allgemeines

Als Keimzahl wird die Anzahl von Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen, Hefen und Protozoen im Untersuchungssubstrat pro Gramm oder Milliliter bezeichnet (WIESNER & RIBBECK, 2000). Die Abschätzung des Keimgehaltes in Lebensmitteln kann direkt durch Nachweis und Zählung der Mikroorganismen oder indirekt durch Nachweis von mit der Zahl der Mikroorganismen korrelierenden Markern erfolgen. In der Regel ist der Begriff „Keimzahl“ in der Milchhygiene jedoch in einem eingeschränkten Sinn als aerobe mesophile Keimzahl zu verstehen.

### 2.4.2 Aerobe mesophile Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen

Zum Nachweis der aeroben mesophilen Keimzahl von Bakterien in Trockenmilcherzeugnissen werden nach §64 LFGB, Methode L01.00-57 „Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten - Spatelverfahren“ sowie Methode L01.00-5 „Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten - Referenzverfahren“ direkte, kulturelle Methoden wie das Spatel- oder Gussverfahren angewendet. Dezimale Verdünnungen der Probe werden auf nicht-selektiven Nährmedien ausgespatelt bzw. mit diesen überschichtet. Nach 48 bzw. 72 Stunden Bebrütung bei 30 °C werden makroskopisch sichtbare Kolonien gezählt (Koloniezahl) und auf die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KbE) je Gramm oder Milliliter der Probe umgerechnet (Keimzahl, als gewichtetes arithmetisches Mittel).

Es gilt jedoch zu beachten, dass jedes Verfahren durch seine methodischen Parameter limitiert und der absolute Keimgehalt nicht messbar ist. Die bei den kulturellen Verfahren vorausgesetzte Annahme, dass jeder vorhandene Keim zu einer Kolonie aufwächst bzw. dass jede Kolonie ihren Ausgang von nur einem Keim nimmt, ist nach KIELWEIN (1994b) nicht immer gegeben, da sich nicht alle Keime in jedem Nährmedium und bei jeder Temperatur in gleicher Weise vermehren oder mehrere zusammen gelagerte Keime zu einer gemeinsamen Kolonie aufwachsen können. Weiterhin ist die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten abhängig von der Art der Bakterien, der Zusammensetzung der Flora und des Nährmediums

sowie der Sauerstoffspannung. Daraus folgt nach Angabe des Autors, dass nur bei bekannter Zusammensetzung des Nährmediums und bekannten Züchtungsbedingungen eine Vergleichbarkeit von kulturell ermittelten Keimzahlen besteht und nur einheitliche Methoden und Nährmedien Anwendung finden sollten.

Die Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl in Milchpulvern ist abhängig sowohl von der Anzahl als auch der Art der in der Rohmilch vorhandenen Mikroorganismen sowie von eventuellen Rekontaminationen (vgl. Kap. 2.1.2.3). Während Hitzebehandlungen im Produktionsprozess vegetative Keime und psychrotrophe Bakterien reduzieren, sind thermoresistente Stämme im Endprodukt gegebenenfalls weiterhin vorhanden. Die geringe Wasseraktivität der pulverförmigen Produkte sowie ablaufende Oxidationsprozesse führen zu einer Abnahme der Keimzahlen mit zunehmender Lagerzeit (CELESTINO et al., 1997).

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen liefert einen rein quantitativen Anhaltspunkt zur mikrobiologischen Qualität der Produkte und ist derzeit nicht rechtlich vorgeschrieben. Zur Herstellung von Milcherzeugnissen verwendete rohe Kuhmilch muss unmittelbar vor der Verarbeitung bei 30 °C eine Keimzahl von weniger als  $3 \times 10^5$  KbE/ml, verarbeitete Kuhmilch von weniger als  $1 \times 10^5$  KbE/ml aufweisen (vgl. Kap. 2.1.3). In einer Studie von CELESTINO et al. (1997) sind auch nach Belastungen der Rohmilch mit  $1,2 \times 10^5$  bzw.  $1,1 \times 10^6$  KbE/ml im resultierenden Milchpulver Keimzahlen von weniger als  $10^4$  KbE/g ermittelt worden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen GRIFFITHS et al. (1988); sie wiesen in Milchpulver aus Rohmilch mit  $1,6 \times 10^5$  mesophilen KbE/ml eine Keimzahl von  $2,2 \times 10^3$  KbE/g nach.

Eine aerobe mesophile Keimzahl von  $5 \times 10^4$  KbE/g Milchpulver wird in der Literatur gemeinhin als Standard akzeptiert (LOVELL, 1983), dieser Wert wurde zudem in der Schweizer Hygieneverordnung aus dem Jahre 2004 vor Umsetzung der EU-Richtlinien als Toleranzwert aufgeführt.

#### 2.4.2.1 Untersuchungen zur aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen

Nach LOVELL (1983) werden in Sprühmilchpulvern Keimzahlen von  $10^3$  bis  $10^6$  KbE/g beobachtet. Nach Angabe verschiedener Autoren sind Werte von  $> 10^4$  KbE/g jedoch vergleichsweise selten, häufiger sind Trockenmilcherzeugnisse mit  $10^2$  bis  $10^4$  KbE/g belastet. Eine Übersicht zu einschlägigen Studien ist in Tabelle 15 zusammengestellt.

**Tab. 15:** Untersuchungen zur Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen

Art der Probe	Anzahl Proben	Keimzahlbereich (KbE/g)	Anzahl Proben > 10 <sup>4</sup> KbE/g (Höhe KbE/g)	Anmerkungen	Referenz
Trockenmilch	10	8 x 10 <sup>2</sup> - 2 x 10 <sup>7</sup>	2 (1.: 10 <sup>5</sup> ; 2.: 10 <sup>7</sup> )	Mehrzahl der Proben enthielt 10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup> KbE/g	HELMY et al. (1984)
VMP aus frischer Milch	15	Ø 2,6 x 10 <sup>3</sup>	k.A.		CELESTINO
VMP aus gelagerter Milch	15	Ø 4,6 x 10 <sup>3</sup>	k.A.	Lagerung 48±2 h bei 4±1 °C vor Verarbeitung	et al. (1997)
VMP nach Lagerung	6	9,5 x 10 <sup>2</sup> - 5,4 x 10 <sup>3</sup>	0	Lagerung 0, 2, 4, 6 und 8 Monate	
Milchpulver	28	6,7 x 10 <sup>0</sup> - 2,2 x 10 <sup>5</sup>	4 (1.: 3,5 x 10 <sup>4</sup> 2.: 3,8 x 10 <sup>4</sup> 3.: 4 x 10 <sup>4</sup> 4.: 2,2, x 10 <sup>5</sup> )	thermophile Keimzahl bestimmt, Inkubation 16 h bei 55° C	RÜCKERT et al. (2004)
Milchpulver	72	< 10 <sup>2</sup> - 10 <sup>4</sup>	0	40 % der Proben enthielten < 10 <sup>2</sup> ; 18 % enthielten 10 <sup>2</sup> KbE/g; 22 % > 10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup> KbE/g; 20 % > 10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup> KbE/g	IVERSEN & FORSYTHE (2004b)
SMP	28*	< 1x10 <sup>1</sup> - 1,98x10 <sup>5</sup>	2 (1.: 5x10 <sup>4</sup> ; 2.: 1,98 x 10 <sup>5</sup> )	Beide Proben mit >10 <sup>4</sup> KbE/g entstammten dem selben Hersteller**, restliche Proben enthielten < 1 x 10 <sup>1</sup> - 4,5 x 10 <sup>2</sup> KbE/g	SITHOLE et al., (2006)

VMP = Vollmilchpulver, SMP = Süßmilchpulver, k.A. keine Angabe

\* Sammelproben von sieben Herstellern der USA, Untersuchungen jeweils im Winter und Sommer, nach Lagerung drei und neun Monate

\*\* Wintercharge, nach Lagerung drei und neun Monate

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Probenmaterial

Zur Untersuchung wurden ausschließlich pulverförmige Produkte herangezogen, die als Zutat Milch oder Milcherzeugnisse enthielten. Laut Herstellerangaben sind alle Pulver vor dem Verzehr mit Wasser oder Milch anzurühren. Die Auswahl der Proben richtete sich nach der anzunehmenden Verzehrshäufigkeit und der im Handel verfügbaren Angebotspalette. In Abbildung 5 ist die Verwendung von Milch und Milchbestandteilen bei der Herstellung einiger in die Untersuchung einbezogener Trockenmilcherzeugnisse schematisch dargestellt. Zur Veranschaulichung wurden die Produkte im Folgenden zunächst aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihres Verwendungszwecks anhand des ADV-Kodierkatalogs für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittel-Monitoring, Katalog Nr. 3: Matrixkodex („ADV-Matrixkodex“; ANONYM (ohne Jahr)) eingestuft und anschließend in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthält Produkte, die nur aus Milch oder Milcherzeugnissen hergestellt sind. Die zweite Gruppe bilden Produkte, die aus Milch bzw. Milcherzeugnissen und anderen Lebensmitteln zusammengesetzt sind. Eine Übersicht über Art und Häufigkeitsverteilung der untersuchten Proben innerhalb der Gruppen geben die Abbildungen 6 und 7. In Tabelle 16 sind ergänzend die Anzahl der unterschiedlichen Hersteller und die jeweiligen Herstellungsländer jeder Produktgruppe aufgeführt.

Anhand des „ADV-Matrixkodex“ als Kaffeeweißer eingestufte Produkte werden im Folgenden aufgrund ihrer Zusammensetzung als „Milcheiweiß“ bezeichnet. Weiterhin werden folgende, verkürzte Bezeichnungen verwendet: Kaffeeersatzextrakt mit anderen Lebensmitteln = „Kaffeeersatzextrakt“, Pulvernahrung für die Zubereitung kalorienarmer Ernährung zur Gewichtsverringering (Tagesration sowie Ersatz einer Mahlzeit) = „Pulvernahrung“, Eiweißkonzentrate für intensive Muskelanstrengungen vor allem für Sportler = „Eiweißkonzentrat“, diätetische Lebensmittel eiweißangereichert = „diätet. Lebensmittel“, diätetische Nahrungsergänzung = „diätet. Nahrungsergänzung“, Energy- und Fitnessgetränke = „Energy Drink“.

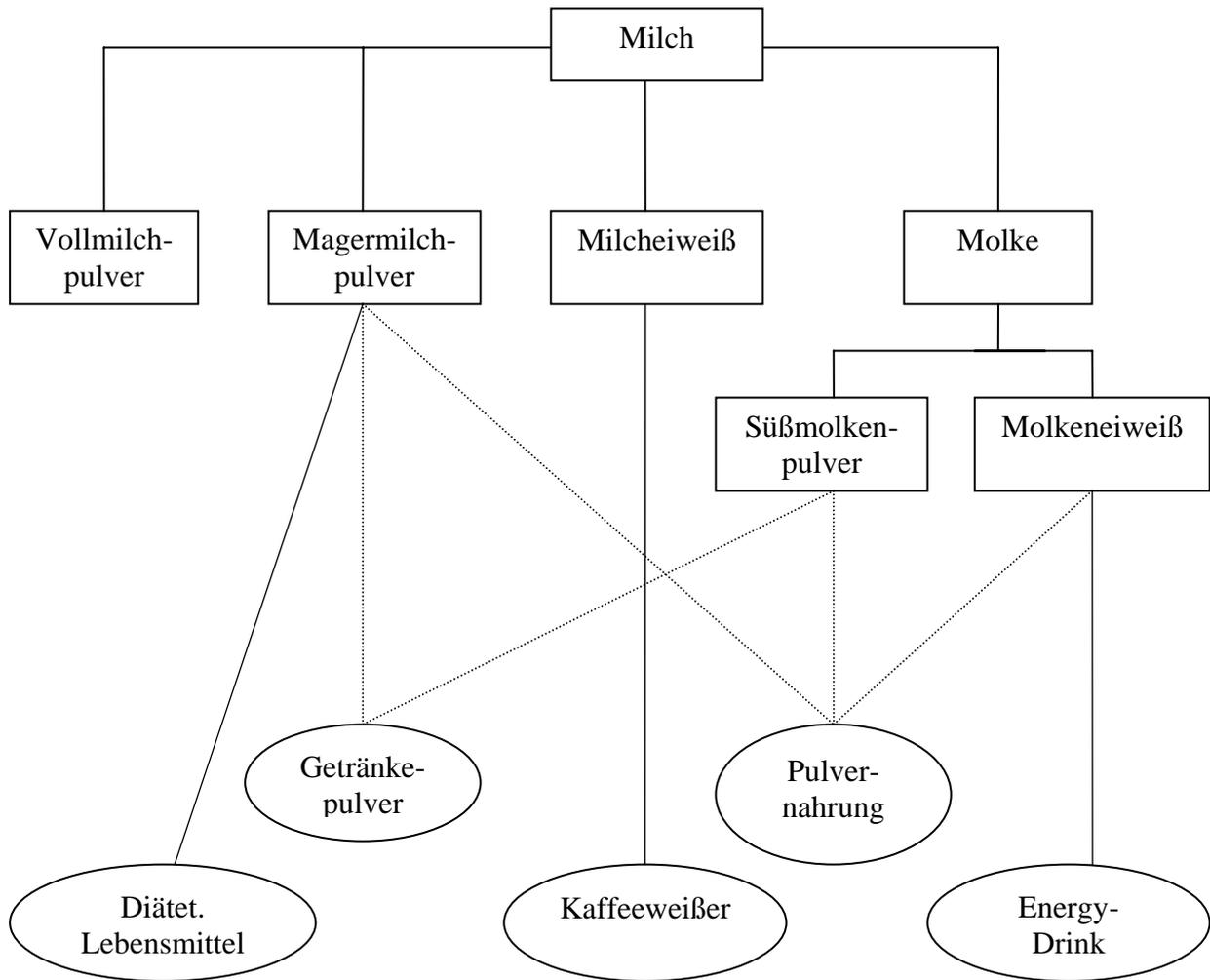


Abb. 5: Verwendung von Milch und Milchbestandteilen zur Herstellung einiger Trockenmilcherzeugnisse

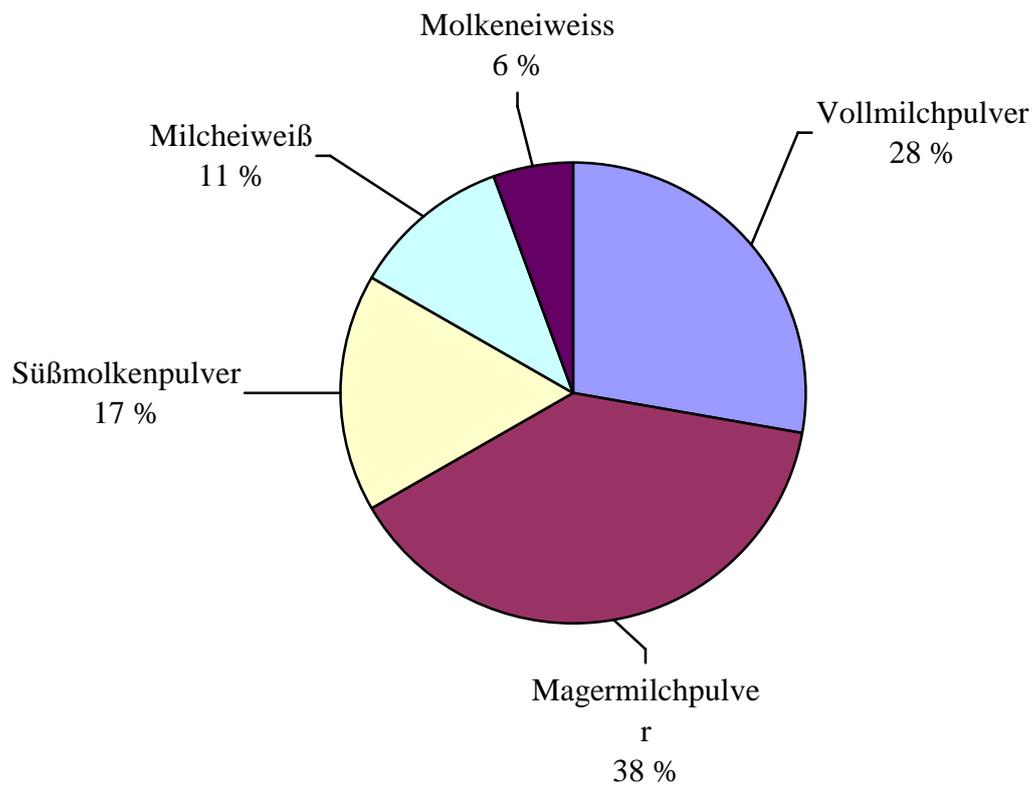


Abb. 6: Übersicht über die Probenverteilung innerhalb der Gruppe 1  
(Produkte, die nur aus Milch oder Milcherzeugnissen hergestellt sind);  $n = 18$

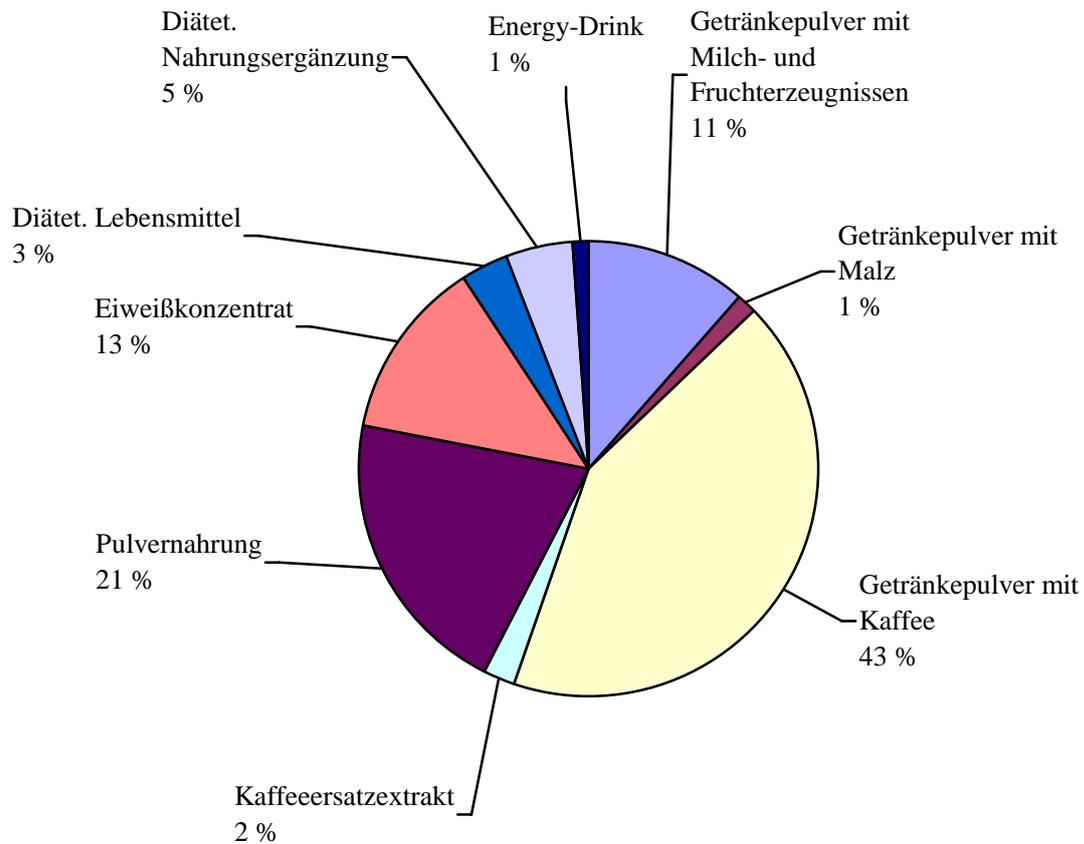


Abb. 7: Übersicht über die Probenverteilung innerhalb der Gruppe 2 (Produkte, die aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzt sind); n = 87

**Tab. 16:** Übersicht über die Anzahl unterschiedlicher Hersteller sowie Herstellungsländer der untersuchten Trockenmilcherzeugnisse

Gruppe	Trockenmilcherzeugnis		Anzahl Proben	Anzahl Hersteller	DE	PL	AT	CH
	Art							
Nur aus Milch oder	Vollmilchpulver		5	4	4	1	-	-
Milcherzeugnissen	Magermilchpulver		7	5	7	-	-	-
bestehende Produkte	Süßmolkenpulver		3	2	3	-	-	-
	Milcheiweiß		2	2	2	-	-	-
	Molkeneiweiß		1	1	1	-	-	-
	<i>Summe</i>		18	12 <sup>a)</sup>	17	1	-	-
Aus Milch und	Getränkepulver mit Milch-		10	7	10	-	-	-
Milcherzeugnissen	und Fruchterzeugnissen							
sowie anderen	Getränkepulver mit Malz		1	1	-	-	1	-
Lebensmitteln	Getränkepulver mit Kaffee		37	17	37	-	-	-
zusammengesetzte	Kaffeersatzextrakt		2	1	-	-	-	2
Produkte	Pulvernahrung		18	9	18	-	-	-
	Eiweißkonzentrat		11	8	11	-	-	1
	Energy Drink		1	1	-	-	-	-
	Diätet. Lebensmittel		3	1	3	-	-	-
	Diätet. Nahrungsergänzung		4	3	4	-	-	-
	<i>Summe</i>		87	38 <sup>a)</sup>	83	-	1	3
	<i>Summe gesamt</i>		105	46 <sup>b)</sup>	100	1	1	3

DE = Deutschland, PL = Polen, AT = Österreich, CH = Schweiz

a) für Produkte dieser Gruppe

b) Anzahl unterschiedlicher Hersteller insgesamt

### 3.1.2 Nährmedien und Chemikalien

#### Allgemein

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar USP (CASO)	VWR 1.05458.0500
Columbia-Agar-Basis	VWR 1.10455.0500
Ethanol, absolut reinst	VWR 8.18760.1000
GRAM-color Lösung 1: Kristallviolettlösung	VWR 1.11885./1
GRAM-color Lösung 2: LUGOLS Lösung stabil	VWR 1.11885./2
GRAM-color Lösung 3: Entfärbelösung	VWR 1.11885./3
GRAM-color Lösung 4: Entfärbelösung	VWR 1.11885./4
GRAM-color Lösung 5: Safraninlösung	VWR 1.11885./5
Kaliumhydroxid-Plätzchen	VWR 1.05033.0500
Natriumchlorid	VWR 1.06404.1000
Paraffinöl	bioMérieux 70100
Ringer-Lösung-Tabletten	Oxoid BR 0052 G
Schafblut, defibriniert	elokin-lab GmbH 30.100.100
Steriles aqua destillatum	Bestand Institut
Wasserstoffperoxid 3%	VWR 1.07210.0250

#### Bestimmung von *Enterobacteriaceae*

Api <sup>®</sup> 20 E	bioMérieux 20100
Api <sup>®</sup> NaCl 0,85 % Medium, 5ml	bioMérieux 20230
BBL <sup>™</sup> Enterotube <sup>™</sup> II	Beckton Dickinson 273176
<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment Broth (EEB)	Bio-Rad 356 4794
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Bio-Rad 64684
Glucose-Caseinpepton Agar	VWR 1.10860.0500
James-Reagenz	bioMérieux 70542
KÓVACS Indolreagenz	VWR 1.09293.0100
NIT1+NIT2-Reagenz	bioMérieux 70442
Oxidase Bactident <sup>®</sup> Teststäbchen	VWR 1.13300.0001

Selektiver *E. coli*/

chromogener Coliformen Agar (ECC)	Oxoid CM 1046
TDA-Reagenz	bioMérieux 70402
Violet-Red-Bile-Glucose Agar (VRBG)	acumedia 7425 A
VP1+VP2-Reagenz	bioMérieux 70422
Zinkstaub	VWR 1.1.59481.0100

**Bestimmung von *Enterobacter sakazakii***

Api <sup>®</sup> 20 E	bioMérieux 20100
Api <sup>®</sup> NaCl 0,85 % Medium, 2ml	bioMérieux 20040
BBL <sup>™</sup> Enterotube <sup>™</sup> II	Beckton Dickinson 273176
Chromogener <i>Enterobacter sakazakii</i> – Agar (DFI)	Oxoid CM 1055
Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Bio-Rad 64684
Glucose-Caseinpepton Agar	VWR 1.10860.0500
James-Reagenz	bioMérieux 70542
KÓVACS Indolreagenz	VWR 1.09293.0100
Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon (LST)	VWR 1.12588.0500
NIT1+NIT2-Reagenz	bioMérieux 70442
Oxidase Bactident <sup>®</sup> Teststäbchen	VWR 1.13300.0001
TDA-Reagenz	bioMérieux 70402
Vancomycin Hydrochloride	Sigma V.2002
Violet-Red-Bile-Glucose Agar (VRBG)	acumedia 7425 A
VP1+VP2-Reagenz	bioMérieux 70422
Zinkstaub	VWR 1.1.59481.0100

**Bestimmung von aeroben Sporenbildnern**

1-Naphtol	VWR 1.06223.0050
Api <sup>®</sup> 50 CH B/E Medium	bioMérieux 50430
Api <sup>®</sup> 50 CH	bioMérieux 50300

Api <sup>®</sup> NaCl 0,85% Medium, 2ml	bioMérieux 20040
<i>Bacillus cereus</i> Agar Basis	Oxoid CM 617
<i>Bacillus cereus</i> Chromogen Agar Basis	Oxoid CM 1036
<i>Bacillus cereus</i> Chromogen Selektiv-Supplement	Oxoid SR 0230
<i>Bacillus cereus</i> Selektiv-Supplement	Oxoid SR 0099 E
Creatin-Monohydrat	VWR 8.41470.0050
Eigelb-Emulsion	Oxoid SR 0047 C
Glucose-Caseinpepton Agar	VWR 1.10860.0500
GRIESS-ILLOSVAYS Reagenz auf Nitrit	VWR 1.09023.0500
Malachitgrün (Oxalat)	VWR 1.01398.0025
Mc Farland Standard	biomérieux 70900
Methylrot (C.I. 13020) Indikator	VWR 1.06076.0025
MR-VP-Bouillon (Methylrot- VOGES PROSKAUER-Bouillon)	VWR 1.05712.0500
Nitrat-Bouillon	Acila ADB 0320
Safranin O	VWR 1.15948.0025
Sudanschwarz B	VWR 1.15928.0025
Xylol zur Analyse	VWR 1.08681.1000
Zinkstaub	VWR 1.1.59481.0100

### **Bestimmung des *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögens**

<i>Bacillus cereus</i> Agar Basis	Oxoid CM 617
<i>Bacillus cereus</i> Selektiv-Supplement	Oxoid SR 0099 E
Casein-Sojamehlpepton Bouillon USP (CASO-Bouillon)	VWR 1.05459
Caseinhydrolysat-Glucose-Hefeextrakt Bouillon Basis (CGY - Bouillon)	VWR 1.01868.0100
D - (+) – Glucose	VWR 1.08337
Eigelb-Emulsion	Oxoid SR 0047 C
Duopath <sup>®</sup> Cereus Enterotoxins	VWR 1.04146.0001

### Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl

Magermilchpulver	VWR 1.15363
Plate Count Agar	VWR 1.05463.0500

#### 3.1.3 Bakterien-Referenzstämme

Zur Überprüfung der Nachweisverfahren wurden nachfolgend aufgelistete Bakterien-Referenzstämme verwendet. Diese wurden bei + 4 °C auf Columbia-Blutagarplatten gelagert und wöchentlich auf frische Columbia-Blutagarplatten überimpft.

**Tab. 17:** Aufstellung der verwendeten Bakterien-Referenzstämme

Mikroorganismus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 13061	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047	Max von Pettenkofer Institut, München
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 35317	Max von Pettenkofer Institut, München
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, JLU Gießen

ATCC = American Type Culture Collection, JLU = Justus-Liebig-Universität

## 3.1.4 Geräte und Sonstiges

Abzug invent FCS LAFA™	vvr Laborbau, Deutschland
accu-jet® pro, Pipettierhelfer, Brand	VWR 612-2625
Agarclav	Integra Biosciences, biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001705
Alufolie alupro®	VWR 291-0011
Autoclav SterVis	Holzner, Stuttgart, Deutschland
Autoclavierwannen	euro-clinic München
Bag filter® P	Transia 85002
Bag light® 400 ml	Transia 85011
BBL™ Enterotube™ II Codebuch	Beckton Dickinson & Co, 1998, France
Brutschrank B12	Heraeus 50042307
Brutschrank B6	Heraeus 50042301
Brutschrank Heraeus Thermo B 6420	Thermo Electron Cooperation 51015281
Bunsenbrenner Gas-Profi 1	WLD-Tec 6.001.000
Cryobank™, blau	Mast diagnostica 291704
Cryobank™-Aufbewahrungsbox; grün	Mast diagnostica 291692
Deckgläser 18 x 18mm	VWR 631-1331
Dose-it 803	Integra Biosciences, biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001707
Filterpapier	VWR 515-1008
Identifizierungssoftware apiweb™	bioMérieux 40011
Immersionöl	VWR 1.04699.0500
Magnetrührer Heidolph MR 3001	VWR 442-1203
Magnetrührstäbchen	VWR 442-4530
Meßkette pH Elektrode Sen Tix 81	WTW- Inolab C 023207099
Microprocessor pH-Meter pH 537	WTW-Inolab, Deutschland
Objekträger	Karl-Hecht KG 2401
Präzisionswaage	Sartorius LA 2305

Schlauch für Agarclav, Ø 4 mm	biomedis A 515 100
Schlauch für Dose-it, Ø 4 mm	biomedis
Sprizenfilter steril, Rotilabo®	Roth P665.1
Stereomikroskop Axioplan	Zeiss, Deutschland
sterile Spritzen, 5 ml ohne Kanüle	Terumo SS + T05ES
Stomacher 400 Circulator	Seward, Norfolk, England
Tecnomat 125, Plattengiesser	Integra Biosciences, biomedis Laborservice GmbH, ID-Nr. 001704
Tiefkühltruhe Hera freeze 286 Basic	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland: 510 14 684
Vortex VF 2	JK Janke&Kunkel IKA-Labortechnik
Waage	Explorer Ohaus® Item No. E0D 120
Wasserbad	Julabo SW 22
Wattestäbchen Eurotubo®, steril, einzeln verpackt	Deltalab 300200

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Probennahme

Während des Jahres 2007 wurden 105 Trockenmilcherzeugnisse in Deutschland erworben. Die Mehrzahl der Produkte (insgesamt 79 Proben) konnte in überregionalen Supermärkten, Drogerien oder Reformhäusern bezogen werden. Der Einkauf der restlichen Proben erfolgte im Großhandel, in Apotheken, in Outdoor-Zubehörgeschäften sowie in Sportbedarfs- und Delikatessenzläden. Tabelle 18 stellt eine Übersicht über die unterschiedlichen Kauforte der Proben dar. Proben, bei denen auffällige Untersuchungsergebnisse festgestellt worden waren sowie einzelne Produkte, die eine gewisse Marktdominanz aufwiesen, wurden erneut eingekauft und untersucht. Insgesamt wurden 20 Erzeugnisse doppelt beprobt. Der Einkauf mehrerer Einzelproben aus identischen Chargen wurde weitestgehend vermieden. Die Lagerung bis zum Beginn der Untersuchungen - sofern nicht unverzüglich damit begonnen wurde - erfolgte nach Vorgabe der Hersteller kühl und trocken in der verschlossenen Originalpackung. Die Entnahme der zur Untersuchung vorgesehenen Teilmengen erfolgte unter aseptischen Bedingungen, ohne den restlichen Packungsinhalt zu kontaminieren. Proben, die später in die weiterführenden Untersuchungen eingingen, wurden bis dahin ebenfalls kühl und trocken im wieder verschlossenen Originalbehälter gelagert.

**Tab. 18:** Übersicht über Art und Anzahl der unterschiedlichen, zur Probenbeschaffung genutzten Warenhäuser

Kaufort	Anzahl unterschiedlicher Filialen* (n = 28)	Gesamtzahl erstandener Proben**
Apotheke	4	8
Drogerie	4	24
Reformhaus	3	15
Supermarkt	13	40
Großhandel	1	11
Outdoor-Bedarf	1	1
Sportbedarf	1	7
Delikatessengeschäft	1	1

\* Anzahl unterschiedlicher, zum Einkauf besuchter Filialen der jeweiligen Kategorie

\*\* Gesamtzahl der in Filialen der jeweiligen Kategorie erstandenen Proben

### 3.2.2 Untersuchungsverfahren

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Methoden der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) bzw. an die Vorgaben der jeweiligen DIN EN ISO-Normen durchgeführt. Tabelle 19 listet die zugrunde liegenden Methoden auf. Vorgenommene Modifikationen werden nachfolgend kenntlich gemacht. Es wurden - mit Ausnahme der Untersuchungen zur Keimzahlbestimmung - jeweils Positivkontrollen mit den oben genannten Bakterien-Referenzstämmen sowie Negativkontrollen mitgeführt. Zur Negativkontrolle wurde je ein mit *Staphylococcus aureus* beimpftes sowie ein unbeimpftes Nährmedium mitgeführt.

**Tab. 19:** Aufstellung der den jeweiligen mikrobiologischen Untersuchungen zugrunde liegenden Methoden

Untersuchungsgang	Methoden
<i>Enterobacteriaceae</i>	DIN EN ISO 21528-1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	DIN EN ISO/TS 22964
Aerobe Sporenbildner	L 01.00-72*; L 02.07-1*
Aerobe mesophile Keimzahl	L 01.00-57*; L 02.07-1*

\* Methoden gemäß Amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB

### 3.2.3 Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Proben für den qualitativen Nachweis von *Enterobacteriaceae* und *Enterobacter sakazakii* erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 21528-1 „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 1: Detection and Enumeration by MPN technique with pre-enrichment“ bzw. DIN EN ISO/TS 22964 „Milk and milk products - Detection of *Enterobacter sakazakii*“. Dazu wurden nach gründlicher Durchmischung des gesamten Inhaltes 10 g der zu untersuchenden Probe unter aseptischen Bedingungen in 90 ml gepuffertes Peptonwasser (BPW) eingewogen.

Die Suspendierung des Pulvers erfolgte durch vorsichtiges Schwenken und Schütteln. Anschließend folgte eine Homogenisierung für zwei Minuten in einem Beutel-Walkmischgerät bei Raumtemperatur. Die Anschüttelung wurde nicht weiter verdünnt, sondern zur weiteren Bearbeitung in einen Erlenmeyerkolben überführt.

An 13 der untersuchten Pulvernahrungsprodukte wurde eine modifizierte Nachuntersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* und *Enterobacter sakazakii* durchgeführt. Hierzu wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet, jedoch unter Verwendung von 3 x 100 g Pulver bzw. 1 x 100 g Pulver, welches in jeweils 900 ml BPW suspendiert und homogenisiert wurde. Die verwendete Menge richtete sich nach dem in der aseptisch verschlossenen Packung verbliebenen Probenrest.

Die Vorbereitung der Proben für die Bestimmung aerober Sporenbildner und der aeroben mesophilen Keimzahl erfolgte gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Methode L02.07-1 „Vorbereitung der Proben für mikrobiologische Untersuchungen - Verfahren für Trockenmilcherzeugnisse“. Hierbei wurden jeweils 10 g der durchmischten Probe in 90 ml, auf 45 °C erwärmter, viertelstarker Ringerlösung suspendiert und für zwei Minuten im Beutel-Walkmischgerät homogenisiert. Die so entstandene Anschüttelung wurde zur Herstellung einer Verdünnungsreihe nach Demeter mit viertelstarker Ringerlösung herangezogen. Es wurden von jeder Probe Verdünnungsstufen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  hergestellt.

Zur Überprüfung der Keimvermehrung unter verbrauchernahen Bedingungen wurden fünf ausgewählte Proben in haushaltsüblicher Weise zubereitet. Dabei wurden die Pulver je nach Packungsanleitung mit kaltem Leitungswasser, heißem Wasser oder steriler H-Milch versetzt und aufgelöst. Diese Suspension galt als Ausgangsprobe und wurde im Prinzip wie oben beschrieben vorbereitet. Der Untersuchungsgang wird im Folgenden (Kap. 3.2.8) separat dargestellt.

### 3.2.4 Bestimmung von *Enterobacteriaceae*

Zur Bestimmung von *Enterobacteriaceae* wurde nach DIN EN ISO 21528-1 die Anschüttelung im Erlenmeyerkolben für 18 bis 20 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad bebrütet (nicht selektive Voranreicherung). Zur selektiven Anreicherung erfolgte danach die Überführung von 1,0 ml der bebrüteten Suspension in 10 ml *Enterobacteriaceae*-Enrichment-Broth (EEB) und die Bebrütung für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurde aus der bebrüteten Bouillon ein Ösenausstrich auf Violet-Red-Bile-Glucose Agar (VRBG) angefertigt und zusätzlich je 0,1 ml im Doppelansatz auf VRBG-Platten verbracht und ausgespatelt. Weiterhin wurde ein Ösenausstrich der bebrüteten Kultur auf Selektivem *E.Coli*/Chromogenem Coliformen Agar (ECC) durchgeführt. Die beimpften Nährmedien wurden für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Nach Abschluss der Bebrütung wurden von jeder Platte typische Kolonien ausgewählt und auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37 °C. Zur biochemischen Bestätigung wurden gut isolierte Kolonien, nach Feststellung des Gram-Verhaltens mittels KOH-Test, im Oxidase-Test sowie im Glucose-Fermentationstest geprüft. Abschließend erfolgte die Identifizierung der einzelnen Spezies anhand des BBL<sup>TM</sup> Enterotube<sup>TM</sup>-Systems bzw. des Api<sup>®</sup>-Systems.

Bei der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungsprodukten wurde in ebendieser Weise verfahren. Abweichend wurden jedoch 10 ml der bebrüteten Anschüttelung in 90 ml EEB überführt. Weiterhin wurde aus der bebrüteten Bouillon ein zusätzlicher Ösenausstrich auf *Enterobacter-sakazakii*-Chromogen-Agar (DFI) angefertigt. Dieser wurde ebenso wie die parallel beimpften VRBG- und ECC-Platten 24 Stunden bei 37 °C bebrütet.

Abweichend von dem durch die ISO-Norm DIN EN ISO 21528-1 vorgegebenen Untersuchungsschema zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* wurde nach der selektiven Voranreicherung mittels EEB ein zusätzlicher Ösenausstrich auf ECC vorgenommen. Dieses Vorgehen diente der Überprüfung der Einsetzbarkeit des ECC-Agars alternativ zu dem vorgeschriebenen VRBG-Agar. Ebenso wurde bei der Nachuntersuchung der 13 Pulvernahrungen verfahren, hier wurde zusätzlich ein weiterer Ösenausstrich auf DFI angefertigt.

*Enterobacteriaceae* zeigen charakteristisches Wachstum auf den unterschiedlichen Nährmedien. Bei Anzüchtung auf VRBG erscheinen die Kolonien typischerweise rosa bis rot oder violett gefärbt, das Vorhandensein eines Präzipitationshofes kann vorkommen. Bei einigen Spezies ist die Entfärbung der Kolonien oder des Mediums möglich. Die Koloniegröße liegt bei 1-2 mm (DIN EN ISO 21528-1; IVERSEN et al. 2004b; ACUMEDIA 2008). Das Nachweisprinzip des ECC-Agars der Firma Oxoid beruht darauf, dass *Escherichia coli* sowohl  $\beta$ -Glucuronidase als auch  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität besitzt, andere coliforme Keime hingegen nur über  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität verfügen und so nur eines der beiden zugesetzten chromogenen Substrate spalten können. Bei Verwendung dieses Agars erscheinen Kolonien von *Escherichia coli* typischerweise violett gefärbt mit einer Größe von 1 mm, von anderen coliformen Keimen gebildete Kolonien sind kleiner und rosa gefärbt (OXOID, 2008). Der DFI-Agar der Firma Oxoid stellt einen von DRUGGAN, FORSYTHE und IVERSEN entwickelten chromogenen Nährboden zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii* aus Lebensmitteln dar. *Enterobacter sakazakii* spaltet mithilfe einer  $\alpha$ -Glucosidase-Aktivität im Agar enthaltenes, chromogenes Substrat und bildet typische blau-grüne Kolonien. Dem Medium zugesetztes Desoxycholat verhindert das Wachstum der meisten gram-positiven Organismen. *Enterobacter sakazakii* bildet auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO) gelb pigmentierte Kolonien. Eine morphologische Differenzierung zwischen *Enterobacter sakazakii* und anderen *Enterobacteriaceae* auf VRBG ist nicht möglich (OXOID 2008).

### 3.2.5 Bestimmung von *Enterobacter sakazakii*

Die Bestimmung von *Enterobacter sakazakii* erfolgte - auch im Falle der Nachuntersuchungen - in Anlehnung an DIN EN ISO/TS 22964. Nach Bebrütung der Anschüttelung für 18 bis 20 Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad wurde je 0,1 ml der Suspension in 10 ml modifizierte Lauryl-Sulfat-Tryptose Bouillon mit Vancomycin (mLST-Vancomycin) überführt und 24 Stunden bei 45 °C inkubiert. Es erfolgte ein Ösenausstrich der bebrüteten Bouillon auf DFI-Platten. Zusätzlich wurde je 0,1 ml der Kultur auf VRBG-Platten verbracht und ausgespatelt sowie ein Ösenausstrich auf VRBG angefertigt. Die beimpften Platten wurden für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Zur weiteren Bestimmung wurden anschließend eine bis fünf Kolonien mit charakteristischem Wachstum ausgewählt und auf CASO-Platten ausgestrichen. Nach einer Bebrütung von 48 Stunden bei 25 °C

wurden die typischen Kolonien biochemisch überprüft. Auf die Untersuchung mittels KOH-Test, Oxidase-Test sowie Glucose-Fermentationstest folgte die Bestätigung anhand des BBL™ Enterotube™-Systems bzw. des Api®-Systems.

Abweichend von dem durch die ISO-Norm DIN EN ISO/TS 22964 vorgegebenen Untersuchungsschema zum Nachweis von *Enterobacter sakazakii* aus Milch und Milchprodukten wurde nach der selektiven Voranreicherung mittels mLST-Vancomycin ein Ösenausstrich auf DFI anstelle des vorgeschlagenen *Enterobacter-sakazakii*-Isolation-Agar (ESIA) vorgenommen und parallel VRBG-Platten beimpft. Laut Maßgaben der ISO-Norm ist der Einsatz eines dem ESIA äquivalenten Nährmediums zulässig. Zudem wurde, da andere Nährmedien zum Einsatz kamen, die Bebrütungszeit angepasst (DFI und VRBG: 24 Stunden bei 37 °C anstatt 24 Stunden bei 44 °C (ESIA)).

Der Einsatz des DFI erfolgte aufgrund von Untersuchungsergebnissen, bei denen IVERSEN et al. (2004c) eine hohe Sensitivität (87,2 %) und Spezifität (100 %) (bei Untersuchung an 243 *Enterobacteriaceae*-Stämmen) für den Nachweis von *Enterobacter sakazakii* ermittelten und weiterhin feststellten, dass die Identifikation auch in Anwesenheit anderer *Enterobacteriaceae* möglich ist. Sie stellten zudem fest, dass der Einsatz von DFI anstelle von VRBG bei Anwendung der von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) vorgegebenen Methode „Isolation and enumeration of *Enterobacter sakazakii* from dehydrated powdered infant formula“ den Untersuchungsgang um zwei Tage verkürzt und ein Überwachsen der *Enterobacter sakazakii*-Kolonien durch andere *Enterobacteriaceae* verhindert. Die FDA-Methode sieht folgendes Schema vor: 1:10 Verdünnung des Untersuchungsmaterials mit auf 45 °C vorgewärmtem Aqua dest., Bebrütung über Nacht bei 36 °C; Inkubieren von 10 ml der Suspension in 90 ml EEB über Nacht bei 36 °C; Subkultivieren auf VRBG über Nacht bei 36 °C; Ausstrich auf CASO (Bebrütung 48-72 Stunden bei 25 °C) und Überprüfen der Kolonien auf die Bildung von gelbem Pigment mit nachfolgender Bestätigung mittels Api® 20E. Abgesehen von der Verwendung von BPW anstelle von Aqua dest. und der geringgradig höheren Bebrütungstemperatur bei beiden Anreicherungsschritten (BPW und EEB: 37 °C) sowie den veränderten Bebrütungsbedingungen der CASO-Platten (24 Stunden bei 37 °C) entspricht das in der vorliegenden Studie zum Nachweis von *Enterobacteriaceae* angewendete Verfahren dieser Methode. Bei der Nachuntersuchung der 13 Pulvernahrungen wurde mit dem Einsatz des DFI parallel zu VRBG annähernd die von IVERSEN et al.

(2004c) bzw. einer Herstellerfirma (OXOID, 2008) empfohlene Untersuchungsmethode angewendet.

### 3.2.6 Bestimmung aerober Sporenbildner

Die Bestimmung aerober Sporenbildner erfolgte anhand des Nachweises präsumtiver *B. cereus* gemäß § 64 LFGB, Methode L 01.00-72 „Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten - Teil 1: Koloniezählverfahren bei 37 °C“. Dazu wurde im Doppelansatz 1,0 ml der Anschüttelung gleichmäßig (je 0,33 ml) auf drei Platten Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) verteilt und ausgespatelt (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ). Weiterhin wurden im Doppelansatz je 0,1 ml der Anschüttelung und der nächsten Verdünnungsstufe auf PEMBA-Platten ausgespatelt (Verdünnungen  $10^{-2}$  bzw.  $10^{-3}$ ). In derselben Weise wurden darüber hinaus Platten mit *Bacillus-Cereus*-Chromogen-Selektivnährboden (BCC) beimpft. Die Agarplatten wurden anschließend für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Waren nach diesem Zeitraum keine deutlichen Kolonien sichtbar, erfolgte eine weitere Bebrütung für 24 Stunden.

Zur Auswertung wurden nach Abschluss der Bebrütung zunächst für *B. cereus* typische Kolonien ausgezählt und reinkultiviert. Es wurden Subkulturen der jeweiligen Kolonien auf Columbia-Blutagar angelegt und für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach Beurteilung der Hämolyseform erfolgte die mikroskopische Untersuchung von je einem Nativpräparat, einem mit GRAM-Color® gefärbten sowie einem mittels Malachitgrün und Sudanschwarz gefärbten Präparat. Zur biochemischen Bestätigung wurden die Kolonien mithilfe des Glucose-Fermentationstests, der Voges-Proskauer-Reaktion und des Nitratreduktionstests überprüft. In Einzelfällen wurde, zur Überprüfung der Methode, eine Untersuchung der Kolonien mit dem Api® -System angeschlossen. Die zusätzlich zu *B. cereus* auf den Nährmedien PEMBA und BCC gewachsenen, sonstigen aeroben Sporenbildner wurden ebenfalls ausgezählt und subkultiviert. Zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens bestimmter Kolonieförmigkeiten wurden diese zunächst mikroskopisch als sporenbildende Keime identifiziert und mittels des Api® -Systems speziesspezifisch bestimmt. Nachfolgend wurde die Zuordnung zu einer Spezies hauptsächlich morphologisch vorgenommen. Es erfolgten jeweils mikroskopische Untersuchungen sowie stichprobenartige biochemische Überprüfungen. Aus der Anzahl der

gezählten Kolonien wurde mithilfe des gewichteten arithmetischen Mittels die Anzahl der Mikroorganismen je Gramm der Probe berechnet. Nach folgender Zahlengleichung wurde die Summe aller ausgezählten Kolonien der jeweiligen Spezies durch die Summe der untersuchten Substratmengen dividiert:

$$N = \frac{\sum a}{(n1 + 0,1 n2)} \cdot d$$

Hierin bedeuten:

- N** Anzahl der jeweiligen aeroben Sporenbildner je Milliliter bzw. Gramm
- $\sum a$**  Summe der typischen bzw. bestätigten Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden
- n1** Anzahl der Petrischalen der niedrigsten Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden
- n2** Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufen, die zur Berechnung herangezogen werden
- d** Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n1 bezogene Verdünnungsstufe

Einige Isolate der nachgewiesenen aeroben Sporenbildner wurden zur Aufbewahrung für spätere, weiterführende Untersuchungen (vgl. Kap. 3.2.9) bei - 80 °C in einer Cryobank<sup>TM</sup> konserviert.

Zusätzlich zu den nach Methode L 01.00-72 (§ 64 LFGB) vorgeschriebenen PEMBA-Platten wurden, zur Überprüfung der Einsetzbarkeit als alternatives Nährmedium, BCC-Platten beimpft. Obwohl der Untersuchungsgang zum Nachweis präsumtiver *B. cereus* angelegt ist, wurden auch andere als typische *B. cereus*-Kolonien erfasst.

Das für *B. cereus* charakteristische Wachstum auf PEMBA ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von 2-5 mm großen, blau bis blaugrünen Kolonien mit unregelmäßig gekerbtem bis wurzelartigem Rand und eventuell grauweißem Zentrum. Der 5 mm große, auf die Eigelbreaktion zurückzuführende Präzipitathof kann fehlen (L 01.00-72). Der BCC-Agar der Firma Oxoid führt aufgrund der Spaltung des im Nährmedium enthaltenen Substrates

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Glucopyranosid durch die  $\beta$ -Glucosidase von *B. cereus* zu blaugrün gefärbten Kolonien. Das Vorhandensein der beiden Antibiotika Polymyxin und Trimethoprim hemmt die meisten gram-negativen sowie einige gram-positive Keime, nicht jedoch *B. cereus* (OXOID, 2008). Auf Blutagarplatten zeigen *B. cereus* typischerweise scharfrandige, vollständige ( $\beta$ -) Hämolyse.

### 3.2.7 Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl

Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl wurde das Spatelverfahren nach § 64 LFGB, Methode L01.00-57 „Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten - Spatelverfahren“ angewendet. Je 1,0 ml der Anschüttelung wurde im Doppelansatz gleichmäßig auf drei Platten Plate-Count-Agar mit Magermilchzusatz (PC) verteilt und ausgespatelt (Verdünnungsstufe  $10^{-1}$ ). Weiterhin wurden im Doppelansatz je 0,1 ml der Anschüttelung und der nächsten Verdünnungsstufe auf PC-Platten ausgespatelt (Verdünnungen  $10^{-2}$  bzw.  $10^{-3}$ ). Nach einer Bebrütung von 48 bis 72 Stunden bei 30 °C unter aeroben Bedingungen wurden die gewachsenen Kolonien gezählt (Koloniezahl) und daraus die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (kbE) je Gramm der Probe berechnet (Keimzahl). Die Berechnung erfolgte ebenfalls durch Ermittlung des gewichteten arithmetischen Mittels (vgl. Kap. 3.2.6) mit  $N$  = Keimzahl je Milliliter bzw. Gramm und  $\sum a$  = Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen wurden. Es wurden nur solche Agarplatten ausgewertet, die zwischen 10 und 300 Kolonien aufwiesen.

### 3.2.8 Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung der Trockenmilcherzeugnisse

Zur Untersuchung der Vermehrung von Keimgehalten in Trockenmilcherzeugnissen bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung wurden fünf der Proben nach Angaben des Herstellers mit Wasser oder Milch trinkfertig angerührt. Dabei wurde eine Probe mit kaltem Leitungswasser versetzt, zwei mit abgekochtem, heißem Wasser und zwei weitere Proben mit steriler H-Milch einer neu angebrochenen Packung. Über einen Zeitraum von acht Stunden wurden stündlich Untersuchungen zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl durchgeführt. Eine abschließende Untersuchung fand nach 24 Stunden statt. Bei dem ersten sowie dem letzten Ansatz der Proben wurde ebenfalls auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* und *B. cereus* untersucht.

Direkt nach Anrühren der Pulver sowie 24 Stunden danach wurden jeweils 10 ml in 90 ml BPW und weitere 10 ml in 90 ml viertelstarke Ringerlösung verbracht (Anschüttelung zum Zeitpunkt  $t_0$  bzw.  $t_{24}$ ). Die dazwischen liegenden Anschüttelungen erfolgten nur in viertelstarker Ringerlösung ( $t_1$  bis  $t_8$ ).

Die weitere Durchführung der Untersuchungen erfolgte wie oben beschrieben (vgl. Kap. 3.2.4 bis 3.2.7), einzig die Verdünnungsstufen variierten. Diese wurden in Abhängigkeit der zu erwartenden Keimzahl mit fortschreitender Zeit erhöht. Bei der Abschlussuntersuchung zum Zeitpunkt  $t_{24}$  lagen die Verdünnungen zur Bestimmung von *Enterobacteriaceae* und *B. cereus* bei  $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$ , zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl wurde bis  $10^{-7}$  verdünnt. Eine Übersicht über das Vorgehen gibt Tabelle 20. Die angerührten Proben wurden bis zum nächsten Bestimmungszeitpunkt abgedeckt bei Raumtemperatur gelagert und vor Entnahme des zu untersuchenden Aliquots gründlich aufgeschüttelt.

**Tab. 20:** Übersicht zu Zeitpunkt und Art der durchgeführten Untersuchungsgänge an fünf haushaltsüblich zubereiteten Proben

Zeitpunkt der Untersuchung	Untersuchungsgang	Verdünnungsschema
t <sub>0</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>-1</sup>
t <sub>0</sub>	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>-1</sup>
t <sub>0</sub>	<i>B. cereus</i>	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>-1</sup>
t <sub>1</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>0</sup> bis 10 <sup>-2</sup>
t <sub>2</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>
t <sub>3</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>
t <sub>4</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>
t <sub>5</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>
t <sub>6</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-2</sup> bis 10 <sup>-6</sup>
t <sub>7</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-2</sup> bis 10 <sup>-6</sup>
t <sub>8</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-2</sup> bis 10 <sup>-6</sup>
t <sub>24</sub>	Aerobe mesophile Keimzahl	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-7</sup>
t <sub>24</sub>	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>
t <sub>24</sub>	<i>B. cereus</i>	10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-5</sup>

### 3.2.9 Bestimmung des *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögens

Die Bestimmung des *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögens erfolgte anhand eines Gold Labelled ImmunoSorbent Assay (GLISA) zum qualitativen Nachweis der Enterotoxine von *B. cereus* (Duopath® Cereus Enterotoxins). Dazu wurden zuvor aus den Proben isolierte und mittels Cryobank® konservierte aerobe Sporenbildner herangezogen. Insgesamt gingen 30 *B. cereus*-Isolate sowie zum Vergleich 30 *B. licheniformis*-, drei *B. subtilis*-, zwei *B. mycoides*-, zwei *B. pumilus*-Isolate und je ein *B. circulans*- und *B. firmus*-Isolat in die Untersuchung ein. Die Keime wurden in 1,0 ml Casein-Sojamehlpepton Bouillon USP (CASO-Bouillon) suspendiert und für 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach Ausstrich der Kulturen auf CASO- und PEMBA-Platten und Inkubation für 24 Stunden bei 37 °C wurden typische, gut isolierte Kolonien in 1,0 ml Caseinhydrolysat-Glucose-Hefeextrakt-Bouillon Basis mit 1 % Glucose (CGY-Bouillon) überführt und weitere vier Stunden bei 37 °C bebrütet.

Bei Erreichen der Raumtemperatur von Probensuspension und Testkit wurden je 150 µl der Kultur in die vorgesehene Öffnung der Testvorrichtung pipettiert und der Test nach 30 Minuten ausgewertet. Die Testkits wurden als funktionsfähig angesehen, wenn innerhalb von 30 Minuten in der Kontrollzone („C“) eine eindeutig rot gefärbte Linie erschien. Als positiv wurden Proben bewertet, bei denen innerhalb von 30 Minuten eindeutig rot gefärbte Linien in den Testzonen der jeweiligen Enterotoxine („Nhe“ bzw. „Hbl“) erschienen; schwach gefärbte Linien führten zur Beurteilung der jeweiligen Probe als nicht eindeutig positiv. Waren innerhalb von 30 Minuten keine weiteren Linien als die der Kontrollzone sichtbar, wurde die Probe als negativ auf das Vorhandensein von *B. cereus*-Enterotoxinen beurteilt.

Der zum Nachweis von *B. cereus*-Enterotoxinen eingesetzte GLISA Test Duopath® Cereus Enterotoxins der Firma Merck war zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen noch nicht kommerziell erhältlich. Das Testprinzip, basierend auf der Lateral Flow Technologie, beruht auf dem Nachweis der Enterotoxin-Komponenten L<sub>2</sub> (Hbl) und NheB (Nhe) mittels Gold markierter, monoklonaler Antikörper (SLAGHUIS et al., 2007). Die Anwendung kann als Screening oder als Bestätigungstest erfolgen, laut Hersteller ist sie ebenso spezifisch wie die ELISA-Methode und liefert genauere Ergebnisse. Bei der Screeningmethode werden 10 g/ml der Lebensmittelprobe mit 90 ml CGY-Bouillon gemischt und gegebenenfalls homogenisiert.

Nach 18 bis 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C werden 200 µl der angereicherten Probe in 20 ml CGY-Bouillon überführt und 18 bis 24 Stunden („schnelles Screening“) bzw. sechs Stunden („empfindliches Screening“) bebrütet und anschließend die Testvorrichtungen befüllt. Die Bestätigungsmethode sieht ein Ausstreichen von 100 µl der homogenisierten Lebensmittelprobe auf Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin-Agarplatten (MYP) und das anschließende Bebrüten für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C vor. Ein bis drei verdächtige Kolonien werden in 1 ml CGY-Bouillon überführt und vier Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor die Testdurchführung beginnt (MERCK, 2008).

SLAGHUIS et al. (2007) ermittelten in einer Studie an 77 mit *B. cereus* kontaminierten Lebensmittelproben (davon 45 künstlich und 32 natürlich kontaminierte Proben), dass bei einer Kontaminationshöhe von 100 KbE/g (künstlich kontaminierte Säuglingsnahrungsmittel) bzw. 1000 KbE/g (künstlich kontaminierter Reis, Nudeln, Gemüse, Convenience Food) mittels der „schnellen Screeningmethode“ 100 % der enterotoxinogenen *B. cereus* nach 24 Stunden detektiert werden konnten. Nach einer weiteren Bebrütungszeit von sechs Stunden („empfindliches Screening“) lag die Detektionsgrenze bei 1–10 KbE/g. Im Falle der natürlich kontaminierten Lebensmittel zeigten 13 von 15 Proben (86,6 %), die mehr als 1 KbE *B. cereus*/g enthielten, in einer der beiden Screeningmethoden positive Ergebnisse. Die Sensitivität wird bezüglich der Nhe-Komponente mit 6 ng/ml, bezüglich der Hbl-Komponente mit 20 ng/ml angegeben (SLAGHUIS et al., 2007).

ARAGON-ALEGRO et al. (2007) verwendeten den Duopath® Cereus Enterotoxins Test in einer Studie an 155 aus brasilianischen Lebensmitteln isolierten *B. cereus*-Stämmen. Hierbei wurden insgesamt 105 Hbl-positive sowie 154 Nhe-positive Stämme detektiert, bei einem *B. cereus*-Isolat war keine Enterotoxinkomponentenbildung nachweisbar. Bei allen untersuchten Stämmen war mittels PCR mindestens eines der für Nhe kodierenden Gene und bei 149 Stämmen (96,1 %) mindestens eines der für Hbl kodierenden Gene nachweisbar. Ein Isolat wies demnach für Nhe kodierende Gene auf, ohne dass die Bildung der Enterotoxinkomponente mittels des Immunoassays nachgewiesen werden konnte; dasselbe gilt für 34 Stämme bei denen zwar für Hbl kodierende Gene, jedoch keine Enterotoxinkomponentenbildung detektiert werden konnte. Nach Angabe der Autoren kann diese Beobachtung entweder auf Vorgänge im Transkriptionsprozess oder auf die geringe Sensitivität des Tests zurückzuführen sein.

Der Duopath® Cereus Enterotoxins Test wurde bisher nicht anhand von auf PEMBA kultivierten *B. cereus* eingesetzt (SLAGHUIS, persönliche Mitteilung). Der Einsatz des Testsystems in der vorliegenden Untersuchung an aus Trockenmilcherzeugnissen isolierten *Bacillus*-Spezies diente sowohl der Überprüfung der Anwendbarkeit an kryokonservierten und mittels PEMBA neu angezüchteten Isolaten, als auch der zusätzlichen Evaluierung des Enterotoxinbildungsvermögens von anderen *Bacillus* spp. als *B. cereus*.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Charakterisierung des untersuchten Probenmaterials**

Die in die Untersuchung eingegangenen Trockenmilcherzeugnisse enthielten alle Milch-, Magermilch-, Molken- oder Süßmolkenpulver, Milcheiweiß, Molkeneiweiß, Molkenpermeat oder Molkenerzeugnisse in unterschiedlicher Menge und Zusammensetzung. Aufgrund der Variabilität der Produktpalette hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Verwendungszweckes wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, eine Einteilung anhand des „ADV-Matrixkodex“ (ANONYM, ohne Jahr) sowie eine Eingruppierung in zwei Gruppen vorgenommen (vgl. Kap. 3.1.1).

## 4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung von Trockenmilcherzeugnissen

### 4.2.1 Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung

Eine Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen Erstuntersuchung der Trockenmilcherzeugnisse ist in Tabelle 21 dargestellt. Bezüglich des Vorkommens von *Enterobacteriaceae* sowie *Enterobacter sakazakii* ergab sich ein sporadisches Auftreten kontaminierter Proben. Alle 13 *Enterobacteriaceae*-positiven Proben (12 %) entstammten der Gruppe „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“, *Enterobacter sakazakii* konnte nur aus einer Probe Pulvernahrung (1 %) isoliert werden. *B. cereus* wurde in insgesamt 50 Proben (48 %) nachgewiesen, wobei die prozentuale Verteilung positiver Proben innerhalb der beiden Gruppen mit 55 % bzw. 46 % ähnlich hoch lag. Sonstige Sporenbildner waren in 77 Proben (73 %) nachweisbar. Hierbei lag der Anteil positiver Proben innerhalb der Gruppe „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“ mit 78 % am höchsten. Die aerobe mesophile Keimzahl der überwiegenden Anzahl der untersuchten Proben (83 %) bewegte sich im Bereich zwischen  $10^1$  und  $10^3$  KbE/g, nur dreimal (3 %) konnten Werte von  $> 10^4$  KbE/g ermittelt werden.

Die detaillierten Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsgänge werden in den nachfolgenden Kapiteln separat dargestellt. Weiterhin erfolgt eine differenzierte Darstellung der Ergebnisse bezüglich der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung der Trockenmilcherzeugnisse sowie der Bestimmung des *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögens (Kap. 4.3, Kap. 4.4).

**Tab. 21:** Übersicht über die Ergebnisse der mikrobiologischen (Erst-) Untersuchung der Trockenmilcherzeugnisse

Trockenmilcherzeugnis		Anzahl positive Proben (Anteil in %)											
Art der Probe	n	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>B. cereus</i>	Sonstige Sporenbildner	Aerober mesophiler Keimzahlbereich in KbE/g							
						< 10	10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>4</sup>			
Gruppe 1													
Vollmilchpulver	5	-	-	2 (40)	1 (20)	2 (40)	-	3 (60)	-	-	-	-	-
Magermilchpulver	7	-	-	4 (57)	6 (86)	-	3 (43)	1 (14)	3 (43)	-	-	-	-
Süßmolkenpulver	3	-	-	2 (66)	1 (33)	-	1 (33)	1 (33)	-	-	1 (33)	-	-
Milchweiß	2	-	-	1 (50)	-	-	1 (50)	1 (50)	-	-	-	-	-
Molkeneiweiß	1	-	-	1 (100)	1 (100)	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-
<i>Summe</i>	18	-	-	10 (55)	9 (50)	2 (11)	6 (34)	6 (34)	3 (17)	1 (6)	-	-	-
Gruppe 2													
Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen	10	1 (10)	-	4 (40)	9 (90)	-	3 (30)	6 (60)	1 (10)	-	-	-	-
Getränkpulver mit Malz	1	-	-	1 (100)	1 (100)	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-
Getränkpulver mit Kaffee	37	1 (3)	-	19 (51)	31 (84)	-	7 (19)	27 (73)	2 (5)	1 (3)	-	-	-
Kaffeersatzextrakt	2	2 (100)	-	1 (50)	1 (50)	-	1 (50)	1 (50)	-	-	-	-	-
Pulvernahrung	18	4 (22)	1 (5)	5 (28)	15 (83)	-	4 (22)	12 (67)	2 (11)	-	-	-	-
Eiweißkonzentrat	11	4 (36)	-	6 (55)	6 (55)	-	6 (55)	4 (36)	1 (9)	-	-	-	-
Diätet. Lebensmittel	3	1 (33)	-	2 (66)	2 (66)	-	-	1 (33)	1 (33)	1 (33)	-	-	-
Diätet. Nahrungsergänzung	4	-	-	2 (50)	3 (75)	-	-	2 (50)	2 (50)	-	-	-	-
Energy Drink	1	-	-	-	-	-	1 (100)	-	-	-	-	-	-
<i>Summe</i>	87	13 (15)	1 (1)	40 (46)	68 (78)	1 (1)	21 (24)	54 (62)	9 (10)	2 (2)	-	-	-
<b>Summe gesamt</b>	<b>105</b>	<b>13 (12)</b>	<b>1 (1)</b>	<b>50 (48)</b>	<b>77 (73)</b>	<b>3 (3)</b>	<b>27 (26)</b>	<b>60 (57)</b>	<b>12 (11)</b>	<b>3 (3)</b>	-	-	-

Gruppe 1: „nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“; Gruppe 2: „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“; *E. sakazakii* = *Enterobacter sakazakii*; - : keine positive Probe

## 4.2.2 *Enterobacteriaceae*

### 4.2.2.1 Erstuntersuchung

Bei der Erstuntersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* in je 10 g der Trockenmilcherzeugnisse fiel auf, dass neben einer nur geringen Anzahl an positiven Proben nur wenige verschiedene Spezies isoliert werden konnten (Tab. 22). Die häufigste der insgesamt zehn isolierten Arten stellte *Enterobacter cloacae* dar, sie konnte in fünf Proben nachgewiesen werden. Alle anderen Spezies waren nur in jeweils einer bzw. zwei (*Acinetobacter calcoaceticus*) Proben nachweisbar. Elf der insgesamt 13 *Enterobacteriaceae*-positiven Proben enthielten jeweils nur eine Spezies; in einer Probe Kaffeeersatzextrakt kamen *Enterobacter amnigenus* und *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* gemeinsam vor. Eine Pulvernahrung enthielt gleichzeitig *Pantoea* spp. und *Escherichia adecarboxylata*. Aus Proben der Gruppe 1 („nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“) konnten, ebenso wie aus den untersuchten Proben der Gruppen Getränkepulver mit Malz, Diätet. Nahrungsergänzung und Energy-Drink, keine *Enterobacteriaceae* in 10 g der Probe nachgewiesen werden

**Tab. 22:** Vorkommen von *Enterobacteriaceae* in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105)

Art der Probe	Anzahl Proben	Anzahl positiv	Isolierte Spezies (n = 15)
Getränkepulver Milch	10	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
Getränkepulver mit Kaffee	37	1	<i>Serratia rubidaea</i>
Kaffeeersatzextrakt	2	2	1 Pr.: <i>Enterobacter amnigenus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> 1 Pr.: <i>Escherichia vulneris</i>
Pulvernahrung	18	4	3 Pr.: <i>Enterobacter cloacae</i> 1 Pr.: <i>Pantoea</i> spp., <i>Escherichia adecarboxylata</i>
Eiweißkonzentrat	11	4	1 Pr.: <i>Enterobacter cloacae</i> 1 Pr.: <i>Escherichia coli</i> 1 Pr.: <i>Klebsiella oxytoca</i> 1 Pr.: <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *
Diätet. Lebensmittel	3	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *

Getränkepulver Milch = Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen; Pr. = Probe

\* gehört nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*, wird aber im BBL™ Enterotube™ II differenziert

Bezüglich der beiden zum *Enterobacteriaceae*-Nachweis verwendeten Nährmedien fielen Unterschiede in der Nachweisbarkeit der *Enterobacteriaceae* auf. So konnten zwar in acht der 13 positiven Proben mit beiden Nährböden dieselben Spezies gleichermaßen nachgewiesen werden. In fünf Fällen jedoch wurde der jeweilige Keim nur mit einem von beiden Nährmedien detektiert, in zwei dieser Proben wurde zudem mit jedem Nährmedium eine andere Spezies nachgewiesen (Tab. 23). Diejenigen Spezies, die mehrfach isoliert wurden (*Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*) wiesen in jeder Probe auf dem jeweiligen Nährboden die für sie charakteristische Morphologie auf.

**Tab. 23:** Vergleich der zum *Enterobacteriaceae*-Nachweis verwendeten Nährmedien

Art der Probe	Spezies	Nachweis*
Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Eiweißkonzentrat	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Eiweißkonzentrat	<i>Escherichia coli</i>	VRBG, ECC
Getränkpulver mit Kaffee	<i>Serratia rubidaea</i>	VRBG, ECC
Eiweißkonzentrat	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> **	VRBG, ECC
Diätet. Lebensmittel	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> **	VRBG
Eiweißkonzentrat	<i>Klebsiella oxytoca</i>	VRBG
Kaffeersatzextrakt	<i>Escherichia vulneris</i>	VRBG
Kaffeersatzextrakt	<i>Enterobacter amnigenus</i>	VRBG
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	ECC
Pulvernahrung	<i>Pantoea</i> spp.	VRBG
	<i>Escherichia adecarboxylata</i>	ECC

\* Nährmedium, auf dem Wachstum und Nachweis der jeweiligen Spezies erfolgte

\*\* gehört nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*, wird aber im BBL™ Enterotube™ II differenziert

Die Speziesidentifizierung erfolgte bei 14 der insgesamt 15 Isolate mittels BBL™ Enterotube™ II, in einem Fall (*Pantoea* spp.) wurde aufgrund der Nicht-Auswertbarkeit des Tests alternativ das Api®20E-System eingesetzt.

#### 4.2.2.2 Nachuntersuchung

Die Nachuntersuchung auf *Enterobacteriaceae* an je 3 x 100 g bzw. 1 x 100 g von 13 Pulvernahrungen ergab zwar ein relativ ähnliches Keimspektrum, jedoch mit sieben positiv getesteten Proben (54 %) eine deutlich höhere Inzidenz als die Erstuntersuchung (Tab. 24). In die Nachuntersuchung gingen von insgesamt 18 Pulvernahrungen alle vier bereits in der Erstuntersuchung positiv auf *Enterobacteriaceae* getesteten Proben, eine *Enterobacter sakazakii*-positiv getestete Probe sowie acht weitere, in der Erstuntersuchung negativ auf *Enterobacteriaceae* getestete Proben ein. Die Untersuchung umfasste auch den (modifizierten) Nachweis von *Enterobacter sakazakii* mittels Anreicherung in EEB und Bebrütung von DFI-Agarplatten.

Von den insgesamt zehn isolierten Spezies kamen *Pantoea agglomerans* und *Serratia plymuthica* jeweils zweimal vor, alle anderen Spezies wurden nur einmal im untersuchten Probenmaterial nachgewiesen. *Enterobacter sakazakii* konnte aus keiner Probe isoliert werden. In drei Proben wurde jeweils nur eine Spezies nachgewiesen, drei weitere Proben enthielten jeweils zwei unterschiedliche *Enterobacteriaceae*-Arten und eine Probe wies drei verschiedene Spezies auf. Bemerkenswert war, dass bei denjenigen Proben, von denen 3 x 100 g Pulver nachuntersucht werden konnten, in maximal zwei der drei 100 g-Aliquote *Enterobacteriaceae* nachweisbar waren und jeweils unterschiedliche Spezies isoliert wurden.

Insgesamt konnte bei fünf Proben erst anhand der Nachuntersuchung das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* detektiert werden. Hierin ist auch die Probe enthalten, die zuvor zwar *Enterobacter sakazakii*-positiv getestet wurde, aber bei der Erstuntersuchung keine weiteren *Enterobacteriaceae* enthielt (vgl. Kap. 4.2.3). In zwei Proben, die bereits in der Erstuntersuchung positiv getestet wurden, konnten auch mit Hilfe der Nachuntersuchung *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Jedoch wurden in beiden Untersuchungsgängen unterschiedliche Spezies ermittelt. Die zwei weiteren, in der Erstuntersuchung positiv getesteten Proben, stellten sich in der Nachuntersuchung als negativ in Bezug auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* dar. In vier Proben konnte mit keinem der Untersuchungsgänge *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden.

**Tab. 24:** Ergebnis der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungen auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae*

Anzahl Proben	Menge*	Spezies	Nachweis**	Ergebnis der Erstuntersuchung
1	3 x 100 g	<i>Pantoea agglomerans</i>	1 x 100 g	n.n.
1	3 x 100 g	<i>Escherichia coli</i>	1 x 100 g	n.n.
1	3 x 100 g	<i>Enterobacter amnigenus</i>	1 x 100 g	n.n.
		<i>Klebsiella ozaenae</i> *** & <i>Pantoea agglomerans</i>	1 x 100 g	
1	3 x 100 g	<i>Serratia plymuthica</i>	1 x 100 g	n.n.
		<i>Enterobacter cloacae</i>	1 x 100 g	
1	3 x 100 g	<i>Escherichia vulneris</i>	1 x 100 g	( <i>Enterobacter sakazakii</i> )
		<i>Serratia plymuthica</i>	1 x 100 g	
1	3 x 100 g	<i>Citrobacter freundii</i>	1 x 100 g	<i>Enterobacter cloacae</i>
1	1 x 100 g	<i>Serratia rubidaea</i> & <i>Serratia odorifera</i>	1 x 100 g	<i>Enterobacter cloacae</i>
1	3 x 100 g	n.n.	n.n.	<i>Pantoea</i> spp. & <i>Escherichia adecarboxylata</i>
1	1 x 100 g	n.n.	n.n.	<i>Enterobacter cloacae</i>
2	3 x 100 g	n.n.	n.n.	n.n.
2	1 x 100 g	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

\* Anzahl untersuchter Aliquote á 100 g Pulver

\*\* Anzahl der Aliquote á 100 g Pulver, in denen *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden konnten

\*\*\* *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

Beim Vergleich der verwendeten Nährmedien fielen Unterschiede sowohl innerhalb der Nachuntersuchung als auch zu den Ergebnissen der Erstuntersuchung auf (Tab. 25). Die beiden Spezies, die bei der Nachuntersuchung jeweils zweimal nachgewiesen wurden (*Serratia plymuthica*, *Pantoea agglomerans*), wurden in je einer Probe nur von VRBG isoliert, in der jeweils anderen Probe jedoch von allen drei Nährmedien. Im Hinblick auf die Erstuntersuchung gab es bei drei von sechs in beiden Untersuchungsgängen isolierten Spezies Übereinstimmungen. So waren *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* und *Serratia rubidaea* in allen Fällen auf VRBG und ECC nachweisbar. *Escherichia vulneris* und *Enterobacter amnigenus* waren immer auf VRBG nachweisbar, konnten in der Nachuntersuchung jedoch

zusätzlich mittels ECC isoliert werden. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* war bei der Erstuntersuchung nur auf ECC, bei der Nachuntersuchung hingegen nur auf VRBG nachweisbar. Insgesamt wurden acht Spezies auch mit Hilfe der zusätzlich beimpften DFI-Agarplatten isoliert. In jedem dieser Fälle gelang der Nachweis gleichzeitig auch mittels VRBG und ECC.

**Tab. 25:** Vergleich der bei der Nach- und Erstuntersuchung von 13 Pulvernahrungen zum *Enterobacteriaceae*-Nachweis verwendeten Nährmedien. Bei der Nachuntersuchung wurden VRBG, ECC und DFI eingesetzt, bei der Erstuntersuchung wurden nur VRBG und ECC verwendet

Anzahl Proben	Spezies	Nachweis bei Nachuntersuchung*	Nachweis bei Erstuntersuchung*
1	<i>Pantoea agglomerans</i>	VRBG	n.n.
1	<i>Escherichia coli</i>	VRBG, ECC, DFI	VRBG, ECC
1	<i>Citrobacter freundii</i>	VRBG, ECC, DFI	n.n.
1	<i>Serratia plymuthica</i>	VRBG	n.n.
	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC, DFI	VRBG, ECC
1	<i>Serratia plymuthica</i>	VRBG, ECC, DFI	n.n.
	<i>Escherichia vulneris</i>	VRBG, ECC, DFI	VRBG
1	<i>Serratia rubidaea</i>	VRBG, ECC, DFI	VRBG, ECC
	<i>Serratia odorifera</i>	VRBG, ECC	n.n.
1	<i>Enterobacter amnigenus</i>	VRBG, ECC, DFI	VRBG
	<i>Klebsiella ozaenae</i> **	VRBG	ECC
	<i>Pantoea agglomerans</i>	VRBG, ECC, DFI	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

\* Nährmedium, auf dem Wachstum und Nachweis der jeweiligen Spezies bei der Nach- bzw. der Erstuntersuchung erfolgte

\*\* *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

Die Speziesidentifizierung aller zwölf Isolate erfolgte mittels des BBL™ Enterotube™ II.

### 4.2.3 *Enterobacter sakazakii*

Lediglich eine von 105 untersuchten Proben (1 %) war positiv für *Enterobacter sakazakii*, diese stellte eine Pulvernahrung dar. Bemerkenswert war, dass der Nachweis bei der Erstuntersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae*, mittels der Nährmedien VRBG und ECC, gelang und keine weiteren *Enterobacteriaceae*-Spezies isoliert werden konnten. Das *Enterobacter sakazakii*-Isolat war auf beiden Nährmedien in 10 g der Probe gleichermaßen nachweisbar und wurde anhand des BBL™ Enterotube™ II sowie des Api® 20E-Systems identifiziert.

Anhand des parallelen Ansatzes zum spezifischen Nachweis von *Enterobacter sakazakii* mittels mLST-Vancomycin und DFI bzw. VRBG konnte in keiner der 105 untersuchten Trockenmilcherzeugnisse *Enterobacter sakazakii* nachgewiesen werden. In sechs Proben konnten jedoch mit Hilfe dieses Untersuchungsganges andere *Enterobacteriaceae* als *Enterobacter sakazakii* isoliert werden (Tab. 26). In jedem Fall war die betreffende Spezies bereits mit Hilfe der Erstuntersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* isoliert worden.

**Tab. 26:** Übersicht über die mittels der Untersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacter sakazakii* isolierten *Enterobacteriaceae*-Spezies; Vergleich zu den Ergebnissen der Erstuntersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae*

Art der Probe	Spezies	Nachweis*	Ergebnis der Erstuntersuchung	Nachweis Erstuntersuchung*
Kaffeersatz	<i>Enterobacter amnigenus</i>	VRBG	<i>Enterobacter amnigenus</i> , <i>Klebsiella ozaenae</i> **	VRBG
Eiweißkonz.	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Getr. Milch	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, DFI	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, DFI	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC
Pulvernahrung	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, DFI	<i>Enterobacter cloacae</i>	VRBG, ECC

Kaffeersatz = Kaffeersatzextrakt, Eiweißkonz. = Eiweißkonzentrat; Getr. Milch = Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen

\* Nährmedium, auf dem der Nachweis der jeweiligen Spezies bei der Untersuchung auf das Vorhandensein von *Enterobacter sakazakii* bzw. der Erstuntersuchung auf *Enterobacteriaceae* erfolgte

\*\* *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*

Bei der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungen auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* wurde in keiner der untersuchten Proben *Enterobacter sakazakii* nachgewiesen. Auch aus der bei der Erstuntersuchung zuvor als positiv getesteten Probe, von der 3 x 100 g in die Nachuntersuchung eingingen, konnte kein *Enterobacter sakazakii* mehr isoliert werden (Tab. 24). Der Untersuchungsgang beinhaltete abweichend zur Erstuntersuchung einen zusätzlichen Ösenausstrich der EEB-Bouillon auf DFI-Agarplatten.

#### 4.2.4 Aerobe Sporenbildner

Bei der Untersuchung auf das Vorhandensein von aeroben Sporenbildnern isolierte Spezies, die andere *Bacillus* spp. als *B. cereus* darstellten, wurden als „sonstige Sporenbildner“ eingruppiert und werden im Folgenden auch als solche bezeichnet.

In insgesamt 89 der 105 untersuchten Trockenmilcherzeugnisse (85 %) konnten aerobe Sporenbildner nachgewiesen werden. Hierbei enthielten 38 Proben *B. cereus* und sonstige Sporenbildner, zwölf Proben enthielten nur *B. cereus* und in 39 Proben waren nur sonstige Sporenbildner nachweisbar (Tab. 27). Die untersuchte Probe „Energy-Drink“ enthielt keine aeroben Sporenbildner. Innerhalb der restlichen Produktgruppen lag die Kontaminationshäufigkeit für aerobe Sporenbildner allgemein zwischen 40 % und 100 %. Die detaillierten Ergebnisse der Untersuchung auf das Vorhandensein von aeroben Sporenbildnern werden in den folgenden Kapiteln (Kap. 4.2.4.1, Kap. 4.2.4.2) nach Erregergruppen sortiert dargestellt.

**Tab. 27:** Übersicht über das Vorkommen von *B. cereus* sowie sonstigen Sporenbildnern in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105)

Art der Probe	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%) <sup>*</sup>	nur <i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> + sonstige Sporenbildner	nur sonstige Sporenbildner	
Gruppe 1	Vollmilchpulver	5	2 (40)	1	1	-
	Magermilchpulver	7	6 (86)	-	4	2
	Süßmolkenpulver	3	2 (67)	1	1	-
	Milcheiweiß	2	1 (50)	1	-	-
	Molkeneiweiß	1	1 (100)	-	1	-
Gruppe 2	Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen	10	9 (90)	-	4	5
	Getränkepulver mit Malz	1	1 (100)	-	1	-
	Getränkepulver mit Kaffee	37	34 (92)	3	16	15
	Kaffeersatzextrakt	2	2 (100)	1	-	1
	Pulvernahrung	18	16 (89)	1	4	11
	Eiweißkonzentrat	11	8 (73)	2	4	2
	Diätet. Lebensmittel	3	3 (100)	1	1	1
	Diätet. Nahrungsergänzung	4	4 (100)	1	1	2
Energy Drink	1	-	-	-	-	

Gruppe 1: „nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“; Gruppe 2: „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“;

- : keine positive Probe

\* der Wert in Klammern stellt den prozentualen Anteil positiver Proben innerhalb der jeweiligen Produktgruppe dar

#### 4.2.4.1 *Bacillus cereus*

In insgesamt 50 der untersuchten Proben konnte das Vorhandensein von *B. cereus* nachgewiesen werden, wobei die Verteilung innerhalb der beiden Gruppen 1 und 2 sehr ähnlich war und die Inzidenz je nach Produktgruppe zwischen 28 % und 100 % betrug (Tab. 21, 28). Bezüglich der beiden parallel verwendeten Nährmedien, PEMBA und BCC, wurden bei der Mehrzahl der untersuchten Proben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Nachweisbarkeit von *B. cereus* festgestellt. Die Unterschiede zwischen beiden Nährmedien sind in Tabelle 29 detailliert dargestellt. Zur Auswertung wurden die jeweils höchsten ermittelten Werte herangezogen. Die Kontaminationshöhe lag hiernach zwischen  $5 \times 10^0$  und  $9 \times 10^1$  KbE/g Trockenmilcherzeugnis, die durchschnittlichen Werte betragen je nach Produktgruppe  $5 \times 10^0$  bis  $4,1 \times 10^1$  KbE *B. cereus*/g (Tab. 28).

**Tab. 28:** Übersicht über das Vorkommen sowie die Kontaminationshöhe von *B. cereus* in Trockenmilcherzeugnissen (n gesamt = 105)

	Art der Probe	Anzahl Proben	Anzahl positiv (%)*	KbE <i>B. cereus</i> /g**		
				Min.	Max.	Ø
Gruppe 1	Vollmilchpulver	5	2 (40)	$5 \times 10^0$	$2,9 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$
	Magermilchpulver	7	4 (57)	$5 \times 10^0$	$9 \times 10^1$	$2,8 \times 10^1$
	Süßmolkenpulver	3	2 (66)	$5 \times 10^0$	$3 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
	Milcheiweiß	2	1 (50)	$5 \times 10^0$	$5 \times 10^0$	$5 \times 10^0$
	Molkeneiweiß	1	1 (100)	$2,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$
Gruppe 2	Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen	10	4 (40)	$5 \times 10^0$	$4,2 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$
	Getränkepulver mit Malz	1	1 (100)	$4 \times 10^1$	$4 \times 10^1$	$4 \times 10^1$
	Getränkepulver mit Kaffee	37	19 (51)	$5 \times 10^0$	$5,2 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$
	Kaffeersatzextrakt	2	1 (50)	$4,1 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$
	Pulvernahrung	18	5 (28)	$5 \times 10^0$	$5 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$
	Eiweißkonzentrat	11	6 (55)	$5 \times 10^0$	$5,2 \times 10^1$	$1,9 \times 10^1$
	Diätet. Lebensmittel	3	2 (66)	$5 \times 10^0$	$5 \times 10^0$	$5 \times 10^0$
	Diätet. Nahrungsergänzung	4	2 (50)	$5 \times 10^0$	$4 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$
	Energy Drink	1	-	-	-	-

Gruppe 1: „nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“; Gruppe 2: „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“;

- : keine positive Probe

\* der Wert in Klammern stellt den prozentualen Anteil positiver Proben innerhalb der jeweiligen Produktgruppe dar

\*\*Mindest- (Min.) und Höchstwerte (Max.) sowie Mittelwerte (Ø) des Gehalts an *B. cereus* in KbE/g

**Tab. 29:** Vergleich der parallel eingesetzten Nährmedien PEMBA und BCC zum Nachweis von *B. cereus* in Trockenmilchzerzeugnissen

Art der Probe	Anzahl Proben	ermittelte Kontaminationshöhe <i>B. cereus</i> in KBE/g		
		PEMBA	PEMBA	BCC
Vollmilchpulver	1	<b>2,9 x 10<sup>1</sup></b>		5 x 10 <sup>0</sup>
	1	-		5 x 10 <sup>0</sup>
Magermilchpulver	2	5 x 10 <sup>0</sup>		-
	1	-		1 x 10 <sup>1</sup>
	1	6,4 x 10 <sup>1</sup>		<b>9 x 10<sup>1</sup></b>
Süßmolkenpulver	1	-		3 x 10 <sup>1</sup>
Milchweiß	1	5 x 10 <sup>0</sup>		-
Molkeneiweiß	1	5 x 10 <sup>0</sup>		-
Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen	1	2,5 x 10 <sup>1</sup>		-
	1	5 x 10 <sup>0</sup>		-
	1	1 x 10 <sup>1</sup>		-
	1	<b>4,2 x 10<sup>1</sup></b>		1 x 10 <sup>1</sup>
Getränkepulver mit Malz	1	-		5 x 10 <sup>0</sup>
	1	-		4 x 10 <sup>1</sup>
Getränkepulver mit Kaffee	1	-		2,5 x 10 <sup>1</sup>
	1	-		1,5 x 10 <sup>1</sup>
	1	-		2,8 x 10 <sup>1</sup>
	5	-		5 x 10 <sup>0</sup>
	1	<b>1 x 10<sup>1</sup></b>		<b>5 x 10<sup>0</sup></b>
Getränkepulver mit Kaffee	1	-		1 x 10 <sup>1</sup>
	1	<b>2 x 10<sup>1</sup></b>		5 x 10 <sup>0</sup>

Fortsetzung **Tab. 29:** Vergleich der parallel eingesetzten Nährmedien PEMBA und BCC zum Nachweis von *B. cereus* in Trockenmilcherzeugnissen

Art der Probe	Anzahl Proben	ermittelte Kontaminationshöhe <i>B. cereus</i> in KBE/g	
		PEMBA	BCC
Getränkpulver mit Kaffee	3	5 x 10 <sup>0</sup>	-
	1	<b>3,8 x 10<sup>1</sup></b>	1,9 x 10 <sup>1</sup>
	1	<b>1 x 10<sup>1</sup></b>	<b>1,5 x 10<sup>1</sup></b>
	1	1,5 x 10 <sup>1</sup>	-
	1	3,8 x 10 <sup>1</sup>	<b>5,2 x 10<sup>1</sup></b>
	1	2 x 10 <sup>1</sup>	<b>3 x 10<sup>1</sup></b>
Kaffeersatzextrakt	1	<b>4,1 x 10<sup>1</sup></b>	<b>4,1 x 10<sup>1</sup></b>
Pulvernahrung	1	1,4 x 10 <sup>1</sup>	<b>5 x 10<sup>1</sup></b>
	1	5 x 10 <sup>0</sup>	-
	1	-	4,8 x 10 <sup>1</sup>
	1	<b>2 x 10<sup>1</sup></b>	<b>1,5 x 10<sup>1</sup></b>
	1	-	1 x 10 <sup>1</sup>
Eiweißkonzentrat	2	5 x 10 <sup>0</sup>	-
	1	2,5 x 10 <sup>1</sup>	-
	1	<b>2 x 10<sup>1</sup></b>	<b>2 x 10<sup>1</sup></b>
	1	-	5 x 10 <sup>0</sup>
1	<b>5,2 x 10<sup>1</sup></b>	<b>5 x 10<sup>1</sup></b>	
Diätet. Lebensmittel	2	-	5 x 10 <sup>0</sup>
Diätet. Nahrungsergänzung	1	-	5 x 10 <sup>0</sup>
	1	-	4 x 10 <sup>1</sup>

- : kein Wachstum

Wie aus Tabelle 29 ersichtlich, war *B. cereus* in 36 der 50 positiven Proben nur mit einem von beiden Nährmedien nachweisbar. Hierbei gelang der Nachweis in 15 Fällen nur mittels PEMBA, 21 Mal wurde *B. cereus* nur mittels BCC nachgewiesen. Bei acht Proben wurden deutlich abweichende (Unterschied  $> 5 \times 10^0$  KbE/g) KbE *B. cereus*/g ermittelt. Bei sechs Proben konnten mit beiden Nährmedien gleiche oder ähnliche (Unterschied maximal  $5 \times 10^0$  KbE/g) Ergebnisse bezüglich der Kontaminationshöhe von *B. cereus* ermittelt werden.

Die Identifizierung erfolgte bei allen isolierten *B. cereus* anhand der Koloniemorphologie, der mikroskopischen Untersuchung einschließlich Gram- und Sporenfärbung, biochemischen Reaktionstests sowie in Einzelfällen mittels des Api®-Testsystems.

#### 4.2.4.2 Sonstige Sporenbildner

Im Zuge der Untersuchung der Trockenmilcherzeugnisse auf das Vorhandensein von aeroben Sporenbildnern wurden, abgesehen von *B. cereus*, in insgesamt 77 Proben sonstige Sporenbildner isoliert. Hierbei wurden die Spezies *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. mycooides*, *B. pumilus*, *B. firmus* und *B. circulans* gesondert erfasst. Andere aerobe Sporenbildner wurden nicht weiter identifiziert und werden im Folgenden als „andere Sporenbildner“ bezeichnet. Insgesamt enthielten 54 Proben *B. licheniformis*. *B. subtilis* wurde aus drei Proben isoliert, *B. mycooides* und *B. pumilus* wurden in jeweils zwei Proben nachgewiesen. *B. firmus* und *B. circulans* waren in jeweils einer Probe nachweisbar. Andere Sporenbildner wurden in 55 Proben nachgewiesen (Tab. 30). In beiden untersuchten Milcheiweiß-Proben sowie dem Energy-Drink waren keine sonstigen Sporenbildner nachweisbar.

Die Kontaminationshöhe von *B. licheniformis* lag je nach Produktgruppe im Durchschnitt zwischen  $1 \times 10^1$  und  $3,5 \times 10^2$  KbE/g (Tab. 30), wobei Keimzahlwerte von  $5 \times 10^0$  bis  $3,7 \times 10^3$  KbE/g auftraten. Insgesamt enthielten jedoch nur zwei Proben, ein Getränkepulver mit Kaffee sowie eine Pulvernahrung, Werte im Bereich von  $10^3$  KbE/g. In allen anderen Proben wurden maximal  $5,5 \times 10^2$  KbE *B. licheniformis*/g nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

Die Keimzahlen der nachgewiesenen Isolate von *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. firmus* und *B. circulans* lagen zwischen  $5 \times 10^0$  und  $1,1 \times 10^2$  KbE/g (Tab. 30). Alle Proben, die Vertreter dieser Gattungen enthielten, gehörten der Gruppe „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“ an; ein Getränkepulver mit Malz sowie ein Kaffeeersatzextrakt enthielten gleichzeitig zwei Vertreter dieser Gattungen.

Die Belastung mit anderen Sporenbildnern lag je nach Produktgruppe im Durchschnitt zwischen  $1 \times 10^1$  und  $1,7 \times 10^2$  KbE/g (Tab. 30), im Einzelnen wurden Keimzahlen von  $5 \times 10^0$  bis  $3,7 \times 10^2$  KbE/g nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

**Tab. 30:** Vorkommen und Kontaminationshöhe von aeroben Sporenbildnern (ohne *B. cereus*) in Trockenmilchzeugnissen (n = 105), sortiert nach Produktgruppen. Die jeweils erste Zahl jeder Spalte gibt die Anzahl der positiv getesteten Proben an, die Zahl in Klammern stellt den arithmetischen Mittelwert der festgestellten Keimzahlwerte in KbE/g dar.

Art der Probe	Anzahl Proben	Anzahl positiv	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. firmus</i>	<i>B. circulans</i>	Andere Sporenbildner
Vollmilchpulver	5	1	1 (160)	-	-	-	-	-	1 (60)
Magermilchpulver	7	6	2 (350)	-	-	-	-	-	5 (152)
Süßmolkenpulver	3	1	-	-	-	-	-	-	1 (25)
Milchweiße	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Molkeneiweiß	1	1	-	-	-	-	-	-	1 (10)
Getr. Milch	10	9	6 (102)	1 (5)	-	-	-	-	8 (31)
Getr. Malz	1	1	-	<b>1 (110)</b>	<b>1 (10)</b>	-	-	-	-
Getr. Kaffee	37	31	26 (114)	-	-	1 (5)	1 (5)	-	22 (35)
Kaffeersatz	2	1	1 (35)	-	<b>1 (45)</b>	<b>1 (5)</b>	-	-	-
Pulvernahrung	18	15	9 (287)	-	-	-	-	1 (5)	12 (48)
Eiweißkonzentrat	11	6	5 (12)	1 (5)	-	-	-	-	3 (17)
Diätet. LM	3	2	1 (10)	-	-	-	-	-	2 (170)
Diätet. Nahr.	4	3	3 (153)	-	-	-	-	-	-
Energy Drink	1	-	-	-	-	-	-	-	-

Getr. Milch = Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen; Getr. Malz = Getränkpulver mit Malz; Getr. Kaffee = Getränkpulver mit Kaffee; Kaffeersatz = Kaffeersatzextrakt; Diätet. LM = Diätet. Lebensmittel; Diätet. Nahr. = Diätet. Nahrungsergänzung; - : keine positive Probe

Insgesamt enthielten 33 Proben sowohl *B. licheniformis* als auch andere, nicht weiter differenzierte Sporenbildner. In 20 Proben wurde nur *B. licheniformis* nachgewiesen, 22 Proben enthielten nur andere Sporenbildner. Aus einem Getränkepulver mit Kaffee wurden nur *B. pumilus* und andere Sporenbildner isoliert, das Getränkepulver mit Malz enthielt neben *B. subtilis* und *B. mycoides* keine weiteren Sporenbildner (Tab. 31).

**Tab. 31:** Verteilung des Vorkommens von sonstigen Sporenbildnern ausser *B. cereus*  
(mit B. lich. = *B. licheniformis*; B. subt. = *B. subtilis*; B. myc. = *B. mycoides*; B. pum. = *B. pumilus*; B. firm. = *B. firmus*; B. circ. = *B. circulans*; A. = andere Sporenbildner) in  
Trockenmilcherzeugnissen, sortiert nach Produktgruppen

	Art der Probe	Anzahl Proben	B. lich. + A.	nur B. lich.	nur A.	weitere Sporenbildner
Gruppe 1	Vollmilchpulver	1	1	-	-	-
	Magermilchpulver	6	1	1	4	-
	Süßmolkenpulver	1	-	-	1	-
	Molkeneiweiß	1	-	-	1	-
Gruppe 2	Getr. Milch	9	5	1	3	1 Pr.: B. lich. + B. subt.+ A.
	Getr. Malz	1	-	-	-	B. subt. + B. myc.
	Getr. Kaffee	31	17	9	5	1 Pr.: B. firm. + A.; 1 Pr.: B. lich. + B. pum. + A.
	Kaffeersatz	1	-	-	-	B. lich. + B. myc. + B. pum.
	Pulvernahrung	15	6	3	6	1 Pr.: B. lich. + B. circ. + A.
	Eiweißkonzentrat	6	2	3	1	1 Pr.: B. lich. + B. subt.
	Diätet. LM	2	1	-	1	-
	Diätet. Nahr.	3	-	3	-	-

Gruppe 1: „nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“; Gruppe 2: „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“;

Getr. Milch = Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen; Getr. Malz = Getränkepulver mit Malz; Getr. Kaffee = Getränkepulver mit Kaffee; Kaffeersatz = Kaffeersatzextrakt; Diätet. LM = Diätet. Lebensmittel; Diätet. Nahr. = Diätet. Nahrungsergänzung; Pr. = Probe; - : keine positive Probe

#### 4.2.5 Aerobe mesophile Keimzahl

Bei der Untersuchung der Trockenmilcherzeugnisse hinsichtlich ihrer aeroben mesophilen Keimzahl wiesen 60 der 105 untersuchten Proben (57 %) Keimzahlen im Bereich von  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g auf. Weitere 29 % (30 Proben) lagen unter  $10^2$  KbE/g, wobei in zwei Vollmilchpulvern sowie dem Energy-Drink überhaupt kein mikrobiologisches Wachstum nachgewiesen werden konnte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorherigen mikrobiologischen Untersuchungen an diesen drei Produkten. In 15 der untersuchten Proben (14 %) wurden Keimzahlen von  $> 10^3$  KbE/g nachgewiesen, wobei nur drei Produkte (3 %) mehr als  $10^4$  KbE/g enthielten (Tab. 21, 32).

Die Keimzahlbereiche erstreckten sich, wie in Tabelle 32 dargestellt, von  $1 \times 10^1$  bis  $2,2 \times 10^4$  KbE/g; die durchschnittliche Belastung lag je nach Produktgruppe zwischen  $2 \times 10^1$  und  $7,4 \times 10^3$  KbE/g. Die auffallend hohe durchschnittliche Belastung von Süßmolkenpulver ( $7,4 \times 10^3$  KbE/g) ist bei der geringen Probenzahl innerhalb dieser Gruppe auf einen relativ hohen Einzelwert ( $2,2 \times 10^4$  KbE/g) zurückzuführen. Diese Probe war mit Bifido-Bakterienkulturen angereichert. Weiterhin fielen die diätetischen Lebensmittel sowie die diätetischen Nahrungsergänzungen durch eine durchschnittliche Belastung von  $> 10^3$  KbE/g auf. Die untersuchte Probe Molkeneiweiß enthielt  $2 \times 10^1$  KbE/g; alle anderen Produktgruppen enthielten im Durchschnitt  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g.

Bei näherer Betrachtung der Proben mit Keimzahlen von mehr als  $10^3$  bzw.  $10^4$  KbE/g fiel auf, dass drei der 15 Proben *Enterobacteriaceae* enthielten. In 13 der betreffenden Proben waren *B. cereus* und/oder mehr als  $10^2$  KbE sonstige Sporenbildner/g vorhanden. Hierbei waren in neun der Proben auch *B. licheniformis* nachweisbar. Aus einer Probe, einem Getränkepulver mit Kaffee welches eine Keimzahl von  $> 10^3$  KbE/g aufwies, konnte *B. pumilus* isoliert werden. Vertreter der Gattungen *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. firmus* und *B. circulans* traten in keiner dieser Proben auf (Daten nicht dargestellt).

**Tab. 32:** Übersicht über die Ergebnisse der Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen (n = 105)

	Art der Probe	n	Keimzahl*					Keimzahlbereich**		
			<10	10 <sup>1</sup> - 10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	>10 <sup>3</sup>	>10 <sup>4</sup>	Min.	Max.	Ø
Gruppe 1	Vollmilchp.	5	2	-	3	-	-	3,5x10 <sup>2</sup>	5,9x10 <sup>2</sup>	4,4x10 <sup>2</sup>
	Magermilchp.	7	-	3	1	3	-	5x10 <sup>1</sup>	3,2x10 <sup>3</sup>	9,7x10 <sup>2</sup>
	Süßmolkenp.	3	-	1	1	-	1	7,5x10 <sup>1</sup>	2,2x10 <sup>4a)</sup>	7,4x10 <sup>3</sup>
	Milcheiweiß	2	-	1	1	-	-	3x10 <sup>1</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>
	Molkeneiweiß	1	-	1	-	-	-	2x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>1</sup>
Gruppe 2	Getr. Milch	10	-	3	6	1	-	4x10 <sup>1</sup>	3,2x10 <sup>3</sup>	5,2x10 <sup>2</sup>
	Getr. Malz	1	-	-	1	-	-	1,1x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>2</sup>
	Getr. Kaffee	37	-	7	27	2	1	2,5x10 <sup>1</sup>	1,7x10 <sup>4</sup>	9,3x10 <sup>2</sup>
	Kaffeeersatz	2	-	1	1	-	-	9,5x10 <sup>1</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>
	Pulvernahrung	18	-	4	12	2	-	4,8x10 <sup>1</sup>	3,1x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>2</sup>
	Eiweißkonz.	11	-	6	4	1	-	1x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>3</sup>	2,8x10 <sup>2</sup>
	Diätet. LM	3	-	-	1	1	1	6x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>	4,2x10 <sup>3</sup>
	Diätet. Nahr.	4	-	-	2	2	-	3,4x10 <sup>2</sup>	1,6x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>
	Energy Drink	1	1	-	-	-	-	-	-	-

Gruppe 1: „nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte“; Gruppe 2: „aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte“;

Vollmilchp. = Vollmilchpulver; Magermilchp. = Magermilchpulver; Süßmolkenp. = Süßmolkenpulver; Getr. Milch = Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen; Getr. Malz = Getränkpulver mit Malz; Getr. Kaffee = Getränkpulver mit Kaffee; Eiweißkonz. = Eiweißkonzentrat; Diätet. LM = Diätet. Lebensmittel; Diätet. Nahr. = Diätet. Nahrungsergänzung; - : keine positive Probe

\* Anzahl der Proben, die in dem jeweiligen Keimzahlbereich (in KbE/g) lagen

\*\* Mindest- (Min.) und Höchstwerte (Max.) sowie Mittelwerte der aeroben mesophilen Keimzahl innerhalb der jeweiligen Produktgruppen in KbE/g

a) Probe enthielt Bifido-Bakterienkulturen

### **4.3 Ergebnisse der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von Trockenmilcherzeugnissen**

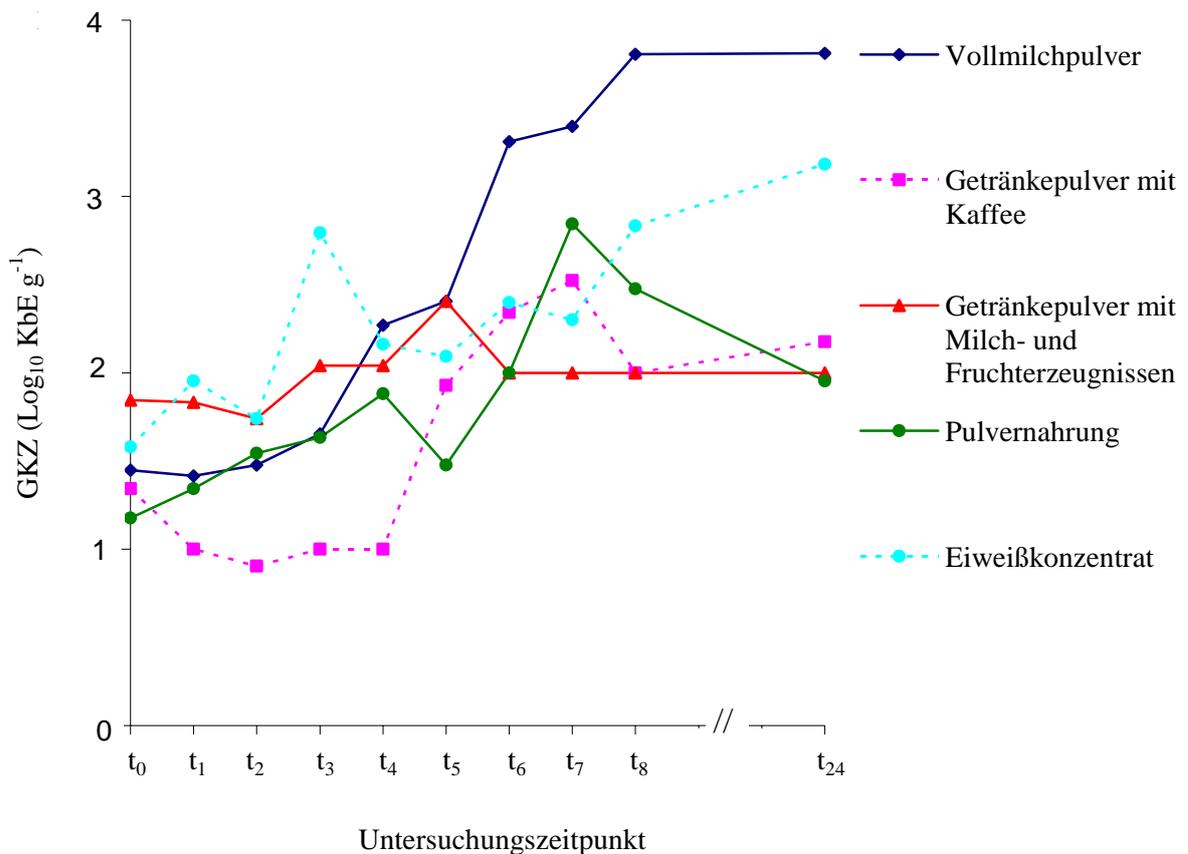
In die Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von Trockenmilcherzeugnissen gingen fünf Proben unterschiedlicher Produktgruppen ein, die nach Herstellerangaben zubereitet wurden. Ein Vollmilchpulver sowie ein Getränkepulver mit Kaffee wurden mit heißem Wasser angerührt, ein Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen wurde mit kaltem Wasser versetzt, eine Pulvernahrung sowie ein Eiweißkonzentrat wurden mit H-Milch zubereitet. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Zeitpunkt  $t_0$  (direkt nach Herstellung der Suspension) bis  $t_{24}$  (24 Stunden nach Herstellung der Suspension) sind in Tabelle 33 dargestellt.

Bezüglich der aeroben mesophilen Keimzahl waren im Verlauf der Untersuchung deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Proben zu beobachten. Zwar wiesen alle Proben nach 24 Stunden höhere Keimzahlen auf als zum Zeitpunkt  $t_0$ , jedoch war nur bei zwei Proben (Vollmilchpulver und Eiweißkonzentrat) ein Anstieg auf  $> 10^3$  KbE/g zu verzeichnen. Keine der Proben erreichte Keimzahlen von  $\geq 10^4$  KbE/g. Das Vollmilchpulver wies als einzige Probe einen kontinuierlichen Anstieg der aeroben mesophilen Keimzahl je Gramm Pulver auf, die anderen Proben zeigten mehr oder weniger deutliche Schwankungen (Tab. 33, Abb. 8), wobei nach vier bis sieben Stunden die stärksten Zunahmen der Keimzahl beobachtet wurden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Erstuntersuchung fiel auf, dass diejenigen Proben, die mit heißem Wasser oder H-Milch angesetzt wurden (Vollmilchpulver, Getränkepulver mit Kaffee, Pulvernahrung, Eiweißkonzentrat), zum Zeitpunkt  $t_0$  geringere Keimzahlen aufwiesen. Das mit kaltem Wasser angerührte Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen wies zum Zeitpunkt  $t_0$  eine höhere Keimzahl auf als bei der zuvor durchgeführten Erstuntersuchung (Tab. 33).

**Tab. 33:** Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von fünf Trockenmilcherzeugnissen; Vergleich zu den mittels der mikrobiologischen Erstuntersuchung (Erst-Unters.) ermittelten Ergebnissen der Proben (Werte für *B. cereus* ermittelt mittels PEMBA)

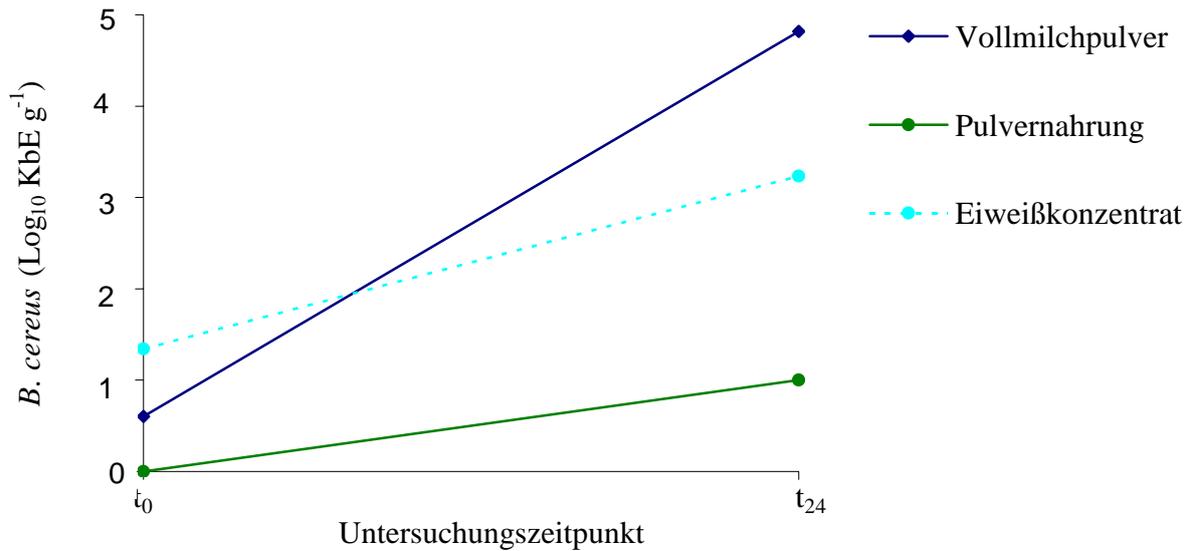
Probe	Untersuchungs- Kriterium	Untersuchungszeitpunkt											Erst- Unters.
		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>6</sub>	t <sub>7</sub>	t <sub>8</sub>	t <sub>24</sub>		
VMP	GKZ (KbE/g)	2,8x10 <sup>1</sup>	2,6x10 <sup>1</sup>	3x10 <sup>1</sup>	4,5 x 10 <sup>1</sup>	1,9x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>	6,4x10 <sup>3</sup>	6,5x10 <sup>3</sup>	3,5x10 <sup>3</sup>	
	<i>B. cereus</i> (KbE/g)	4x10 <sup>0</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2x10 <sup>4</sup>	2,9x10 <sup>1</sup>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.	n.n.	
Getr. Kaffee	GKZ (KbE/g)	2,2x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>1</sup>	8x10 <sup>0</sup>	1 x 10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>1</sup>	8,5x10 <sup>1</sup>	2,2x10 <sup>2</sup>	3,3x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	5x10 <sup>1</sup>	
	<i>B. cereus</i> (KbE/g)	3x10 <sup>0</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.	2x10 <sup>1</sup>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.	n.n.	
Getr. Milch	GKZ (KbE/g)	7x10 <sup>1</sup>	6,8x10 <sup>1</sup>	5,5x10 <sup>1</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	4,8x10 <sup>1</sup>	
	<i>B. cereus</i> (KbE/g)	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.	5x10 <sup>0</sup>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	n.n.	n.n.	
Pulver	GKZ (KbE/g)	1,5x10 <sup>1</sup>	2,2x10 <sup>1</sup>	3,5x10 <sup>1</sup>	4,3 x 10 <sup>1</sup>	7,6x10 <sup>1</sup>	3x10 <sup>1</sup>	1x10 <sup>2</sup>	7x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	9x10 <sup>1</sup>	3,5x10 <sup>2</sup>	
	<i>B. cereus</i> (KbE/g)	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-	1x10 <sup>1</sup>	2x10 <sup>1</sup>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. vulneris</i>	n.n.	
Eiweiß	GKZ (KbE/g)	3,8x10 <sup>1</sup>	9x10 <sup>1</sup>	5,5x10 <sup>1</sup>	6,2 x 10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	6,8x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	2,9x10 <sup>2</sup>	
	<i>B. cereus</i> (KbE/g)	2,2x10 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7x10 <sup>3</sup>	5,2x10 <sup>1</sup>	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	n.n.	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. cloacae.</i>	n.n.	
<i>P. agglom.</i>													

VMP = Vollmilchpulver; Getr. Kaffee = Getränkpulver mit Kaffee; Getr. Milch = Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen;  
Pulver = Pulvernahrung; Eiweiß = Eiweißkonzentrat; GKZ = aerobe mesophile Keimzahl; - : nicht durchgeführt; n.n. = nicht nachweisbar  
*E. cloacae* = *Enterobacter cloacae*; *C. freundii* = *Citrobacter freundii*; *E. vulneris* = *Escherichia vulneris*; *P. agglom.* = *Pantoea agglomerans*

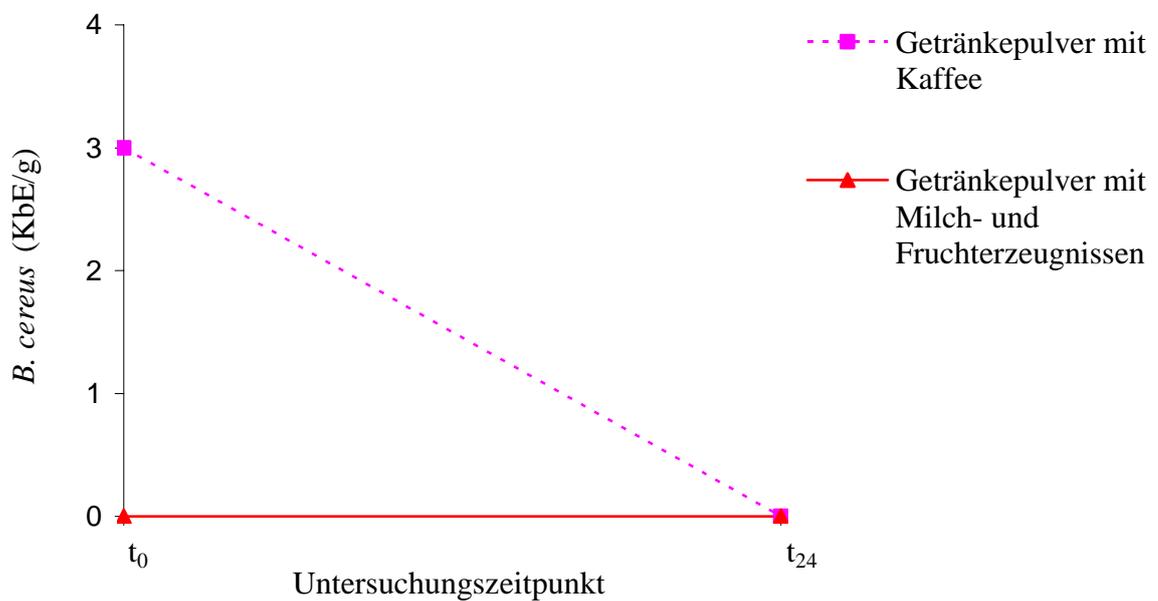


**Abb. 8:** Verlauf der aeroben mesophilen Keimzahl (GKZ) bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von fünf verschiedenen Trockenmilcherzeugnissen in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (t<sub>0</sub> bis t<sub>24</sub> in Stunden nach Rekonstitution)

Hinsichtlich der Untersuchung auf das Vorhandensein von *B. cereus* zeigten diejenigen Proben, die bereits die höchsten aeroben mesophilen Keimzahlen je Gramm Pulver aufwiesen (Vollmilchpulver, Eiweißkonzentrat), zum Zeitpunkt t<sub>24</sub> mit  $6,2 \times 10^4$  bzw.  $1,7 \times 10^3$  KbE *B. cereus*/g ebenfalls die höchsten ermittelten Werte. Alle untersuchten Proben wiesen, unabhängig mit welchem Medium die Zubereitung erfolgte, zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> geringere Kontaminationen an *B. cereus*/g auf als bei der Erstuntersuchung ermittelt wurden. Bei insgesamt drei Proben wurde während der Untersuchungsdauer ein Anstieg der KbE *B. cereus*/g verzeichnet; in zwei Proben (Getränkepulver mit Kaffee, Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen) konnte nach 24 Stunden kein *B. cereus* mehr nachgewiesen werden (Tab. 33, Abb. 9,10).



**Abb. 9:** Gehalt an *B. cereus*/g in drei verschiedenen Trockenmilcherzeugnissen bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (t<sub>0</sub> und t<sub>24</sub> in Stunden nach Rekonstitution)



**Abb. 10:** Gehalt an *B. cereus*/g in zwei verschiedenen Trockenmilcherzeugnissen bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (t<sub>0</sub> und t<sub>24</sub> in Stunden nach Rekonstitution)

Obwohl in keiner der fünf untersuchten Proben mithilfe der Erstuntersuchung *Enterobacteriaceae* nachgewiesen wurden, konnte direkt nach Herstellen der Suspension unter haushaltsüblichen Bedingungen aus zwei Proben (Getränkpulver mit Kaffee, Pulvernahrung) *Enterobacter cloacae* sowie aus einer Probe (Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen) *Citrobacter freundii* isoliert werden (Tab. 34). Nach 24 Stunden konnte aus der Pulvernahrung zwar *Escherichia vulneris* jedoch kein *Enterobacter cloacae* mehr nachgewiesen werden. Aus den Getränkpulvern sowie dem Vollmilchpulver waren zu diesem Zeitpunkt keine *Enterobacteriaceae* nachweisbar, das Eiweißkonzentrat enthielt je ein Isolat *Enterobacter cloacae* sowie *Pantoea agglomerans*. Alle im Rahmen dieser Untersuchung isolierten *Enterobacteriaceae* waren sowohl auf VRBG als auch auf ECC nachweisbar.

#### 4.4 Ergebnisse der Untersuchung auf *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögen

In die Untersuchung auf das *B. cereus*-Enterotoxinbildungsvermögen mittels Duopath® Cereus Enterotoxins-Test gingen insgesamt 69 *Bacillus* spp.-Isolate ein. Diese stammten aus 37 der zuvor untersuchten Trockenmilcherzeugnisse. Bei 33 der untersuchten Isolate (47 %) konnte keine *B. cereus*-Enterotoxinkomponentenbildung nachgewiesen werden und drei *B. cereus*-Isolate (4 %) wurden als nicht eindeutig Nhe-positiv eingestuft. Bei 33 Isolaten (48 %) war eine Nhe- Komponentenbildung eindeutig nachweisbar, hierbei produzierten sechs Isolate (9 %) zusätzlich auch Hbl-Komponenten. (Tab. 34, Abb. 11). Die Produktion von Hbl-Komponenten alleine wurde bei keinem der untersuchten Isolate beobachtet.

**Tab. 34:** Übersicht über die Verteilung von mittels Duopath® Cereus Enterotoxins Test negativ und positiv auf Nhe- und Hbl-Komponentenbildung getesteten *Bacillus* spp.-Isolaten (n gesamt = 69)

Spezies	Anzahl untersuchte Isolate	Anzahl negative Isolate <sup>a)</sup>	Anzahl nicht eindeutig Nhe-positive Isolate <sup>b)</sup>	Anzahl Nhe-positive Isolate <sup>c)</sup>	Anzahl Hbl-positive Isolate <sup>d)</sup>
<i>B. cereus</i>	30	1	3	26	5
<i>B. licheniformis</i>	30	26	n.n.	4	n.n.
<i>B. subtilis</i>	3	3	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. mycoides</i>	2	n.n.	n.n.	2	1
<i>B. pumilus</i>	2	2	n.n.	n.n.	n.n.
<i>B. firmus</i>	1	n.n.	n.n.	1	n.n.
<i>B. circulans</i>	1	1	n.n.	n.n.	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

a) keine Enterotoxinkomponentenbildung nachgewiesen

b) Nhe-Komponentenbildung nicht eindeutig nachgewiesen (schwach gefärbte Linie der Testzone)

c) Nhe-Komponentenbildung nachgewiesen

d) Hbl-Komponentenbildung nachgewiesen, alle Hbl-positiven Isolate waren auch Nhe-positiv



**Abb. 11:** Beispiele für mittels des Duopath® Cereus Enterotoxins Test negativ getestete *Bacillus* spp. (links), Nhe-positive *Bacillus* spp. (Mitte) sowie Nhe- und Hbl-positive *Bacillus* spp. (rechts). Eine 30 Minuten nach Beginn der Testdurchführung sichtbare rot gefärbte Linie der Kontrollzone “C“ zeigt die Funktionsfähigkeit des Tests an, das gleichzeitige Vorhandensein von eindeutig rot gefärbten Linien in den Testzonen (“NHE“ bzw. “HBL“) führt zur Bewertung der untersuchten Probe bzw. des getesteten Isolates als positiv bezüglich der Ausbildung der jeweiligen *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten.

Insgesamt zeigten 26 der 30 untersuchten *B. cereus*-Isolate (87 %) Enterotoxinkomponentenbildung, wobei fünf Isolate (17 %) sowohl Nhe- als auch Hbl-Komponenten produzierten. Bemerkenswert ist, dass zusätzlich vier von 30 *B. licheniformis*-Isolaten (13 %) sowie je ein *B. mycoides*- und *B. firmus*-Isolat (50 bzw. 100 %) Nhe-Komponentenbildung aufwiesen. Weiterhin wurde bei einem *B. mycoides*-Isolat die Produktion von Nhe- und Hbl-Komponenten nachgewiesen.

Die Enterotoxinkomponenten bildenden *Bacillus* spp.-Isolate stammten aus insgesamt 24 Trockenmilcherzeugnissen unterschiedlicher Produktgruppen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Allgemeines

Trockenmilcherzeugnisse werden in vielfältiger Weise als Lebensmittel konsumiert, sowohl im „normalen“ Verbraucherhaushalt (z.B. über Backzutaten wie Voll- und Magermilchpulver, Milcheiweiß als Kaffeeweiß, Kaffee- und Malzgetränke), als auch im Zusammenhang mit speziellen diätetischen Bedürfnissen (z.B. über Eiweißkonzentrate zum Muskelaufbau für Sportler, über Pulvernahrung zur Gewichtsreduktion, Molkekuren, diätetische Lebensmittel und zahlreiche Nahrungsergänzungsmittel). Hinsichtlich der Konsumentengruppe sowie der angenommenen Verzehrshäufigkeit gibt es deutliche Unterschiede, wobei insbesondere das Angebot an als „gesundheitsfördernden“ oder als die „Wellness fördernden“ Produkten steigt. Es besteht Grund zu der Annahme, dass ein Teil der Konsumenten bestimmter hier untersuchter Produkte (z.B. spezieller „diätetischer“ Erzeugnisse) aufgrund einer Vorerkrankung oder wegen starken Übergewichts, eventuell auch durch extremen Leistungssport, als besonders vulnerabel angesehen werden kann.

Da sich die in die vorliegende Untersuchung einbezogenen Erzeugnisse auch hinsichtlich ihrer Herstellungsweise und der damit verbundenen Kontaminationsrisiken unterscheiden, wurden sie für eine bessere Vergleichbarkeit in zwei Gruppen (nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte bzw. aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln hergestellte Produkte) eingeteilt.

Das primäre Ziel der Studie war es, einen Überblick über die mikrobiologische Qualität der untersuchten Trockenmilcherzeugnisse zu erhalten. Hierbei wurden die Proben sowohl auf das Vorkommen von allgemeinen Hygieneindikatoren (*Enterobacteriaceae*, aerobe mesophile Keimzahl) und potentiell pathogenen Keimen (*Enterobacter sakazakii*, *B. cereus* bzw. sonstige aerobe Sporenbildner) als auch stichprobenartig auf eventuell vorhandenes Toxinbildungsvermögen verschiedener Isolate (*B. cereus*-Enterotoxinkomponenten-Nachweis bei verschiedenen *Bacillus* spp.) untersucht. Hierbei wurde ein neuartiger Immuntest (GLISA Test „Duopath® Cereus Enterotoxins“) eingesetzt. Da eine Kontamination der Produkte mit den oben genannten Mikroorganismen nicht nur durch die Ausgangsstoffe oder bei der Herstellung, sondern auch bei fehlerhafter Zubereitung und Behandlung der Produkte im

Verbraucherhaushalt entstehen kann, wurde zudem an fünf ausgewählten Proben eine exemplarische Untersuchung zur möglichen Keimvermehrung nach Zubereitung der Lebensmittel unter verbrauchernahen Bedingungen durchgeführt.

Rechtliche Vorschriften bezüglich mikrobiologischer Kriterien für die in die Studie einbezogenen Trockenmilcherzeugnisse existieren derzeit nur im Hinblick auf den Parameter *Enterobacteriaceae* in Milch- und Molkepulvern am Ende des Herstellungsprozesses (nicht gültig für Milch- und Molkepulver, die zur weiteren Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt sind). So dürfen nach Maßgaben der VO (EG) Nr. 1441/2007 in keiner von fünf Probeneinheiten der Stichprobe mehr als 10 KBE *Enterobacteriaceae* pro Gramm vorhanden sein. Für die anderen hier untersuchten Mikroorganismen gilt, dass sie oder ihre Toxine oder Metaboliten „nicht in Mengen enthalten sein“ dürfen, die ein für die menschliche Gesundheit unannehmbares Risiko darstellen.

## **5.2 Betrachtung nach Untersuchungskriterium**

### *5.2.1 Enterobacteriaceae und Enterobacter sakazakii*

#### 5.2.1.1 Vorkommen

Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* in jeweils 10 g Trockenmilcherzeugnis von 12 % (über alle Erzeugnisse hinweg) ist nur schwer mit anderen Literaturangaben vergleichbar, da kaum aktuelle Studien zu dieser Produktpalette publiziert wurden.

In nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehenden Produkten (Vollmilchpulver, Magermilchpulver, Süßmolkenpulver, Milcheiweiß, Molkeneiweiß) wurden in 10 g keine *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, dies deckt sich mit den für Milchpulver (WESSELS et al., 1988) bzw. Süßmolkenpulver (SITHOLE et al., 2006) publizierten Ergebnissen, weicht jedoch von den Ergebnissen der Untersuchungen an Vollmilchpulvern (n = 20; 2 positiv) durch SHAKER et al. (2007) ab. IVERSEN & FORSYTHE (2004b) konnten in insgesamt 36

von 72 Milchpulverproben *Enterobacteriaceae* nachweisen, wobei die Untersuchung an je 25 g Pulver erfolgte.

Das in der Erstuntersuchung aller Trockenmilcherzeugnisse (n = 105) sowie der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungen ermittelte Spektrum an *Enterobacteriaceae*-Spezies stimmt größtenteils mit den Ergebnissen der an Molkereiumfeldproben, Rohmilch, pasteurisierter Milch, Sahne sowie Milchpulvern durchgeführten Studien überein (WESSELS et al., 1988; TERNSTRÖM et al., 1993; LINDBERG et al., 1998; WÖRNER et al., 2003; IVERSEN & FORSYTHE, 2004b). Dies gilt auch für das verhältnismäßig häufige Vorkommen von *Enterobacter cloacae* (6 Isolate). Insgesamt wurden 15 verschiedene Arten isoliert (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia adecarboxylata*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia coli*, *Serratia rubidaea*, *Serratia plymuthica*, *Serratia odorifera*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea agglomerans*, *Pantoea* spp., *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter calcoaceticus*).

*Enterobacter sakazakii* konnte in nur einer Pulvernahrung nachgewiesen werden. Die Nicht-Nachweisbarkeit in reinen Milch- und Molkenpulvern deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien an Milch- bzw. Vollmilchpulvern und Trockenmilch (WESSELS et al., 1988; SHAKER et al., 2007; BFR, 2008). Auch IVERSEN & FORSYTHE (2004b) wiesen nur in drei von 72 Milchpulvern *Enterobacter sakazakii* in 25 g nach.

Die aufgrund eines positiven Befunds für *Enterobacter sakazakii* durchgeführte Nachuntersuchung an 100 g-Aliquoten von 13 ausgewählten Pulvernahrungen ergab zwar eine deutlich höhere Vorkommenshäufigkeit von *Enterobacteriaceae* innerhalb dieses Probenpools (54 %), jedoch konnte kein weiterer positiver Nachweis von *Enterobacter sakazakii* geführt werden. Da bei der Nachuntersuchung grundsätzlich dieselben Untersuchungsmethoden verwendet wurden, können die Abweichungen bezüglich der erhöhten Inzidenz an *Enterobacteriaceae* auch auf die erhöhte Menge an Probenmaterial und Nährmedien zurückgeführt werden.

### 5.2.1.2 Vergleich der Nährmedien

Die bei der Untersuchung auf *Enterobacteriaceae* und *Enterobacter sakazakii* parallel eingesetzten Nährmedien ergaben sowohl qualitativ als auch quantitativ voneinander abweichende Resultate. Bei der Erstuntersuchung war der Nachweis von *Enterobacteriaceae* in fünf Proben nur in jeweils einem der beiden verwendeten Nährmedien (VRBG bzw. ECC) möglich, in zwei Fällen wurden sogar jeweils unterschiedliche Spezies ermittelt. Insgesamt ergab der VRBG einen höheren Anteil positiver Ergebnisse (Tab. 23). Im Rahmen der Nachuntersuchung von 13 Pulvernahrungen, die nach Voranreicherung mittels EEB auf den Nährböden VRBG, ECC und DFI durchgeführt wurde, stellte sich ein ähnliches Bild dar. Alle zwölf Isolate konnten mittels VRBG nachgewiesen werden, neun Isolate waren auch mittels ECC und acht Isolate zusätzlich mittels DFI nachweisbar. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Erstuntersuchung (bezogen auf diejenigen Spezies, die mit beiden Untersuchungsgängen in derselben Probe nachweisbar waren) wichen drei von sechs Resultaten ab. So konnten zwei Spezies erst bei der Nachuntersuchung auch auf ECC (zusätzlich zu VRBG) nachgewiesen werden, eine Spezies war bei der Erstuntersuchung mittels ECC, bei der Nachuntersuchung jedoch nur mittels VRBG nachweisbar (Tab. 25). In beiden Untersuchungsgängen wurden mittels ECC auch nicht zu den coliformen Keimen zählende Gattungen (*Serratia*, *Pantoea*, *Acinetobacter*) isoliert, aber nicht alle coliformen Keime waren auch stets auf ECC-Agar nachweisbar.

Der Untersuchungsgang zur Bestimmung von *Enterobacter sakazakii* mittels Voranreicherung in mLST-Vancomycin und Bebrütung von VRBG und DFI-Agarplatten war zwar geeignet, alle bereits vorher nachgewiesenen *Enterobacter cloacae* und *Enterobacter amnigenus*-Isolate zu detektieren, wobei drei Isolate auch mittels DFI nachgewiesen wurden (Tab. 26). Der positive Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in einer Probe wurde jedoch auf VRBG und ECC im Rahmen der Erstuntersuchung auf *Enterobacteriaceae* (nach Voranreicherung in EEB) erhalten. Dies zeigt, dass *Enterobacter sakazakii* wohl sehr selten sporadisch in diesen Erzeugnissen vorkommt, der Nachweis damit auch stark zufälligen Charakter aufweist.

### 5.2.1.3 Verhalten bei Rekonstitution

Bei der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von fünf ausgewählten Trockenmilcherzeugnissen wurde auch das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* zu den Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_{24}$  erfasst. Da jedoch nur eine qualitative Bestimmung erfolgte, sind die Ergebnisse hinsichtlich einer gesundheitlichen Gefährdung des Verbrauchers nicht unbedingt aussagekräftig. Dies gilt insbesondere, da die Aussagekraft der Untersuchung bezüglich ihrer praktischen Relevanz (offensichtlicher Verderb nach 24 Stunden) fraglich ist. Die Tatsache, dass in insgesamt vier der untersuchten Proben, welche in der Erstuntersuchung keine *Enterobacteriaceae* enthielten, Vertreter der Gattungen *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* sowie *Pantoea* nachgewiesen werden konnten, ist vermutlich auf die zur Rekonstitution verwendeten Medien (heißes bzw. kaltes Wasser, H-Milch) bzw. deren Handhabung und eine (Re-) Kontamination bei der Zubereitung zurückzuführen. Es wurde kein Zusammenhang mit gleichzeitig vorhandenen hohen Keimzahlen an *B. cereus* oder einer hohen aeroben mesophilen Keimzahl beobachtet.

### 5.2.1.4 Beurteilung

Eine abschliessende Beurteilung der Produkte unter rechtlichen Gesichtspunkten ist schwierig, zumal nur eine rein qualitative Bestimmung des Vorhandenseins von *Enterobacteriaceae* erfolgte und die Bestimmungen der VO (EG) Nr. 1441/2007 nur für Milch- und Molkepulver am Ende des Herstellungsprozesses - und zudem nicht für Produkte, die zur weiteren Verarbeitung in der Lebensmittelindustrie bestimmt sind - gelten (vgl. Kap. 2.1.3). Insgesamt erscheint die Belastung von Trockenmilcherzeugnissen mit *Enterobacteriaceae* jedoch als gering. Beim nachgewiesenen Spektrum von *Enterobacteriaceae* sind einige als fakultativ pathogen geltende Gattungen (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) vertreten, welche zumindest als Verderbniserreger und opportunistische Krankheitserreger bei immunsupprimierten Konsumenten eine Rolle spielen könnten. Der Nachweis von *Enterobacter sakazakii* in einer Pulvernahrung zeigt die Möglichkeit einer Kontamination auf, insgesamt scheint die Belastung hier aber recht gering zu sein.

## 5.2.2. Aerobe Sporenbildner

### 5.2.2.1 Vorkommen und Enterotoxinkomponenten-Nachweis

Insgesamt zeigte die Untersuchung, dass ein hoher Anteil (85 %) aller untersuchten Trockenmilcherzeugnisse mit aeroben Sporenbildnern kontaminiert war, wobei sich auch hier ein Vergleich zu Angaben aus der Literatur - mangels gezielter Studien bezüglich der zugrunde liegenden Produktpaletten - schwierig gestaltet.

Der häufige Nachweis präsumtiver *B. cereus* (48 % der Proben insgesamt, Inzidenz je nach Produktgruppe 28 bis 100 %) sowie das Vorliegen von geringen Keimzahlen ( $5 \times 10^0$  bis  $9 \times 10^1$  KbE/g) deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (WONG et al., 1988; BECKER et al., 1994; REYES et al., 2007). Die Verteilung innerhalb der beiden Übergruppen war sehr ähnlich mit 55 % (nur aus Milch- und Milcherzeugnissen bestehende Produkte) bzw. 46 % (aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte) kontaminierten Proben. Somit konnte die Feststellung von WONG et al. (1988) und REYES et al. (2007), dass Trockenmilcherzeugnisse mit Zusatz von Reis, Cerealien, Hülsenfrüchten und Aromen höhere Inzidenzen sowie Kontaminationsraten an *B. cereus* als herkömmliche Milchpulver aufweisen, nicht bestätigt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur eine verhältnismäßig geringe Probenzahl der nur aus Milch und Milcherzeugnissen bestehenden Produkte in die vorliegende Untersuchung einging. Insgesamt kam *B. cereus* häufiger mit anderen aeroben Sporenbildnern zusammen vor (38 Proben) als alleine (12 Proben). Das Vorkommen von anderen aeroben Sporenbildnern lässt aber nicht auf das Vorhandensein von *B. cereus* schliessen, da in 39 Proben nur andere aerobe Sporenbildner aber kein *B. cereus* nachweisbar waren (Tab. 27).

Das in der vorliegenden Untersuchung ermittelte Spektrum an *Bacillus* spp. in Trockenmilcherzeugnissen ist mit den Angaben anderer Autoren aus Studien zum Vorkommen in Rohmilch, pasteurisierter Milch, Milchprodukten und Milchpulvern (CRIELLY et al., 1994; SUTHERLAND & MURDOCH, 1994; COSENTINO et al., 1997; RÜCKERT et al., 2004; COOREVITS et al., 2008) vergleichbar, wobei zu beachten ist, dass hier nur einige Spezies gezielt identifiziert wurden. Die Beobachtung, dass *B. licheniformis* am häufigsten isoliert werden konnte, stimmt zwar mit dem Ergebnis einer Studie an

Milchpulvern (RÜCKERT et al., 2004) sowie verschiedenen Studien an Rohmilch, pasteurisierter Milch und rekonstituierten Milchpulvern (CRIELLY et al., 1994; COSENTINO et al., 1997; COOREVITS et al., 2008; BANYKÓ & VYLETÉLOVÁ, 2009) überein, jedoch lag die hier ermittelte Inzidenz (51 % der Proben insgesamt) unter den von RÜCKERT et al. (2004) erfassten Werten. Das Vorkommen von mit *B. subtilis*, *B. pumilus* und *B. circulans* belasteten Proben lag mit 1 bis 3 % ebenfalls unter den von RÜCKERT et al. (2004) ermittelten Werten. Für das Vorkommen von *B. mycoides* sowie *B. firmus* in Trockenmilcherzeugnissen gibt es in der Literatur keine Vergleichswerte, die Inzidenz von 2 % bzw. 1 % erscheint jedoch gering. Andere, nicht weiter identifizierte Sporenbildner hingegen waren in einer relativ hohen Anzahl der untersuchten Proben (52 %) nachweisbar. Insgesamt stellte sich die Verteilung des Vorkommens von sonstigen Sporenbildnern (ausser *B. cereus*) als relativ unterschiedlich dar; so waren 78 % der aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzten Produkte und nur 50 % der nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehenden Produkte kontaminiert. Hier ist unter Umständen ein Bezug zu den Aussagen von WONG et al. (1988) und REYES et al. (2007), welche sich allerdings ausschliesslich auf das Vorhandensein von *B. cereus* beziehen, zu sehen.

Die ermittelte Höhe der Keimzahlen der sonstigen Sporenbildner ausser *B. cereus* ( $5 \times 10^0$  bis  $3,7 \times 10^3$  KbE/g) liegt unter den Ergebnissen der Studie von RÜCKERT et al. (2004), zumal nur in zwei Proben (ein Getränkepulver mit Kaffee und eine Pulvernahrung) Werte von  $> 10^3$  KbE *B. licheniformis*/g erreicht wurden. Die beobachtete durchschnittliche Belastung der Trockenmilcherzeugnisse je nach Produktgruppe (mittlere Keimzahlen von  $1,2 \times 10^1$  bis  $3,5 \times 10^2$  KbE *B. licheniformis*/g,  $5 \times 10^0$  bis  $1,1 \times 10^2$  KbE *B. subtilis*/g,  $1 \times 10^1$  bis  $4,5 \times 10^1$  KbE *B. mycoides*/g, je  $5 \times 10^0$  KbE *B. pumilus*, *B. firmus*, *B. circulans*/g,  $1 \times 10^1$  bis  $1,7 \times 10^2$  KbE sonstige Sporenbildner/g) ist in etwa vergleichbar mit in Studien an Rohmilch ermittelten Werten (CRIELLY et al., 1994; SUTHERLAND & MURDOCH, 1994; MCGUIGGAN et al., 2002; TE GIFFEL et al., 2002; FOLTYS & KIRCHNEROVÁ, 2006; COOREVITS et al., 2008) bzw. erscheint als gering.

Das an den untersuchten *B. cereus*-Isolaten mittels des neuartigen Duopath® Cereus Enterotoxins Test ermittelte Vorkommen von Enterotoxinkomponenten-Bildnern lag mit 17 % bezüglich der Ausbildung von Hbl-Komponenten unter den Ergebnissen anderer Studien (VAN NETTEN et al., 1990; COSENTINO et al., 1997; NIEMINEN et al., 2007;

REYES et al., 2007; SVENSSON et al., 2007). Allerdings wurden in allen genannten Studien BCET-RPLA-Tests verwendet und nur die Studie von REYES et al. (2007) untersuchte aus Milchpulver isolierte *B. cereus*. Zudem ist denkbar, dass die produzierte Toxinmenge einiger hier untersuchter Isolate unterhalb der Nachweisgrenze lag. Bezüglich der Ausbildung von Nhe-Komponenten war das Ergebnis mit insgesamt 87 % positiven Isolaten (70 % nur Nhe positiv, 17 % Nhe und Hbl positiv) vergleichbar mit in der Untersuchung von HAMMER et al. (2001) an aus Milchpulvern und Umfeldproben eines Milchtrocknungsbetriebes isolierten *B. cereus* (BDE-VIA) sowie den von SVENSSON et al. (2007) untersuchten Isolaten. Da bei den hier untersuchten Isolaten keine quantitative Bestimmung der Toxinmenge durchgeführt wurde, ist eine Beurteilung von als „high producer“ einzustufenden *B. cereus* nicht möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchung anderer ausgewählter *Bacillus* spp. auf das Vorhandensein von *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten weicht zum Teil stark von Angaben aus der Literatur ab (Tab. 8). Einzig die Feststellung, dass bei beiden untersuchten *B. pumilus*-Isolaten weder Nhe- noch Hbl-Komponenten nachweisbar waren, entspricht Angaben anderer Autoren. Für die ebenfalls hier als negativ getesteten Spezies *B. subtilis* und *B. circulans* hingegen wird in der Literatur Nhe-Komponentenbildung (*B. circulans*: häufig) bzw. Hbl-Komponentenbildung (*B. subtilis*, *B. circulans*: häufig) beschrieben. Für *B. licheniformis* (Duopath® Cereus Enterotoxins Test: n = 30; 13 % Nhe positiv, keine Hbl positiven Isolate) wird in der Literatur zusätzlich zum Vorkommen von Nhe-Komponenten häufig über das Vorkommen von Hbl-Komponenten berichtet, für *B. mycoides* (Duopath® Cereus Enterotoxins Test: n = 2; 50 % Nhe positiv, 50 % Nhe und Hbl positiv) lagen bisher nur Berichte über Hbl-Komponenten bildende Isolate vor. Im Falle von *B. firmus* (Duopath® Cereus Enterotoxins Test: n = 1, 100 % Nhe positiv) war bisher keine Ausbildung von *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten bekannt.

Abweichend von der vorgesehenen Anwendungsweise des Duopath® Cereus Enterotoxins Test, bei der 100 µl homogenisierte Lebensmittelprobe auf MYP-Agarplatten ausgestrichen werden, wurden in der vorliegenden Untersuchung kryokonservierte *Bacillus* spp.-Isolate nach Suspension in CASO-Bouillon auf CASO- und PEMBA-Platten aufgetragen. Die Bebrütung und die nachfolgende Testdurchführung einschließlich Überführung in CGY-Bouillon erfolgten wie vorgegeben. Obwohl die Evaluierung des Tests nur mittels MYP erfolgte (SLAGHUIS, persönliche Mitteilung) war auch die hier verwendete Methode gut durchführbar. Besonders im Hinblick auf den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von Nhe-

und Hbl-Enterotoxinkomponenten, der Kürze der Untersuchungsdauer, der direkten Anwendbarkeit an homogenisiertem Probenmaterial sowie der einfachen Testdurchführung ergeben sich Vorteile für den Anwender.

### 5.2.2.2 Vergleich der Nährmedien

Die hinsichtlich der Nachweisbarkeit von *B. cereus* beobachteten deutlichen Unterschiede zwischen den beiden parallel verwendeten Nährmedien PEMBA und BCC (Tab. 29) bei sonst identischer Probenvorbereitung und Untersuchung könnten dahingehend interpretiert werden, dass die Aussagekraft bei Verwendung nur eines Nährmediums limitiert ist. Da bei immerhin 36 von 50 Isolaten der Nachweis nur mit jeweils einem von beiden Nährmedien gelang, wurden zur Absicherung beide Medien bis zum Schluss mitgeführt. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte eine inhomogene Verteilung der *B. cereus*-Zellen bzw. Sporen im Untersuchungsmaterial sein, wobei darüber bisher in diesem Ausmaß nicht berichtet wurde.

### 5.2.2.3 Verhalten bei Rekonstitution

Das Verhalten von *B. cereus* bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung war in zwei der fünf untersuchten Trockenmilcherzeugnisse vergleichbar mit den von CRIELLY et al. (1994) an Säuglingsnahrungsmitteln ermittelten Ergebnissen. So traten in der Vollmilchpulver- und Eiweißkonzentrat-Probe nach Lagerung von 24 Stunden bei Raumtemperatur Werte von  $6,2 \times 10^4$  bzw.  $1,7 \times 10^3$  KbE/g auf. Die Resultate sind insofern vergleichbar, als das nicht-aromatisierte Pulver höhere Keimzahlen an *B. cereus*/g nach 24 Stunden aufwies als die mit Zusatzstoffen und Aromen versetzte Probe; allerdings war in den drei anderen, ebenfalls aromatisierten Proben, kein nennenswerter Anstieg der Keimzahl an *B. cereus*/g zu verzeichnen bzw. nach 24 Stunden kein *B. cereus* mehr nachweisbar (Tab. 33). Es liess sich weder ein Zusammenhang mit dem zur Rekonstitution verwendeten Medium (heißes bzw. kaltes Wasser, H-Milch) noch mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* feststellen. Allerdings wiesen diejenigen Proben, bei denen nach 24

Stunden ein Anstieg des Gehaltes an *B. cereus*/g zu verzeichnen war, zum Zeitpunkt  $t_0$  auch - relativ - hohe Werte der aeroben mesophilen Keimzahl je Gramm auf.

#### 5.2.2.4 Beurteilung

Eine abschliessende Beurteilung hinsichtlich des potentiellen Gesundheitsrisikos ist schwierig, zumal rechtlich festgelegte Grenzwerte nur für *B. cereus* in Säuglingsnahrungsmitteln vorliegen, wobei in einer von fünf Proben Werte zwischen 50 und 500 KbE/g toleriert werden. Die Infektionsdosis für das emetische bzw. das Diarrhö-Syndrom wird mit  $10^5$  bis  $10^8$  KbE *B. cereus*/g angegeben (GRANUM & LUND, 1997; EFSA, 2005), wobei nach GRANUM & LUND (1997) Lebensmittel mit  $> 10^3$  KbE *B. cereus*/g als nicht unbedenklich zum Verzehr angesehen werden. Lebensmittel, die im Zusammenhang mit Vergiftungen durch andere *Bacillus* spp. als *B. cereus* in Erscheinung getreten sind, enthielten Keimzahlen von  $> 10^6$  KbE/g (EFSA, 2005). Unter diesen Gesichtspunkten erscheint das von Trockenmilcherzeugnissen ausgehende gesundheitliche Risiko gering, jedoch muss die produktspezifische Gefahr durch Rekonstitution und damit verbundene Fehlerquellen bei Handhabung und Lagerung hervorgehoben werden. Die Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von Trockenmilcherzeugnissen ergab immerhin bei zwei von fünf Proben nach 24 Stunden eine Vermehrung von *B. cereus* auf kritische Werte. Bezogen auf die Aussagekraft der Untersuchung bleibt jedoch fraglich, ob ein Stehenlassen der rekonstituierten Produkte bei Raumtemperatur und der anschließende Verzehr auch nach 24 Stunden als realistisch zu betrachten sind, da zu diesem Zeitpunkt bereits deutliche sensorische Veränderungen feststellbar waren, die auf einen Verderb hinwiesen. Damit kann ein Konsum des Produkts in diesem Zustand als eher unwahrscheinlich angesehen werden.

Da in der vorliegenden Untersuchung, ebenso wie in anderen Studien zum Vorkommen von *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten bildenden *Bacillus* spp., keine DNA-basierten Speziesdiagnosen eingesetzt wurden und kommerzielle Testkits nur einzelne Komponenten der komplex aufgebauten Enterotoxine nachweisen, sind die hier ermittelten Resultate ebenfalls mit Vorsicht zu beurteilen. Dies gilt besonders im Hinblick auf tatsächlich vorliegendes, biologisch aktives Toxin und die Höhe der produzierten Toxinmenge

(BEECHER & MACMILLAN, 1991; PEDERSEN et al., 2002; ROWAN et al., 2003; LINDBÄCK et al., 2004). Dennoch ist das Vorkommen von potentiellen Toxinbildnern bzw. von als Lebensmittelvergiftern bekannten Spezies in Trockenmilcherzeugnissen, deren Konsumentengruppe durchaus Risikopatienten wie immunsupprimierte oder ältere Personen sowie Patienten mit verminderter Magensäureproduktion enthält, als nicht unbedenklich einzustufen.

### 5.2.3 Aerobe mesophile Keimzahl

#### 5.2.3.1 Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl in Trockenmilcherzeugnissen

Die in der vorliegenden Studie im Hinblick auf die aeroben mesophilen Keimzahlen von Trockenmilcherzeugnissen ermittelten Werte sind in ihrer Verteilung für beide Gruppen und insgesamt betrachtet sehr ähnlich (Tab. 21). Auch hier ist ein Vergleich mit Angaben aus der Literatur aufgrund der komplexen gesamten Produktpalette schwierig. Das insgesamt gehäufte Vorkommen von Proben mit weniger als  $10^2$  KbE/g (29 %) bzw.  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g (57 %) und das nur vereinzelte Auftreten von Proben mit Keimzahlen von  $> 10^3$  KbE/g (14 %) ähnelt dennoch der Verteilung in der von IVERSEN & FORSYTHE (2004b) an Milchpulvern durchgeführten Studie.

Das Vorhandensein einer aeroben mesophilen Keimzahl von  $> 10^4$  KbE/g Trockenmilch ist, ebenso wie in anderen Studien, nur selten (3 %) beobachtet worden (HELMY et al., 1984; CELESTINO et al., 1997; RÜCKERT et al., 2004; IVERSEN & FORSYTHE, 2004b; SITHOLE et al., 2006). Lediglich in den Untersuchungen von HELMY et al. (1984) und CELESTINO et al. (1997) wurden bei der Mehrzahl der Proben höhere Keimzahlen je Gramm ermittelt als in der vorliegenden Studie. Eine nähere Betrachtung der 15 Proben, die Keimzahlen von  $> 10^3$  bzw.  $> 10^4$  KbE/g aufwiesen, zeigte in 13 Fällen das gleichzeitige Vorhandensein von *B. cereus* und/oder mehr als  $10^2$  KbE/g sonstigen aeroben Sporenbildnern auf. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an aeroben Sporenbildnern und einer hohen aeroben mesophilen Keimzahl beobachtet werden. So wiesen nicht zwangsläufig alle Proben mit hoher aerober mesophiler Keimzahl auch hohe Werte an aeroben Sporenbildnern je Gramm auf und umgekehrt.

Nach Produktgruppe betrachtet lagen die Durchschnittswerte der aeroben mesophilen Keimzahl bei zwei von 14 Gruppen unter  $10^2$  KbE/g, bei neun Gruppen zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KbE/g. Bei drei Produktgruppen lag die durchschnittliche Belastung über  $10^3$  KbE/g, wobei zumindest im Falle des Süßmolkenpulvers ein hoher Einzelwert von  $> 10^4$  KbE/g bei gleichzeitig niedriger Probenanzahl ausschlaggebend war. Diejenige Probe, die einen hohen Einzelwert ( $2,2 \times 10^4$  KbE/g) aufwies, war als mit Bifido-Bakterienkulturen angereichert gekennzeichnet. Von den ebenfalls überdurchschnittlich hoch belasteten Produktgruppen diätetische Lebensmittel sowie diätetische Nahrungsergänzung wurden zwar auch nur geringe Probenanzahlen untersucht, jedoch wurden hier insgesamt relativ hohe aerobe mesophile Keimzahlen ermittelt (Tab. 32). Bei zwei der fünf untersuchten Vollmilchpulver sowie dem „Energy Drink“ konnte kein mikrobiologisches Wachstum nachgewiesen werden, diese Proben stellten sich auch in Bezug auf das Vorhandensein von *Enterobacteriaceae* und aeroben Sporenbildnern als negativ dar.

### 5.2.3.2 Verhalten bei Rekonstitution

Die Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung von Trockenmilcherzeugnissen zeigte bei allen fünf Proben unterschiedliche Verläufe der aeroben mesophilen Keimzahl. Zwei Proben wiesen nach 24 Stunden Werte von  $> 10^3$  KbE/g auf (Vollmilchpulver:  $6,5 \times 10^3$  KbE/g; Eiweißkonzentrat:  $1,5 \times 10^3$  KbE/g), drei Proben wiesen Keimzahlen von lediglich  $9 \times 10^1$  bis  $1,5 \times 10^2$  KbE/g auf (Tab. 34). In beiden Proben mit einer aeroben mesophilen Keimzahl von  $> 10^3$  KbE/g zum Zeitpunkt  $t_{24}$  waren auch deutliche Anstiege der Anzahl an *B. cereus* je Gramm (Vollmilchpulver:  $6,6 \times 10^4$  KbE *B. cereus*/g; Eiweißkonzentrat:  $1,7 \times 10^3$  KbE *B. cereus*/g) nachweisbar. Mit Ausnahme des Vollmilchpulvers war bei keiner der untersuchten Proben ein kontinuierlicher Anstieg der aeroben mesophilen Keimzahl zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zu verzeichnen.

### 5.2.3.3 Beurteilung

Obwohl keine rechtliche Grundlage zur Beurteilung von Trockenmilcherzeugnissen vorliegt, erscheint die Qualität bezüglich der aeroben mesophilen Keimzahl vor dem Hintergrund des in der Literatur als Standard akzeptierten Wertes von  $5 \times 10^4$  KbE/g zufriedenstellend. Selbst nach Rekonstitution mit unterschiedlichen Medien und unter Einbezug einer möglichen (wenn auch eher unwahrscheinlichen) fehlerhaften Zubereitung durch den Verbraucher (Stehenlassen bei Raumtemperatur und Konsum erst nach 24 Stunden) wurde dieser Wert in keiner der untersuchten Proben erreicht. Zu beachten ist jedoch, dass bei Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl keine weitere Identifizierung der zugrunde liegenden Mikroorganismen erfolgt und das Vorhandensein von gesundheitsgefährdenden Keimen nicht auszuschliessen ist.

## 5.3 Betrachtung nach Produktgruppe

### 5.3.1 Nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte

In nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehenden Produkten ( $n = 18$ ) konnten keine *Enterobacteriaceae* einschließlich *Enterobacter sakazakii* nachgewiesen werden. Das Vorkommen von *B. cereus* in insgesamt 55 % der Proben (40 bis 100 % je nach Produktgruppe) mit Keimzahlen von  $5 \times 10^0$  bis  $9 \times 10^1$  KbE/g (mittlere Keimzahlen je nach Produktgruppe  $5 \times 10^0$  bis  $2,8 \times 10^1$  KbE *B. cereus*/g) entspricht den in anderen Studien ermittelten Ergebnissen (WONG et al., 1988; BECKER et al., 1994; REYES et al., 2007). Sonstige aerobe Sporenbildner wurden aus 50 % der Proben isoliert, wobei vor allem nicht weiter identifizierte Sporenbildner auftraten (Tab. 31). *B. licheniformis* wurde in drei Proben (ein Vollmilchpulver, zwei Magermilchpulver) nachgewiesen, andere aerobe Sporenbildner wie *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pumilus*, *B. firmus* und *B. circulans* konnten aus keiner Probe isoliert werden. Insgesamt wiesen die untersuchten Magermilchpulverproben die höchsten durchschnittlichen Kontaminationsraten innerhalb dieser Gruppe auf (mittlere Keimzahlen von  $2,8 \times 10^1$  KbE *B. cereus*/g,  $3,5 \times 10^2$  KbE *B. licheniformis*/g sowie  $1,5 \times 10^2$  KbE andere aerobe Sporenbildner/g).

Die aerobe mesophile Keimzahl lag bei 45 % der Proben unter  $10^2$  KbE/g,  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g wurden bei 34 % der Proben ermittelt. Bei drei Magermilchproben (17 % innerhalb dieser Gruppe) konnte eine Keimzahl von  $> 10^3$  KbE/g festgestellt werden, ein Süßmolkenpulver enthielt  $> 10^4$  KbE/g ( $2,2 \times 10^4$  KbE/g, mit Bifido-Bakterienkulturen angereicherte Probe). Die höchsten durchschnittlichen Keimzahlen betrafen somit die Gruppe der Magermilchpulver (mittlere Keimzahl:  $9,7 \times 10^2$  KbE/g) und Süßmolkenpulver (mittlere Keimzahl:  $7,4 \times 10^3$  KbE/g), die niedrigste Keimzahl wies das untersuchte Molkeneiweiß ( $2 \times 10^1$  KbE/g) auf. In zwei der fünf untersuchten Vollmilchpulverproben konnte überhaupt kein mikrobiologisches Wachstum nachgewiesen werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass die Produkte dieser Gruppe zum größten Teil als küchentechnische Hilfsmittel wie z.B. Backzutaten (Voll- und Magermilchpulver), Kaffeeweißer (Milcheiweiß) und Vanille-Eis-Pulver (Molkeneiweiß) eingesetzt werden, ist die Konsumentengruppe nicht als vorrangig gefährdet anzusehen. Hohe Einzelwerte wie im Falle des Magermilchpulvers sind wohl als weniger kritisch zu betrachten. Für die als „Wellness“-Drinks bzw. Molkekuren verwendeten Süßmolkenpulver kann dagegen eher eine sensible Konsumentengruppe sowie eine wahrscheinlich höhere Verzehrshäufigkeit angenommen werden. Dennoch wurden auch hier keine kritischen Werte im Bezug auf die Untersuchungskriterien erreicht. Einzig das mögliche Vorkommen von Enterotoxin-komponenten bildenden *Bacillus* spp. (unabhängig von der Höhe der aeroben mesophilen Keimzahl bzw. der Keimzahl an *Bacillus* spp. je Gramm) sowie die potentielle Vermehrung speziell von *B. cereus* nach Rekonstitution bei fehlerhaftem Umgang und Lagerung im Haushalt sind als Gefährdungsquelle für den Verbraucher durch Produkte dieser Gruppe nicht auszuschließen.

### 5.3.2 Aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte

In aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzten Produkten ( $n = 87$ ) wurden in 15 % der Proben *Enterobacteriaceae* nachgewiesen, wobei keine obligat pathogenen Keime, wohl aber Vertreter von fakultativ pathogenen Gattungen in Erscheinung traten. Am häufigsten erfolgte der Nachweis aus Pulvernahrungen und

Eiweißkonzentrat (jeweils vier Proben) bzw. Kaffeeersatzextrakt (zwei Proben), die am häufigsten isolierte Spezies stellte *Enterobacter cloacae* (in fünf Proben) dar. Eine Pulvernahrung sowie ein Kaffeeersatzextrakt enthielten gleichzeitig zwei unterschiedliche Spezies, alle anderen positiven Proben enthielten jeweils nur eine Spezies. In Produkten der Gruppen Getränkpulver mit Malz, diätetische Nahrungsergänzung sowie Energy Drink konnten keine *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. *Enterobacter sakazakii* konnte aus einer Pulvernahrung isoliert werden, wobei sich dieses Ergebnis bei der Nachuntersuchung von 3 x 100 g der Probe nicht reproduzieren ließ (Tab. 24, vgl. Kap. 5.2.1.2). Insgesamt ergab die Nachuntersuchung an 100 g-Probenmengen von 13 Pulvernahrungen, verglichen mit der Erstuntersuchung an je 10 g, ein ähnliches *Enterobacteriaceae*-Spektrum bei deutlich größerer Vorkommenshäufigkeit (54 % positiv; n = 13). In fünf Proben konnten erst anhand der größeren Probenmenge *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden, vier Proben wiesen in keinem der beiden Untersuchungsgänge positive Befunde auf; *Enterobacter sakazakii* konnte bei der Nachuntersuchung in keiner der Proben isoliert werden.

In 46 % der Proben (28 bis 100 % je nach Produktgruppe) dieser Gruppe konnte *B. cereus* nachgewiesen werden, hierbei traten Keimzahlen von  $5 \times 10^0$  bis  $5,2 \times 10^1$  KbE/g (mittlere Keimzahl je nach Produktgruppe  $5 \times 10^0$  bis  $4,1 \times 10^1$  KbE *B. cereus*/g) auf. Sonstige aerobe Sporenbildner wurden aus 78 % der Proben isoliert, wobei *B. licheniformis* am häufigsten (in 51 von 87 Proben) und mit den höchsten Keimzahlen je Gramm (mittlere Keimzahlen von  $1 \times 10^1$  bis  $2,8 \times 10^2$  KbE *B. licheniformis*/g je nach Produktgruppe) vorkam (Tab. 30). In drei Proben (Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen, Getränkpulver mit Malz, Eiweißkonzentrat) wurde *B. subtilis* nachgewiesen, wobei das Getränkpulver mit Malz gleichzeitig ein Isolat *B. mycoides* enthielt. Ein Kaffeeersatzextrakt enthielt *B. mycoides* und *B. pumilus*; *B. pumilus* konnte weiterhin aus einem Getränkpulver mit Kaffee isoliert werden. *B. firmus* und *B. circulans* wurden in jeweils einer Probe (Getränkpulver mit Kaffee bzw. Pulvernahrung) nachgewiesen (Tab. 31). Die Keimzahlen dieser *Bacillus* spp.-Isolate lagen zwischen  $5 \times 10^0$  und  $1,1 \times 10^2$  KbE/g (Tab 30). In Bezug auf das Vorhandensein von aeroben Sporenbildnern gelang der Nachweis am häufigsten in Getränkpulvern mit Kaffee (19 Proben *B. cereus* positiv, 31 Proben sonstige Sporenbildner positiv), gefolgt von Eiweißkonzentrat (sechs Proben *B. cereus*, sechs Proben sonstige Sporenbildner), Pulvernahrungen (fünf Proben *B. cereus*, 15 Proben sonstige Sporenbildner) und Getränkpulvern mit Milch (vier Proben *B. cereus*, neun Proben sonstige Sporenbildner).

Bei 25 % der Proben dieser Gruppe lag die ermittelte aerobe mesophile Keimzahl bei  $< 10^2$  KbE/g, 62 % der Proben wiesen  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g auf. Bei neun der 87 Proben (10 %) konnten Keimzahlen von  $> 10^3$  KbE/g beobachtet werden, zwei Proben enthielten  $> 10^4$  KbE/g (ein Getränkpulver mit Kaffee:  $1,7 \times 10^4$  KbE/g, ein diätetisches Lebensmittel:  $1,1 \times 10^4$  KbE/g). Die höchsten durchschnittlichen Werte der aeroben mesophilen Keimzahl wurden in der Gruppe der diätetischen Lebensmittel (mittlere Keimzahl:  $4,2 \times 10^3$  KbE/g) sowie der diätetischen Nahrungsergänzungen (mittlere Keimzahl:  $1 \times 10^3$  KbE/g) festgestellt, dicht gefolgt von der Gruppe der Getränkpulver mit Kaffee (mittlere Keimzahl:  $9,3 \times 10^2$  KbE/g). Für die untersuchte Energy-Drink Probe konnte in keinem der Untersuchungsgänge mikrobiologisches Wachstum festgestellt werden.

Die Produkte dieser Gruppe sind, besonders im Hinblick auf ihre Zusammensetzung sowie ihre Verwendung und die jeweilige Konsumentengruppe, sehr heterogen. So werden die Getränkpulver mit Malz oder Kaffee bzw. Kaffeeersatzextrakte als Instant Malz- oder Kaffeegetränke (insbesondere aromatisierte Cappuccinogetränke) im normalen Verbraucherhaushalt wahrscheinlich gelegentlich bis häufig eingesetzt. Als Muskelaufbaupräparate für Sportler verwendete Produkte (Eiweißkonzentrat) werden wahrscheinlich ebenfalls - je nach Intensität des Trainings und in einer bestimmten Konsumentengruppe - gelegentlich bis häufig verzehrt. Die sensibelste Konsumentengruppe bei anzunehmendem häufigem bis sehr häufigem Verzehr ist für als Molkekuren (Getränkpulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen, „Energy Drinks“) sowie Pulvernahrungen zur Zubereitung kalorienarmer Ernährung zur Gewichtsverringering eingesetzte Produkte gegeben. Dies gilt vermutlich ebenfalls für diätetische Lebensmittel und Nahrungsergänzungen, die z.B. als „Figur former“, „Basenpulver“ oder „Bio-Eiweißkonzentrat“ auf dem Markt erhältlich sind. Zwar sind im Rahmen der Untersuchung für keines der Produkte kritische Werte ermittelt worden, dennoch ist das Vorkommen von fakultativ pathogenen *Enterobacteriaceae*-Spezies sowie möglicherweise Enterotoxin-komponenten bildenden *Bacillus* spp. besonders in Pulvernahrungen, Getränkpulvern mit Milch- und Fruchterzeugnissen sowie diätetischen Lebensmitteln und Nahrungsergänzungen als nicht völlig unbedenklich einzustufen. Dies gilt insbesondere, da Hygienefehler des Verbrauchers bei Zubereitung und Behandlung der Produkte, aus denen eine Gesundheitsgefährdung resultieren könnte, nicht ausgeschlossen werden können.

## 5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist die mikrobiologische Qualität der Trockenmilcherzeugnisse in Hinsicht auf die untersuchten Kriterien durchweg als gut einzustufen, ein gesundheitliches Risiko sollte - zumindest bei ordnungsgemäßer Handhabung und nicht prädisponierten Verbrauchern - von keinem der Produkte ausgehen. Es ergaben sich keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen mikrobiologischer Beschaffenheit und einem bestimmten Hersteller, wobei dieser Parameter aufgrund der letztlich limitierten Probenzahl und der oft nicht angegebenen Herstelleradresse des Milchpulvers nur eingeschränkt geprüft werden konnte.

Der häufigere Nachweis der als Hygieneindikatoren dienenden *Enterobacteriaceae* in Produkten, die aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzt sind - im Vergleich zu nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehenden Produkten - ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Herstellungsweise beider Produktgruppen zurückzuführen. Hierbei sind insbesondere Mischvorgänge und der Zusatz von Aromen sowie anderen hitzelabilen Zusatz- und Inhaltsstoffen zu den eigentlichen Milch- und Molkepulvern nach der Wärmebehandlung geeignet, eine Rekontamination herbeizuführen. Auch das gehäufte Auftreten von coliformen Keimen lässt auf nachträglichen Eintrag aus dem Produktionsumfeld schliessen.

Die prozentuale Verteilung von mit *B. cereus* belasteten Proben war in beiden Gruppen in etwa gleich hoch und lässt sich auf das ubiquitäre Vorkommen des Keims in der zur Herstellung verwendeten Rohmilch zurückführen. Die ermittelten Keimzahlen waren bei allen Proben gering (max.  $9 \times 10^1$  KbE *B. cereus*/g) und Werte von  $\geq 5 \times 10^2$  KbE *B. cereus*/g, welche nach RÜCKERT et al. (2004) und RONIMUS et al. (2003) als Indiz für Wachstum innerhalb der Produktionsanlagen anzusehen wären, wurden nicht annähernd erreicht. Sonstige Sporenbildner - und insbesondere andere, bereits als Lebensmittelvergifter in Erscheinung getretene *Bacillus* spp. - waren vermehrt in aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzten Produkten nachweisbar, wobei nur in zwei Proben Keimgehalte von  $> 5 \times 10^2$  KbE/g (*B. licheniformis*) erreicht wurden. Auch hier ist ein Eintrag als Re- oder Kreuzkontamination im Zusammenhang mit der Produktionsweise

denkbar, zumal besonders stark aromatisierte sowie kohlehydrat- und stärkeiche Produkte betroffen waren.

Das - im Vergleich gesehen - höhere Risiko der mikrobiellen Belastung, das aus mehreren Komponenten zusammengesetzte Trockenmilcherzeugnisse aufzuweisen scheinen, lässt sich auch an der prozentual häufigeren Probenanzahl im Keimzahlbereich von  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g ablesen. Allerdings sind bei beiden Gruppen Proben mit einer aeroben mesophilen Keimzahl von mehr als  $10^3$  KbE/g vergleichsweise selten, Keimzahlen von mehr als  $10^4$  KbE/g kamen nur sehr vereinzelt vor.

Der Nachweis von *Enterobacter sakazakii*, welcher als opportunistischer Krankheitserreger eingestuft wird, in einer Pulvernahrung sollte zwar nicht überinterpretiert werden, kann aber nicht pauschal als unkritisch bewertet werden. Obwohl bisherige Krankheitsfälle nur im Zusammenhang mit Säuglingsnahrungsmitteln beobachtet wurden und bisher keine Erkrankungen bei immunkompetenten Personen beschrieben wurden (LEHNER & STEPHAN, 2004; ANONYM, 2004b; FRIEDEMANN, 2008) ist aufgrund der unter Umständen sensiblen Konsumentengruppe der Pulvernahrung Vorsicht geboten, auch wenn das Ergebnis mithilfe der Nachuntersuchung nicht reproduziert werden konnte. So erscheint die seit dem Jahre 2006 durchzuführende Ehrhebung der Daten zum Vorkommen von *Enterobacter sakazakii* in Milcherzeugnissen und Kindernahrung nach Maßgabe der EFSA durch das BfR (BFR, 2008) als sinnvolle Maßnahme. Die Einführung von rechtlich festgelegten Grenzwerten für *Enterobacter sakazakii* - analog zu der rechtlichen Regelung von getrockneten Säuglingsnahrungsmitteln (VO (EG) Nr. 1441/2007) - zumindest in Trockenmilcherzeugnissen, die für bestimmte sensible Konsumentengruppen angeboten werden, wäre in Erwägung zu ziehen.

Ähnliches gilt für *B. cereus*. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung nur Keimzahlen ermittelt wurden, die bisher nicht im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen bzw. Toxinbildung beschrieben wurden ( $10^5$  -  $10^8$  KbE *B. cereus*/g), kann das Vorkommen von *B. cereus* speziell für sensible Konsumentengruppen problematisch sein. Dies gilt insbesondere auch im Hinblick auf das emetische Syndrom, bei dem unter Umständen präformiertes, hitzestabiles Toxin die Herstellung der Trockenmilcherzeugnisse überdauert hat während die Toxinproduzenten nicht mehr nachweisbar sind. Überträgt man die von SHAHEEN et al. (2006) an Säuglingsnahrungsmitteln erzielten Ergebnisse auf herkömmliche Trockenmilch-

erzeugnisse, wären besonders mit Cerealien zusammengesetzte Produkte, wie sie zum Beispiel im Falle von Pulvernahrungen vorkommen, geeignet um eine Cereulidproduktion zu begünstigen. Die Beurteilung einer von den Produkten ausgehenden Gefahr hinsichtlich des Diarrhö-Syndroms ist, trotz des hier erfolgten Nachweises von einigen Enterotoxin-komponenten bildenden Isolaten, schwierig. Dies beruht zum einen auf der Tatsache, dass kein tatsächlich vorliegendes, biologisch aktives Toxin nachgewiesen werden konnte und keinerlei Angaben über die Höhe der eventuellen Toxinmenge gemacht werden können; zum anderen ist der Ausbruch einer Erkrankung von verschiedenen Faktoren - wie z.B. Überstehen der Magenpassage der aufgenommen *B. cereus* - abhängig. Auch hier sind sensible und unter Umständen immunsupprimierte oder geschwächte Patienten stärker gefährdet, besonders wenn sie eine verminderte Magensäureproduktion aufweisen (CLAVEL et al., 2004). Da nach MORAVEK et al. (2006) ein Gesundheitsrisiko hauptsächlich für Nhe-produzierende *B. cereus*-Stämme gegeben ist, kann das in den eigenen Untersuchungen festgestellte Vorkommen von 87 % Nhe positiven Isolaten (n = 30) als beachtenswert gelten. Dies gilt vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bei grob fehlerhaftem Umgang (Anrühren der Produkte und mehrstündiges Stehenlassen bei Raumtemperatur) durchaus Keimgehalte erreicht werden, bei denen nach GRANUM & LUND (1997) Lebensmittel als nicht unbedenklich zum Verzehr eingestuft werden ( $> 10^3$  KBE *B. cereus*/g). Auch wenn bei sachgemäßer Zubereitung und Behandlung keine oder nur eine geringe Gesundheitsgefährdung von den Trockenmilcherzeugnissen für den normalen Verbraucher auszugehen scheint, wäre eine rechtliche Regelung anhand von Grenzwerten für *B. cereus* in Trockenmilcherzeugnissen für bestimmte sensible Konsumentengruppen, ähnlich der rechtlichen Regelung für getrocknete Säuglingsnahrungsmittel (VO (EG) Nr. 1441/2007), unter Umständen sinnvoll. Im Hinblick auf das Gefährdungspotential durch andere aerobe Sporenbildner in Trockenmilcherzeugnissen würden weitere Studien (mit mehr zu untersuchenden Isolaten sowie DNA-basierten Speziesdiagnosen) aufschlussreich und einer spezifischen Risikoerörterung dienlich sein.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden im Jahr 2007 insgesamt 105 Trockenmilcherzeugnisse von 46 verschiedenen Herstellern in Angebotsform im deutschen Lebensmitteleinzelhandel erworben und auf das Vorhandensein von als allgemeinen Hygieneindikatoren dienenden Parametern (*Enterobacteriaceae*, aerobe mesophile Keimzahl) sowie auf pathogene bzw. potentiell toxinogene Mikroorganismen (*Enterobacter sakazakii*, präsumtive *B. cereus* bzw. aerobe Sporenbildner) untersucht. Weiterhin wurden verschiedene Isolate von *B. cereus* sowie sonstigen aeroben Sporenbildnern anhand eines GLISA Tests stichprobenartig auf die Bildung von *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten überprüft; fünf Produkte wurden exemplarisch auf die Vermehrung der Keimgehalte bei haushaltsüblicher Zubereitung und Behandlung untersucht. Die Produktpalette umfasste 18 nur aus Milch oder Milcherzeugnissen bestehende Produkte (Gruppe 1: fünf Vollmilchpulver, sieben Magermilchpulver, drei Süßmolkenpulver, zwei Milcheiweiß, ein Molkeneiweiß) sowie 87 aus Milch und Milcherzeugnissen sowie anderen Lebensmitteln zusammengesetzte Produkte (Gruppe 2: zehn Getränkepulver mit Milch- und Früchterzeugnissen, ein Getränkepulver mit Malz, 37 Getränkepulver mit Kaffee, zwei Kaffeeersatzextrakte, 18 Pulvernahrungen, elf Eiweißkonzentrate, drei diätetische Lebensmittel, vier diätetische Nahrungsergänzungen, ein Energy Drink), welche überwiegend in Deutschland hergestellt wurden.

*Enterobacteriaceae* konnten in 13 Proben (12 %) in 10 g nachgewiesen werden, hierbei waren nur Produkte der Gruppe 2 betroffen. Das Spektrum an *Enterobacteriaceae*-Spezies (15 verschiedene Arten) ähnelte vergleichbaren Untersuchungen an diversen Milchprodukten, wobei keine obligat pathogenen Spezies isoliert wurden. Am häufigsten konnte *Enterobacter cloacae* (sechs Isolate) nachgewiesen werden. *Enterobacter sakazakii* wurde in einer Pulvernahrung nachgewiesen.

In 89 Proben (85 %) wurden aerobe Sporenbildner nachgewiesen; das Spektrum der isolierten *Bacillus* spp. deckte sich, ebenso wie das häufigere Auftreten von *B. licheniformis* im Vergleich zu anderen Spezies, weitestgehend mit ähnlichen Untersuchungen an diversen Milchprodukten. Produkte der Gruppe 2 waren häufiger (78 %) mit sonstigen aeroben Sporenbildnern kontaminiert als Produkte der Gruppe 1 (50 %).

Die Höhe der ermittelten Keimbelastung war mit  $5 \times 10^0$  bis  $3,7 \times 10^3$  KbE/g insgesamt gering, zumal nur zwei Proben (ein Getränkepulver mit Kaffee, eine Pulvernahrung) Werte von  $> 10^3$  KbE/g aufwiesen (jeweils *B. licheniformis*). Ebenso war die Vorkommenshäufigkeit einzelner isolierter Spezies vergleichsweise gering (*B. licheniformis* in 51 % der Proben nachweisbar, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. mycoides*, *B. firmus* in 1 bis 3 % der Proben).

*B. cereus* konnte aus insgesamt 50 Proben (48 %) isoliert werden, wobei die Verteilung innerhalb beider Gruppen sehr ähnlich war. Die Keimzahlen waren mit  $5 \times 10^0$  bis  $9 \times 10^1$  KbE/g eher gering. *B. cereus* war in den Produkten zumeist in Kombination mit anderen aeroben Sporenbildnern nachweisbar.

Die Untersuchung auf *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten ergab bei 26 von 30 untersuchten *B. cereus*-Isolaten (87 %) ein positives Ergebnis. Hierbei konnten bei 21 Isolaten (70 %) nur Nhe-, bei fünf Isolaten (17 %) Nhe- und Hbl-Komponenten nachgewiesen werden. Bezüglich der Ausbildung von Hbl-Komponenten lagen die Ergebnisse unter denen vergleichbarer Studien. Desweiteren wurde bei vier von 30 untersuchten *B. licheniformis*-Isolaten (13 %), zwei *B. mycoides*-Isolaten sowie einem *B. firmus*-Isolat Nhe-Komponentenbildung nachgewiesen; ein *B. mycoides*-Isolat wies zudem Hbl-Komponentenbildung auf. Bei den ebenfalls untersuchten Isolaten von *B. subtilis* (n = 3), *B. pumilus* (n = 2) und *B. circulans* (n = 1) konnten keine *B. cereus*-Enterotoxinkomponenten detektiert werden.

Die Höhe der ermittelten aeroben mesophilen Keimzahl lag bei 30 Proben (29 %) unter  $10^2$  KbE/g, bei 60 Proben (57 %) zwischen  $10^2$  und  $10^3$  KbE/g und bei zwölf Proben (11 %) bei über  $10^3$  KbE/g. Nur drei Proben (3 %) wiesen eine aerobe mesophile Keimzahl von  $> 10^4$  KbE/g auf, wobei der Maximalwert  $2,2 \times 10^4$  KbE/g betrug. Die Verteilung innerhalb beider Gruppen war relativ ähnlich, wobei Produkte der Gruppe 2 häufiger Keimzahlen im Bereich von  $10^2$  bis  $10^3$  KbE/g aufwiesen. Nach Produktgruppen betrachtet wiesen nur drei Gruppen (Süßmolkenpulver, diätetische Lebensmittel, diätetische Nahrungsergänzungen) eine mittlere Keimzahl von  $> 10^3$  KbE/g auf.

Bei der Untersuchung zur Vermehrung der Keimgehalte an fünf Trockenmilcherzeugnissen (ein Vollmilchpulver, ein Getränkepulver mit Kaffee, ein Getränkepulver mit Milch- und Fruchterzeugnissen, eine Pulvernahrung, ein Eiweißkonzentrat) mittels Rekonstitution nach Herstellerangaben und Lagerung bei Raumtemperatur war bei zwei Proben (Vollmilchpulver, Eiweißkonzentrat) nach 24 Stunden ein deutlicher Anstieg der aeroben mesophilen Keimzahl ( $6,5 \times 10^3$  bzw.  $1,5 \times 10^3$  KbE/g) und dem Gehalt an *B. cereus* je Gramm ( $6,2 \times 10^4$  bzw.  $1,7 \times 10^3$  KbE/g) zu verzeichnen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen erbrachten, bei insgesamt guter Bewertung aller Proben, eine verhältnismäßig gesehen höhere Belastung von Produkten der Gruppe 2. Insgesamt scheint bei sorgfältigem Umgang im Verbraucherhaushalt das Gesundheitsrisiko durch die hier untersuchte Lebensmittelgruppe eher gering zu sein.

## 7 SUMMARY

This thesis describes studies concerning the microbiological quality of foods based on powdered milk. A total of 105 samples of powdered milk and products thereof, produced by 46 different manufacturers, were purchased from retail shops and specialized shops in Germany. These samples were analysed for indicators of general production hygiene (*Enterobacteriaceae*, total aerobic mesophilic bacteria) and for opportunistic pathogens (*Enterobacter sakazakii*, *B. cereus* and other aerobic spore forming bacteria). Selected isolates of *B. cereus* and other aerobic spore forming bacteria from these samples were tested for production of *B. cereus* enterotoxin components using a GLISA test kit. Finally, the time course (increase of colony forming units, cfu) of aerobic mesophilic bacteria and of *B. cereus* after reconstitution and prolonged storage at ambient temperature was studied, using five different products.

The types of food under study included products consisting of plain powdered milk or powdered milk products (group 1, n = 18; whole milk powder, skim milk powder, whey powders, dried milk proteins or dried whey protein), and products which were composed of powdered milk products and other non-milk ingredients (group 2, n = 87; powdered milk+fruit drinks, powdered milk+cereal malt drinks, powdered drinks containing coffee or coffee substitute extracts, special foods intended for use in a weight reduction scheme, protein concentrates, dietary supplements, various functional foods). Most but not all products were produced in Germany.

Presence of *Enterobacteriaceae* in 10 g test portions was detected for 13 samples (12 %), exclusively in samples belonging to group 2. The spectrum of *Enterobacteriaceae*-species identified for isolates from these samples by biochemical assay (API 20E) was regarded as typical for milk products. The most frequently isolated type was *Enterobacter cloacae* (6 isolates), other commonly found species were *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp. and *Serratia* spp. *Enterobacter sakazakii* was isolated from one sample of powdered “weight reduction” formula in 10 g test portion, but not in 3 x 100g test portion after reanalysis.

Aerobic spore forming bacteria (*Bacillus* spp.) were detected in 89 samples (85 %), the spectrum of species was typical for that commonly found in milk products. A species which was frequently isolated was *B. licheniformis*. Products from group 2 were more frequently (78 %) contaminated with aerobic spore forming bacteria (excluding *B. cereus*) than products from group 1 (50 %). The quantitative contamination level was low in most cases, colony counts ranged from  $5 \times 10^0$  to  $3,7 \times 10^3$  cfu/g and only two samples (one powdered coffee drink, one powdered “weight reduction” formula) had  $> 10^3$  cfu/g (*B. licheniformis* in each case).

*B. licheniformis* was the predominant *Bacillus* species and was detected in 51 % of the samples, followed by *B. cereus* (48 %). Other species were occasionally (1-3 %) found in these samples, namely *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. mycooides* and *B. firmus*.

*B. cereus* was found with similar frequency throughout all products under study. Although this species was found with high frequency, the number of bacteria was typically very low ( $5 \times 10^0$  to  $9 \times 10^1$  cfu/g), similar as reported in other studies. *B. cereus* positive samples typically contained other *Bacillus* species.

When production of *B. cereus* enterotoxin components was tested, most isolates were clearly positive (26/30; 87 %) or weakly positive (3/30; 10 %) for Nhe components. Five isolates (17 %) were additionally positive for Hbl components. The Nhe-positive results were also obtained for 4/30 isolates of *B. licheniformis* isolates (13 %), 1/2 isolates of *B. mycooides* and for 1/1 *B. firmus* isolate. One isolate of *B. mycooides* was positive both for Nhe and Hbl. Other *Bacillus* spp., including *B. subtilis* (n = 3), *B. pumilus* (n = 2) and *B. circulans* (n = 1) were tested negative both for Nhe and Hbl, respectively.

The number of aerobic mesophilic bacteria was below  $10^2$  cfu/g in 30 samples (29 %), between  $10^2$  and  $10^3$  cfu/g in 60 samples (57 %), and  $> 10^3$  cfu/g in twelve samples (11 %). Only three samples (3 %) had  $> 10^4$  cfu/g, the maximum value was  $2,2 \times 10^4$  cfu/g. The findings concerning aerobic mesophilic bacteria were similar for both food groups, although samples from group 2 more often had total bacteria numbers in a range from  $10^2$  to  $10^3$  cfu/g. With regard to the different kinds of products only three groups (sweet whey powder, dietary foods and dietary supplements) yielded average numbers of total bacteria of  $> 10^3$  cfu/g.

The time course of the increase of total bacteria after reconstitution and storage at ambient temperature was studied in five selected samples, each one whole milk powder, powdered coffee drink, powdered milk+fruit drink, powdered weight reduction formula, and protein concentrate). Elevated total numbers of aerobic mesophilic colony count and *B. cereus* colony count were observed in two products after 24 hours, but the organoleptic properties of these products were also deteriorated strongly.

In conclusion the results of the study show that the overall microbiological quality of these products was good. A slightly higher frequency and levels of bacteria from all parameters studied was found for products belonging to group 2. If prolonged storage after reconstitution is avoided, the inherent health risks concerning the parameters under study in powdered milk products seem to be minimal.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

### Zitierte Rechtsvorschriften sowie eingesetzte Untersuchungsnormen:

Verordnung über Milcherzeugnisse (Milcherzeugnisverordnung-MilchErzV)

vom 15. Juli 1970:

Bundesgesetzblatt Teil I, S. 1150; zuletzt geändert durch die Verordnung vom 21. Dezember 2007 (Bundesgesetzblatt Teil I, S. 3282)

Verordnung über diätetische Lebensmittel (DiätV) vom 20. Juni 1963:

Diätverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 28. April 2005, Bundesgesetzblatt Teil I, S. 1161; zuletzt geändert durch Artikel 5 der Verordnung vom 30. Januar 2008 (Bundesgesetzblatt Teil I, S. 132)

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene:

Amtsblatt der Europäischen Union, **L 139**, S. 1-54; zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1019/2008 der Kommission vom 17. Oktober 2008 (Amtsblatt der Europäischen Union, **L 277**, S. 7)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs: Amtsblatt der Europäischen Union, **L 139**, S. 55-205; zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1020/2008 der Kommission vom 17. Oktober 2008 (Amtsblatt der Europäischen Union, **L 277**, S. 8-14)

Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel: Amtsblatt der Europäischen Union, **L 322**, S. 12-29

Gesetz zur Neuordnung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts vom 01. September 2005,  
Artikel 1: Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und  
Futtermittelgesetzbuch; LFGB):  
Bundesgesetzblatt Teil I, S. 2618-2669

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges  
Tabakgesetz, § 28b GenTG - I – Lebensmittel.

Band I (L) - Verfahren zur Probennahme und Untersuchung von Lebensmitteln – Grundwerk.  
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Hrsg.),  
Beuth Verlag GmbH, Berlin

Methode L 01.00-57: „Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten -  
Spatelverfahren“

Methode L 01.00-72: „Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und  
Milchprodukte – Teil 1: Koloniezählverfahren bei 37°C“

Methode L 02.07-1: „Vorbereitung der Proben für mikrobiologische  
Untersuchungen – Verfahren für Trockenmilcherzeugnisse“

DIN EN ISO/TS 22964: 2006

„Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*“

International Organization for Standardization, Genf

DIN EN ISO 21528-1: 2004

„Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and  
enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 1: Detection and Enumeration by MPN technique  
with pre-enrichment“

International Organization for Standardization, Genf

ACUMEDIA (2008):

Violet Red Bile Glucose Agar (7425).

[http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7425\\_PI.pdf](http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7425_PI.pdf) (Stand: 09.12.2009)

AGATA, N., M. MORI, M. OHTA, S. SUWAN, I. OHTANI, M. ISOBE (1994):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells.

FEMS Microbiology Letters **121**, 31-34

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI, M. ISOBE (1995):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiology Letters **129**, 17-20

AGATA, N., M. OHTA, M. MORI, K. SHIBAYAMA (1999):

Growth conditions of and emetic toxin production by *Bacillus cereus* in a defined medium with amino acids.

Microbiology and Immunology **43**, 15-18

AGATA, N., M. OHTA, K. YOKOYAMA (2002):

Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods.

International Journal of Food Microbiology **73**, 23-27

ANONYM (1915):

The bacteriology of condensed milk and milk powders.

The Lancet **185**, 385

ANONYM (2004a):

Bacteria Associated with Foodborne Diseases.

Institute of Food Technologists, 1-21

ANONYM (2004b):

Background information on *Enterobacter sakazakii*.

[http://www.ifm.net/issues/esakazakii\\_background.htm](http://www.ifm.net/issues/esakazakii_background.htm) (Stand: 9.12.2009)

ANONYM (2007a):

*Enterobacter sakazakii*: Rückruf von Säuglingsmilchnahrung.

Newsletter Food & Hygiene **07/07**, 2

ANONYM (2007b):

*Enterobacter sakazakii* - Ursache für den Rückruf von Babynahrungen.

Newsletter Food & Hygiene **08/07**, 11-13

ANONYM (2008):

Voll- und Magermilchpulver.

<http://www.alp.admin.ch/themen/00625/00694/01232/index.html?lang=de>

(Stand: 9.12.2009)

ANONYM (ohne Jahr):

Bund/Länder-Arbeitsgruppe "ADV in der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung". ADV-Kodierkataloge für die Übermittlung von Daten aus der amtlichen Lebensmittel- und Veterinärüberwachung sowie dem Lebensmittel-Monitoring. Katalog Nr. 3: Matrixkodex.

ARAGON-ALEGRO, L.C., G.V. LOPES, G. PALCICH, M. LANDRAF, M.T. DESTRO (2007):

Enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* strains from food origin.

International Association of Food Protection's 94th Annual Meeting, Lake Buena Vista, Florida, July 8-11, 2007, Program and Abstract Book p.235

ARKU, B., N. MULLANE, E. FOX, S. FANNING, K. JORDAN (2008):

*Enterobacter sakazakii* survives spray drying.

International Journal of Dairy Technology **61**, 102-108

ASAO, T., Y. KUMEDA, T. KAWAI, T. SHIBATA, H. ODA, K. HARUKI, H. NAKAZAWA, S. KOZAKI (2003):

An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk.

Epidemiology and Infection **130**, 33-40

BANYKÓ, J., M. VYLETÉLOVÁ (2009):

Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt.

Letters in Applied Microbiology **48**, 318-323

BEATTIE, S.H., A.G. WILLIAMS (1999):

Detection of toxinogenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay.

Letters in Applied Microbiology **28**, 221-225

BECKER, H., G. SCHALLER, W. VON WIESE, G. TERPLAN (1994):

*Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products.

International Journal of Food Microbiology **23**, 1-15

BEECHER, D.J., J.D. MACMILLAN (1991):

Characterization of the components of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*.

Infection and Immunity **59**, 1778-1784

- BEECHER, D.J., A.C.L. WONG (1994):  
Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin immunoassay kits.  
*Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4614-4616
- BEECHER, D.J., J.L. SCHOENI, A.C.L. WONG (1995):  
Enterotoxic activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*.  
*Infection and Immunity* **63**, 4423-4428
- BEECHER, D.J., A.C.L. WONG (1997):  
Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*.  
*The Journal of biological chemistry* **272**, 233-239
- BFR (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG) (2008):  
Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2006.  
In: HARTUNG, M. (Hrsg.), BfR Wissenschaft 04/2008, BfR-Hausdruckerei Dahlem, Berlin
- BOWEN, A.B., C.R. BRADEN (2006):  
Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants.  
*Emerging Infectious Diseases* **12**, 1185-1189
- BREEUWER, P., M. LARDEAU, M. PETERZ, H.M. JOOSTEN (2003):  
Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*.  
*Journal of Applied Microbiology* **95**, 967-973
- BRENNER, D.J., J.J. FARMER III (2005):  
Family I. *Enterobacteriaceae*.  
In: BRENNER, D. J., N. R. KRIEG and J. T. STALEY (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria*, Springer, New York
- CELESTINO, E.L., M. IYER, H. ROGINSKI (1997):  
The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods.  
*International Dairy Journal* **7**, 119-127
- CHEN, L., T. COOLBEAR, R.M. DANIEL (2004):  
Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines.  
*International Dairy Journal* **14**, 495-504

CLAUS, D., R.C.W. BERKELEY (1986):

Genus *Bacillus* Cohn.

In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE and J. G. HOLT (Hrsg.),

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **Vol. 2**, S. 1105-1129

Williams & Wilkins, Baltimore

CLAVEL, T., F. CARLIN, D. LAIRON, C. NGUYEN-THE, P. SCHMITT (2004):

Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach.

Journal of Applied Microbiology **97**, 214-219

COOREVITS, A., V. DE JONGHE, J. VANDROEMME, R. REEKMANS, J. HEYRMAN, W. MESSENS, P. DE VOS, M. HEYNDRICKX (2008):

Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms.

Systematic and Applied Microbiology **31**, 126-140

COSENTINO, S., A.F. MULARGIA, B. PISANO, P. TUVERI, F. PALMAS (1997):

Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products.

International Journal of Food Microbiology **38**, 235-238

COUSIN, M.A. (1982):

Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review.

Journal of Food Protection **45**, 172-207

CRIELLY, E.M., N.A. LOGAN, A. ANDERTON (1994):

Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products.

Journal of Applied Bacteriology **77**, 256-263

DAUERER, J. (2008a):

Coliforme Bakterien.

<http://www.fak-hauswirtschaft.de> (Stand: 9.12.2009)

DAUERER, J. (2008b):

*Bacillus*.

<http://www.fak-hauswirtschaft.de> (Stand: 9.12.2009)

DIERICK, K., E. VAN COILLIE, I. SWIECICKA, G. MEYFROIDT, H. DEVLIEGER, A. MEULEMANS, G. HOEDEMAEKERS, L. FOURIE, M. HEYNDRICKX, J. MAHILLON (2005):

Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning.

Journal of Clinical Microbiology **43**, 4277-4279

DIETRICH, R., M. MORAVEK, C. BUERK, P.E. GRANUM, E. MÄRTLBAUER (2005):  
Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex.  
Applied and Environmental Microbiology **71**, 8214-8220

DROBNIEWSKI, F.A. (1993):  
*Bacillus cereus* and related species.  
Clinical Microbiology Reviews **6**, 324-338

DUNCAN, S.E. (1998):  
Dairy products: The next generation. Altering the image of dairy products through technology.  
Journal of Dairy Science **81**, 877-883

EARLY, R. (Hrsg.) (1998):  
Milk powders.  
The technology of dairy products, **2nd edition**, S. 251-300  
Blackie Academic & Professional, London

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2005):  
Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs.  
The EFSA Journal **175**, 1-48

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2006):  
The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005.  
The EFSA Journal **94**, 212-288

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2009):  
The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007.  
The EFSA Journal **271**, 1-102

EHLING-SCHULZ, M., M. FRICKER, S. SCHERER (2004):  
*Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness.  
Molecular Nutrition & Food Research **48**, 479-487

FAGERLUND, A., T. LINDBÄCK, A.K. STORSET, P.E. GRANUM, S.P. HARDY (2008):  
*Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia.  
Microbiology **154**, 693-704

FARMER, J.J., M.A. ASBURY, F.W. HICKMAN, D.J. BRENNER,  
THE *ENTEROBACTERIACEAE* STUDY GROUP (1980):

*Enterobacter sakazakii*: A new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens.

International Journal of Systematic Bacteriology **30**, 569-584

FARMER, J.J., T. KELLEY (1991):

*Enterobacteriaceae*.

In: BALOWS, A. (Hrsg.), Manual of Clinical Microbiology, **5. edition**, S. 360-383

American Society for Microbiology, Washington, D.C

FEHLHABER, K., J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.) (2005a):

Markerorganismen.

Handbuch Lebensmittelhygiene,

Behr's Verlag, Hamburg

FEHLHABER, K., J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.) (2005b):

Milcherzeugnisse.

Handbuch Lebensmittelhygiene,

Behr's Verlag, Hamburg

FEHLHABER, K., J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.) (2005c):

Lebensmittelinfektionen, Zoonosen, Lebensmittelintoxikationen.

Handbuch Lebensmittelhygiene,

Behr's Verlag, Hamburg

FEHLHABER, K., J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.) (2005d):

Grampositive Bakterien.

Handbuch Lebensmittelhygiene,

Behr's Verlag, Hamburg

FINLAY, W.J.J., N.A. LOGAN, A.D. SUTHERLAND (2000):

*Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures.

Letters in Applied Microbiology **31**, 385-389

FOLTYS, V., K. KIRCHNEROVÁ (2006):

Mesophilic and psychrotrophic aerobic sporulating microorganisms in raw cow's milk.

Central European Journal of Biology **4**, 545-560

FRIEDEMANN, F. (2008):

Gesundheitliches Gefährdungspotenzial von *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp. nov.) in Säuglingsnahrung.

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz **51**, 664-674

- FRITZE, D. (2004):  
Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria.  
*Phytopathology* **94**, 1245-1248
- FROM, C., R. PUKALL, P. SCHUMANN, V. HORMAZÁBAL, P.E. GRANUM (2005):  
Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group.  
*Applied and Environmental Microbiology* **71**, 1178-1183
- GORDON, R.E., W.C. HAYNES, C.H.-N. PANG (Hrsg.) (1973):  
The genus *Bacillus*.  
U.S. Department of agricultural handbook no. 427. U.S. Department of Agriculture,  
Washington, D.C.
- GRANUM, P.E., S. BRYNESTAD, K. O'SULLIVAN, H. NISSEN (1993):  
Enterotoxin from *Bacillus cereus*: production and biochemical characterization.  
*Netherlands Milk Dairy Journal* **47**, 63-70
- GRANUM, P.E. (1994):  
*Bacillus cereus* and its toxins.  
*Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement* **76**, 61-66
- GRANUM, P.E., T. LUND (1997):  
*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.  
*FEMS Microbiology Letters* **157**, 223-228
- GRANUM, P.E., K. O'SULLIVAN, T. LUND (1999):  
The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*.  
*FEMS Microbiology Letters* **177**, 225-229
- GRAVERT, H.O. (Hrsg.) (1983):  
Milch und Milchprodukte.  
Die Milch - Erzeugung, Gewinnung, Qualität, S. 46-55  
Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart
- GRIFFITHS, M.W., J.D. PHILLIPS, I.G. WEST, A.W.M. SWEETSUR, D.D. MUIR (1988):  
The quality of skim-milk powder produced from raw milk stored at 2°C.  
*Food Microbiology* **5**, 89-96
- GUINEBRETIERE, M.-H., F.L. THOMPSON, A. SOROKIN, P. NORMAND,  
P. DAWYNDT, M. EHLING-SCHULZ, B. SVENSSON, V. SANCHIS, C. NGUYEN-THE,  
M. HEYNDRIKX, P. DE VOS (2008):  
Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group.  
*Environmental Microbiology* **10**, 851-865

- HÄGGBLOM, M.M., C. APETROAIE, M.A. ANDERSSON, M.S. SALKINOJA-SALONEN (2002):  
Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions.  
*Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2479-2483
- HAMMER, P., C. WIEBE, H.-G. WALTE, P. TEUFEL (2001):  
Vorkommen und Eigenschaften von *Bacillus cereus*-Stämmen in einem Milchtrocknungsbetrieb - Risikoerörterung und Qualitätssicherung.  
*Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **53**, 123-146
- HELLER, K.J. (1996):  
Mikrobiologie der Dauermilcherzeugnisse.  
In: WEBER, H. (Hrsg.), *Mikrobiologie der Lebensmittel - Milch und Milchprodukte*, S. 355-374  
Behr's Verlag, Hamburg
- HELMY, Z.A., A. ABD-EL-BAKEY, E.I. MOHAMED (1984):  
Occurrence of *Bacillus cereus* in milk and milk products in Egypt.  
*Zentralblatt Mikrobiologie* **139**, 129-133
- HOLT, J.G. (Hrsg.) (1994a):  
Group 5 - Facultatively anaerobic gram-negative rods.  
*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, **9. edition**, S. 175-252  
Williams & Wilkins, Baltimore
- HOLT, J.G. (Hrsg.) (1994b):  
Group 18 - Endospore-forming gram-positive rods and cocci.  
*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, **9. edition**, S. 559-562  
Williams & Wilkins, Baltimore
- HONG, H.A., L.H. DUC, S.M. CUTTING (2005):  
The use of bacterial spore formers as probiotics.  
*FEMS Microbiology Reviews* **29**, 813-835
- IVERSEN, C., S. FORSYTHE (2003):  
Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula.  
*Trends in Food Science & Technology* **14**, 443-454
- IVERSEN, C., M. LANE, S. FORSYTHE (2004a):  
The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk.  
*Letters in Applied Microbiology* **38**, 378-382

IVERSEN, C., S. FORSYTHE (2004b):

Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products.

Food Microbiology **21**, 771-777

IVERSEN, C., P. DRUGGAN, S. FORSYTHE (2004c):

A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study.

International Journal of Food Microbiology **96**, 133-139

IVERSEN, C., A. LEHNER, N. MULLANE, E. BIDLAS, I. CLEENWERCK, J. MARUGG, S. FANNING, R. STEPHAN, H. JOOSTEN (2007):

The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies I.

BMC Evolutionary Biology **7**, 64-75

JACKSON, S.G., R.B. GOODBRAND, R. AHMED, S. KASATIYA (1995):

*Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation.

Letters in Applied Microbiology **21**, 103-105

KANDHAI, M.C., M.W. REIJ, L.G.M. GORRIS, O. GUILLAUME-GENTIL, M. VAN SCHOTHORST (2004):

Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households.

The Lancet **363**, 39-40

KEIM, P., M. MOCK, J. YOUNG, T.M. KOEHLER (2006):

The international *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis* conference, "Bacillus-ACT05".

Journal of Bacteriology **188**, 3433-3441

KESSLER, H.G. (Hrsg.) (1996):

Trocknen - Instantisieren.

Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie, S. 265-302

Verlag A. Kessler, München

KIELWEIN, G. (Hrsg.) (1994a):

Milch als Überträger von Infektions- und Intoxikationskrankheiten.

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, **3. Auflage**, S. 97-98

Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

- KIELWEIN, G. (Hrsg.) (1994b):  
Beeinflussung von Milch und Erzeugnissen aus Milch durch Mikroben.  
Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, **3. Auflage**, S. 72-96  
Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
- KOTIRANTA, A., K. LOUNATMAA, M. HAAPASALO (2000):  
Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.  
*Microbes and Infection* **2**, 189-198
- KRÄMER, J. (Hrsg.) (2002a):  
Haltbarmachung von Lebensmitteln.  
Lebensmittel-Mikrobiologie, **4. Auflage**, S. 168-170  
Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart
- KRÄMER, J. (Hrsg.) (2002c):  
Lebensmittelvergiftungen.  
Lebensmittel-Mikrobiologie, **4. Auflage**, S. 33-53  
Eugen-Ulmer-Verlag, Stuttgart
- KRÄMER, J. (Hrsg.) (2002d):  
Beeinflussung des Lebensmittelverderbs.  
Lebensmittel-Mikrobiologie, **4. Auflage**, S. 123-138  
Eugen-Ulmer Verlag, Stuttgart,
- KRAMER, J.M., R.J. GILBERT (1989):  
*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species.  
In: DOYLE, M. P. (Hrsg.), Foodborne bacterial pathogens, S. 21-70  
Marcel Dekker, New York
- KURZ, C. (2009):  
Vorkommen und Bedeutung von *Enterobacteriaceae* in Säuglingsfertignahrungsmitteln unter besonderer Berücksichtigung von *Enterobacter sakazakii*.  
Dissertation med. vet., VVB Laufersweiler Verlag, Gießen
- LAI, K.K. (2001):  
*Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults.  
*Medicine* **80**, 113-122
- LECHNER, S., R. MAYR, K.P. FRANCIS, B.M. PRÜß, T. KAPLAN, E. WIEßNER-GUNKEL, G.S.A.B. STEWART, S. SCHERER (1998):  
*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group.  
*International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 1373-1382

- LEHNER, A., R. STEPHAN (2004):  
Microbiological, epidemiological and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*.  
Journal of Food Protection **67**, 2850-2857
- LICARI, J.J., N.N. POTTER (1970):  
*Salmonella* survival during spray drying and subsequent handling of skim milk powder.  
II Effects of drying conditions.  
Journal of Dairy Science **53**, 871-876
- LINDBÄCK, T., A. FAGERLUND, M.S. RODLAND, P.E. GRANUM (2004):  
Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin.  
Microbiology **150**, 3959-3967
- LINDBERG, A.M., A. LJUNGH, S. AHRNE, S. LÖFDAHL, G. MOLIN (1998):  
*Enterobacteriaceae* found in high numbers in fish, minced meat and pasteurised milk or  
cream and the presence of toxin encoding genes.  
International Journal of Food Microbiology **39**, 11-17
- LOVELL, H.R. (1983):  
The microbiology of dried milk powders.  
In: ROBINSON, R. K. (Hrsg.), Dairy Microbiology, **Vol. 1**: The microbiology of milk,  
S. 209-231  
Applied Science Publishers, London, New York
- LUND, T., P.E. GRANUM (1996):  
Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after  
a foodborne outbreak.  
FEMS Microbiology Letters **141**, 151-156
- LUND, T., M.-L. DE BUYSER, P.E. GRANUM (2000):  
A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis.  
Molecular Microbiology **38**, 254-261
- MAHLER, H., A. PASI, J.M. KRAMER, P. SCHULTE, A.C. SCOGING, W. BÄR,  
S. KRÄHENBÜHL (1997):  
Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*.  
The New England Journal of Medicine **336**, 1142-1148
- MCDONOUGH, F.E., R.E. HARGROVE (1968):  
Heat resistance of *Salmonella* in dried milk.  
Journal of Dairy Science **51**, 1587-1591

MCGUIGGAN, J.T.M., D.R. MCCLEERY, A. HANNAN, A. GILMOUR (2002):  
Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores.  
International Journal of Dairy Technology **55**, 100-107

MENESTRINA, G., M. DALLA SERRA, G. PRÉVOST (2001):  
Mode of action of  $\beta$ -barrel pore forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family.  
Toxicon **39**, 1661-1672

MERCK (2008):  
104146 Duopath® Cereus Enterotoxins.  
[http://www.merck-chemicals.com/chemdat/en\\_US/Merck-International-Site/USD/ViewProductDetail-Attachments?CatalogCategoryID=&ProductUUID= oTSb.s1OgJAAAAEYrMApgezry&SelectedDocumentType=TI#ankerTechnicalInfo](http://www.merck-chemicals.com/chemdat/en_US/Merck-International-Site/USD/ViewProductDetail-Attachments?CatalogCategoryID=&ProductUUID= oTSb.s1OgJAAAAEYrMApgezry&SelectedDocumentType=TI#ankerTechnicalInfo)  
(Stand: 9.12.2009)

MIKKOLA, R., N.-E.L. SARIS, P.A. GRIGORIEV, M.A. ANDERSSON, M. SALKINOJA-SALONEN (1999):  
Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide, the emetic toxin of *B. cereus*.  
European Journal of Biochemistry **263**, 112-117

MIKKOLA, R., M. KOLARI, M.A. ANDERSSON, J. HELIN, M. SALKINOJA-SALONEN (2000):  
Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*.  
European Journal of Biochemistry **267**, 4068-4074

MILLER, D.L., J.M. GOEPFERT, C.H. AMUNDSON (1972):  
Survival of *Salmonellae* and *Escherichia coli* during the spray drying of various food products.  
Journal of Food Science **37**, 828-831

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

NAZAROWEC-WHITE, M., J.M. FARBER (1997a):  
Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula.  
Letters in Applied Microbiology **24**, 9-13

NAZAROWEC-WHITE, M., J.M. FARBER (1997b):  
Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula.  
Journal of Food Protection **60**, 226-230

NAZAROWEC-WHITE, M., J.M. FARBER (1997c):

*Enterobacter sakazakii*: a review.

International Journal of Food Microbiology **34**, 103-113

NIEMINEN, T., N. RINTALUOMA, M. ANDERSSON, A.-M. TAIMISTO, T. ALI-VEHMAS, A. SEPPÄLÄ, O. PRIHA, M. SALKINOJA-SALONEN (2007):

Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk.

Veterinary Microbiology **124**, 329-339

NOVAK, J.S., J. CALL, P. TOMASULA, J.B. LUCHANSKY (2005):

An assessment of pasteurization treatment of water, media and milk with respect to *Bacillus* spores.

Journal of Food Protection **68**, 751-757

OLSVIK, O., Y. WASTESON, A. LUND, E. HORNES (1991):

Pathogenic *Escherichia coli* found in food.

International Journal of Food Microbiology **12**, 103-114

OSAILI, T.M., R.R. SHAKER, M.S. AL-HADDAQ, A.A. AL-NABULSI, R.A. HOLLEY (2009):

Heat resistance of *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in milk and special feeding formula.

Journal of Applied Microbiology **107**, 928-935

OXOID (2008):

Brilliance *E.coli*/Coliform Selektive Agar:

[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1046&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1046&c=UK&lang=EN)

Brilliance *Enterobacter sakazakii* Agar (DFI Formulation):

[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1055&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1055&c=UK&lang=EN)

Brilliance *Bacillus cereus* Agar:

[http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1036&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&c=UK&lang=EN)

(Stand: 9.12.2009)

PEDERSEN, P.B., M.E. BJORNVARD, M.D. RASMUSSEN, J.N. PETERSEN (2002):

Cytotoxic potential of industrial strains of *Bacillus* sp.

Regulatory Toxicology and Pharmacology **36**, 155-161

PHELPS, R.J., J.L. MCKILLIP (2002):

Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group.

Applied and Environmental Microbiology **68**, 3147-3151

- RAJKOVIC, A., M. UYTTENDAELE, S.-A. OMBREGT, E. JAASKELAINEN, M. SALKINOJA-SALONEN, J. DEBEVERE (2006):  
Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin.  
Journal of Food Protection **69**, 847-852
- RASKO, D.A., M.R. ALTHERR, C.S. HAN, J. RAVEL (2005):  
Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms.  
FEMS Microbiology Reviews **29**, 303-329
- REYES, J.E., J.M. BASTÍAS, M.R. GUTIÉRREZ, M.D.L.O. RODRÍGUEZ (2007):  
Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean school feeding program.  
Food Microbiology **24**, 1-6
- RONIMUS, R.S., L.E. PARKER, N. TURNER, S. POUDEL, A. RÜCKERT, H.W. MORGAN (2003):  
A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders.  
International Journal of Food Microbiology **85**, 45-61
- ROWAN, N.J., K. DEANS, J.G. ANDERSON, C.G. GEMMELL, I.S. HUNTER, T. CHAITHONG (2001):  
Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae.  
Applied and Environmental Microbiology **67**, 3873-3881
- ROWAN, N.J., G. CALDOW, C.G. GEMMELL, I.S. HUNTER (2003):  
Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections.  
Applied and Environmental Microbiology **69**, 2372-2376
- RÜCKERT, A., R.S. RONIMUS, H.W. MORGAN (2004):  
A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries.  
International Journal of Food Microbiology **96**, 263-272
- SALKINOJA-SALONEN, M.S., R. VUORIO, M.A. ANDERSSON, P. KÄMPFER, M.C. ANDERSSON, T. HONKANEN-BUZALSKI, A.C. SCOGING (1999):  
Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning.  
Applied and Environmental Microbiology **65**, 4637-4645
- SCHMIDT, K. (2001):  
WHO surveillance program for control of foodborne infections and intoxications in Europe.  
FAO/WHO Collaborating Centre for Training and Research in Food Hygiene and Zoonoses,  
Berlin

- SHAHEEN, R., M.A. ANDERSSON, C. APETROAIE, A. SCHULZ, M. EHLING-SCHULZ, V.-M. OLLILAINEN, M.S. SALKINOJA-SALONEN (2006):  
Potential of selected infant food formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide.  
International Journal of Food Microbiology **107**, 287-294
- SHAKER, R., T. OSAILI, W. AL-OMARY, Z. JARADAT, M. AL-ZUBY (2007):  
Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from food and food production environments.  
Food Control **18**, 1241-1245
- SHINAGAWA, K. (1993):  
Serology and characterization of toxigenic *Bacillus cereus*.  
Netherlands Milk Dairy Journal **47**, 89-103
- SHINAGAWA, K., H. KONUMA, H. SEKITA, S. SUGII (1995):  
Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the HEp-2 vacuolation factor (cereulide) produced by *Bacillus cereus*.  
FEMS Microbiology Letters **130**, 87-90
- SHINAGAWA, K., Y. UENO, D. HU, S. UEDA, S. SUGII (1996):  
Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning.  
Japanese Society for Veterinary Science **58**, 1027-1029
- SITHOLE, R., M.R. MCDANIEL, L.M. GODDIK (2006):  
Physicochemical, microbiological, aroma and flavor profile of selected commercial sweet whey powders.  
Journal of Food Science **71**, 157-163
- SLAGHUIS, J., N. KRAUSE, R. DIETRICH, H. BECKER, M. MORAVEK, E. MÄRTLBAUER (2007):  
Evaluation of the Duopath® Cereus Enterotoxins for the rapid detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in food.  
Proceedings of 107th general meeting of the American Society of Microbiology, Toronto, May 21-25, 2007
- SNEATH, P.H.A. (1986):  
Section 13 - Endospore-forming gram-positive rods and cocci.  
In: SNEATH, P. H. A., N. S. MAIR, M. E. SHARPE and J. G. HOLT (Hrsg.),  
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **Vol. 2**, S. 1104-1138  
Williams & Wilkins, Baltimore

SPREER, E. (Hrsg.) (1995):

Dauermilcherzeugnisse; Molke und Molkeverwertung.  
Technologie der Milchverarbeitung, **7. Auflage**, S. 439 - 502  
Behr's Verlag, Hamburg

STENFORS ARNESEN, L.P., A. FAGERLUND, P.E. GRANUM (2008):

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.  
FEMS Microbiology Review **32**, 579-606

SUOMINEN, I., M.A. ANDERSSON, M.C. ANDERSSON, A.-M. HALLAKSELA,  
P. KÄMPFER, F.A. RAINEY, M. SALKINOJA-SALONEN (2001):

Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples.  
Systematic and Applied Microbiology **24**, 267-276

SUTHERLAND, A.D., R. MURDOCH (1994):

Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp.  
International Journal of Food Microbiology **21**, 279-292

SVENSSON, B., A. ENEROTH, J. BRENDHAUG, A. CHRISTIANSSON (1999):

Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR.  
International Dairy Journal **9**, 903-912

SVENSSON, B., A. MONTHÁN, R. SHAHEEN, M.A. ANDERSSON, M. SALKINOJA-SALONEN, A. CHRISTIANSSON (2006):

Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain.  
International Dairy Journal **16**, 740-749

SVENSSON, B., A. MONTHÁN, M.-H. GUINEBRETIERE, C. NGUYEN-THE, A. CHRISTIANSSON (2007):

Toxin production potential and the detection of toxin genes among strains of the *Bacillus cereus* group isolated along the dairy production chain.  
International Dairy Journal **17**, 1201-1208

TAYLOR, J.M.W., A.D. SUTHERLAND, K.E. AIDOO, N.A. LOGAN (2005):

Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*.  
FEMS Microbiology Letters **242**, 313-317

TE GIFFEL, M.C., A. WAGENDORP, A. HERREWEGH, F. DRIEHUIS (2002):

Bacterial spores in silage and raw milk.  
Antonie van Leeuwenhoek **81**, 625-630

- TERNSTRÖM, A., A.M. LINDBERG, G. MOLIN (1993):  
Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*.  
Journal of Applied Bacteriology **75**, 25-34
- TURNBULL, P.C.B., M. KRAMER (1991):  
Chapter 33 - *Bacillus*.  
In: BALOWS, A., W. J. HAUSLER, K. L. HERRMANN, H. D. ISENBERG and H. J. SHADOMY (Hrsg.), Manual of clinical microbiology, **5. edition**, S. 296-303  
American Society for Microbiology, Washington, D.C
- VAN NETTEN, P., A. VAN DE MOOSDIJK, P. VAN HOENSEL, D.A.A. MOSSEL, I. PERALES (1990):  
Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin.  
Journal of Applied Bacteriology **69**, 73-79
- WESSELS, D., P.J. JOOSTE, J.F. MOSTERT (1988):  
Die Voorkoms en betekenis van *Enterobacteriaceae*-Isolate in melk en suiwelprodukte.  
South African Journal of Dairy Science **20**, 23-28
- WHO, FAO (WORLD HEALTH ORGANISATION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONA) (2007):  
Safe preparation, handling and storage of powdered infant formula guidelines.  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif_guidelines.pdf) (Stand: 9.12.2009)
- WIESNER, E., R. RIBBECK (Hrsg.) (2000):  
Lexikon der Veterinärmedizin.  
Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- WIJNANDS, L.M., J.B. DUFRENNE, F.M. ROMBOUTS, P.H. IN'T VELD, F.M. VAN LEUSDEN (2006):  
Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in the Netherlands.  
Journal of Food Protection **69**, 2587-2594
- WONG, H.-C., M.-H. CHANG, J.-Y. FAN (1988):  
Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products.  
Applied and Environmental Microbiology **54**, 699-702
- WÖRNER, G., H. STRECKER, E. WEISSMANN, H. SEILER (2003):  
Die *Enterobacteriaceae*-Flora in einer Molkerei.  
homepage: [www.wzw.tum.de/blm/fml/deutsch/j08mik.pdf](http://www.wzw.tum.de/blm/fml/deutsch/j08mik.pdf) (Stand: 24.09.2009)



## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber danke ich ganz herzlich für die Überlassung dieses Themas, die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit, die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung.

Mein Dank gilt ausserdem allen Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften der Justus-Liebig-Universität Gießen für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre im Institut. Besonders danken möchte ich Frau Cornelia Eichmann, die mich während meiner Promotionszeit nicht nur fachlich mit viel Engagement und Tatkraft unterstützte. Weiterhin danke ich Frau Christa Zeidler für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Angelegenheiten.

Der Firma Merck danke ich für die Überlassung der Duopath® Cereus Enterotoxin Testkits; besonders Herrn Slaghuis möchte ich an dieser Stelle für sein Interesse an dieser Arbeit sowie die Übermittlung hilfreicher Informationen danken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit durch ihre liebevolle Anteilnahme, das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts, ihren Glauben an mich sowie ihre unermüdliche Geduld so wertvoll unterstützten. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir sowohl das Studium als auch die Dissertation überhaupt erst ermöglichten und immer für mich da sind. Ihrer bedingungs- und grenzenlosen Unterstützung in jeglicher Hinsicht verdanke ich nicht nur das Gelingen dieser Arbeit. Danke!

## **ERKLÄRUNG**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5580-6



9 783835 195580 6

© Aga & Miko Materne - Fotolia.com  
© chorboon chiranuparp - Fotolia.com  
© Dimitrije Paunovic - Fotolia.com  
© Sven Hoppe - Fotolia.com