

Aus dem Department für Nutztiere und  
öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien  
(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael HESS)  
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie  
und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin  
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

# ***Bacillus cereus* Gruppe Präsenz und kultureller Nachweis in Lebensmitteln**

**Diplomarbeit**  
zur Erlangung der Würde einer  
**MAGISTRA MEDICINAE VETERINARIAE**  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von  
Christina Raab  
Wien, im April 2021

**Betreuer/in**

Dr. med. vet. Beatrix Steßl

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

**Begutachter/in**

Ao. Univ.-Prof. Dr.med.vet. Peter Paulsen Dipl.ECVPH

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen, Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln

## ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen	
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
Aqua bidest.	<i>Aqua bidestillata</i>
a <sub>w</sub>	Wasseraktivität
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BIOHAZ	Biological Hazards
bzw.	beziehungsweise
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CDC	US Center for Disease Control and Prevention
CIP	Cleaning-in-place
CytK	Zytotoxin K
D-Wert	durchschnittliche dezimale Reduktionszeit
dd-PCR	droplet digital-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonate
<i>E.</i>	<i>Escherischia</i>
EFSA	European Food Safety Authority
EntFM	Entertoxin FM
FDA	US Food and Drug Administration
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
<i>G.</i>	<i>Geobacillus</i>
h	Stunde(n)
HBL	Hämolysin BL
HGT	Horizontaler Gen Transfer
HPLC	High performance liquid chromatography
ISO	Internationale Organisation für Standardisierung
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
kg	Kilogramm
kGy	Kilogray
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MIC	Minimale Hemmkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter

Abkürzungen	
MLEE	Multilocus Enzym Elektrophorese
MLST	Multilocus Sequenz Typisierung
MYP	Mannitol Eigelb Polymyxin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHE	nicht-hämolisierendes Enterotoxin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEMPA	Polymyxin Eigelb Mannitol Bromthymolblau
PES	Peressigsäure
pH	pH-Wert
PC-PLC	phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase
PI-PLC	phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase
PMA	Propidium Monoazid
ppm	parts per million
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RT-PCR	realtime-PCR
S.	<i>Staphylococcus</i>
s. l.	sensu lato
s. s.	sensu stricto
sek	Sekunden
SLB	Sample Loading Buffer
spp.	<i>species pluralis</i>
TBE	Trishydroxymethylaminomethan-Borat-EDTA
Tris HCl	Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
TSA-Y	Trypton-Soja mit 6 % Hefe
UHT	Ultra-Hoch-Temperatur
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
WGS	whole genome sequencing

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Die „klassischen“ <i>B. cereus</i> Gruppe Vertreter ( <i>B. cereus sensu lato</i> ).....	7
Tabelle 2: Weitere Vertreter der <i>B. cereus</i> -Gruppe. ....	12
Tabelle 3: Richt- und Warnwerte (laut der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, DGHM) der laut RASFF-Bericht (siehe Abbildung 3) am stärksten betroffenen Produktkategorien....	19
Tabelle 4: Alternative Nährmedien für den präsumtiven <i>B. cereus</i> Nachweis. ....	21
Tabelle 5: Die sieben phylogenetischen Gruppen von <i>B. cereus</i> (s.l.). ....	25
Tabelle 6: Probenüberblick zum Nachweis von <i>Bacillus cereus</i> (n=64). ....	28
Tabelle 7: Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar Zusammensetzung (pH at 25 °C 7.2 ± 0.2).....	29
Tabelle 8: Zusammensetzung der in dieser Studie eingesetzten chromogenen <i>Bacillus cereus</i> Selektivnährmedien.....	31
Tabelle 9: PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>gyrB</i> PCR nach DZIECIOL et al. (2013). ....	33
Tabelle 10: PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>ces</i> PCR nach EHLING-SCHULZ (2006). ....	34
Tabelle 11: PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>CytK</i> PCR nach EHLING-SCHULZ (2006). ....	34
Tabelle 12: PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>Nhe</i> PCR nach EHLING-SCHULZ (2006). ....	35
Tabelle 13: PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>Hbl</i> PCR nach EHLING-SCHULZ (2006). ....	36
Tabelle 14: PCR (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die <i>panC</i> PCR modifiziert nach GUINEBRÈTIÈRE und NGUYEN-THÉ (2003). ....	36

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anzahl der EFSA gemeldeten <i>B. cereus</i> Intoxikationen zwischen 2006 und 2014. ....	14
Abbildung 2: Prozentualer Anteil von <i>B. cereus</i> -assoziierten Intoxikationen an allen an die EFSA gemeldeten zoonosebedingten Erkrankungen vorhanden. ....	15
Abbildung 3: Prozentuelle Verteilung der in RASFF dokumentierten <i>B. cereus</i> Kontaminationen nach Probenkategorie (Meldungen n=188). ....	16
Abbildung 4: Versuchsaufbau im Rahmen der Diplomarbeit zum Nachweis von präsumtiven <i>Bacillus cereus</i> und <i>Bacillus spp.</i> .....	26
Abbildung 5: <i>GyrB</i> PCR-positive <i>B. cereus</i> Proben (insgesamt n=64) eingeteilt in <i>panC</i> -Gruppen in Kombination mit Toxin Profilen prozentual und numerisch dargestellt. ....	38
Abbildung 6: <i>B. cereus</i> positive Proben (n=64 gesamt) detektiert auf Bacara Agar, CHROMagar, Brilliance Agar, ChromoSelect und Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar dargestellt in Prozenten. ....	39
Abbildung 7: Maximum Likelihood tree der <i>B. cereus panC</i> -Gruppen isoliert aus 64 Proben. ....	41
Abbildung 8: Beispiele typischer präsumtiver <i>B. cereus</i> Kolonien und non-target Begleitflora auf Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar. ....	43
Abbildung 9: Beispiele typischer und atypischer präsumtiver <i>B. cereus</i> Kolonien und Begleitflora auf ChromoSelect und Brilliance Agar. ....	44
Abbildung 10: Beispiele typischer und atypischer präsumtiver <i>B. cereus</i> Kolonien und Begleitflora auf Brilliance Agar und Chromagar. ....	45
Abbildung 11: Beispiele typischer und atypischer präsumtiver <i>B. cereus</i> Kolonien auf <i>B. cereus</i> Rapid Agar .....	46

## Inhalt

1.	EINLEITUNG .....	7
1.1.	<i>BACILLUS CEREUS</i> -GRUPPE und <i>BACILLUS SPP.</i> .....	7
1.2.	<i>BACILLUS CEREUS SENSU LATO</i> VORKOMMEN und AUSBRÜCHE.....	13
1.3.	GESETZLICHE GRUNDLAGEN .....	17
1.4.	NACHWEISMETHODEN und PHYLOGENIE .....	19
1.4.1.	Mikrobiologische Nachweismethoden .....	19
1.4.2.	Molekularbiologische Methoden.....	22
1.4.3.	Toxin Nachweis .....	24
1.4.4.	Phylogenie .....	24
1.5.	ZIEL DER STUDIE .....	26
2.	MATERIAL & METHODEN.....	27
2.1.	GERÄTE UND MATERIALIEN.....	27
2.2.	PROBEN UND PROBENZIEHUNG.....	27
2.3.	MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG .....	29
2.3.1.	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar: Zusammensetzung und Koloniemorphologie von präsumtiven <i>B. cereus</i> .....	29
2.3.2.	Alternative Selektivnährmedien: Zusammensetzung und Wachstum von <i>B. cereus</i> ...	30
2.4.	MOLEKULARBIOLOGISCHE BESTÄTIGUNG UND SUBTYPISIERUNG .....	32
2.4.1.	Isolatsammlung und DNA-Extraktion aus Isolaten mit Chelex .....	32
2.4.2.	PCR-Assays.....	32
2.4.3.	Gelelektrophorese .....	37
3.	RESULTATE .....	37
3.1.	PROBEN .....	37
3.2.	AGAR.....	41
4.	DISKUSSION & KONKLUSION .....	47
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	53
6.	EXTENDED SUMMARY .....	54
7.	LITERATURVERZEICHNIS .....	55
8.	SUPPLEMENTE .....	62

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. *BACILLUS CEREUS*-GRUPPE und *BACILLUS SPP.*

Insgesamt zählen 2289 *Bacillus* Spezies und 85 Subspecies zum Genus *Bacillus* und zum Phylum der *Firmicutes* (<https://www.bacterio.net/>; eingesehen am: 31.03.2021). Die „klassische“ *Bacillus cereus*-Gruppe besteht aus neun Vertretern, die sich phylogenetisch nahestehen. Die Gram-positiven Bazillen mit niedrigem GC-Gehalt haben die Form gerader Stäbchen, die aerob wachsen und Sporen formen können (EHLING-SCHULZ et al., 2019; MESSELHÄUßER und EHLING-SCHULZ, 2014). „*Bacillus*“ kommt aus dem Lateinischen und bedeutet auf Deutsch „Stäbchen“. „*Cereus*“ ebenfalls aus dem Lateinischen heißt „wachsfarben“ (MESSELHÄUßER und EHLING-SCHULZ, 2014). *Bacillus anthracis*, *B. cereus* und *B. thuringiensis* sind für ihr pathogenes Potenzial bekannt (EHLING-SCHULZ et al., 2019).

**Tabelle 1:** Die „klassischen“ *B. cereus* Gruppe Vertreter (*B. cereus sensu lato*).

SPEZIES	ERSTBESCHREIBUNG	RISIKO - GRUPPE	BESONDERHEIT
<i>B. anthracis</i>	Cohn 1872	3	Obligat pathogen
<i>B. mycoides</i>	Flügge 1886	1	Lebensmittelverderbserreger
<i>B. cereus</i>	Frankland and Frankland 1887	2	Fakultativ pathogen
<i>B. thuringiensis</i>	Berliner 1915	1	Insektizides Toxin
<i>B. pseudomycoides</i>	Nakamura 1998	1	Lebensmittelverderbserreger
<i>B. weihenstephanensis</i>	Lechner et al. 1998	2	Lebensmittelverderbserreger
<i>B. toyonensis</i>	Jiménez et al. 2014	1	Futtermittelzusatz
<i>B. cytotoxicus</i>	Guinebretière et al. 2013	2	Lebensmittelbedingte Erkrankung
<i>B. wiedmannii</i>	Miller et al. 2016	2	Erstmals aus Rohmilch isoliert

Quelle: *Bacillus cereus*, Vorkommen, Nachweis und Präventionsstrategien, U. Messelhäuser, M. Ehling-Schulz, 2014, <http://www.bacterio.net/bacillus.html>; eingesehen am 31.03.2021; <https://bacdiv.dsmz.de/>; eingesehen am 31.03.2021 und <https://www.bfr.bund.de/cm/343/bacillus-cereus-bakterien-in-lebensmitteln-koennen-magen-darm-erkrankungen-verursachen.pdf>, zuletzt eingesehen am 31.03.2021.

Gemäß dem ArbeitnehmerInnenschutzgesetz gilt für Mikroorganismen mit Infektionspotenzial eine Einteilung in vier Risikogruppen. Von Mikroorganismen der Risikogruppe 1 geht die geringste Gefahr aus, denn es ist unwahrscheinlich, dass sie beim Menschen keine Krankheit auslösen. In der Risikogruppe 2 findet man Mikroorganismen, die eine Krankheit hervorrufen können, aber eine Vorbeugung bzw. eine Behandlung möglich ist. Ab der dritten Risikogruppe besteht zusätzlich die Gefahr der Verbreitung der Erkrankung in der Bevölkerung.

Die vierte und somit gefährlichste Gruppe besteht aus den Mikroorganismen, die eine schwere Krankheit auslösen und wo keine wirksame Vorbeugung oder Behandlung möglich ist (<https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10008910>; eingesehen am 20.03. 2021).

*B. anthracis* ist am besten bekannt als ursächlicher Auslöser des Milzbrandes. Bereits im späten 19. Jahrhundert kam es zu den ersten Impfversuchen und es war die erste Infektionskrankheit, gegen die man ein attenuiertes Lebendvirus zu Impfung einsetzte. Es kann alle Säugetiere, manche Vögel und womöglich sogar Reptilien infizieren. Am stärksten betroffen sind Zentralasien und westliche Teile Afrikas, sie bilden den sogenannten „Anthrax-Gürtel“. Aber auch in Nordamerika gibt es vor allem bei heißem, trockenem Wetter immer wieder Ausbrüche. Einige Stämme sind sogar schon weltweit zu finden, vor allem durch den starken Personenverkehr und Tierhandel (vor allem Schafe und Ziegen). In einer Studie von CARLSON et al. (2019) wurde mittels Hochrechnung ermittelt, dass rund 63,8 Millionen Viehhalter aus armen ländlichen Regionen und etwa 1,1 Milliarden Vieh in gefährdeten Regionen lebt. Genaue tatsächliche Zahlen sind nicht zugänglich, da viele der betroffenen Länder arm sind und die dortigen Überwachungsprogramme nicht ausreichend sind. Je nach Eintrittspforte können unterschiedliche Formen der Erkrankung entstehen: Haut-, Gastro-intestinale oder Lungen-Form.

Vor allem im Bereich der Milchprodukte stellen *Bacillus cereus* (s. I.) und seine Sporen Probleme dar, da man zwar die Umwelteinflüsse (pH-Wert, Temperatur, Wasseraktivität, Salzgehalt oder andere Zusätze) verändern kann, aber auch Gefahr läuft die vorhandenen Sporen zur Auskeimung zu bringen. Höhere Temperaturen bei der Erhitzung oder andere Anpassungen der Parameter sind bei vielen Produkten wie z. B. Säuglingsnahrung nicht möglich, da sonst auch wichtige Inhaltstoffe verloren gehen können (VIDIC et al., 2020). So können laut dem Ministerium für ländlichen Raum und



Verbraucherschutz von Baden-Württemberg bereits bei der Pasteurisierung der Milch bis zu zehn Prozent von Vitamin B, Vitamin C und Folsäure verloren gehen.

Ein Milchprodukt, das keiner Behandlung wie Mikrofiltration oder Bakofugation vor dem Erhitzungsprozess unterzogen wurde, kann auf Grund der enzymatischen Aktivität (Protease, Lipase oder Amylase) von *B. cereus* (s.l.) verderben. Dabei kommt es zur Süßgerinnung („sweet curdling“) durch die Phospholipase C Aktivität von *B. cereus* (s.l.) oder zur Bildung von Flocken im Rahm wenn er heißen Getränken hinzugefügt wird („bitty cream“) (KRÖMKER, 2006; KUMARI et al. 2014; <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/14149/direct>; eingesehen am: 04.03.2021).

*B. cereus* (*sensu stricto*) Intoxikationen gehen mit zwei Symptomen einher, abhängig vom Toxin, das in dem Lebensmittel vorhanden war:

Erbrechen, ausgelöst vom emetischen *B. cereus* Typ ist meistens assoziiert mit stärkehaltigen Lebensmitteln (wie zum Beispiel Reis oder Nudeln), in denen von *B. cereus* das emetische hitzestabile Toxin Cereulid vor der Verdauung noch im Lebensmittel produziert wird. Die infektiöse Dosis dabei beträgt  $10^5$ - $10^8$  Zellen pro Gramm. Typische Symptome dieser Infektion sind Übelkeit und Erbrechen, die bereits 30 Minuten bis 6 Stunden nach der Aufnahme eintreten und etwa für 6 bis 24 Stunden anhalten (MCDOWELL et al., 2019; ROUZEAU-SZYNALSKI et al., 2020).

Der diarrhoeische Typ (Durchfallkrankheit) ist oft mit proteinreichen Lebensmitteln (wie zum Beispiel Fleisch, Gemüse, Milchprodukte etc.) assoziiert. Vegetative Zellen in den kontaminierten Lebensmitteln produzieren dabei Entertoxine im Dünndarm (e.g. NHE, HBL, CYTK). Ab einer Menge von  $10^5$ - $10^7$  Zellen pro Gramm spricht man von einer infektiösen Dosis. Symptome wie Bauchschmerzen, wässriger Durchfall, Übelkeit und Erbrechen treten bei einer Infektion innerhalb von 8 bis 16 Stunden nach der Aufnahme auf, allerdings verschwinden sie auch wieder nach 12 bis 24 Stunden (ABEE et al., 2011). Das Toxin ist nicht hitzeresistent, bei mindestens 56°C über einen Zeitraum von fünf Minuten wird es inaktiviert (GHARIB et al., 2020; GRIFFITHS und SCHRAFT, 2017).

*B. cereus* kann nicht nur intestinale, sondern auch in selteneren Fällen extraintestinale Erkrankungen auslösen, wie zum Beispiel Endokarditis, Endophthalmitis und Septikämien (GLASSET et al., 2018).

*B. thuringiensis* Berliner wurde 1901 in den Larven der Seidenraupe in Japan zum ersten Mal isoliert. Eine Infektion mit dem Bakterium verursachte bei diesen wertvollen Tieren einen plötzlichen Tod

(„Sudden-collapse disease“). 1977 wurde entdeckt, dass *B. thuringiensis* auch auf Mosquitos, einige Insektenarten und Wirbellose eine tödliche Wirkung hat, daher wird es als Insektizid genutzt. Die verantwortlichen Toxine sind Cry und Cyt, die die für *B. thuringiensis* charakteristischen parasporalen Kristalle bilden (AZIZOGLU, 2019; JOUZANI et al, 2017; MENDOZA-ALMANZA et al., 2020).

*Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* (Bti) wird in Mückenbekämpfungsprogrammen als zielgerichtetes Biozid eingesetzt. Der Einsatz von Bti ist nicht unumstritten, da aquatische und terrestrische Raubtiere Mücken als Nahrungsquelle nutzen, was sich womöglich auf die biologische Vielfalt auswirkt (BRÜHL et al., 2020).

Im Bereich der Lebensmitteluntersuchung ist *B. thuringiensis* und *B. cereus* kaum zu unterscheiden. Als Biopestizid eingesetzte *B. thuringiensis* Stämme zeigten, dass sie unter simulierten Darmbedingungen wachsen und signifikante Mengen an Enterotoxinen produzieren können. Im Zytotoxizitätstests wurde die Mehrheit der Isolate als hochtoxisch eingestuft, dabei waren Biopestizid-Stämme nicht von anderen Isolaten unterscheidbar (SCHWENK et al., 2020).

In einer Studie zeigten die *B. thuringiensis*-Biopestizid-Stämme in einem Vero-Zell-Test eine mittlere Zytotoxizität, wobei einige dieser Stämme nicht von Lebensmittel- oder Ausbruchs- assoziierten Isolaten unterschieden werden konnten. Die Verwendung von *B. thuringiensis*-Stämmen als Biopestizide stellt ein Risiko für die Lebensmittelsicherheit dar, was die Bedeutung der Bewertung des Gefährdungspotenzials jedes verwendeten Stammes und jeder verwendeten Formulierung unterstreicht (JOHLER et al., 2018).

*B. mycooides* und *B. pseudomycooides* sind nicht beweglich und zeigen ein rhizoides Wachstum am Agar. Sie unterscheiden sich somit makroskopisch stark von den anderen Vertretern der *B. cereus* Gruppe. Diese beiden apathogenen Spezies spielen im Bereich des Lebensmittelverderbs eine Rolle (SOUFIANE und COTÉ, 2013).

*B. weihenstephanensis* ist im Gegensatz zu den meisten anderen *B. cereus*-Gruppenmitglieder psychrotolerant und somit in der Lage auch niedrigen Temperaturen bis 4°C, also Kühlschrankschranktemperaturen, stand zu halten. Deshalb spielt er eine wichtige Rolle als Verderbserreger im Bereich von Milch und Milchprodukten. *B. weihenstephanensis* wächst nicht bei 43 °C und besitzt ein cold shock protein A (*cspA*) Gen das die Kälteadaptation steuert. Emetische *B. cereus* (s. s.) Stämme

sind meist mesophil, wachsen nicht unter 10 °C und produzieren Cereulid am besten  $\geq 16$  °C, was zu einer guten Abgrenzung von *B. weihenstephanensis* führt (LABBÉ und GARCIA, 2013).

BENO et al. (2019) beschrieb genetische und phänotypische Unterschiede in der Psychrotoleranz von milchassoziierten *B. mycooides*/*B. weihenstephanensis* Isolaten und zeigte, dass die Psychrotoleranz vom Wachstumsmedium abhängig ist.

Genetisch gesehen ist *B. weihenstephanensis* kaum zu unterscheiden von *B. mycooides* was zu einer fehlerhaften Artbestimmung für mehrere Stämme führte (LIU et al., 2018).

*B. toyonensis* BCT-7112T besitzt probiotische Eigenschaften und wird auch Tierfutter zugesetzt, da es die Wirkung eines Anabolikums besitzt (EHLING-SCHULZ et al., 2019). Dieser ist in der Europäischen Union als Futtermittelzusatzstoff bei Schwein, Rind, Geflügel und Hasen zugelassen. Der *Bacillus cereus*-Vertreter ist für diese Aufgabe besonders geeignet, da seine Sporen längere Lagerung, Pelletierung und sogar den sauren pH-Wert des Magens unbeschadet übersteht (ABDULMAWJOOD et al., 2019).

*B. cytotoxicus* konnte bisher vor allem aus Gemüse und gemüseassoziierten Produkten, wie zum Beispiel Kartoffelpüree, isoliert werden und löste 1998 einen Ausbruch in Frankreich aus (CONTZEN et al., 2014; GUINEBRETIERE et al., 2013). Diese Spezies besitzt die Fähigkeit das Enterotoxin CytK-1 zu bilden (FAGERLUND et al. 2004, 2007).

Aktuell konnte eine Sammlung von *B. cytotoxicus* Isolaten aus geothermalen Gebieten isoliert werden und verfügte über beträchtliche proteolytische und keratinolytische Kapazitäten (CAVELLO et al., 2020).

*B. wiedmannii* wurde erstmals 2016 beschrieben (MILLER et al., 2016). Wie oben beschrieben wurde er aus Rohmilch isoliert und besitzt sowohl *nhe* als auch *hbl* und *cytK* Gene. Seine Zytotoxizität wurde allerdings nur als moderat eingestuft. Einige Isolate von *B. wiedmannii* (phylogenetische Gruppe II) zeigten die Fähigkeit bei 6°C zu wachsen wie es zuvor nur für *B. mycooides*/*B. weihenstephanensis* (Gruppe VI) beschrieben wurde (MILLER et al., 2018a).

Ein Vergleich von *B. cereus* (*s. l.*) isoliert aus Erde zeigte, dass die Gene *nheA* und *hblA* in allen phylogenetischen Gruppen vorhanden waren. Im Gegensatz dazu, wurde das *cytK* Gen in *B. cereus* (*s.*

l.) Stämmen aus geographischen Regionen mit trockenem Klima isoliert und wurde der mesophilen genetischen Gruppe III und IV zugeordnet. Die höchste *in vitro* Zytotoxizität wurde in der genetischen Gruppen II und IV beobachtet (DREWNOWSKA et al., 2020).

MILLER et al. (2018b) untersuchte die Zytotoxizität von Isolaten aus Milch. *B. pseudomycooides* (genetische Klade I), der als harmloser Umweltmikroorganismus gilt, produzierte Toxine in der Zellkultur. *B. mycooides*/*B. weihenstephanensis*-Isolate wiesen, trotz der Präsenz von multiplen Toxingenen, keine Zytotoxizität auf. Weiterhin sind neue Methoden zur Unterscheidung pathogener von nicht-pathogenen Spezies innerhalb der *B. cereus* Gruppe dringend gesucht. Im weiteren Sinne umfasst die *B. cereus*-Gruppe 22 Mitglieder, inklusive der „klassischen Vertreter“, die bereits in Tabelle 1 dargestellt wurden. Die weiteren 13 Mitglieder werden in Tabelle 2 beschrieben.

**Tabelle 2:** Weitere Vertreter der *B. cereus*-Gruppe.

BACILLUS CEREUS GROUP	ERSTBESCHREIBUNG	ISOLATIONSQUELLE
<i>Bacillus albus</i>	Liu et al. 2017, sp. nov.	N35-10-2 aus Sedimenten des Südchinesischen Meeres
<i>Bacillus luti</i>	Liu et al. 2017	TD41 aus Sedimenten des Pazifischen Ozeans
<i>Bacillus mobilis</i>	Liu et al. 2017	0711P9-1 aus Sedimenten des Indischen Ozeans
<i>Bacillus nitratireducens</i>	Liu et al. 2017	4049 aus Sedimenten des Pazifischen Ozeans
<i>Bacillus pacificus</i>	Liu et al. 2017	EB422 aus Sedimenten des Pazifischen Ozeans
<i>Bacillus paramycooides</i>	Liu et al. 2017	NH24A2 aus Sedimenten des Südchinesischen Meeres
<i>Bacillus paranthracis</i>	Liu et al. 2017	Mn5 aus Sedimenten des Pazifischen Ozeans
<i>Bacillus proteolyticus</i>	Liu et al. 2017	TD42 aus Sedimenten des Pazifischen Ozeans
<i>Bacillus tropicus</i>	Liu et al. 2017	N24 aus Sedimenten des Südchinesischen Meeres
<i>Bacillus clarus</i>	Liu et al. 2019	Erde (Papua Neuguinea)
<i>Bacillus gaemokensis</i>	Jung et al. 2010	
<i>Bacillus bingmayonensis</i>	Liu et al. 2014	
<i>Bacillus maliponensis</i>	Jung et al. 2011	

Quelle: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>, <https://bacdive.dsmz.de/>; eingesehen am 04.03. 2021, LIU et al. 2017.

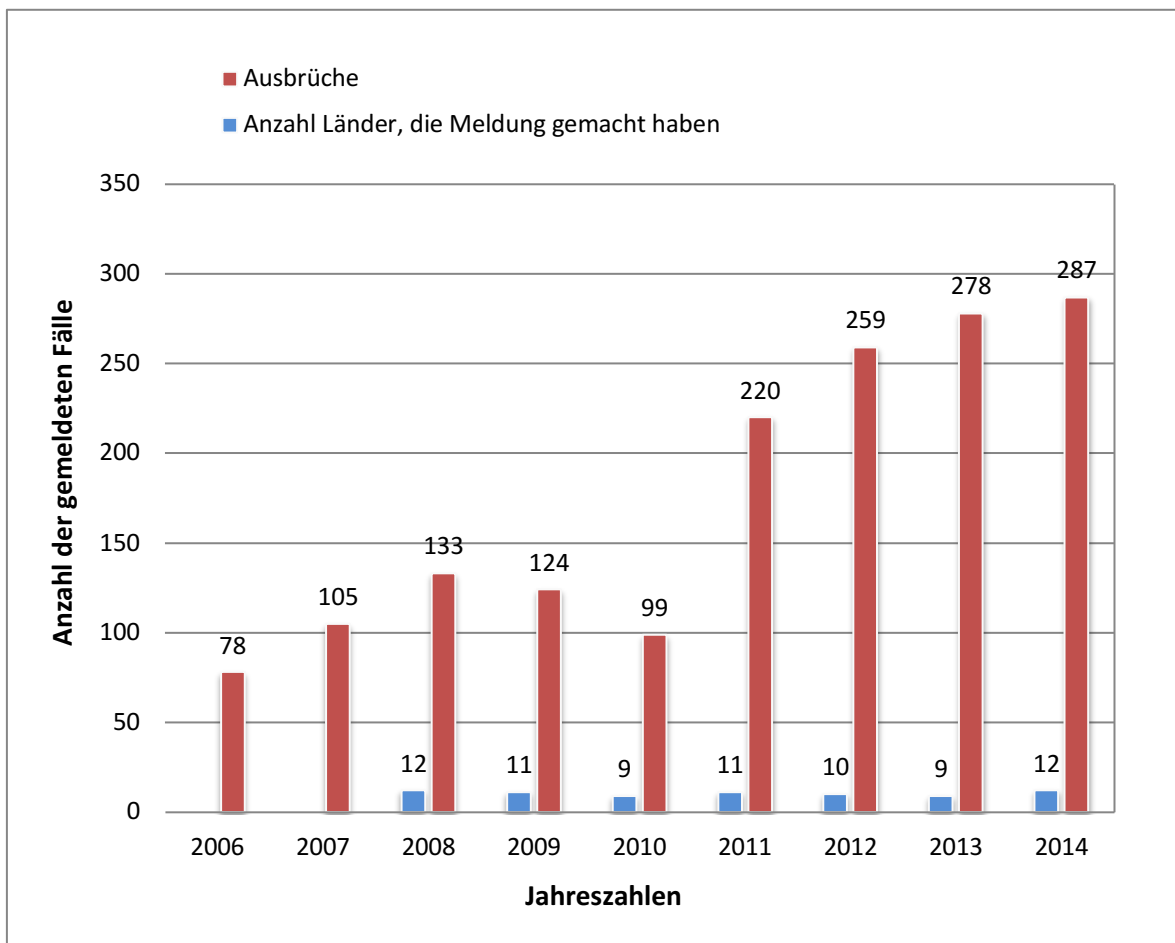
*B. albus*, *B. luti*, *B. mobilis*, *B. nitratireducens*, *B. pacificus*, *B. paramycoides*, *B. paranthracis*, *B. proteolyticus* und *B. tropicus* sind nur schwer von einander unterscheidbar. Eine gesamte Genomsequenzierung ist notwendig, um die Nukleotidabweichungen festzustellen und somit die Spezies zu identifizieren (LIU et al. 2017; <https://www.bfr.bund.de/cm/343/bacillus-cereus-bakterien-in-lebensmitteln-koennen-magen-darm-erkrankungen-verursachen.pdf>; eingesehen am: 04.03.2021).

## **1.2. BACILLUS CEREUS SENSU LATO VORKOMMEN und AUSBRÜCHE**

Die *B. cereus* Gruppe (oder *B. cereus sensu lato*) ist heterogen in der Zusammensetzung und wurde phylogenetisch in sieben Gruppen („Clades“) eingeteilt. Besonders die optimalen Wachstumsbedingungen der einzelnen Vertreter waren entscheidend in der Clusterbildung (psychrotroph bis thermophil). *Bacillus cereus sensu lato* ist besonders adaptionsfähig an verschiedene Klimabedingungen und stellt dadurch eine Herausforderung an die Erhaltung der Lebensmittelsicherheit dar (CARLIN et al., 2010). Die meisten Unterschiede in der *B. cereus* Gruppe hängen vom Vorhandensein von großen Plasmiden zusammen, die verschiedene Toxine kodieren. Aber auch Mutation oder Rekombination, sind an der Gestaltung der Evolution und der Populationsstruktur dieser Bakterien beteiligt (PATIÑO-NAVARRETE und SANCHIS, 2017).

Die erste risikobasierte Einschätzung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) zum Thema *B. cereus* und *Bacillus* spp. in Lebensmitteln erschien 2005 (EFSA, 2005). Ab 2006 findet man auch in den jährlichen Zoonose-Berichten eine eigene Rubrik mit Fallzahlen. In Abbildung 1 sind die gemeldeten *B. cereus* Intoxikationen zwischen 2006 und 2014 grafisch dargestellt. Ab 2008 wurde auch die Anzahl der Länder angeführt, in denen die Intoxikationen stattgefunden haben (blaue Balken). Die *B. cereus* Inzidenzrate stieg dabei im Laufe der Jahre von 0,03 auf 0,1 per 100000 capita.

Am Anfang der Berichterstattung (2006) lag der prozentuale Anteil von gemeldeten *B. cereus*-assoziierten Intoxikationen an allen gemeldeten Ausbrüchen nur bei 1,3%. Allerdings stieg er im Laufe der Jahre stetig bis auf 5,5% im Jahre 2014 an (Abbildung 2).



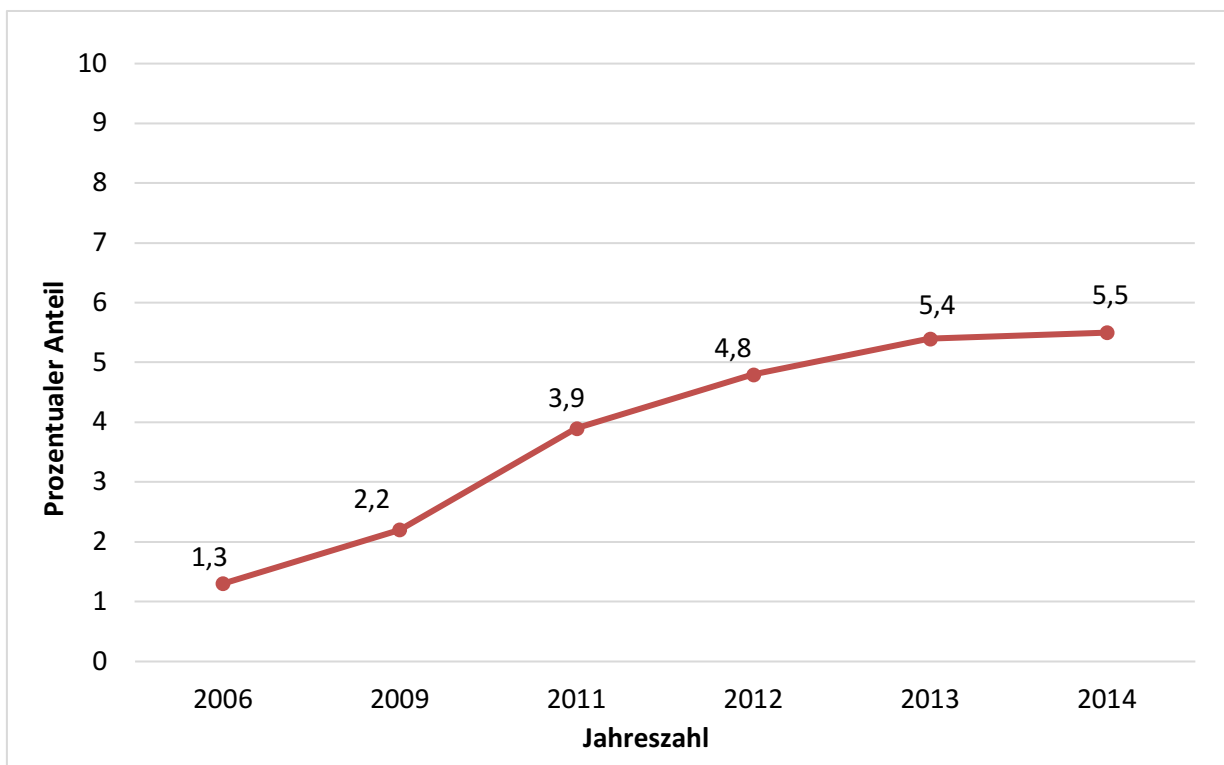
**Abbildung 1:** Anzahl der EFSA gemeldeten *B. cereus* Intoxikationen zwischen 2006 und 2014.

Quelle: EFSA und ECDC 2006 bis 2014, <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/food-and-waterborne-diseases-and-zoonoses/surveillance-and-disease-data/eu-one-health>; eingesehen am 27. 01 2021.

Im Jahr 2015 wurden 291 Ausbrüche, die durch *Bacillus-cereus*-Toxine verursacht wurden, von neun europäischen Mitgliedsstaaten gemeldet. Involvierte Vektoren waren gemischte Fertigprodukte und Getreideprodukte einschließlich Reis und Samen/Hülsenfrüchte (Nüsse, Mandeln). Die Ausbrüche traten in Kantinen, Restaurants, Hotels, Flugzeugen, Schiffen und auch in Privathaushalten auf (EFSA und ECDC, 2016). Ab 2016 wurden durch *Bacillus cereus* ausgelöste Ausbrüche unter dem Begriff „andere bakterielle Toxine als *Clostridium botulinum*“ dokumentiert (EFSA und ECDC, 2017).

Im Jahr 2017 wurden Ausbrüche ausgelöst durch bakterielle Toxine (*B. cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*) von 20 europäischen Mitgliedsstaaten gemeldet, wobei Frankreich die meisten Ausbrüche dokumentierte (EFSA und ECDC, 2018). In dem aktuellen EFSA and ECDC Zoonosebericht wurde insgesamt 12 *B. cereus* assoziierte Ausbrüche dokumentiert, wobei von e. g. *B. cereus*,

*Clostridium botulinum* oder *Clostridium perfringens* produzierte Bakterientoxine für 6 von 40 Todesfällen verantwortlich waren (15 %) (EFSA und ECDC, 2019).

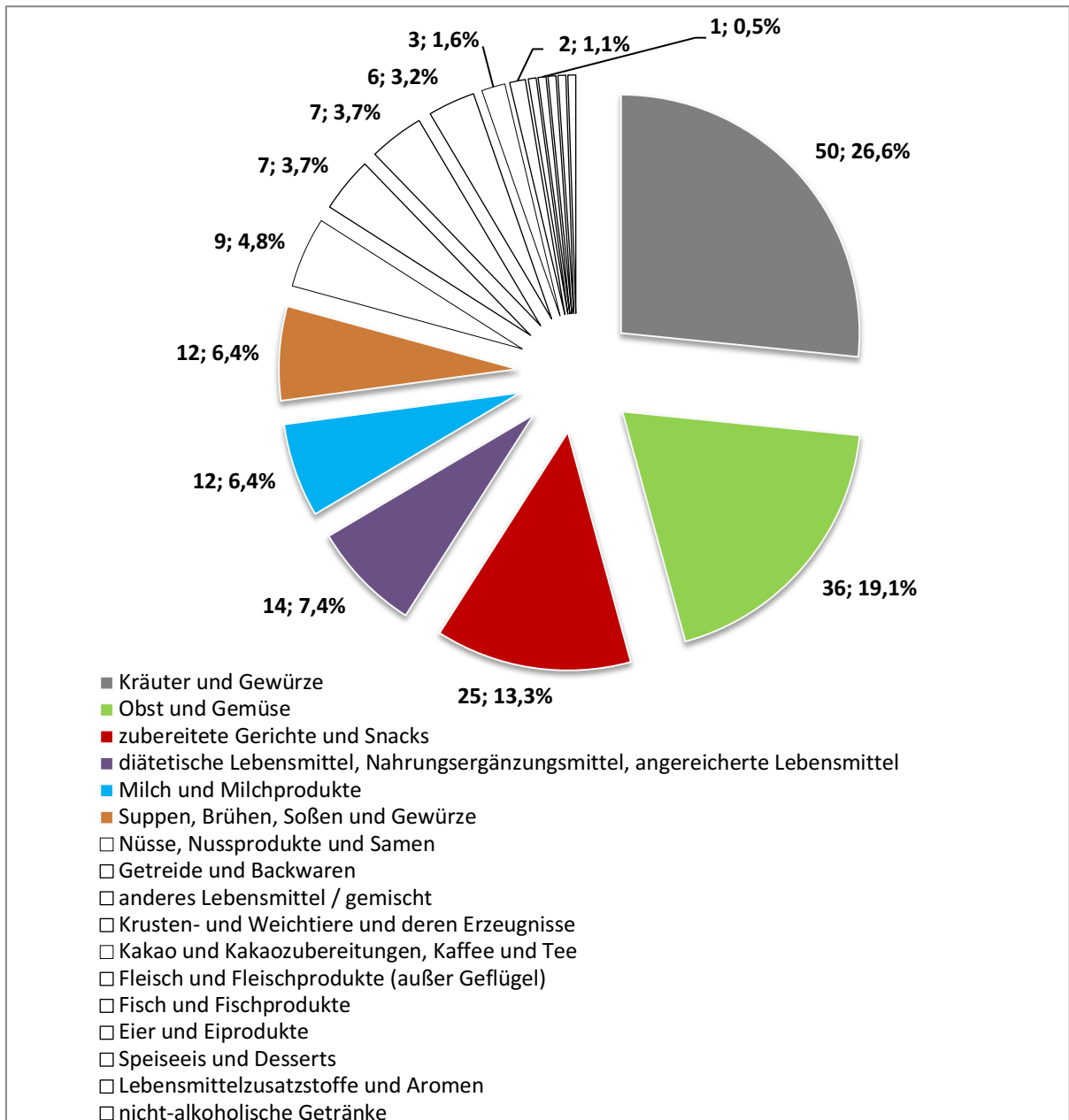


**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil von *B. cereus*-assoziierten Intoxikationen an allen an die EFSA gemeldeten zoonosebedingten Erkrankungen vorhanden.

Quelle: EFSA und ECDC 2006, 2009, 2011-2014, <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/food-and-waterborne-diseases-and-zoonoses/surveillance-and-disease-data/eu-one-health>; eingesehen am 27. 01. 2021.

Das Diagramm (Abbildung 3) zeigt deutlich, dass die meisten Kontaminationen mit *B. cereus*, die an das Europäische Schnellwarnsystem für Lebensmittel und Futtermittel (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) gemeldet werden, aus der Kategorie Kräuter und Gewürze kommen. Von den 188 Meldungen (im Zeitraum von 2010-2020) betrafen diesen Bereich 50 Meldungen und damit 26,6 Prozent aller Meldungen. An zweiter Stelle mit 36 Meldungen liegt der Obst und Gemüse Bereich. Dicht gefolgt von der Kategorie der zubereiteten Gerichte und Snacks. Die weiteren Kategorien wie diätetische Lebensmittel, Nahrungsergänzungsmittel, angereicherte Lebensmittel, Milch und Milchprodukte und Suppen, Brühen, Soßen und Gewürze machen mit 12-14 Meldungen jeweils 6-7 Prozent aller Meldungen beim RASFF aus. Am seltensten kamen Meldungen aus den Bereichen der nicht-alkoholischen Getränke, Lebensmittelzusatzstoffe und Aromen, Speiseeis und Desserts, Eier und

Eiprodukte, Fleisch und Fleischprodukte, Fisch und Fischprodukte mit je nur einer Meldung und somit jeweils einem halben Prozent.



**Abbildung 3:** Prozentuelle Verteilung der in RASFF dokumentierten *B. cereus* Kontaminationen nach Probenkategorie (Meldungen n=188).

Quelle: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>; eingesehen am: 28.01.2021.

Eine genaue Aussage zu treffen welche Infektionsdosis ein Gesundheitsrisiko darstellt ist wegen der Vielfaltigkeit innerhalb der *Bacillus cereus* Gruppe schwierig. Es muss sowohl die Lagerung als auch die



Zusammensetzung der Lebensmittel mitbedacht werden. Die meisten lebensmittelassoziierten Ausbrüche wurden mit einer Bakterienkonzentration von  $10^5$  kolonienbildende Einheiten (KbE)/g oder ml in Verbindung gebracht. Allerdings kann es sowohl bei der Brech- als auch der Durchfallkrankheit schon ab einer Bakterienkonzentration von  $10^3$  KbE/g zu einer Intoxikation kommen (EFSA Panel on Biological Hazards - BIOHAZ, 2016). GLASSET et al. (2016) dokumentierte sogar Ausbrüche die durch mit  $10^2$  KbE/g *B. cereus* kontaminierten Lebensmitteln verursacht wurden.

Wichtige Maßnahmen, die gesetzt werden müssten, um die *Bacillus cereus* Gruppe kontrollieren zu können, sind laut dem Gremium der EFSA, nach dem Ernten die Lebensmittel und Überreste am besten  $<4$  °C zu lagern (EFSA Panel on Biological Hazards, 2016).

Bei Produkten wie z.B. Rohmilch und Rohmilchkäse kann die natürliche Mikroflora eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *B. cereus* haben. In pasteurisierter Milch oder Milchprodukten und Käse, wo der pH-Wert für das Wachstum von *B. cereus* nicht einschränkend wirkt kommt es zu einer raschen Vermehrung bis zu Belastungen von 7 log kolonienbildende Einheiten (KBE)/g (TIRLONI et al., 2017).

### **1.3. GESETZLICHE GRUNDLAGEN, RICHT- UND WARNWERTE**

Man geht immer von einem „präsumtiven“ *B. cereus* aus, da es schwierig ist die verschiedenen Spezies zu unterscheiden (ISO 7932:2004). Einige Aufsichtsbehörden haben Grenzwerte für die Lebensmittelsicherheit der *B. cereus* Gruppe von  $10^3$  cfu/g in Milchprodukten festgelegt und  $10^2$  KBE/g in Säuglingsanfangsnahrung.

In der Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 ist die Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über die mikrobiologischen Kriterien für Lebensmittel mitenthalten.

Die neue Verordnung enthält unter anderem die Grenzwerte der einzelnen Bakterien in den verschiedenen Lebensmitteln aber auch Vorgaben diese zu kontrollieren. Im Falle vom präsumtiven *B. cereus* wird eine Kontrolle der Temperatur und die Einrichtung eines Kontrollsystems basierend auf dem Konzept der Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte (Hazard analysis and critical control points, HACCP) empfohlen. Es wird auf die Gefahr hingewiesen, dass Sporen die in getrockneten diätetischen Lebensmitteln, wie getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und Gewürzen, vorhanden sind sich nach Rehydratisierung wieder vermehren können und hierbei die Gefahr bestehen würde, dass eine anfällige Person diese verzehren könnte. Deshalb sollte der Sporengehalt während der

Herstellung so gering wie möglich sein und ein Prozesshygienekriterium sollte etabliert werden, das den Zeitraum zwischen Zubereitung und Verzehr geringhält.

Bei den Prozesshygienekriterien in Kapitel 2 unter dem Punkt „2. Milch und Milcherzeugnisse“ wird als letztes die Lebensmittelkategorie „getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind“ in Zusammenhang mit dem Mikroorganismus „präsumtiver *Bacillus cereus*“ aufgeführt. Hier wird ein Toleranzwert (m) von 50 KBE/g und ein Grenzwert (M) von 500 KBE/g abgegeben. Weiters soll bei der Probenahme eine Probeneinheit von fünf eingehalten werden und maximal eine darf davon zwischen dem Toleranz- und Grenzwert liegen. Dieses Kriterium gilt für das Ende des Herstellungsprozesses. Im Falle eines unbefriedigenden Ergebnisses müssen Maßnahmen ergriffen werden, wie die Verbesserung der Herstellungshygiene, eine Verhinderung der Rekontamination oder eine bessere Auswahl der Rohstoffe. Als analytische Referenzmethode wird auf die ISO 7932 (2004) verwiesen. Das Wachstumsoptimum von *B. cereus* liegt bei 30-37°C, aber auch bei  $\geq 4^\circ\text{C}$  und  $\leq 50^\circ\text{C}$ , abhängig von der phylogenetischen Gruppe (*B. weihenstephanensis* 5°C, *B. cytotoxicus* bis 50 °C). Wachstum ist außerdem möglich im pH Bereich von 4,3 bis 9,3 und Wasseraktivitätsbereich von 0,912 bis 0,995 (<https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/12/Bacillus-cereus-in-Milk-and-Dairy-Products.pdf>; eingesehen am: 05.02.2021).

Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) hat mikrobiologische Richt- und Warnwerte für einige Lebensmittelkategorien definiert (<https://www.dghm.org/fachinformationen/richt-warnwerte/>; eingesehen am: 05.02.2021). In Tabelle 3 sind diese für die Produktkategorien aufgeführt, die am häufigsten von Kontaminationen mit *Bacillus cereus sensu lato* betroffen sind (nachzulesen in Abbildung 3). Die DGHM legt einen Warnwert von  $10^3$  KBE/g für Obst, Salat, Convenience und Instantprodukte fest, während bei Kräutern und Gewürzen, die laut den RASFF Berichten am häufigsten betroffen sind, ein Warnwert von  $10^4$  beschrieben wird. Die Kontaminationsmenge an präsumtiven *B. cereus* für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung wird bereits in der Verordnung 2073/2005 festgelegt und hier beschreibt die DGHM denselben Richt- und Warnwert für Säuglingsanfangsnahrung auf Milchpulverbasis.

In Frankreich wurde der behördliche Grenzwert für *B. cereus* in Lebensmitteln, insbesondere in stärkehaltigen Lebensmitteln, auf  $1 \times 10^5$  KBE/g Lebensmittel festgelegt (Gesetz DGAL/MUS/N2009-8188, 07. Juli 2009, <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-N2011-8191/telechargement>; RAMARAO et al., 2020).

**Tabelle 3:** Richt- und Warnwerte (laut der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, DGHM) der laut RASFF-Bericht (siehe Abbildung 3) am stärksten betroffenen Produktkategorien.

KATEGORIE		RICHTWERT	WARNWERT	QUELLE
<b>Convenience</b>	gegarte TK-Fertiggerichte ohne rohe Anteile, auf Verzehrttemperatur zu erhitzen	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2013
	rohe oder teilgegarnte TK-Fertiggerichte bzw. Teile davon, vor Verzehr gegart	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2014
<b>Instantprodukte</b>	kalt angerührt	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2014
	Kochprodukte, Trockensuppen etc.	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2019
<b>Kräuter und Gewürze</b>	getrocknete Kräuter und Gewürze	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	DGHM 2018
<b>Obst</b>	frische(s), verzehrfertige vorbereitete(s), geschnittene(s) Obst(mischungen)	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2019
<b>Salate</b>	Mischsalate roh, frisch, verzehrfertig	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	DGHM 2016
<b>Säuglingsnahrung</b>	Säuglingsnahrung Milchpulverbasis	5x10	5x10 <sup>2</sup>	DGHM 2012
	getrocknete Säuglingsanfangsnahrung	5x10	5x10 <sup>2</sup>	VO (EG) 2073/2005

Quelle: <https://www.ladr-lebensmittel.de/richt-warnwerte>, eingesehen am 05.02.2021.

## 1.4. NACHWEISMETHODEN und PHYLOGENIE

### 1.4.1. Mikrobiologische Nachweismethoden

Der kulturelle Nachweis wird im europäischen Raum gemäß ISO 7932 (2004): Mikrobiologie von Lebens- und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtiven *Bacillus cereus* - Colony-count Technik bei 30 °C durchgeführt.

Dabei muss das Probenmaterial im Verhältnis von 1:10 verdünnt werden, homogenisiert und dann eine Verdünnungsreihe hergestellt werden. Davon werden jeweils 0,1 ml je Verdünnungsstufe im Doppelansatz auf Mannitol-Eigelb-Polymyxin-Agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar, MYP-Agar) ausgespatelt. Danach wird es für 24h bei 30°C bebrütet und abgelesen. Zur Auswertung verwendet man Platten von zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen mit typischen Kolonien (nicht mehr als 150 Kolonien pro Platte). Fünf der typischen Kolonien werden auf Schafblutagar überimpft. Zeigen sie hier eine positive β-Hämolysereaktion von zwei bis vier Millimetern, werden sie als „präsumtiver *B.*

*cereus*“ bezeichnet. *B. cereus* verdächtige Kolonien werden auf MYP-Agar rosa und haben einen Präzipitationshof, der durch die positive Lecithinase-Reaktion entsteht (ISO 7932, 2004). Eine Verbesserung der *B. cereus* Diagnostik stellt die Entwicklung von chromogenen Nährmedien dar, bei der ein spezifischerer Nachweis möglich ist mit Hilfe von z.B.  $\beta$ -D Glukosidase und Phosphatidyl-inositol spezifische Phospholipase C (PI-PLC) (Tabelle 4).

Isolate der *B. cereus* Gruppe können morphologisch variabel sein (e.g. rhizoidealer Aspekt, rauhe Kolonien, variabler Durchmesser). Ein kleiner Prozentsatz der *B. cereus*-Stämme exprimiert die Phospholipase oder  $\beta$  D-Glukosidase Aktivität nicht und bildet dadurch keinen Hof oder erscheint als weiße Kolonien (FRICKER et al., 2008; HENDRIKSEN und HANSEN, 2011; [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/Technical\\_Sheets/RAPIDB\\_cereus\\_V2\\_%2028\\_Nov\\_2018.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/Technical_Sheets/RAPIDB_cereus_V2_%2028_Nov_2018.pdf); eingesehen am: 16.02.2021).

Nicht alle Stämme zeigen eine Hämolysereaktion am Blutagar oder einen Präzipitationshof am MYP-Agar (MESSELHÄÜßER et al., 2014).

Eine eindeutige Identifizierung einiger Bazillen-Isolate mittels biochemischer Verfahren (e.g. API Identification System, Biomerieux) ist nicht immer möglich da es auch atypische Reaktionen gibt, die nicht zu einer klaren Spezieszuordnung führen (CELANDRONI et al., 2016; ARUWA und OLATOPE, 2015).

Empfohlen werden hier von der US Food and Drug Administration (FDA) folgende Tests: Voges Proskauer Reaktion, Nitratreduktion, Phenolrot-Glukose-Test, Lysozymresistenz und Verwertung von Tyrosin. Außerdem werden zur Differenzierung folgende Kriterien empfohlen: Motilität und Hämolyseaktivität (zum Ausschluss von *B. anthracis*), rhizoide Wachstum (Nachweis von *B. mycoides*), Produktion von Toxinkristallen (Nachweis von *B. thuringiensis*), Psychrotoleranz (Nachweis von *B. weihenstephanensis*) und der Nachweis von Cereulid (emetischer *B. cereus*) (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>; eingesehen am 16.02.2021). Ein Biotyping Schema wurde von JHA und NARAYAN (1995) entwickelt und basiert auf der Verwertung der Ammoniumsalze der Zucker Xylose, Salicin und Cellobiose. Biotyp 5 verwertet alle drei Zucker, während Biotyp 2, 7 und 8 nur jeweils 2 Zucker fermentieren. Biotyp 3, 4 und 6 sind nur in einer Zuckerreaktion positiv (Salicin, Xylose und Cellobiose) und Biotyp 1 ist in allen Reaktionen negativ.

Im Anhang der ISO 7932 (2004; Amendment 2020) ist nun ein optionales Vorgehen für epidemiologische Fragestellungen angeführt, das mikro- und auch molekularbiologische Methoden

kombiniert. Diese inkludieren den Nachweis des *cytK-1* und *cytK-2* Gens zur Differenzierung von *B. cytotoxicus* (*cytK-2* positiv), von anderen *B. cereus* Gruppen Spezies.

**Tabelle 4:** Alternative Nährmedien für den präsumtiven *B. cereus* Nachweis.

AGAR (HERSTELLER)	KOLONIEMORPHOLOGIE	ENZYMNACHWEIS
<i>Bacillus</i> ChromoSelect Agar (SIGMA ALDRICH; MERCK MILLIPORE); Hicrome™ <i>Bacillus</i> Agar Synonym	hellblaue, große, flache Kolonien mit blauer Mitte	β-D Glukosidase
BRILLIANCE <i>BACILLUS CEREUS</i> AGAR (OXOID)	Blau-grün	β-D Glukosidase, Substrat: X-β,d-Glucopyranosid (X-Glc)
COMPASS® <i>BACILLUS CEREUS</i> AGAR (BIOKAR, SOLABIA GROUP)	Grün	β-D Glukosidase
<i>B. cereus</i> Rapid Agar-BACARA (BIOMERIEUX)	Pink-orange mit opaquer Zone	β-D Glukosidase, Phospholipase C (opaque Zone)
RAPID <i>B.cereus</i> Medium (BIORAD)	Rote Kolonien mit opaquer Zone	β-D Glukosidase, Phospholipase C (opaque Zone)
CHROMAGAR <i>B. CEREUS</i> (Chromagar)	Türkis-blau mit opaquer Zone	β-D Glukosidase, Substrat: X-β,d-Glucopyranosid (X-Glc) Phospholipase C (opaque Zone)
CHROMATIC <i>BACILLUS CEREUS</i> (LIOFILCHEM)	Türkis-blau mit opaquer Zone	β-D Glukosidase, Phospholipase C (opaque Zone)
CHROMOGENIC <i>B.CEREUS</i> (BIOLIFE)	Türkis-blau mit opaquer Zone	β-D Glukosidase, Phospholipase C (opaque Zone)

Quelle: <https://www.rapidmicrobiology.com/test-method/microbiological-analysis-using-chromogenic-and-fluorogenic-media>; <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/92325dat.pdf>; <http://www.chromagar.com/publication.php>; <https://www.biomerieux-industry.com/>; [https://www.solabia.com/Producto\\_304,9/BIOKAR-Diagnostics/COMPASS-BACILLUS-CEREUS-AGAR--COMPASS-BACILLUS-PLUS-AGAR.html](https://www.solabia.com/Producto_304,9/BIOKAR-Diagnostics/COMPASS-BACILLUS-CEREUS-AGAR--COMPASS-BACILLUS-PLUS-AGAR.html); [www.oxid.com](http://www.oxid.com); <https://www.bio-rad.com/>; <https://www.liofilchem.com/search.html>; <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/chromogenic-substrate>; eingesehen am: 16.03.2021.

Emetische *B. cereus* Stämme werden mittels *ces* Gen PCR nachgewiesen (Cereulid positiv). In Kombination mit der Beweglichkeitsprüfung für *B. anthracis* und dem mikroskopischen Nachweis der parasporalen Kristalle von *B. thuringiensis* ist die Differenzierung der präsumtiven *B. cereus* möglich.

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massen-Spektrometrie (MALDI-TOF MS) basiert auf der Analyse von ribosomalen Proteinen. Eben diese Proteine des zu identifizierenden Bakteriums, das in der Matrix eingebettet wurde, werden mit einem Laser beschossen und ionisiert. Es kommt zu einer Beschleunigung im elektrischen Feld und somit im Flugrohr zu einer Auftrennung entsprechend der Ladung und Masse, was zu einem Spezies-spezifischen Muster führt. Diese Muster müssen nur noch mit einer Datenbank abgeglichen werden (SCHUBERT et al., 2010). Dies klingt nach einem schnellen und einfachen Weg zu Speziesbestimmung verschiedener Bakterien und Pilzarten, allerdings ist das Gerät sehr teuer und bei der genauen Speziesbestimmung von *B. cereus* nur bedingt einsetzbar. Denn so nahe verwandten Spezies wie zum Beispiel *B. cereus* und *B. thuringiensis* sind auch in der MALDI-TOF MS nicht differenzierbar (HA et al., 2019). Eine Target-spezifische Differenzierung ist möglich wie z.B. auf Basis des Zytotoxin K1 (CytK1) und nicht-hämolytisches Enterotoxin (NHE) (TSILIA et al., 2012). Cereulid-positive *B. cereus* können mit dem gut etablierten Ethanol/Ameisensäure-Extraktionsverfahren identifiziert werden: Die spezifischen Peaks liegen bei m/z 1175 und 1191. Ein Peak-Positionsunterschied von 16 Th (Thomson) zeigt den Nachweis der Natrium- und Kaliumaddukte von Cereulid an (DOELLINGER et al., 2020). Die *B. anthracis* Differenzierung von anderen Spezies der *B. cereus* Gruppe ist auch vielversprechend. PAUKER et al. (2018) identifizierten 7, 10, 18 und 14 *B. anthracis*-spezifische Biomarker, die in *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis* Stämmen fehlten. Psychrotolerante Arten der Gruppe *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* können aufgrund von vier ribosomalen Untereinheiten-Proteinen (S10, S16, S20 und L30) differenziert werden (TAKAHASHI et al., 2020).

Ein maschineller Lernansatz, basierend auf der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) mit künstlichen neuronalen Netzen (ANN) zur Unterscheidung von Mitgliedern der *B. cereus* Gruppe wurde von BAĞCIOĞLU et al. (2019) entwickelt. Die FTIR-Spektroskopie zeigte eine höhere Übereinstimmung mit der genetischen Profilerstellung im Vergleich zur proteomischen (MALDI-TOF MS) Typisierung (RADMEHR et al., 2020).

#### **1.4.2. Molekularbiologische Methoden**

PCR-Nachweisverfahren zur Bestätigung der *B. cereus* Gruppe, zielen auf die Gene die die Biomarker Chaperonin-Protein (*GroEL*) und das Topoisomerase-Enzym-Protein (*gyrB*) kodieren, ab (WEI et al., 2018).

Einzel PCR-Nachweis von *B. cereus ces* Gen (emetisches Toxin Cereulid), *cytK1* und *cytK2*, *nhe* und *hbl* sind etabliert und teilweise in Protokollen für die molekulare Epidemiologie enthalten (ISO 7934:2004; Amd, 2020). Die Gene werden auch in Multiplex PCRs kombiniert z.B. (*nheA*, *hblD*, *cytK2* und *cesB*), wobei die Nachweisgrenze für die direkte Extraktion aus Instantsäuglingsnahrung bei  $2 \times 10^3$  KBE/g liegt (SÁNCHEZ-CHICA et al., 2020).

Die „digital-droplet“-PCR (ddPCR) ist eine der neuesten und vielversprechendsten Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung von molekularen Targets mittels PCR. Der Vorteil ist, dass die Nachweisgrenze im Vergleich zur Standard-qPCR-Assay gesenkt werden kann. Das ist von besonderem Vorteil in Milchproben, wo der *B. cereus* Target Anteil in geringer Anzahl vorliegt (PORCELLATO et al., 2016).

FRENTZEL et al. (2018) gelang eine Differenzierung und Quantifizierung mittels real-time PCR-Assays von *B. pseudomycooides*, *cry1* positivem *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* von Arten der *B. cereus*-Gruppe mit nicht-rhizoider Koloniemorphologie. Die DNA-Extraktion von Sporen in Gewürzen gestaltete sich als anspruchsvoll. Die Cetyltrimethylammoniumbromid-Methode (CTAB) war bei Paprika, Pfeffer und Oregano anderen Fertigkits zur DNA Extraktion überlegen (Nachweisgrenze  $10^2$  bis  $10^3$  KBE/g im Vergleich zu  $10^5$  KBE/g). Für den Nachweis von *B. anthracis* gibt es sowohl PCR- als auch Real-Time-PCR-Systeme, die durch das Nachweisen der Toxingenkomponenten (*cra*) oder des Kapselsynthesegens (*capB*) funktionieren. Mit diesen Methoden ist nicht nur eine Identifizierung, sondern auch eine Differenzierung der unterschiedlichen Virulenztypen möglich (MESSELHÄUSSER und EHLING-SCHULZ, 2014).

Toxingenprofiling mittels PCR oder Real-Time-PCR eignet sich außerdem zur Differenzierung von emetischen und diarrhoeischen *B. cereus* Typ. Dabei konzentrieren sich die Verfahren auf das genetisch verankerte Vermögen der Bakterien das wichtigste emetische Toxin (Cereulid, *ces* Gen) oder der relevantesten diarrhoeischen Toxin Typen (NHE, HBL, CytK) herzustellen (MESSELHÄUSSER und EHLING-SCHULZ, 2014). Dabei werden sowohl einzel Target PCRs als auch Multiplex-PCR Systeme entwickelt (EHLING-SCHULZ et al., 2006).

FORGHANI et al. (2014) studierte die Nachweisrate von Toxingenen in einem Stammset von *B. cereus* Gruppe Isolaten aus Umwelt, Lebensmitteln und klinischen Ursprungs, dabei waren die Enterotoxin-Gene *nheA*, *entFM*, *hblC* und *cytK* zu 92,33 %, 77,21 %, 59,47 % bzw. 47,58 % im Stammset vorhanden.

### **1.4.3. Toxin Nachweis**

Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie und MALDI-TOF bieten eine geringe Kreuzreaktivität und hohe Spezifität für die Quantifizierung von Cereulid. Diese Messungen erfordern einen chemischen Standard zur Quantifizierung des Moleküls der langen Zeit fehlte und über Valinomycin durch seine Ähnlichkeit in der chemischen Struktur überbrückt wurde (RAMARAO et al., 2020).

Die von *B. cereus* produzierten Enterotoxine sind hitzelabil und werden bei der Lebensmittelverarbeitung oder beim Wiedererwärmen der Lebensmittel zerstört, deshalb greift man für den Nachweis auf molekulare Methoden zurück (EHLING-SCHULZ et al., 2006).

Außerdem gibt es kommerziell erhältliche Immunoassays, die die Enterotoxine Nhe und Hbl detektieren, auf Lateral-Flow-Technik basieren und eine schnelle Auswertung ermöglichen (<https://www.rapidmicrobiology.com/tag/bacillus-cereus>; eingesehen am: 16.02.2021).

### **1.4.4. Phylogenie**

Phylogenetische Hypothesen über *B. cereus* s. l. wurden aus einer Vielzahl von Datenquellen generiert, darunter 16S rRNA-Sequenzen, Daten zum amplifizierten Fragmentlängen-Polymorphismus (AFLP), Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) von „housekeeping“-Genen, Ganzgenom-Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) [18] oder digitale DNA-DNA-Hybridisierungsdaten (dDDH) (BAZINET, 2017; STEVENS et al., 2019).

Die *B. cereus*-Gruppe kann in drei Klassen eingeteilt werden. Die Zuordnung der Stämme zu den Klassen erfolgt mittels *spoIIIAB*-Typisierung (EHLING-SCHULZ et al., 2005).

Die *B. cereus*-Gruppe kann weiters in sieben phylogenetische Gruppen unterteilt werden (GUINEBRETIERE et al., 2008; Tabelle 5). Diese Gruppen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Zytotoxizität, sondern auch anhand ihres Vermögens innerhalb bestimmter Temperaturgrenzen zu wachsen. Unterschieden werden diese Stämme anhand eines Sequenzabschnitts des *panC*-Gens (welches die Biosynthese von Pantothenat und CoEnzym A codiert). Stämme von *B. cereus* (s.s.) werden der Gruppe II, III, IV und V zugeordnet, die konkrete Pathogenität ist allerdings stark stammabhängig (GUINEBRETIERE et al. 2008, 2010). *B. cytotoxicus* ist der *panC*-Gruppe VII zuzuordnen, allerdings gibt es eine hohe Variabilität der Zytotoxizität der einzelnen Stämme. Das Toxin-Expressions-Level ist stark stammabhängig und somit sind nicht alle stark zytotoxisch wie einige Studien zeigen (FAGERLUND et al., 2007, HEINI et al., 2018). *B. weihenstephanensis* und *B. mycoides* sind sich



genetisch so ähnlich, dass von LIU et al. (2015) nach einer Genomsequenzierung beschrieben wurde, dass es sich um die gleiche Spezies handle. Beide sind der phylogenetischen Gruppe VI zuzuordnen. *B. thuringiensis* wird von GUINEBRETIERE et al. (2010) in alle phylogenetischen Gruppen, außer Gruppe I und VII, zugeordnet. *B. toyonensis* besitzt sowohl die Gene als auch die Fähigkeit Enterotoxine (*nhe* und *hbl*) zu bilden, aber nicht so effektiv wie *B. cereus* (s.s.). Somit wird er von MILLER et al. (2018a) und STEVENS et al. (2019) der Gruppe V zugeteilt. *B. wiedmannii* wird der Gruppe II zugeordnet (MILLER et al. 2016, 2018a). Er besitzt ebenfalls sowohl *nhe*- als auch *hbl* Gene und in einigen Stämmen wurden ebenfalls *cytK*-Gene gefunden.

**Tabelle 5:** Die sieben phylogenetischen Gruppen von *B. cereus* (s.l.).

GRUPPE	ZYTOTOXIZITÄT	WACHSTUMSTEMPERATUR-GRENZEN	VERTRETER
Gruppe I	Sehr gering zytotoxisch	≥10°C und ≤43°C	<i>B. pseudomycooides</i>
Gruppe II	Stark zytotoxisch	≥7°C bis ≤40°C	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>
Gruppe III	am stärksten zytotoxisch	≥15°C bis ≤45°C	<i>B. anthracis</i> <i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>
Gruppe IV	Stark zytotoxisch	≥10°C bis ≤45°C	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>
Gruppe V	Weniger zytotoxisch	≥8°C bis ≤40°C	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>
Gruppe VI	Sehr gering zytotoxisch	≥5°C und ≤37°C	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. thuringiensis</i>
Gruppe VII	Stark zytotoxisch	≥20°C bis ≤50°C	<i>B. cytotoxicus</i>

Quelle: GUINEBRETIERE et al., 2010, BfR, 2019; <https://tools.symprevius.org/Bcereus/characteristics.htm>; eingesehen am 27. 02. 2021.

CARROLL et al. (2020) entwickelten ein Tool BTyper3 (<https://github.com/lmc297/BTyper3>; eingesehen am 03.03. 2021) um Genomospezies besser zu identifizieren. Dazu wurden 2.231 Genome charakterisiert und unterschiedliche Methoden der Subtypisierung verglichen: average-nucleotide Identity Vergleich von Genomen, MLST Typisierung Ergebnisse, panC und rpoB-Allel-Gruppen Zuordnung, sowie Enterotoxin Profiling.

## 1.5. ZIEL DER STUDIE

Ziel der vorliegenden Studie war es kommerziell erhältliche Selektivnährmedien zum Nachweis von präsumtiven *Bacillus cereus* in Lebensmitteln (u.a. Milchprodukte; n=64) zu evaluieren. Die Spezies von präsumtiven *Bacillus cereus* wurde mittels PCR Methode bestätigt (*gyrB* Gen) und subtypisiert (Toxin Profiling, panC Typing) (Abbildung 5).

Die Hypothese ist, dass sich die Zusammensetzung der *B. cereus* Gruppe nach dem Einfrieren des Probenmaterials verändert.



**Abbildung 4:** Versuchsaufbau im Rahmen der Diplomarbeit zum Nachweis von präsumtiven *Bacillus cereus* und *Bacillus spp.*

## **2. MATERIAL & METHODEN**

### **2.1. GERÄTE UND MATERIALIEN**

Ein Überblick über die in dieser Studie eingesetzten Geräte und Verbrauchsmaterialien wird in Supplemente Tabelle 1 gegeben.

### **2.2. PROBEN UND PROBENZIEHUNG**

Milchproben (n=51), davon eine Rohmilchprobe und 50 pasteurisierte Proben aus dem Einzelhandel und von Molkereien eingeschickt, wurden zur präsumtiven *B. cereus* Untersuchung von Dr. med. vet. Beatrix Stessl an der Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie (Veterinärmedizinische Universität Wien) für die Diplomarbeit zur Verfügung gestellt. Außerdem waren 13 Lebensmittelproben aus dem Bereich ethnische Lebensmittel (Lebensmittelkategorien Kakao und Kakaoprodukte, Kaffee und Tee, Krustentiere und deren Produkte, Fisch und Fischprodukte, Kräuter und Gewürze, Nüsse, Nussprodukte und Samen und Obst und Gemüse) für die *B. cereus* Untersuchung vorliegend. Die Proben wurden gekühlt und nach Provokation bei 30 °C Inkubation für 24 h vor und nach Einfrieren untersucht. Der Provokationstest wird von Molkereien zur Prozesskontrolle angewendet und dient der Auskeimung vorhandener *B. cereus* Gruppe Sporen um die Sporeneliminierung und das angewendete Erhitzungsverfahren zu überprüfen. Die Milchproben werden unterschiedlichen Erhitzungsverfahren innerhalb der Molkereien unterzogen. Das einfachste Verfahren (Pasteurisierung = Erhitzung für 15-30 Sekunden bei 72-75°C ohne Homogenisierung; PM) war bei 15 Milchproben angewendet worden und 16 Milchproben wurden homogenisiert, mikrofiltriert und pasteurisiert (PM; extended shelf life – ESL). Homogenisierung, Mikrofiltrierung und Hoherhitzung (Hoherhitzung = Erhitzung für 2 Sekunden bei 125 bis 127°C; HP-ESL) war bei sechs Produkten angewendet worden. Ziegen- und Schafmilch waren meist hoherhitzt, über vorangegangene Mikrofiltration fehlten die Angaben. Pasteurisierte Milch ist gekühlt und ungeöffnet 7 bis 10 Tage haltbar, während hoherhitzte Milch bis zu 3 Wochen gekühlt und originalverpackt haltbar ist (TÖPEL, 2015).

Ein hoher Prozentsatz (n=38/51; 74.51%) wurde unter Biorichtlinien produziert (<https://www.bio-austria.at/download/bio-austria-produktionsrichtlinien/>; <https://www.demeter.at/>; <https://bioinfo.at/>; <https://www.zurueckzumursprung.at/>; <https://www.janatuertlich.at/wir-sind-bio/wofuer-wir-stehen/strengste-kontrollen/>; eingesehen am: 02.02.2021; Tabelle 6).

Die Milchproben umfassten Hersteller H-Q und deckten Kuh- (Hersteller H bis N) sowie Schaf- und Ziegenmilch ab (Hersteller P und Q und Hersteller O, P und Q). Die ethnischen Lebensmittel stammten von den Herstellern A bis G.

**Tabelle 6:** Probenüberblick zum Nachweis von *Bacillus cereus* (n=64).

PROBEN ID	Hersteller ID	KATEGORIE	PROBENBEZEICHNUNG	ZUSATZ
75	A	Kakao und Kakaozubereitungen, Kaffee und Tee	Vietnamesischer grüner Tee	
36	B	Krebstiere und ihre Produkte	Flusskrebse	
35	C	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrockneter Eidechsenfisch	
37	D	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrocknete, gesalzene Sardellen	
32	E	Gemüse und Früchte	Pandan-Blätter	
38	E	Gemüse und Früchte	Tamarindenpaste, feucht	
66	E	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrocknete, gesalzene Sardellen	
33	F	Gemüse und Früchte	Sojasprossen	
40	F	Gemüse und Früchte	Goji-Beeren	
105	F	Kräuter und Gewürze	Korianderpulver	
34	G	Gemüse und Früchte	Galanga-Wurzel	
41	G	Kerne und Nüsse	Granatapfelkerne	
47	G	Kerne und Nüsse	gemahlen Egussi	
4, 42, 70	H	PM, NHOMOG.	Kuhmilch	Bio, Heu
11-D, 41, 71	I	PM, NHOMOG.	Kuhmilch	Bio
12	J	PM-ESL, MIKROFILT.	Fettarme Milch	Bio
16, 17, 84	J	PM, NHOMOG.	Kuhmilch	Bio
27	K	RM	Baktofuge vor Entleerung	
64	K	PM	Buttermilch	Bio
85	K	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio
139, 141	K	HP-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	
73, 74, 75	L	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	
2, 13, 15, 76	M	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio
120, 128, 130	M	HP-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio
123, 125, 127, 129	M	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio, Heu
131, 132	M	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	
68	N	HP-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio
77	N	PM-ESL, MIKROFILT.	Kuhmilch	Bio
72	O	PM, NHOMOG.	Kuhmilch	Bio
6	P	HP-ESL	Ziegenmilch	Bio
5, 78, 88, 100	Q	PM, NHOMOG.	Schafmilch	
45	Q	PM, NHOMOG.	Ziegenmilch	
1, 8, 44, 66, 67	R	HP-ESL	Schafmilch	Bio
9, 11-A, 11-B, 11-C, 43, 65	R	HP-ESL	Ziegenmilch	Bio

Legende: PM: pasteurisiert, ESL: extended shelf life, HP: hocherhitzt, MIKROFILT.: mikrofiltriert, NHOMOG.: nicht homogenisiert, RM: Rohmilch.

## 2.3. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

### 2.3.1. Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar: Zusammensetzung und Koloniemorphologie von präsumtiven *B. cereus*

Die Zusammensetzung des Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) ist in Tabelle 7 ersichtlich. Zur Herstellung von 500 ml des Agars werden 21,5 g eingewogen, mit einem Magnetrührstab in 450 ml destilliertem Wasser aufgelöst und 15 Minuten lang bei 121°C autoklaviert. Anschließend wenn die Mischung auf etwa 49°C abgekühlt ist, werden 50 ml Eigelb-Suspension und eine Ampulle Polymyxin B (entspricht 50.000 IE) hinzugefügt.

**Tabelle 7:** Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar Zusammensetzung (pH at 25 °C 7.2 ± 0.2).

GRUNDKOMPONENTEN	Konz. (g/l)	DIFFERENTIAL-SYSTEM	Konz.	SELEKTIVSUPPLEMENT	Konz (IE/l)
Fleischextrakt	1,0	Sojalecithin	100 ml/l	Polymyxin B	10 000 IE/l
Pepton	10,0	Mannitol	10,0 g/l		
Natriumchlorid	10,0	Phenolrot	0,025 g/l		
Agar	12,0				

Quelle: [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0929&c=UK&lang=EN); eingesehen am 02. 03. 2021.

Das Indikatorsystem im Agar setzt sich aus Mannitol, Phenolrot und Eigelb dar. Polymyxin B soll das Wachstum von Begleitflora unterdrücken. Die Inkubationsbedingungen für MYP Agar nach Inokulation sind 30 °C für 18-40h. Präsumtive *B. cereus* stellen sich als große, rosa und körnige Kolonien dar, die Mannitol negativ sind und von einer Eigelbpräzipitationszone umgeben sind.

Bei Proben mit einer hohen Bakterienbelastung wird die Begleitflora nicht ausreichend unterdrückt und es kommt zu einer starken Säurebildung durch z.B. Milchsäurebakterien. Dadurch können präsumtive *B. cereus* Kolonien übersehen werden, da sich der gesamte Agar gelb verfärbt. Es gibt auch atypische *B. cereus* die keine deutliche Eigelb-Reaktion aufweisen. Diese Kolonien sind in der Bestätigung neben typischen Kolonien zu berücksichtigen (ISO 7932, 2004; [file:///C:/Users/Win10/Downloads/Merck%20Rebrand\\_105267\\_1906.pdf](file:///C:/Users/Win10/Downloads/Merck%20Rebrand_105267_1906.pdf); eingesehen am 22.01.2021).

### **2.3.2. Alternative Selektivnährmedien: Zusammensetzung und Wachstum von *B. cereus***

Ein Überblick zu den in dieser Studie eingesetzten chromogenen *B. cereus* Selektivnährmedien ist in Tabelle 8 gegeben.

Zur Herstellung des *Bacillus* ChromoSelect Agar (Zusammensetzung in Tabelle 8 ersichtlich) werden 49,2 g in 1000 ml destilliertem Wasser aufgelöst, mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend bei 15 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung des Agars auf 50 °C wird das Selektivsupplement Polymyxin B zugefügt. Das Indikatorsystem basiert auf dem MYP Agar (Mannitol und Phenolrot). Außerdem ist ein chromogenes Substrat zugesetzt, das zur Koloniefarbe durch den Nachweis der  $\beta$ -D Glukosidase Aktivität beiträgt. Präsumtive *B. cereus* Kolonien wachsen hellblau, groß und flach nach einer Inkubation von 24-48 h bei 30 °C (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/92325dat.pdf>; eingesehen 22.01.2021).

Für die Herstellung vom Brilliance *Bacillus cereus* Agar werden 20,5 g in 500 ml destilliertem Wasser aufgelöst, mit einem Magnetrührer gemischt und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Nach dem Abkühlen des Agars auf 50°C wird das Selektivsupplement bestehend aus Polymixin B und Trimethoprim hinzufügen. Trimethoprim unterdrückt kokkoide Begleitflora und andere *Bacillus* Species als die *Cereus*-Gruppe. Um die Koloniemorphologie beurteilen zu können müssen die Agarplatten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert werden. *B. cereus* Kolonien wachsen groß, blau-grün mit unregelmäßigem Rand

([http://www.oxid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM1036&org=9&c=uk&lang=EN](http://www.oxid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1036&org=9&c=uk&lang=EN); eingesehen am 03. 03. 2021).

Zur Herstellung des *Bacillus cereus* Rapid Agar (BACARA) wird der in einer Flasche befindliche Fertigagar in einem Wasserbad bei 100°C verflüssigt und anschließend auf 44-47°C abgekühlt. Pro 100 ml Medium werden 4 ml BACARA Anreicherungssupplement und 0,5 ml BACARA Selektivsupplement, welches auch die chromogene Mischung enthält, zugefügt. Um die Koloniemorphologie beurteilen zu können müssen die Agarplatten für 22-26 Stunden bei 30°C inkubiert werden. Typische *B. cereus* Kolonien stellen sich durch den Zusatz eines chromogenen Substrats pink-orange mit einem undurchsichtigen Hof (Phospholipase C Reaktion) dar (<https://www.biomerieux.at/industrielle-mikrobiologie/resources/bacillus-cereus-kulturmedien>; [https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-AES-10-10-07-10\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/03/Synt-AES-10-10-07-10_en.pdf); eingesehen am 22.01.2021).

Zur Herstellung des CHROMagar *B. cereus* werden 33,3 g in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst, mit einem Magnetrührer vermischt und autoklaviert (121 °C 15 min). Nach der Abkühlung des Agars auf

47 °C werden 40 ml des Selektivsupplements aseptisch zugesetzt. Inkubiert werden die Platten bei 30°C für 24 Stunden. Typische *B. cereus* Kolonien zeigen sich auf dem hellen CHROMagar als intensiv blaue Kolonien mit Hof (Phospholipase C)

([http://www.chromagar.com/fichiers/1542790606NT\\_EXT\\_068\\_NOTICE\\_BC.pdf?PHPSESSID=f7327f67dc1db88280c6e03ab373b4e1](http://www.chromagar.com/fichiers/1542790606NT_EXT_068_NOTICE_BC.pdf?PHPSESSID=f7327f67dc1db88280c6e03ab373b4e1); eingesehen am 22.01.2021).

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der in dieser Studie eingesetzten chromogenen *Bacillus cereus* Selektivnährmedien.

AGAR	AGARZUSAMMENSETZUNG	g/l	SELEKTIVSUPPLEMENT
<i>Bacillus</i> ChromoSelect Agar	Pepton	10,0	Polymyxin Sulfat (10 mg/l)
	Fleischextrakt	1,0	
	D-Mannitol	10,0	
	Natriumchlorid	10,0	
	chromogene Mischung	3,2	
	Phenolrot	0,02 5	
	Agar	15,0	
Brilliance <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> Agar	Hefeextrakt	4,0	Polymyxin B (106 000 IE/l)
	Pepton	10,0	Trimethoprim (10,0 mg/l)
	Di-Natriumhydrogenphosphat	2,52	
	Kalium Di-Hydrogenphosphat	0,28	
	Natrium pyruvate	10,0	
	Chromogene Mischung	1,2	
	Agar	13,0	
<i>Bacillus cereus</i> Rapid Agar (BACARA)	spezielle Peptonmischung	10,0	Selektivsupplement (0,5 ml)
	Hefextrakt	4,0	
	Natriumchlorid	4,0	
	Phosphatpuffer	10,0	
	Agar	18,0	
	Antibiotikamischung	0,26	
	Chromogenes Substrat	0,05	
	Phospholipide		
CHROMagar <i>Bacillus cereus</i>	Agar	15,0	Selektivmix 3,0 g/l
	Pepton und Hefeextrakt	8,0	
	Natriumchlorid	10,0	
	Chromogene Mischung	0,3	

## **2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE BESTÄTIGUNG UND SUBTYPISIERUNG**

### **2.4.1. Isolatsammlung und DNA-Extraktion aus Isolaten mit Chelex**

Die präsumtiven *B. cereus* Kolonien gewachsen auf MYP Agar und chromogenen Selektivnährmedien (Tabelle 8) werden in einem Isolatset zur weiteren Bestätigung archiviert (Stammsammlung Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien).

Dazu wurden verdächtige Kolonien subkultiviert und als Reinkultur mit einer Öse in 1 ml Glycerolstocks übertragen (25% Glycerolkonzentration). Die Bakterienstocks wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Für die DNA-Extraktion nach WALSH et al. (1991) werden zwei bis drei verdächtige Einzelkolonien in Reinkultur mit einer Öse vom Agar abgenommen. Diese werden in ein 2,0 ml Tube mit 100 µl 0,01 M Trishydroxymethylaminomethan (Tris HCl) überführt und gevortext. Dazu wird noch 400 µl Chelex Resin-Lösung gegeben und anschließend gevortext. Das Tube mit DNA, Tris HCl und Chelex-Lösung wird für 10 Minuten bei 100°C in einem Heizblock inkubiert und anschließend für fünf Sekunden bei 15.000 Umdrehungen zentrifugieren. Es läuft für 20 Extraktionen jeweils eine Leerkontrolle (nur Tris HCl und Chelex, keine DNA) mit.

### **2.4.2. PCR-Assays**

In allen PCR Assays wurde sowohl die Chelex-DNA als Negativkontrolle, als auch DEPC Wasser inklusive der Mastermixkomponenten als PCR Non-Template-Kontrolle (NTC) eingesetzt.

Um zu bestätigen, dass die Isolate der gesammelten Proben der *B. cereus*-Gruppe angehören wurde eine *gyrB* PCR durchgeführt (DZIECIOL et al., 2013). Die verwendeten Primer umfassten 5' - GCC CTG GTA TGT ATA TTG GAT CTA C - 3' als Forward Primer und 5' – GGA CAT AAT AAC TTC TAC AGC AGG A – 3' als Reverse Primer.

Als Positivkontrolle wird die DNA des Referenzstamms *B. cereus* DSM 31 (Frankland and Frankland 1887) mitgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf sind in Tabelle 9 ersichtlich.



**Tabelle 9:** PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *gyrB* PCR nach DZIECIOL et al. (2013).

Mastermix	Endkonz.	Stock konz.	1x in $\mu$ l
Aqua dest.			12,95
10x Puffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	50 mM	1,75
BCG FP2	0,3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	0,75
BCG RP2	0,3 $\mu$ M	10 $\mu$ M	0,75
dNTP`s	200 $\mu$ M	5000 $\mu$ M	1
Taq pol (Plat.)	1,5 U	5 U/ $\mu$ l	0,3
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			25

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	5 min	
94°C	40 sec	
60°C	40 sec	30 Zyklen
72°C	1 min	
72°C	7 min	
4°C	$\infty$	

Die Identifizierung des *ces* Gens dient der Differenzierung emetischer und nicht-emetischer *B. cereus*-Stämmen. Die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf sind in Tabelle 10 ersichtlich. Die Sequenz des verwendeten Forward Primer ist 5' – GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG – 3' und des Reverse Primer 5' – GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A – 3' (EHLING-SCHULZ, 2006).

Die PCRs die zur Identifizierung der Gene die zur Bildung von Toxinen des Diarrhö-Typen führen werden in den Tabellen 11 bis 13 dargestellt.

In Tabelle 11 wird die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf für die *cytK* PCR dargestellt (EHLING-SCHULZ, 2006). Die Sequenz des verwendeten Forward Primer ist 5' – ACA GAT ATC GGI CAA AAT GC – 3' und des Reverse Primer 5' – CAA GTI ACT TGA CCI GTT GC – 3'.

**Tabelle 10:** PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *ces* PCR nach EHLING-SCHULZ (2006).

Mastermix	Endkonz.	Stock Konz.	1x in $\mu\text{l}$
DEPC Wasser			14,05
10x PCR Puffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	50 mM	1,25
ces F1	1 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,5
ces R2	1 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,5
dNTP's	0,2 mM	5 mM	1
Taq	1 U	5 U/ $\mu\text{l}$	0,2
Mastermix ges.			20
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			25

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	35 sec	
60°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	40 sec	
72°C	5 min	
10°C	$\infty$	

**Tabelle 11:** PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *CytK* PCR nach EHLING-SCHULZ (2006).

Mastermix	Endkonz.	Stock Konz.	1x in $\mu\text{l}$
DEPC Wasser			14,7
10x PCR Puffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	50 mM	1,25
CKF2	0,25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,125
CK1R5	0,25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	0,125
dNTP	0,2 mM	5 mM	1
Taq	1,5 U	5 U/ $\mu\text{l}$	0,3
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			25

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	35 sec	
57°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	35 sec	
72°C	5 min	
10°C	$\infty$	

In Tabelle 12 wird die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf für die *Nhe* PCR dargestellt (EHLING-SCHULZ, 2006). Die Sequenz des verwendeten Forward Primer ist 5' – AAG CIG CTC TTC GIA TTC – 3' und des Reverse Primer 5' – ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG – 3'.

**Tabelle 12:** PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *Nhe* PCR nach EHLING-SCHULZ (2006).

Mastermix	Endkonz.	Stock Konz.	1x in $\mu$ l
DEPC Wasser			14,7
10x PCR Puffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	50 mM	1,25
NA2F	0,25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,125
NB1R	0,25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,125
dNTP	0,2 mM	5 mM	1
Taq	1,5 U	5 U/ $\mu$ l	0,3
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			25

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	35 sec	
49°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	66 sec	
72°C	5 min	
10°C	$\infty$	

In Tabelle 13 wird die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf für die *Hbl* PCR dargestellt (EHLING-SCHULZ, 2006). Die Sequenz des verwendeten Forward Primer ist 5' – GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTT C – 3' und des Reverse Primer 5' – AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT – 3'.

In Tabelle 14 wird die Zusammensetzung des PCR-Mastermix, das Reaktionsvolumen und der Ablauf für die *panC* PCR dargestellt. Die Sequenz des verwendeten Forward Primer ist 5'- TYG GTT TTG TYC CAA CRA TGG-3' und des Reverse Primer 5'- CAT AAT CTA CAG TGC CTT TCG-3' (GUINEBRETIERE und NGUYEN-THÉ, 2003).

**Tabelle 13:** PCR Assay (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *Hbl* PCR nach EHLING-SCHULZ (2006).

Mastermix	Endkonz.	Stock Konz.	1x in $\mu$ l
DEPC Wasser			14,7
10x PCR Puffer	1x		2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	50 mM	1,25
HD2F	0,25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,125
HA4R	0,25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	0,125
dNTP	0,2 mM	5 mM	1
Taq	1,5 U	5 U/ $\mu$ l	0,3
Gesamt			20
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			25

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	2 min	
95°C	35 sec	
49°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	66 sec	
72°C	5 min	
10°C	$\infty$	

**Tabelle 14:** PCR (Mastermix und Cyclereinstellungen) für die *panC* PCR modifiziert nach GUINEBRÈTIÈRE und NGUYEN-THÉ (2003).

Mastermix	Endkonz.	Stockkonz.	1x in $\mu$ l
Aqua dest.			30,1
10 x PCR Rxn Puffer	1x		5
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	50 mM	2,5
panC-FP	250 nM	5000 nM	2,5
panC-RP	250 nM	5000 nM	2,5
dNTP's	200 $\mu$ M	5000 $\mu$ M	2
Taq Polymerase (Plat.)	2 U	5 U/ $\mu$ l	0,4
Gesamt			45
Template			5
Reaktionsvolumen 1x			50

Temperatur	Zeit	Zyklen
94°C	5 min	
94°C	15 sec	
55°C	30 sec	30 Zyklen
72°C	30 sec	
72°C	7 min	
4°C	$\infty$	

### **2.4.3. Gelelektrophorese**

Um die PCR Amplifikate nach Größe und Ladung aufzutrennen muss zuerst ein 1,5%iges Agarosegel hergestellt werden. Dieses besteht aus 1,5 g Agarose, 100 ml 10 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (Zusammensetzung: 108 g Trishydroxymethylaminmethan, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA und 1000 ml Millipore Wasser) und 3 µl PeqGreen. Als Vergleich zur besseren Auswertung werden in die erste und in die letzte Tasche jeweils 5 µl der 1000 Bp-Marker pipettiert. In die restlichen Taschen werden jeweils die Mischungen aus 10 µl PCR-Amplifikat und 3-4 µl sample loading buffer (SLB) pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei 120 V für 30 Minuten. Anschließend werden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (GelDoc 2000) und als Foto dokumentiert.

## **3. RESULTATE**

### **3.1. PROBEN**

Die 64 präsumtiv *B. cereus* positiven Proben (Tabelle 6) waren sieben Probenkategorien zugeordnet: Milch und Milchprodukte (n=51; 79,69%), Gemüse und Früchte (n=5; 7,81%), Fisch und Fischereierzeugnisse (n=3; 4,69%), Samen und Nüsse (n=2; 3,13%), Kakao und Kakaozubereitungen, Kaffee und Tee (n=1; 1,56%), Kriebstiere und Erzeugnisse (n=1; 1,56%) und Kräuter und Gewürze (n=1; 1,56%).

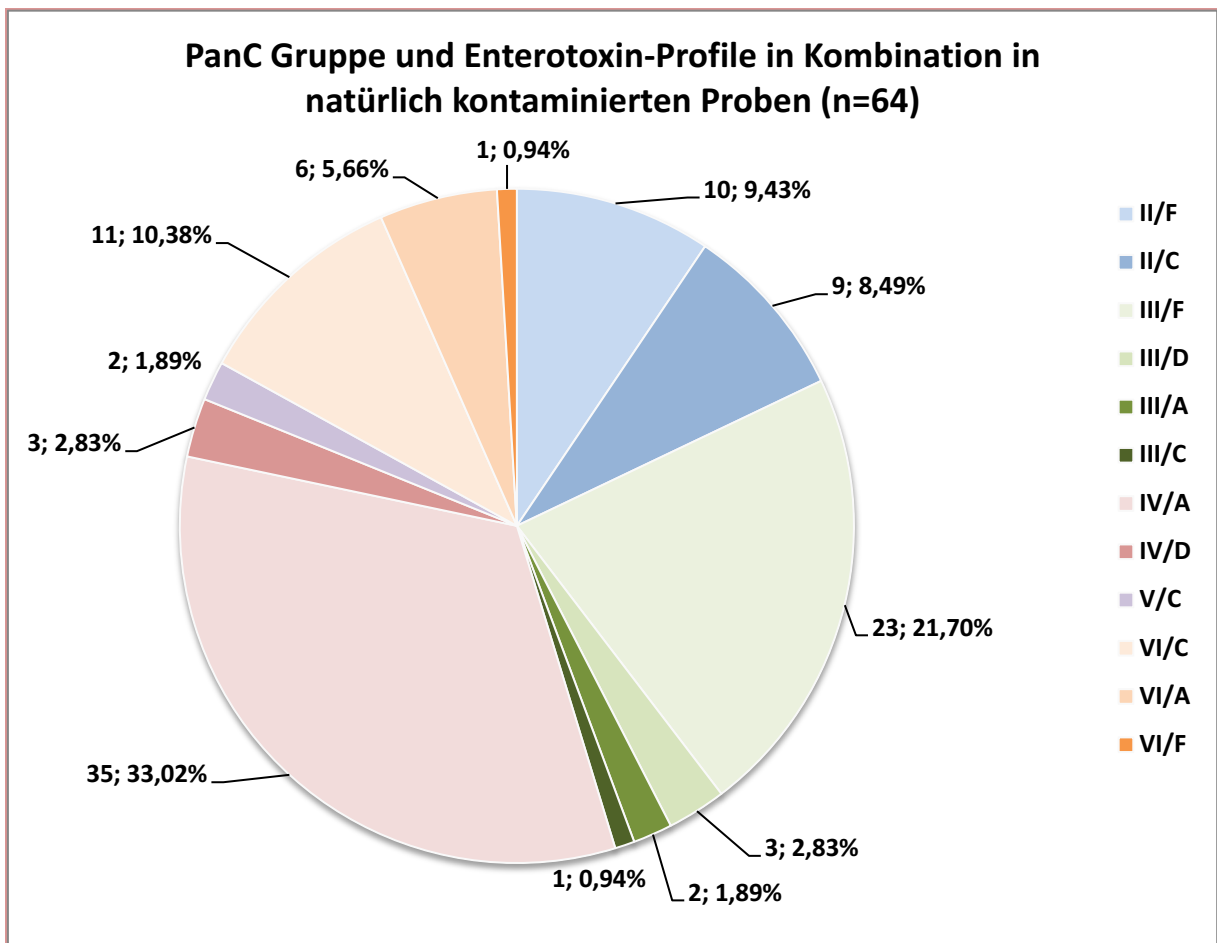
Alle präsumtiven *B. cereus* Isolate (n=241) waren positiv in der *gyrB* PCR, also konnten der *B. cereus* Gruppe zugeordnet werden.

In Abbildung 5 werden die *B. cereus gyrB* positiven Proben hinsichtlich der Verteilung der *panC* Gruppe in Kombination mit den Toxin Profilen dargestellt. Die Proben waren in der PCR Bestätigung des emetischen Toxin-Gens (*ces*) negativ, deshalb waren die Toxin Profile B (*nhe, hbl, ces* Genkombination positiv) und E (*nhe, ces* Genkombination positiv) im Isolatset nicht nachweisbar. Die *panC*/Toxin Kombination IV/A war im Probenset am häufigsten vertreten (33,02%), gefolgt von III/F (21,70%) und VI/C (10,38%) (Abbildung 5).

Vertreter der *B. cereus panC* Gruppe IV sind als stark zytotoxisch beschrieben und wachsen generell  $\geq 10$  °C, also mesophil. Das Toxin Profil A repräsentiert *nhe, hbl* und *cytK* Gen (*cytK2*) positive Isolate. Die Enterotoxin-Gene (*nhe, hbl, cytK2*) befinden sich im Chromosom von diversen Spezies der *B. cereus* Gruppe. Das *cytK1* Gen ist ausschließlich in der thermophilen Spezies *B. cytotoxicus* (*panC* Gruppe VII)

chromosomal verankert (<https://www.bfr.bund.de/cm/343/bacillus-cereus-bakterien-in-lebensmitteln-koennen-magen-darm-erkrankungen-verursachen.pdf>; eingesehen am 11. 03. 2021).

Vertreter der Gruppe *panC* VII wurden in keiner Probe nachgewiesen. Die *panC* Gruppe III gilt als stark zytotoxisch und *B. cereus* Gruppe Vertreter wachsen  $\geq 15$  °C. Das Toxin Profil F ist durch ein positives *nhe* Gen gekennzeichnet (nicht-hämolytisches Enterotoxin). Die *panC* Gruppe VI ist wenig bis gar nicht zytotoxisch und wächst bei  $\geq 5$  °C. Das Toxin Profil C ist charakterisiert durch ein positives *nhe* und *hbl* Gen.



**Abbildung 5:** *GyrB* PCR-positive *B. cereus* Proben (insgesamt n=64) eingeteilt in *panC*-Gruppen in Kombination mit Toxin Profilen prozentual und numerisch dargestellt.

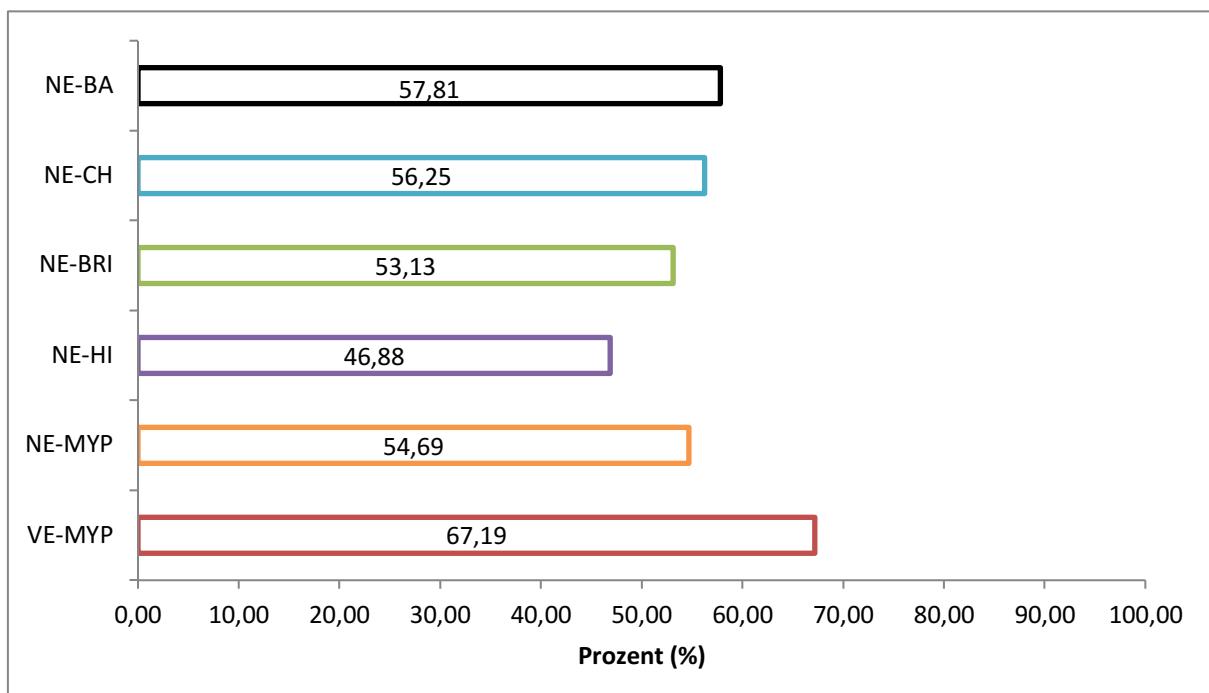
Legende: II, *panC* Gruppe II (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 7$  °C); III, *panC* Gruppe III (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 15$  °C); IV, *panC* Gruppe IV (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 10$  °C); V, *panC* Gruppe V (wenig zytotoxisch, Wachstum  $\geq 8$  °C); VI, *panC* Gruppe VI (nicht oder wenig zytotoxisch; Wachstum  $\geq 5$  °C); Toxin Profil A (*nhe*, *hbl*, *cytK* Gen positiv); Toxin Profil C (*nhe*, *hbl* Gen positiv), Toxin Profil D (*nhe*, *cytK* Gen positiv), Toxin Profil F (*nhe* Gen positiv).

Generell waren 17,19% (n=11/64), 32,81% (n=21/64) und 50,00% (n=32/64) der Proben vor, nach oder vor und nach dem Einfrieren *B. cereus* Gruppe positiv.

Auf MYP-Agar wurden die 64 Proben sowohl vor als auch nach dem Einfrieren auf ein Vorhandensein von *B. cereus* untersucht. Der größere Anteil der untersuchten Proben war vor dem Einfrieren auf MYP Agar positiv (67,19%; n=43/64), im Unterschied zu 54,69% (35/64) nach dem Einfrieren.

Nach dem Einfrieren wurden auch weitere Selektivnährmedien zum Recovery (=Wiederfindungs) Nachweis von *B. cereus* Gruppe eingesetzt. Dabei war der „Best Performer“ *B. cereus* Rapid Agar-BACARA (Biomerieux) (57,81%; n=37/64), gefolgt von CHROMagar (56,25%; n=36/64) und Brilliance *Bacillus cereus* Agar (Oxoid) (53,13%; n=34/64) (Abbildung 6).

Interessanterweise waren die Proben vor und nach dem Einfrieren auf MYP Agar nicht ident positiv. Es war bei 25 Probenpaaren vor und nach Einfrieren ein positiver *B. cereus* Nachweis möglich (25/64; 39,1%), während 18 (28.1%) und 10 Proben (15.6%) exklusive vor oder nach dem Einfrieren *B. cereus* positiv waren.



**Abbildung 6:** *B. cereus* positive Proben (n=64 gesamt) detektiert auf Bacara Agar, CHROMagar, Brilliance Agar, ChromoSelect und Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar dargestellt in Prozenten.

Legende: NE: nach Einfrieren, VE: vor Einfrieren, BA: Bacara Agar, CH: CHROMagar, BRI: Brilliance Agar, HI: ChromoSelect Agar, MYP: Mannitol Egg Yolk Polymyxin-Agar.

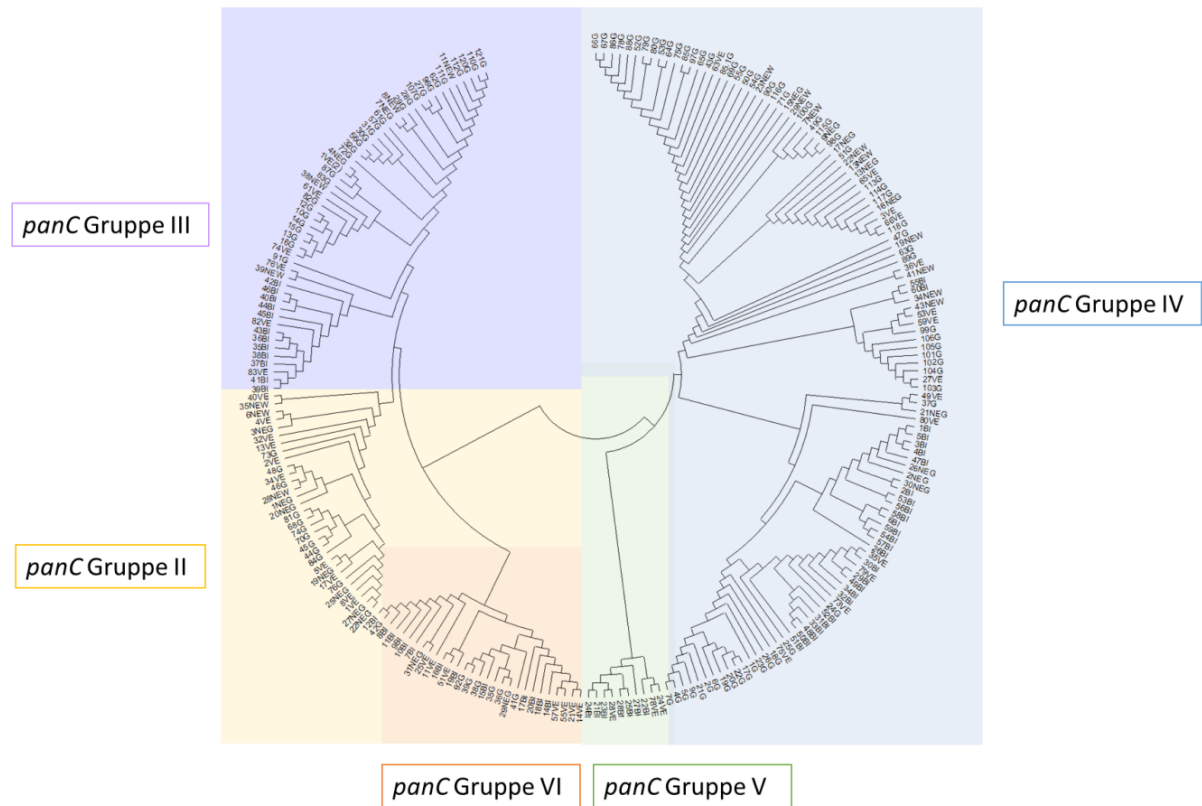
Die meisten Übereinstimmungen (n=6) beim *B. cereus* Nachweis in natürlich Proben auf verschiedenen Selektivnährmedien wurden bei Milch und Milchprodukten (n=15 Proben) der Hersteller H, I, J, K, M, Q und R (Tabelle 6) beobachtet (Supplemente Tabelle 2). Die zweithäufigsten Übereinstimmungen (n=5) beim *B. cereus* Nachweis auf den Testmedien (MYP vor und nach Einfrieren, Bacara Agar, ChromoSelect Agar, Brilliance Agar und Chromoselect Agar) wurden bei Milch und Milchprodukten der Hersteller J, K, M und R festgestellt (n=7 Proben) (Supplemente Tabelle 2).

Auffällig ist, dass die Heterogenität der *B. cereus panC* und Toxin Kombinationen nach dem Einfrieren zunimmt. In 14 Proben (21,88%) waren vor und nach Einfrieren die *panC* und Toxin Profile ident. In jeweils 12 und 14 Proben (18,75 und 21,88%) waren entweder erst vor oder nach dem Einfrieren *B. cereus* nachweisbar. Im größten Anteil der Proben waren nach dem Einfrieren andere *panC* und Toxin Kombinationen detektierbar als vor dem Einfrieren (n=24/64; 37,50%) (Supplemente Tabelle 3).

In Abbildung 7 ist ein phylogenetischer Baum der *B. cereus* Gruppe Isolate dargestellt. Die Evolutionsgeschichte wurde mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode und dem Tamura-Nei-Modell abgeleitet. Der Baum mit der höchsten logarithmischen Wahrscheinlichkeit (-3212.10) ist dargestellt. Die anfänglichen Bäume für die heuristische Suche wurden automatisch durch Anwendung der Algorithmen Neighbor-Join und BioNJ auf eine Matrix paarweiser Abstände, die mithilfe des Tamura-Nei-Modells geschätzt wurden, ermittelt und dann die Topologie mit dem höchsten Log-Likelihood-Wert ausgewählt. Der Baum ist maßstabsgetreu gezeichnet, wobei die Zweiglängen in der Anzahl der Substitutionen pro Stelle gemessen werden. Diese Analyse umfasste 241 Nukleotidsequenzen. Insgesamt gab es 628 Positionen im endgültigen Datensatz. Die evolutionären Analysen wurden in MEGA X durchgeführt. Die Mehrheit der Isolate clusterte in *panC* Gruppe IV, III und II und der geringere Anteil in *panC* Gruppe V und VI (Abbildung 7).



### Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method: *Bacillus cereus* Gruppe



**Abbildung 7:** Maximum Likelihood tree der *B. cereus* panC-Gruppen isoliert aus 64 Proben.

### 3.2. AGAR

Auf dem Referenznährmedium Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP-Agar) wird die typische Kolonie vom präsumtiven *B. cereus*, laut ISO 7932 (2004), rosa mit einem Präzipitationshof. Schlägt der Agar in eine Gelbfärbung um (durch mangelhaft unterdrückte bzw. übermäßig vorhandene Begleitflora), so können sich dennoch darunter *B. cereus* Kolonien befinden, die allerdings kaum in Reinkultur abnehmbar sind, was eine Erkennung, Bestätigung und Subtypisierung von *B. cereus* bei zu stark vorhandener Begleitflora erschwert (siehe Abbildung 7).

Der *Bacillus* ChromoSelect Agar ist eine Modifizierung des MYP Agars durch Einsatz von Mannitol und zusätzlich einem chromogenen Substrat das präsumtive *B. cereus* als blaue Kolonien darstellt. Bei Proben mit hohem Keimanteil ist Polymyxin B nicht ausreichend um den Begleitflora-Anteil ausreichend zu unterdrücken (Abbildung 8).

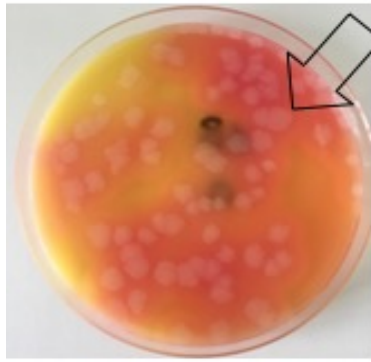
Die präsumtiven *B. cereus* färben sich Kolonien abweichend der Beschreibung des Agars hier nicht hellblau, sondern blaugrün oder violettblau (siehe Abbildung 8).

Im Gegensatz zu den beiden gerade genannten Nährmedien enthält der Brilliance *Bacillus cereus* Agar nicht nur Polymyxin als Selektivsupplement, sondern auch Trimethoprim. Dadurch ist die Begleitflora deutlich besser gehemmt. Das chromogene Substrat sollte laut Beschreibung die präsumtiven *B. cereus* Kolonien blaugrün färben, aber einige färben sich auch türkisblau mit weißem Rand (siehe Abbildung 8). Wenn die Kolonien das Farbsubstrat schlecht oder gar nicht aufnehmen können auch atypische *B. cereus* Kolonien mit einer hellblauen oder weißen Färbung entstehen (siehe Abbildung 9).

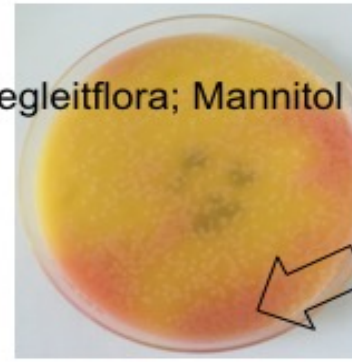
In der Beschreibung vom CHROMagar *Bacillus cereus* wird nicht angegeben, welche Selektivsupplemente genau enthalten sind, aber durch die Hofbildung (Phospholipase C) ist die Begleitflora, selbst wenn viele pinpoint Kolonien vorhanden sind, gut von den präsumtiven *B. cereus* Kolonien zu unterscheiden. Die Farbgebung ist wie beschrieben Türkis (siehe Abbildung 9).

Der *Bacillus cereus* Rapid Agar inhibiert die Begleitflora sehr gut (auch hier wird keine detaillierte Beschreibung des enthaltenen Selektivsupplements gegeben). Das Farbsubstrat wird von den präsumtiven *B. cereus* Kolonien aufgenommen und so entstanden fast keine atypischen Kolonien (Abbildung 10: in der unteren Bilderreihe in der Mitte eine Phospholipase C negative Kolonie, sonst alle Kolonien orange oder orange mit weißem Rand und mit Hof).

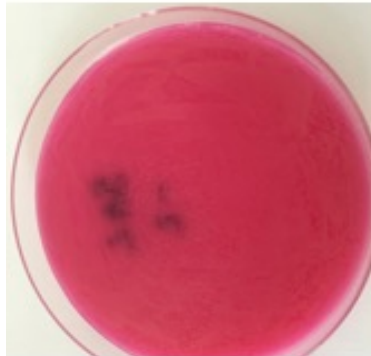
REFERENZAGAR-MYP; präsumtive *B. cereus* Kolonien



Begleitflora; Mannitol positiv



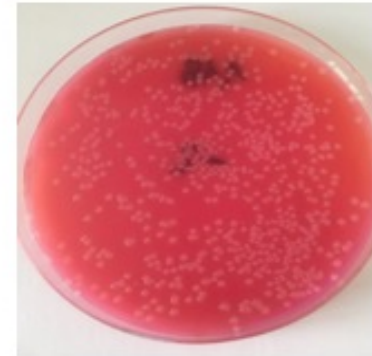
REFERENZAGAR-MYP, Begleitflora



Mannitol positiv



Mannitol negativ



Mannitol positiv

**Abbildung 8:** Beispiele typischer präsumtiver *B. cereus* Kolonien und non-target Begleitflora auf Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar.

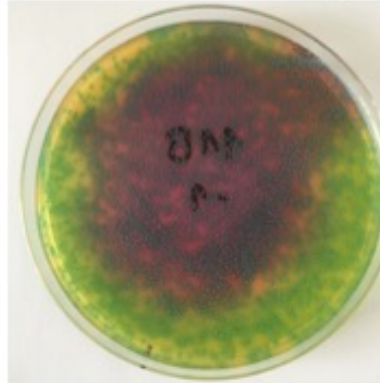
CHROMOGENE AGAR; präsumtive *B. cereus* Kolonien

**Bacillus ChromoSelect Agar**



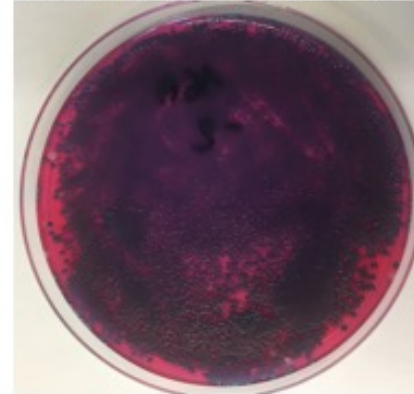
Blau-grüne Kolonien - *B. cereus*  
Rosa Hintergrund: Begleitflora

**Bacillus ChromoSelect Agar**



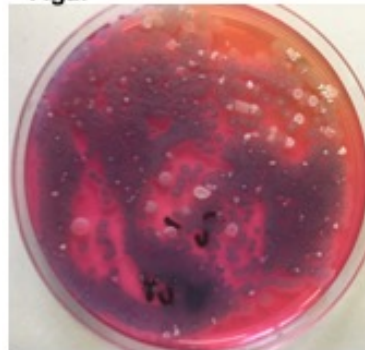
Blau-grüne Kolonien - *B. cereus*  
gelber Hintergrund: Begleitflora,  
Mannitol positiv

**Bacillus ChromoSelect Agar**



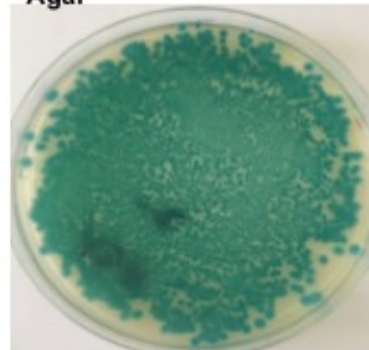
Blaue Kolonien - *B. cereus*

**Bacillus ChromoSelect Agar**



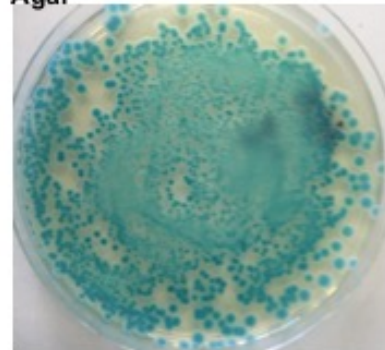
Blaue Kolonien - *B. cereus*,  
β-D Glukosidase negative - *B. cereus*

**Brilliance *Bacillus cereus* Agar**



Blau-grüne Kolonien - *B. cereus*

**Brilliance *Bacillus cereus* Agar**

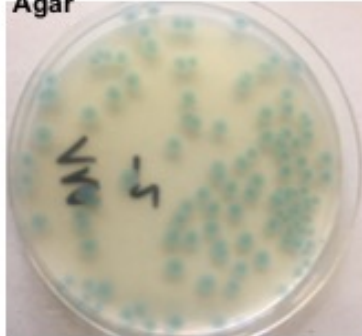


Blaue-türkise Kolonien mit weißem Rand  
- *B. cereus*

**Abbildung 9:** Beispiele typischer und atypischer präsumtiver *B. cereus* Kolonien und Begleitflora auf ChromoSelect und Brilliance Agar.

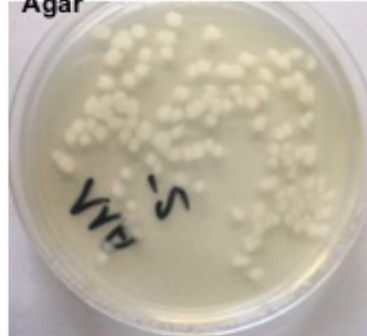
CHROMOGENE AGAR; präsumtive *B. cereus* Kolonien

Brilliance *Bacillus cereus* Agar



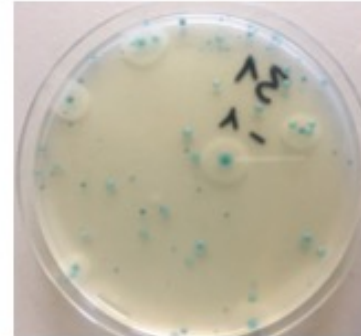
hellblaue Kolonien - *B. cereus*

Brilliance *Bacillus cereus* Agar



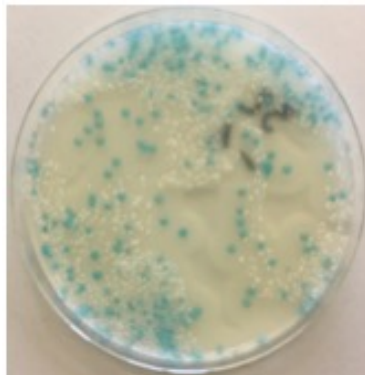
weiße Kolonien - *B. cereus* atypisch

Chromagar *Bacillus cereus* Agar



hellblaue Kolonien mit Hof - *B. cereus*,  
hellblaue Kolonien - Begleitflora

Chromagar *Bacillus cereus* Agar



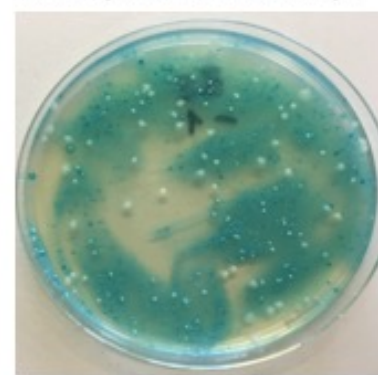
hellblaue Kolonien mit Hof - *B. cereus*,  
weiße Kolonien - Begleitflora

Chromagar *Bacillus cereus* Agar



türkis-blaue Kolonien mit Hof - *B. cereus*,  
Pin-point Kolonien im Hintergrund -  
Begleitflora

Chromagar *Bacillus cereus* Agar

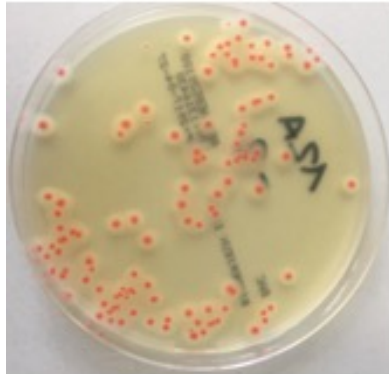


türkis-blaue pin-point Kolonien, weiße  
Kolonien  
- beides Begleitflora

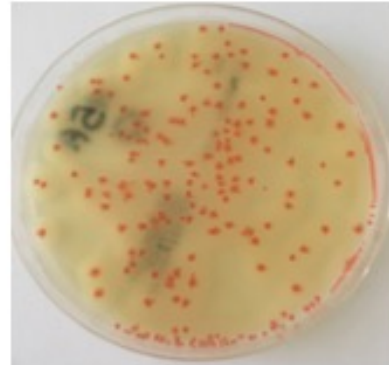
Abbildung 10: Beispiele typischer und atypischer präsumtiver *B. cereus* Kolonien und Begleitflora auf Brilliance Agar und Chromagar.

CHROMOGENE AGAR; präsumtive *B. cereus* Kolonien

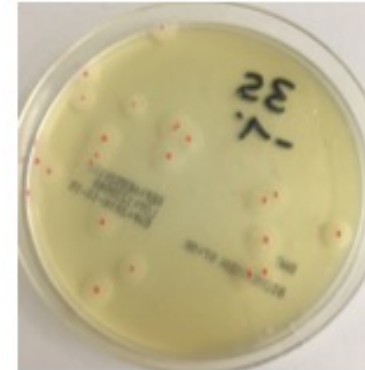
*B. cereus* Rapid Agar-BACARA



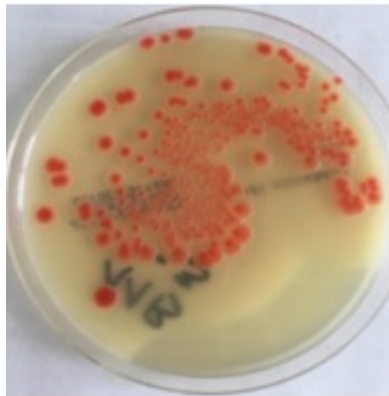
Pink-orange Kolonien mit Hof  
- *B. cereus*



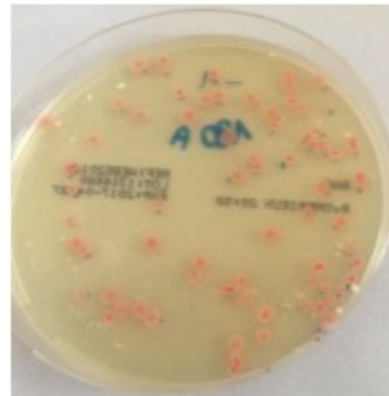
Pink-orange rhizoide Kolonien mit Hof  
- *B. cereus*



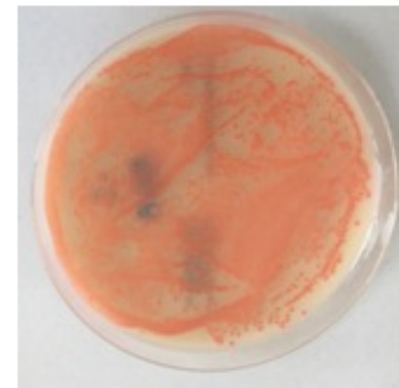
Pink-orange pin point Kolonien mit Hof  
- *B. cereus*



Pink-orange große Kolonien mit Hof  
- *B. cereus*



Pink-orange atypische Kolonien ohne Hof  
- *B. cereus*



Pink-orange pin point Kolonien mit Hof  
- *B. cereus*

Abbildung 11: Beispiele typischer und atypischer präsumtiver *B. cereus* Kolonien auf *B. cereus* Rapid Agar

#### **4. DISKUSSION & KONKLUSION**

*Bacillus cereus s. l.* verursacht Intoxikationen beim Menschen, da sein häufiges Vorkommen in der Umwelt und die Hitze- und Desinfektionsmittelresistenz seiner Sporen im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit eine ungünstige Kombination sind (CARLIN et al., 2010).

Produkte im ungewaschenen (Gemüse, Obst, Kräuter) oder vorgewaschen Zustand (Convenience Stufe V; verzehr-tischfertig), Fertiggerichte (Convenience Stufe IV; regenerierfertig; durch Aufwärmen verzehrfertig), Produkte, die der Convenience Stufe III zugeordnet werden (aufbereitetfertig; Instant-Suppen, Puddingpulver, Fertigsoßen; Kräuter und Gewürze) sowie erhitzte Milch und Milchprodukte sind häufig mit *B. cereus* belastet. Aktuelle Meldungen zeigen auch eine gewisse Belastung in diätetischen Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel (RASFF-Portal; <https://webgate.ec.europa.eu/>; eingesehen am 22.03.2021). Das emetische Toxin akkumuliert besonders in stärkereichen Produkten (MESSELHÄUSER und EHLING-SCHULZ, 2014). *B. cereus* wird bereits durch kontaminierte Rohstoffe in die Produktionskette eingetragen und lässt sich durch Lenkungspunkte (kritische Kontrollpunkte, CCPs) im HACCP Konzept wie Temperatur-Zeit Profil, pH-Wert, Wasseraktivität, Salz und/oder Zuckergehalt nicht vollkommen eliminieren. Bei kleinen Abweichungen in der Kühlkette kann *B. cereus* im Produkt (noch innerhalb des Haltbarkeitsdatums) auskeimen und sich besonders in keimarmen Produkten vermehren. Bei sporadischen *B. cereus* Ausbrüchen waren meist Faktoren wie unzureichende Kühlung, Lagerung und/oder Wiedererwärmung bei der Auskeimung von Sporen begünstigend (WEBB et al., 2019).

Ziel der vorliegenden Studie war es kommerziell erhältlichen Selektivnährmedien zum Nachweis von präsumtiven *Bacillus cereus* in Lebensmitteln (u.a. Milchprodukte; n=64; Tabelle 6) zu evaluieren.

Die Diagnostik von präsumtiven *B. cereus* auf konventionellen Selektivnährmedien (Polymyxin Eigelb Mannitol Bromothymol Blau-PEMBA und Mannit-Eigelb-Polymyxin-MYP Agar) die gemäß ISO Standards empfohlen werden ist oft fehleranfällig, besonders wenn das Laborpersonal nicht speziell auf die Bandbreite der *B. cereus* typischen und atypischen Koloniemorphologien geschult wurde (FRICKER et al., 2008). Bei hochgradigem Wachstum von Begleitflora mit Säurebildung aus Mannitol ist der für *B. cereus* typische Farbumschlag nicht sichtbar, stattdessen verfärbt sich der gesamte Agar gelb (FRICKER et al., 2008; HENDRIKSEN und HANSEN, 2011). Diese Beobachtung wurde auch in der aktuell vorliegenden Diplomarbeit gemacht: präsumtive *B. cereus* die unter einem Rasen von Mannitol-

positiver Begleitflora liegen, sind kaum in Reinkultur abnehmbar, was eine Erkennung, Bestätigung und Subtypisierung von *B. cereus* erschwert (siehe Abbildung 7). Die Bestätigung nach ISO Standard beinhaltet die Beurteilung der Hämolyse auf Schafblutagar, wobei auch hier atypische Kolonien keine  $\beta$ -Hämolyse aufweisen und eine weitere Bestätigungsreaktion inkludiert werden sollte (MESSELHÄUßER et al., 2014).

Chromogene Nährmedien bieten neue Optionen in der Identifizierung und Isolierung von präsumtiven *B. cereus*. Im ersten Ansatz wird auf die Selektivität Wert gelegt wie zum Beispiel durch den Zusatz von weiteren Supplementen wie Trimethoprim, das auch in Brilliance *Bacillus cereus* Agar von Thermofisher, Oxoid enthalten ist (HENDRIKSEN und HANSEN, 2011; KIM et al., 2013).

Die Spezifität von chromogenen Agarformen wurde eindeutig durch den Einsatz von alternativen Supplementen in Kombination mit spezifischeren chromogenen Substraten erhöht (Übersicht chromogene Substrate:

[https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/category\\_sub\\_sub!open&category=Enzyme%20Substrates-Chromogenic%20Substrates](https://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/category_sub_sub!open&category=Enzyme%20Substrates-Chromogenic%20Substrates); eingesehen am 26.03.2021).

Atypische Kolonievarianten von *B. cereus* s. l. die nicht korrekt identifizierbar waren, oder fehlendes Wachstum gezeigt haben (Selektivität) wurden aber weiterhin auf den Testmedien BCM® *B. cereus* group plating medium (BCM, Biosynth AG, Switzerland) und Brilliance *Bacillus cereus* Agar (Thermofisher, Oxoid) beschrieben (FRICKER et al., 2008; HENDRIKSEN und HANSEN, 2011). Im Gegensatz dazu zeigte Brilliance *Bacillus cereus* Agar (Thermofisher, Oxoid) in einer Studie von CHON et al. (2014) eine erhöhte Spezifität und Selektivität in Lebensmitteln mit hoher Grundkeimbelastung und wurde besonders für die quantitative Analyse empfohlen.

In einer Vergleichsanalyse von *B. cereus* Rapid Agar-BACARA (Biomerieux) und Brilliance *Bacillus cereus* Agar (Thermofisher, Oxoid) waren diese beiden Nährmedien den konventionellen Nährmedien deutlich überlegen, wobei Brilliance *Bacillus cereus* Agar in diesem Setting effizienter und selektiver für die Isolierung von *Bacillus* war (KABIR et al., 2017).

In der vorliegenden Diplomarbeit waren CHROMagar *Bacillus cereus* (Chromagar) und *B. cereus* Rapid Agar-BACARA (Biomerieux) in der Darstellung der typischen Koloniemorphologie den anderen chromogenen Agartypen und MYP Agar überlegen (Abbildung 7-10). Es gab kaum atypische *B. cereus*



die entweder Phospholipase C oder  $\beta$ -D Glukosidase (Tabelle 4) negativ waren (weiße Kolonien, oder fehlende Hofbildung um die Kolonie).

Es gibt in der Literatur immer wieder kontroversielle Ergebnisse zu den einzelnen Agartypen:

*Bacillus* ChromoSelect Agar (Synonym: HiCrome *Bacillus cereus* Agar; HiMedia; Merck KgaA) und PEMBA waren in einer Performance Testung dem MYP Agar bei der Isolierung und Identifizierung von *B. cereus* unterlegen, da hier ein klareres Koloniebild zur Quantifizierung vorlag (TEWARI et al., 2013).

Die Überlegenheit von MYP Agar im Vergleich zu *Bacillus* ChromoSelect Agar (HiMedia, Merck KgaA) und Brilliance *Bacillus cereus* Agar (Thermofisher, Oxoid) wurde auch bei einer Untersuchung von Molkerei spezifischen Proben festgestellt, wo nur wenige Sporen/ml enthalten waren, also an der methodischen Nachweisgrenze lagen (NĚMEČKOVÁ et al., 2012).

Unerwünschte Konkurrenzflora war der häufigste Störfaktor in der Quantifizierung, Isolierung und Identifizierung von präsumtiver *B. cereus* Kolonien, deshalb wurde MYP Agar mit Cefuroxim supplementiert. Dabei wurden die Konkurrenzflora in signifikant weniger Proben (70 %) im Vergleich zu der originalen MYP Agar Rezeptur (93 %) nachgewiesen (CHON et al., 2019).

In dieser Studie wurde der Ansatz verfolgt die Proben auch nach dem Einfrieren zu charakterisieren, um die potentielle Diversität der Stämme zu erfassen. Der größere Anteil der untersuchten Proben war vor dem Einfrieren auf MYP Agar positiv (67,19%; n=43/64), im Unterschied zu 54,69% (35/64) nach dem Einfrieren.

Einige Proben waren sehr gering kontaminiert, wie auch bei schon zuvor für Milch und Milchprodukte beschrieben (NĚMEČKOVÁ et al., 2012). Dieser niedrig belastete *B. cereus* Kontaminationsstatus ist nach dem Einfrieren nicht mehr methodisch nachweisbar. Deshalb sollten Lebensmittel natürlich immer im frischen, gekühlten Zustand (4 °C) unmittelbar nach Erhalt untersucht werden.

Wenn die *B. cereus* Stamm - Diversität in stärker kontaminierten Produkten erfasst werden sollten, erweist sich eine Untersuchung vor und nach dem Einfrieren wie in unserem Ansatz als durchaus hilfreich. Im Fall der „Recovery Rate“ (Wiederfindungsrate) auf einzelnen Agarnährmedien zum *B. cereus* Nachweis nach dem Einfrieren waren *Bacillus cereus* Rapid Agar-BACARA (Biomerieux) und *Bacillus cereus* CHROMagar die „Best Performer“ (57,81 und 56,25%).

Wenn konkretere Aussagen bezüglich des Risikos in bestimmten Lebensmitteln getroffen werden müssen, dann ist eine Quantifizierung und Zuordnung der *B. cereus* Gruppe Vertreter mithilfe von Subtypisierungsmethoden unabdingbar (CHAVES et al., 2017; DIETRICH et al., 2021). Dabei werden oft PCR Methoden eingesetzt. *B. cereus* Isolate können mithilfe von PCR Methoden in sieben verschiedene Toxinprofile eingeteilt werden: A (*nhe+*, *hbl+*, *cytK+*), B (*nhe+*, *cytK+*, *ces+*), C (*nhe+*, *hbl+*), D (*nhe+*, *cytK+*), E (*nhe+*, *ces+*), F (*nhe+*), und G (*cytK+*) (EHLING-SCHULZ et al., 2006).

In unserem Studien-Ansatz haben wir uns für eine weitere Subtypisierungsmethode entschieden - die Charakterisierung des *panC* Gens (enkodiert Pantothenate Synthetase). Auf diese Weise können sieben phylogenetische Hauptgruppen (I bis VII) innerhalb der *B. cereus* Gruppe identifiziert werden und eine ökologische Nische aufgrund der Wachstumsoptima zugeordnet werden (GUINEBRETIERE et al., 2008; Tabelle 5). Die thermotolerante Gruppe VII (*B. cytotoxicus*) und die mesophile Gruppe I (*B. pseudomycooides*) waren in unserem Probenstet nicht vertreten. Die zwei mesophilen Gruppen (III, IV), eine intermediäre Gruppe (V) und zwei psychrotolerante Gruppen (VI, II) waren im Probenstet vorhanden. Durch die Kombination Toxin und *panC*-Profil konnte eine Art erstes „Risk profiling“ der Isolate durchgeführt werden. Die Heterogenität der *B. cereus panC* und Toxin Kombinationen im Stammstet nahm nach dem Einfrieren, besonders in Milchproben der Hersteller H, O (Kuhmilch), Q und R (Schaf und Ziegenmilch) zu. In diesen Proben waren drei bis vier verschiedene Toxin/*panC* Gruppe Kombinationen nachweisbar (Supplemente Tabelle 3).

Nach dem Einfrieren waren in 37,50% der Proben andere *panC* und Toxin Kombinationen detektierbar als vor dem Einfrieren (Supplemente Tabelle 3). Das Toxin Gen *ces* (enkodiert das emetischen Toxin Cereulid) war in keiner Proben nachweisbar. Die *panC*/Toxin Kombination IV/A war im Probenstet am häufigsten vertreten (33,02%), gefolgt von III/F (21,70 %) und VI/C (10,38%) (Abbildung 5; Supplemente Tabelle 3). Es gab keinen klaren Trend, das bestimmte *panC* Gruppen nur in Milch und Milchprodukten vorkamen, oder in anderen Lebensmittelkategorien wie z. B. Gemüse und Früchte (Tabelle 5). Die einzige Auffälligkeit war, dass *panC* Gruppe V in Kombination mit dem Toxin Profil C (*nhe+*, *hbl+*) ausschließlich in Produkten des Herstellers M nachweisbar waren (Supplemente Tabelle 3).

Eine ähnliche Diversität der *panC* Gruppen wurde auch in der Literatur in Mehl, Kartoffelpüree, Säuglingsanfangsnahrung, Schalentieren und Molkerei Isolaten aufgezeigt (HEINI et al., 2018; HSU et al., 2021; KINDLE et al., 2019; MILLER et al., 2018a). In der phylogenetischen Studie von MILLER et al. (2018a) wurde wiederum unterstrichen, dass die Clade VI (*B. mycooides*/*B. weihenstephanensis*) bei

37°C nicht zytotoxisch war, was darauf hindeutet, dass Isolate dieser Clade weniger wahrscheinlich lebensmittelbedingte Krankheiten verursachen.

Ein vermehrter Eintrag von als Biopestizide zugelassener *B. thuringiensis* Stämme in die Lebensmittelproduktion wird berichtet (FRENTZEL et al., 2020; JOHLER et al., 2018). Dabei kann im konventionellen mikrobiologischen Ansatz bisher nicht zwischen hochpathogenen *B. cereus* Stämmen und Biopestizidstämmen unterschieden werden. Es kommt durchaus zu Grenzwertüberschreitungen (Tabelle 3) u. a. durch den Eintrag von Biopestizidstämmen und damit zu einer nicht verkehrsfähigen Probe laut EU VO 852 und 853/2004. JOHLER et al. (2018) charakterisierten *B. thuringiensis* Biopestizidstämme (Serovar *aizawai*, *kurstaki*, *israelensis*, *morrisoni*) die bis auf einen Stamm (*panC* Gruppe V) alle in die *panC* Gruppe IV clusterten.

In der milchverarbeitenden Kette kann man durch einfache Euter- und Melkhygienemaßnahmen die Sporenbelastung in der Tankmilch deutlich reduzieren (Zitzenendhygiene, Einwegreinigungstücher) (EVANOWSKI et al., 2020). Wenn Stallhygiene und Melkhygiene einen Eintrag von Sporenbildnern in die Verarbeitungskette beinhalten, kann dies zu einer Verschleppung der *B. cereus* Sporen und auch zu Persistenz in Anlagenteilen der Molkerei führen.

Biofilme werden oft als problematisch beschrieben (GOPAL et al., 2015; RADMEHR et al., 2020; KUMARI et al., 2014, HUANG et al., 2021). In roher und pasteurisierter Milch fand RADMEHR et al. in einer Studie von 2020 in 42,3 % der 97 Proben *B. cereus* spp. und davon konnten 53,7% Biofilme bilden. Das Ergebnis bei KUMARI et al. (2014) fiel ähnlich aus: 230 Milchproben und Milchprodukte wurden untersucht und mit einer Prävalenz von 33-55% wurden 144 Isolate generiert, von welchen 71% auch bei 4°C einen Biofilm bilden konnten.

In dieser Studie wurde *B. cereus* nicht nur in Milch, sondern auch in getrockneten Lebensmitteln wie Gewürze und Kräuter gefunden. Die Trocknung der Lebensmittel hat keinen Einfluss auf das Überleben der Sporen von *B. cereus* und *B. thuringiensis* (THANH et al., 2018). Wie auch in unserer Studie findet man *B. cereus* (s.l.) allerdings am häufigsten in Milch (KUMARI et al. 2014, GOPAL et al. 2015). Phenolische Substanzen, wie sie in Gewürzen und Kräutern vorkommen, und andere Lebensmittelinhaltsstoffe können eine PCR inhibieren, was einen Nachweis erschwert. Außerdem macht die widerstandsfähige Hülle der Sporen ein Freisetzen der DNA zum Nachweis mittels PCR auch schwierig. Es bedarf deshalb besonderer Probenvorbereitungen und Aufschlußverfahren, z.B. die auf „bead-based“ Technologien basieren (FRENTZEL et al., 2018; RAMARAO et al., 2020;

<https://international.neb.com/monarch/high-molecular-weight-dna-extraction> ; eingesehen am 30.03.2021). *B. cereus* Stämmen die Biofilme in Steriltanks bilden können, weisen auch eine erhöhte Toleranz gegenüber Reinigungsmittel mit Säure oder Alkali-Anteil auf (LIN et al., 2017). In unserer Studie waren die *panC* Gruppe IV und III und VI am häufigsten in Milch und Milchprodukten vertreten. Bei der *panC* Gruppe IV wäre die Differenzierung hinsichtlich der *B. thuringiensis* Biopestizidstämme sehr hilfreich um den massiven Anteil dieser Gruppe im Probenet abzuklären. Dazu sollte in weiterer Folge die Kristallbildung bei *B. thuringiensis* als Bestätigung durchgeführt werden und eine Gesamtgenomsequenzierung (FRENTZEL et al., 2020) und eine Analyse mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) folgen (BAĞCIOĞLU et al., 2019).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe (*B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, *B. wiedmannii*) können sowohl aerob wachsen als auch unter anaeroben oder sonstigen widrigen Bedingungen Sporen ausbilden.

Aufgrund der Adaptationsfähigkeit und Widerstandsfähigkeit von *B. cereus* (*s. l.*) kommt es immer wieder zu lebensmittelbedingten Intoxikationen weshalb sich diese Studie mit dem Nachweis von *B. cereus* (*s. l.*) beschäftigt. Evaluiert wurden dabei vier verschiedene kommerziell erhältliche Selektivnährmedien (*Bacillus* ChromoSelect Agar, Brilliance *Bacillus cereus* Agar, *Bacillus cereus* Rapid Agar und CHROMagar *Bacillus cereus*) im Vergleich zum Referenznährmedium (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar). Dazu wurden 64 natürlich kontaminierte Proben mikrobiologisch bearbeitet und Isolate generiert, sowohl vor als auch nach Einfrieren. Zuerst wurde mit der *gyrB* PCR die Spezies bestätigt und danach eine Subtypisierung durchgeführt: Zuordnung in *panC* Gruppen und Toxinprofiling (*ces*, *hbl*, *nhe*, *cytK* Gene).

Auf der Basis dieser PCRs wurden die generierten Isolate in *panC* Gruppen und Toxin Gen Kombinationen zugeordnet. Alle Isolate (n=241) beherbergten zumindest ein Enterotoxin Gen. Die häufigste Kombination war die der *panC* Gruppe IV und des Toxin Gen Profil A (33,02%), gefolgt von *panC* Gruppe III Toxin Profil F (21,70%) und *panC* Gruppe VI und Toxin Profil C (10,38%). In dieser Studie wurde kein *ces* Gen und keine *panC* Gruppe I und VII gefunden.

Dabei war die Hälfte der Proben (50,00%; n=32/64) sowohl vor als auch nach Einfrieren positiv, 11 (17,19%) waren nur vor und 21 (32,81%) nur nach Einfrieren positiv. Bei der Wiederfindungsrate von präsumtiven *B. cereus* war der BACARA Agar der „best performer“ mit 57,81% (entspricht 37 Proben), dicht gefolgt vom CHROMagar mit 56,25% (36 Proben). Die Heterogenität der *B. cereus panC* Gruppen und Toxin Gen Kombinationen hat nach dem Einfrieren zugenommen. Die Spezifität und Selektivität der *B. cereus* Nährmedien steigt durch den Einsatz alternativer Selektivsupplemente und chromogener Zusätze. In weiterer Folge wird eine Unterscheidung von *B. thuringiensis* Biopestizidstämmen von anderen Feldstämmen der *B. cereus* Gruppe unabdingbar, da es hier zu einer potentiell vermehrten Akkumulation in der Lebensmittelkette kommt. Dazu müssen mikro- als auch molekularbiologischen Methoden kombiniert werden und eine Risikobewertung folgen, da auch in zugelassenen *B. thuringiensis* Präparaten Enterotoxingene präsent sind.

## 6. SUMMARY

Evaluation of novel alternative agar planting media for the quantification of the food spoilage associated and pathogenic *Bacillus cereus* group.

The members of the *Bacillus cereus* group (*B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. cytotoxicus*, *B. wiedmannii*) can grow aerobically as well as form spores under anaerobic or other adverse conditions.

Due to the adaptability and resistance of *B. cereus* (s. l.), foodborne intoxications occur frequently, which is why this study deals with the detection of *B. cereus* (s. l.). Four different commercially available selective culture media (*Bacillus* ChromoSelect Agar, Brilliance *Bacillus cereus* Agar, *Bacillus cereus* Rapid Agar and CHROMagar *Bacillus cereus*) were evaluated in comparison to the reference culture medium (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar). For this purpose, 64 naturally contaminated samples were microbiologically processed and isolates were generated, both before and after freezing. First, *gyrB* gene PCR was used to confirm the species, followed by subtyping: Assignment into *panC* gene groups and toxin gene profiling (*ces*, *hbl*, *nhe*, *cytK*).

Based on these PCRs, the generated isolates were assigned into *panC* groups and toxin gene combinations. All isolates (n=241) harbored at least one enterotoxin gene. The most common combination was that of *panC* group IV and toxin gene profile A (33.02%), followed by *panC* group III toxin profile F (21.70%) and *panC* group VI and toxin profile C (10.38%). In this study, *ces* gene and *panC* group I and VII were absent in all samples.

Half of the samples (50.00%; n=32/64) were positive both before and after freezing, 11 (17.19%) were positive only before freezing and 21 (32.81%) were positive only after freezing. In detecting recovery rates, BACARA agar was the "best performer" with 57.81% (corresponding to 37 samples), closely followed by CHROMagar with 56.25% (36 samples) positive samples. The heterogeneity of *B. cereus* *panC* groups and toxin gene combinations increased after freezing. The specificity and selectivity of *B. cereus* culture media increases with the use of alternative selective supplements and chromogenic additives. Subsequently, differentiation of *B. thuringiensis* biopestid strains from other field strains of the *B. cereus* group becomes indispensable due to potentially increased accumulation in the food chain. For this purpose, microbiological as well as molecular biological methods have to be combined and a risk assessment has to follow, since enterotoxins are also present in approved *B. thuringiensis* preparations.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- ABDULMAWJOOD, A., HERRMANN, J., RIEDE, S., JIMENEZ, G., BECKER, A., BREVES, G. (2019). Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112T. *PLoS one*, 14(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214536>
- ABEE, T., GROOT, M. N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R., VAN DER VOORT, M. (2011). Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food microbiology*, 28, 199-208.
- ARUWA, C. E., OLATOPE, S. O. A. (2015). Characterization of *Bacillus* species from convenience foods with conventional and API kit method: A comparative analysis. *Journal of Applied Life Sciences International*, 42-48.
- AZIZOGLU, U. (2019). *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. *Current microbiology*, 1-7.
- BAĞCIOĞLU, M., FRICKER, M., JOHLER, S., EHLING-SCHULZ, M. (2019). Detection and identification of *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus weihenstephanensis* via machine learning based FTIR Spectroscopy. *Frontiers in microbiology*, 10, 902.
- BAZINET, A. L. (2017). Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 176.
- BENO, S. M., ORSI, R. H., CHENG, R. A., KENT, D. J., KOVAC, J., DUNCAN, D. R., MARTIN, N. H., WIEDMANN, M. (2019). Genes associated with psychrotolerant *Bacillus cereus* group isolates. *Frontiers in microbiology*, 10, 662.
- BRÜHL, C. A., DESPRES, L., FRÖR, O., PATIL, C. D., POULIN, B., TETREAU, G., ALLGEIER, S. (2020). Environmental and socioeconomic effects of mosquito control in Europe using the biocide *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis (Bti). *Science of the Total Environment*, 724. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137800>
- CARLIN, F., BRILLARD, J., BROUSSOLLE, V., CLAVEL, T., DUPORT, C., JOBIN, M., GUINEBRETIERE, M. H., AUGER, S., SOROKINE, A., NGUYEN-THÉ, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, 43(7), 1885-1894.
- CARLSON, C. J., KRACALIK, I. T., ROSS, N., ALEXANDER, K. A., HUGH-JONES, M. E., FEGAN, M., ELKIN, B. T., EPP, T., SHURY, T. K., ZHANG, W., BAGIROVA, M., GETZ, W. M., BLACKBURN, J. K. (2019). The global distribution of *Bacillus anthracis* and associated anthrax risk to humans, livestock and wildlife. *Nature microbiology*, 4(8), 1337-1343.
- CARROLL, L. M., CHENG, R. A., KOVAC, J. (2020). No Assembly Required: Using BType3 to Assess the Congruency of a Proposed Taxonomic Framework for the *Bacillus cereus* group with historical typing methods. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2285.
- CAVELLO, I., URBIETA, M. S., CAVALITTO, S., DONATI, E. (2020). *Bacillus cytotoxicus* Isolated from a Pristine Natural Geothermal Area Reveals High Keratinolytic Activity. *Microorganisms*, 8(6), 796.
- CELANDRONI, F., SALVETTI, S., GUEYE, S. A., MAZZANTINI, D., LUPETTI, A., SENESI, S., GHELARDI, E. (2016). Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. *PLoS One*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152831>

- CHAVES, J. Q., DE PAIVA, E. P., RABINOVITCH, L., VIVONI, A. M. (2017). Molecular characterization and risk assessment of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from ultrahigh-temperature and pasteurized milk marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of food protection*, 80(7), 1060-1065.
- CHON, J. W., SONG, K. Y., KIM, H., SEO, K. H. (2014). Comparison of 3 selective media for enumeration of *Bacillus cereus* in several food matrixes. *Journal of food science*, 79(12), 2480-2484.
- CHON, J. W., KIM, Y. J., KIM, D. H., SONG, K. Y., KIM, H., SEO, K. H. (2019). Supplementation of Modified Mannitol-Yolk-Polymyxin B Agar with Cefuroxime for Quantitative Detection of *Bacillus cereus* in Food. *Journal of food science*, 84(1), 133-137.
- CONTZEN, M., HAILER, M., RAU, J. (2014). Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *International journal of food microbiology*, 174, 19-22.
- DIETRICH, R., JESSBERGER, N., EHLING-SCHULZ, M., MÄRTLBAUER, E., GRANUM, P. E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98
- DOELLINGER, J., SCHNEIDER, A., STARK, T. D., EHLING-SCHULZ, M., LASCH, P. (2020). Evaluation of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Cereulide from *Bacillus cereus* Cultures. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2483.
- DREWNOWSKA, J. M., STEFANSKA, N., CZERNIECKA, M., ZAMBROWSKI, G., SWIECICKA, I. (2020). Potential enterotoxicity of phylogenetically diverse *Bacillus cereus sensu lato* soil isolates from different geographical locations. *Applied and environmental microbiology*, 86(11). <http://doi.org/10.1128/AEM.03032-19>
- DZIECIOL, M., FRICKER, M., WAGNER, M., HEIN, I., EHLING-SCHULZ, M. (2013). A novel diagnostic real-time PCR assay for quantification and differentiation of emetic and non-emetic *Bacillus cereus*. *Food control* 32, 176-185.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7), e04524.
- EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., GUINEBRETIERE, M. H., LINDBÄCK, T., ANDERSSON, M., SCHULZ, A., FRICKER, M., CHRISTIANSSON, A., GRANUM, P. E., MÄRTLBAUER, E., NGUYEN-THÉ, C., SALKINOJA-SALONEN, M., SCHERER, S. (2005). Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151, 183–197
- EHLING-SCHULZ, M., GUINEBRETIERE, M. H., MONTHÁN, A., BERGE, O., FRICKER, M., SVENSSON, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 260(2), 232-240.
- EHLING-SCHULZ, M., LERECLUS, D., KOEHLER, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Gram-Positive Pathogens*, 875-902.
- EUROPÄISCHE UNION, VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. OJ L 338, 22.12. 2005, p. 1-26.
- EUROPÄISCHE UNION, VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. ABI L 226, 25.6. 2004, p. 3.
- EUROPÄISCHE UNION, VERORDNUNG (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygiene-Vorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs. ABI L 226, 25.6. 2004, p. 22.



- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2006). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA Journal*, 4(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.94r>
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), e04634.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), e05077.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EFSA and ECDC) (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EFSA and ECDC) (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
- EVANOWSKI, R. L., KENT, D. J., WIEDMANN, M., MARTIN, N. H. (2020). Milking time hygiene interventions on dairy farms reduce spore counts in raw milk. *Journal of dairy science*, 103(5), 4088-4099.
- FAGERLUND, A., BRILLARD, J., FÜRST, R., GUINEBRETIERE, M.H., GRANUM, P.E. (2007). Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology*, 7(1), 1-8.
- FAGERLUND, A., WEEN, A., LUND, T., HARDY, S.P., GRANUM, P.E. (2004). Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology-Sgm*, 150, 2689- 2697.
- FORGHANI, F., KIM, J. B., OH, D. H. (2014). Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin-and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *Journal of food science*, 79(11), M2288-M2293.
- FRANKLAND, G. C., FRANKLAND, P. F. (1887). Studies on some new microorganisms obtained from air. *R. Soc. Lond. Philos. Trans. B Biol. Sci.*, 178, 257–287.
- FRENTZEL, H., THANH, M. D., KRAUSE, G., APPEL, B., MADER, A. (2018). Quantification and differentiation of *Bacillus cereus* group species in spices and herbs by real-time PCR. *Food Control*, 83, 99-108.
- FRENTZEL, H., JURASCHEK, K., PAULY, N., KELNER-BURGOS, Y., WICHMANN-SCHAUER, H. (2020). Indications of biopesticidal *Bacillus thuringiensis* strains in bell pepper and tomato. *International journal of food microbiology*, 321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108542>
- FRICKER, M., REISSBRODT, R., EHLING-SCHULZ, M. (2008). Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *International journal of food microbiology*, 121(1), 27-34.
- GHARIB, A. A., EL-HAMID, M. I. A., EL-AZIZ, N. K. A., YONAN, E. Y., ALLAM, M. O. (2020). *Bacillus cereus*: Pathogenicity, viability and adaptation. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 8(s1), 34-40.
- GLASSET, B., HERBIN, S., GUILLIER, L., CADEL-SIX, S., VIGNAUD, M. L., GROUT, J., PAIRAUD, S., MICHEL, V., HENNEKINNE, J. A., RAMARAO, N., BRISABOIS, A. (2016). *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in

France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterization. *Eurosurveillance*, 21(48).  
<http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917>

GLASSET, B., HERBIN, S., GRANIER, S. A., CAVALIÉ, L., LAFEUILLE, E., GUÉRIN, C., RUIMY, R., CASAGRANDE-MAGNE, F., LEVAST, M., CHAUTEMPS, N., DECOUSSER, J. W., BELOTTI, L., PELLOUX, I., ... RAMARAO, N. (2018). *Bacillus cereus*, a serious cause of nosocomial infections: epidemiologic and genetic survey. *PLoS One*, 13(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>

GOPAL, N., HILL, C., ROSS, P. R., BERESFORD, T. P., FENELON, M. A., COTTER, P. D. (2015). The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Frontiers in microbiology*, 6, 1418.

GRIFFITHS, M. W., SCHRAFT, H. (2017). *Bacillus cereus* food poisoning. *Foodborne diseases*, 395-405.

GUINEBRETIERE, M. H., NGUYEN-THÉ, C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS microbiology ecology*, 43, 207-215.

GUINEBRETIERE, M.H., THOMPSON, F.L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M., DE VOS, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 10, 851-865.

GUINEBRETIERE, M.H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M.L., NGUYEN-THE, C. (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 3388-3391.

GUINEBRETIERE, M. H., AUGER, S., GALLERON, N., CONTZEN, M., DE SARRAU, B., DE BUYSER, M. L., LAMBERET, G., FAGERLUND, A., GRANUM, P. E., LERECLUS, D., DE VOS, P., NGUYEN-THÉ, C., SOROKIN, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(1), 31-40.

HA, M., JO, H. J., CHOI, E. K., KIM, Y., KIM, J., CHO, H. J. (2019). Reliable Identification of *Bacillus cereus* Group Species Using Low Mass Biomarkers by MALDI-TOF MS. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 29(6), 887-896.

HEINI, N., STEPHAN, R., EHLING-SCHULZ, M., JOHLER, S. (2018). Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 59-64.

HENDRIKSEN, N. B., HANSEN, B. M. (2011). Diagnostic properties of three conventional selective plating media for selection of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*. *Folia microbiologica*, 56(6), 535-539.

HSU, T. K., TSAI, H. C., HSU, B. M., YANG, Y. Y., & CHEN, J. S. (2021). Prevalence, enterotoxin-gene profiles, antimicrobial resistance, and genetic diversity of *Bacillus cereus* group in aquatic environments and shellfish. *Science of The Total Environment*, 758. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143665>

HUANG, Y., FLINT, S. H., YU, S., DING, Y., PALMER, J. S. (2021). Phenotypic properties and genotyping analysis of *Bacillus cereus* group isolates from dairy and potato products. *LWT*, 140.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110853>

ISO 7932:2004

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren zur Auszählung von mutmaßlichem *Bacillus cereus* – Kolonieverfahren bei 30 Grad C. (International Organ, Genf, Schweiz)

- JHA, N. K., NARAYAN, K. G. (1995). Biotyping of *Bacillus cereus* isolates. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 32(3), 231-232.
- JOHLER, S., KALBHENN, E. M., HEINI, N., BRODMANN, P., GAUTSCH, S., BAĞCIOĞLU, M., CONTZEN, M., STEPHAN, R., EHLING-SCHULZ, M. (2018). Enterotoxin production of *Bacillus thuringiensis* isolates from biopesticides, foods, and outbreaks. *Frontiers in microbiology*, 9, 1915.
- JOUZANI, G. S., VALIJANIAN, E., & SHARAFI, R. (2017). *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(7), 2691-2711.
- KABIR, M. S., HSIEH, Y. H., SIMPSON, S., KERDAHI, K., SULAIMAN, I. M. (2017). Evaluation of two standard and two chromogenic selective media for optimal growth and enumeration of isolates of 16 unique *Bacillus* species. *Journal of food protection*, 80(6), 952-962.
- KINDLE, P., ETTER, D., STEPHAN, R., JOHLER, S. (2019). Population structure and toxin gene profiles of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from flour products. *FEMS microbiology letters*, 366(20).  
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnz240>
- KIM, D. H., KIM, H., CHON, J. W., MOON, J. S., SONG, K. Y., SEO, K. H. (2013). Development of blood–yolk–polymyxin B–trimethoprim agar for the enumeration of *Bacillus cereus* in various foods. *International journal of food microbiology*, 165(2), 144-147.
- KRÖMKER, V. (2006). *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene*. Georg Thieme Verlag.
- KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C., TAMURA, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- KUMARI, S., SARKAR, P. (2014). Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. *Dairy Science & Technology*. 94 (5), 483-497.
- LABBÉ, R. G., GARCÍA, S. (2013). *Guide to foodborne pathogens*. Wiley Blackwell.
- LIN, Y., REN, F., ZHAO, L., GUO, H. (2017). Genotypes and the persistence survival phenotypes of *Bacillus cereus* isolated from UHT milk processing lines. *Food Control*, 82, 48-56.
- LINDBÄCK, T., GRANUM, P. E. (2015). *Bacillus cereus* phospholipases, enterotoxins, and other hemolysins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, 839.
- LIU, Y., DU, J., LAI, Q. L., ZENG, R. Y., YE, D. Z., XU, J., SHAO, Z. Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2499-2508.
- LIU, Y., LAI, Q. L., GOKER, M., MEIER-KOLTHOFF, J. P., WANG, M., SUN, Y. M., WANG, L., SHAO, Z. Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* 5, 11.
- LIU, Y., LAI, Q., SHAO, Z. (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 106-112.
- MCDOWELL, R. H., SANDS, E. M., FRIEDMAN, H. (2019). *Bacillus cereus*. StatPearls Publishing.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>

MENDOZA-ALMANZA, G., ESPARZA-IBARRA, E. L., AYALA-LUJÁN, J. L., MERCADO-REYES, M., GODINA-GONZÁLEZ, S., HERNÁNDEZ-BARRALES, M., OLMOS-SOTO, J. (2020). The Cytocidal Spectrum of *Bacillus thuringiensis* Toxins: From Insects to Human Cancer Cells. *Toxins*, 12(5), 301.

MESSELHÄÜßER, U., EHLING-SCHULZ, M. (2014). *Bacillus cereus: Vorkommen, Nachweis und Präventionsstrategien*. 2. Aufl., Behr's Verlag DE.

MILLER, R.A., BENO, S.M., KENT, D.J., CARROLL, L.M., MARTIN, N.H., BOOR, K.J., KOVAC, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 4744-4753.

MILLER, R. A., JIAN, J., BENO, S. M., WIEDMANN, M., KOVAC, J. (2018a). Intraclade variability in toxin production and cytotoxicity of *Bacillus cereus* group type strains and dairy-associated isolates. *Applied and environmental microbiology*, 84(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-17>

MILLER, R. A., JIAN, J., BENO, S. M., WIEDMANN, M., & KOVAC, J. (2018b). Genomic and phenotypic characterization of type strains and dairy-associated isolates in the *Bacillus cereus* group indicates considerable intra-clade variability in toxin production and cytotoxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-17>

NĚMEČKOVÁ, I., SOLICHOVÁ, K., ROUBAL, P., UHROVA, B., ŠVIRÁKOVÁ, E. (2012). Methods for detection of *Bacillus* sp., *B. cereus*, and *B. licheniformis* in raw milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(Special Issue), 55-60.

ODEYEMI, O. A., ALEGBELEYE, O. O., STRATEVA, M., STRATEV, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311-331.

PATIÑO-NAVARRETE, R., SANCHIS, V. (2017). Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Research in Microbiology*, 168(4), 309-318.

PAUKER, V. I., THOMA, B. R., GRASS, G., BLEICHERT, P., HANCZARUK, M., ZÖLLER, L., ZANGE, S. (2018). Improved discrimination of *Bacillus anthracis* from closely related species in the *Bacillus cereus sensu lato* group based on matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 56(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.01900-17>

PILO, P., FREY, J. (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infection, genetics and evolution*, 64, 115-125.

PORCELLATO, D., NARVHUS, J., SKEIE, S. B. (2016). Detection and quantification of *Bacillus cereus* group in milk by droplet digital PCR. *Journal of microbiological methods*, 127, 1-6.

RADMEHR, B., ZAFERANLOO, B., TRAN, T., BEALE, D. J., PALOMBO, E. A. (2020). Prevalence and Characteristics of *Bacillus cereus* Group Isolated from Raw and Pasteurised Milk. *Current Microbiology*, 77(10), 3065-3075.

RAMARAO, N., TRAN, S. L., MARIN, M., VIDIC, J. (2020). Advanced Methods for Detection of *Bacillus cereus* and Its Pathogenic Factors. *Sensors*, 20(9), 2667.

ROUZEAU-SZYNALSKI, K., STOLLEWERK, K., MESSELHÄÜßER, U., EHLING-SCHULZ, M. (2020). Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food microbiology*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103279>

- SÁNCHEZ-CHICA, J., CORREA, M. M., ACEVES-DIEZ, A. E., CASTAÑEDA-SANDOVAL, L. M. (2020). A novel method for direct detection of *Bacillus cereus* toxin genes in powdered dairy products. *International Dairy Journal*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104625>
- SCHUBERT, S., WIESER, A. (2010). MALDI-TOF in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOSpektrum*, 16, 760-762.
- SCHWENK, V., RIEGG, J., LACROIX, M., MÄRTLBAUER, E., JESSBERGER, N. (2020). Enteropathogenic Potential of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil, Animals, Food and Biopesticides. *Foods*, 9(10), 1484.
- SOUFIANE, B., CÔTÉ, J. C. (2013). *Bacillus weihenstephanensis* characteristics are present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *FEMS microbiology letters*, 341(2), 127-137.
- STEVENS, M. J. A., TASARA, T., KLUMPP, J., STEPHAN, R., EHLING-SCHULZ, M., JOHLER, S. (2019). Whole-genome-based phylogeny of *Bacillus cytotoxicus* reveals different clades within the species and provides clues on ecology and evolution. *Scientific reports*, 9(1) 1-14.
- TAKAHASHI, N., NAGAI, S., FUJITA, A., IDO, Y., KATO, K., SAITO, A., MORIYA, Y., TOMIMATSU, Y., KANETA, N., TSUJIMOTO, Y., TAMURA, H. (2020). Discrimination of psychrotolerant *Bacillus cereus* group based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal subunit proteins. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103542>
- TAMURA, K., NEI, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- THANH, M. D., FRENTZEL, H., FETSCH, A., KRAUSE, G., APPEL, B., MADER, A. (2018). Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. *Food Control*, 83, 75-84.
- TEWARI, A., SINGH, S. P., SINGH, R., KUMAR, D. (2013). Comparison of a new chromogenic medium with standard media for isolation and identification of *Bacillus cereus*. *Eurasian J. Vet. Sci*, 29(1), 39-42.
- TIRLONI, E., GHELARDI, E., CELANDRONI, F., BERNARDI, C., STELLA, S. (2017). Effect of dairy product environment on the growth of *Bacillus cereus*. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7026-7034.
- TÖPEL, A. (2015). *Chemie und physik der milch*. Behr's Verlag DE.
- TSILIA, V., DEVREESE, B., DE BAENST, I., MESUERE, B., RAJKOVIC, A., UYTENDAELE, M., VAN DE WIELE, T., HEYNDRIKX, M. (2012). Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(6-7), 1691-1702.
- VIDIC, J., CHAIX, C., MANZANO, M., HEYNDRIKX, M. (2020). Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. *Biosensors*, 10(3), 15.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A., HIGUCHI, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10, 506-513.
- WEBB, M. D., BARKER, G. C., GOODBURN, K. E., PECK, M. W. (2019). Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in food science & technology*, 93, 94-105.
- WEI, S., CHELLIAH, R., PARK, B. J., PARK, J. H., FORGHANI, F., PARK, Y. S., CHO, M. S., PARK, D. S., OH, D. H. (2018). Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimbab) using quantitative real-time PCR targeting groEL and gyrB. *Microbial pathogenesis*, 115, 312-320.

## 8. SUPPLEMENTE

**Tabelle 1:** Geräte und Verbrauchsmaterialien.

BEZEICHNUNG	ERZEUGER/DISTRIBUTOR
I. Geräte	
Elektrophorese-Unit	Bio-Rad Laboratories GsmBH, Hercules, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Korneuburg, Österreich
Gefriertruhe -80 °C	Sanyo, Morigushi, Japan
GelDoc 2000 UV-Kamera	Bio-Rad Laboratories GesmbH, Hercules, USA
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ika® Vortex Genius 3	Ika® -Werke GmbH CO. KG, Staufen, Deutschland
Inkubator 30 °C	Ehret, Emmendingen, Deutschland
Inkubator Friocell 7 °C	MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, München, Deutschland
Messzylinder 100 ml	Tempelmann GmbH & Co KG, Hagen, Deutschland
Milli-Q Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mini-Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipetten 1-1000 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GesmbH, Hercules, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
II. Verbrauchsmaterialien	
10 ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
100 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
10 x PCR Rxn Puffer (-MgCl <sub>2</sub> )	Firma Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
10 x Trishydroxymethylaminomethan(Tris)-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	Institut für Milchhygiene, VUW, Wien, Österreich
Aqua bidestillata	Milli-Q Integral Wasseraufbereitungssystem
Bacara Agar	Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Borsäure	VWR International GmbH, Radnor, USA
Brain-Heart-Infusion-Broth	Oxoid Limited, Hampshire, UK
Brilliance <i>Bacillus cereus</i> Agar	Oxoid Limited, Hampshire, UK
Chelexlösung	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA

**Tabelle 1 fortgeführt:** Geräte und Verbrauchsmaterialien.

BEZEICHNUNG	ERZEUGER/DISTRIBUTOR
II. Verbrauchsmaterialien	
CHROMagar <i>Bacillus cereus</i>	Chromagar, Paris, Frankreich
Columbia-Schafblutagar	Oxoid Limited, Hampshire, UK
Cryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
DEPC treated water (Aqua dest.)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
dNTP Mix 20 mM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Eppendorff-Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
HiCrome <i>Bacillus</i> Agar	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Impfösen 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Latex-Handschuhe	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) Agar	Oxoid Limited, Hampshire, UK
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Firma Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Erlangen, Deutschland
peqGreen	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Platinum <sup>®</sup> Taq DNA Polymerase	Firma Invitrogen - Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
Primer	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SafeSeal SurPhob Pipettenspitzen 1-1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Sample Loading Buffer (SLB)	Institut für Milchhygiene, VUW, Wien, Österreich
Tris HCl	Sigma-Aldrich Co. LCC, St. Louis, USA
Trypton-Soja Agar mit 6% Hefe	Oxoid Limited, Hampshire, UK

**Supplemente Tabelle 2:** Tabelle der natürlich kontaminierten Proben (n=64) zur Darstellung der Übereinstimmungen beim *Bacillus cereus* Nachweis vor und nach Einfrieren auf Bacara Agar, CHROMagar, Brilliance Agar, ChromoSelect Agar und Mannitol Egg Yolk Polymyxin-Agar.

Proben ID	Hersteller	Kategorie	Probe	VE-MYP	NE-MYP	NE-HI	NE-BRI	NE-CH	NE-BA	Übereinstimmung
42	H	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1	1	6
71	I	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1	1	6
84	J	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1	1	6
85	K	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1	1	6
120, 123, 129, 131, 132	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1	1	6
45	Q	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM	1	1	1	1	1	1	6
78, 88, 100	Q	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM	1	1	1	1	1	1	6
44, 67	R	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM	1	1	1	1	1	1	6
12	J	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM		1	1	1	1	1	5
139	K	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM		1	1	1	1	1	5
125, 128	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1	1	1		5
43	R	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM	1	1	1	1	1		5
65	R	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM	1	1	1	1		1	5
66	R	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM	1	1	1	1	1		5
36	B	Krebstiere und Erzeugnisse	Flusskrebse getrocknet	1	1			1	1	4
40	F	Gemüse und Früchte	Goji-Beeren		1		1	1	1	4
34	G	Gemüse und Früchte	Galanga-Wurzel		1		1	1	1	4
4	H	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1		1		4
141	K	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM		1	1	1	1		4
6	P	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM		1		1	1	1	4
5	Q	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM			1	1	1	1	4
75	A	Kakao und Kakaozubereitungen, Kaffee und Tee	Vietnamesischer grüner Tee	1		1			1	3
37	D	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrocknet, gesalzene Sardellen				1	1	1	3
33	F	Gemüse und Früchte	Bohnen sprossen				1	1	1	3
41	G	Samen und Nüsse	Granatapfelkerne		1			1	1	3



**Supplemente Tabelle 2 fortgeführt:** Tabelle der natürlich kontaminierten Proben (n=64) zur Darstellung der Übereinstimmungen beim *Bacillus cereus* Nachweis vor und nach Einfrieren auf Bacara Agar, CHROMagar, Brilliance Agar, ChromoSelect Agar und Mannitol Egg Yolk Polymyxin-Agar.

Proben ID	Hersteller	Kategorie	Probe	VE-MYP	NE-MYP	NE-HI	NE-BRI	NE-CH	NE-BA	Übereinstimmung
17	J	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM		1		1	1		3
13	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM			1	1		1	3
72	O	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1	1				3
11-C	R	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM				1	1	1	3
35	C	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrockneter Eidechsenfisch	1					1	2
66	E	Fisch und Fischereierzeugnisse	getrocknet, gesalzene Sardellen	1					1	2
47	G	Samen und Nüsse	Gemahlene Egussi	1					1	2
16	J	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM				1	1		2
15	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1			1			2
127, 130	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1	1					2
1	R	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM	1					1	2
8, 9	R	Milch und Milchprodukte	Schaf-PM			1			1	2
11-A	R	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM	1					1	2
32	E	Gemüse und Früchte	Pandanblätter					1		1

**Supplemente Tabelle 2 fortgeführt:** Tabelle der natürlich kontaminierten Proben (n=64) zur Darstellung der Übereinstimmungen beim *Bacillus cereus* Nachweis vor und nach Einfrieren auf Bacara Agar, CHROMagar, Brilliance Agar, ChromoSelect Agar und Mannitol Egg Yolk Polymyxin-Agar.

Proben ID	Hersteller	Kategorie	Probe	VE-MYP	NE-MYP	NE-HI	NE-BRI	NE-CH	NE-BA	Übereinstimmung
32	E	Gemüse und Früchte	Pandanblätter					1		1
38	E	Gemüse und Früchte	Tamarindenpaste, feucht		1					1
105	F	Kräuter und Gewürze	Korianderpulver	1						1
70	H	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1						1
11-D	I	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM					1		1
41	I	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1						1
27, 64	K	Milch und Milchprodukte	RM-bactofuge	1						1
73, 74, 75	L	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1						1
2	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM						1	1
76	M	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1						1
68, 77	N	Milch und Milchprodukte	Kuh-PM	1						1
11-B	R	Milch und Milchprodukte	Ziege-PM		1					1
<b>SUMME</b>				<b>43</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	<b>34</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	

Legende: PM: pasteurisiert, ESL: extended shelf life, HP: hocherhitzt, MIKROFILT.: mikrofiltriert, NHOMOG.: nicht homogenisiert, RM: Rohmilch. NE: nach Einfrieren, VE: vor Einfrieren, BA: Bacara Agar, CH: CHROMagar, BRI: Brilliance Agar, HI: ChromoSelect Agar, MYP: Mannitol Egg Yolk Polymyxin-Agar. Gelb: vor und nach Einfrieren auf Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar positiv, Grün: vor Einfrieren auf Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar positiv, Blau: nach Einfrieren auf Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar positiv.

**Supplemente Tabelle 3:** Probentabelle mit Darstellung der *panC* und Toxin Kombinationen der isolierten *Bacillus cereus* Kolonien vor und nach Einfrieren.

Proben	Proben ID	Hersteller	VE	VE	VE	VE	VE	VE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Vietnamesischer grüner Tee	75	A			IV/A							IV/A			
Flusskrebse getrocknet	36	B		III/F						III/C					
getrockneter Eidechsenfisch	35	C		III/F						III/F					
getrocknet, gesalzene Sardellen	37	D									IV/A			VI/C	
getrocknet, gesalzene Sardellen	66	E		III/D						III/D					
Pandanblätter	32	E								III/F					
Tamarindenpaste, feucht	38	E								III/F					
Korianderpulver	105	F			IV/A										
Bohnensprossen	33	F									IV/A	IV/D			
Goji-Beeren	40	F									IV/A	IV/D			
Granatapfelkerne	41	G							II/C						
Gemahlene Egussi	47	G		III/D						III/D					
Galanga-Wurzel	34	G								III/F		IV/D			
Kuh-PM	4	H							II/C		IV/A				
Kuh-PM	42	H	II/F		IV/A	VI/A					IV/A			VI/C	
Kuh-PM	70	H	II/F					VI/C							
Kuh-PM	11-D	I									IV/A				
Kuh-PM	41	I					VI/C								
Kuh-PM	71	I					VI/C							VI/C	
Kuh-PM	12	J							II/F		IV/A				
Kuh-PM	16	J							II/F		IV/A				
Kuh-PM	17	J												VI/C	
Kuh-PM	84	J			IV/A						IV/A				
RM-bactofuge	27	K			III/F										
Butter milk	64	K			III/F										

**Supplemente Tabelle 3 fortgeführt:** Probentabelle mit Darstellung der *panC* und Toxin Kombinationen der isolierten *Bacillus cereus* Kolonien vor und nach Einfrieren.

Proben	Proben ID	Hersteller	VE	VE	VE	VE	VE	VE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Kuh-PM	85	K			IV/A										VI/C
Kuh-PM	139	K										IV/A			
Kuh-PM	141	K										IV/A			
Kuh-PM	73	L	II/C												
Kuh-PM	74	L						VI/C							
Kuh-PM	75	L			IV/A										
Kuh-PM	2	M										IV/A			
Kuh-PM	13	M										IV/A			
Kuh-PM	15	M						VI/C							VI/C
Kuh-PM	76	M				VI/A									
Kuh-PM	120	M		III/F								IV/A			
Kuh-PM	123	M		III/F					III/F						
Kuh-PM	125	M			IV/A							IV/A			
Kuh-PM	127	M		III/D											VI/F
Kuh-PM	128	M			IV/A								V/C		
Kuh-PM	129	M			IV/A							IV/A			
Kuh-PM	130	M				V/C						IV/A			
Kuh-PM	131	M		III/F						III/F					
Kuh-PM	132	M		III/F						III/F					
Kuh-PM	68	N	II/F												
Kuh-PM	77	N	II/C												
Kuh-PM	72	O	II/C		IV/A			VI/F	II/F						VI/F

**Supplemente Tabelle 3 fortgeführt:** Probentabelle mit Darstellung der *panC* und Toxin Kombinationen der isolierten *Bacillus cereus* Kolonien vor und nach Einfrieren.

Proben	Proben ID	Hersteller	VE	VE	VE	VE	VE	VE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Ziege-PM	6	P								III/F	IV/A				
Schaf-PM	5	Q								III/F	IV/A				
Ziege-PM	45	Q		III/F	VI/A					III/F	IV/A				
Schaf-PM	78	Q			VI/A					III/F	IV/A				
Schaf-PM	88	Q						VI/C		III/F	IV/A				
Schaf-PM	100	Q		III/F						III/F					
Schaf-PM	1	R	II/C						II/C						
Schaf-PM	8	R								III/F	IV/A				
Ziege-PM	9	R								III/F	IV/A				
Ziege-PM	43	R			VI/A				II/F		IV/A				
Schaf-PM	44	R			VI/A					III/F	IV/A				
Ziege-PM	65	R	II/F		IV/A				II/F	III/F	IV/A				
Schaf-PM	66	R	II/F						II/F	III/F	IV/A				
Schaf-PM	67	R	II/F								IV/A				
Ziege-PM	11-A	R	II/C												
Ziege-PM	11-B	R							II/C						
Ziege-PM	11-C	R							II/C	III/F					

Legende: II, *panC* Gruppe II (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 7^\circ\text{C}$ ); III, *panC* Gruppe III (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 15^\circ\text{C}$ ); IV, *panC* Gruppe IV (stark zytotoxisch, Wachstum  $\geq 10^\circ\text{C}$ ); V, *panC* Gruppe V (wenig zytotoxisch, Wachstum  $\geq 8^\circ\text{C}$ ); VI, *panC* Gruppe VI (nicht oder wenig zytotoxisch; Wachstum  $\geq 5^\circ\text{C}$ ); Toxin Profil A (*nhe*, *hbl*, *cytK* Gen positiv); Toxin Profil C (*nhe*, *hbl* Gen positiv), Toxin Profil D (*nhe*, *cytK* Gen positiv), Toxin Profil F (*nhe* Gen positiv).

PM: pasteurisiert, ESL: extended shelf life, HP: hocherhitzt, MIKROFILT.: mikrofiltriert, NHOMOG.: nicht homogenisiert, RM: Rohmilch.

NE: nach Einfrieren, VE: vor Einfrieren.