

# *Bacillus cereus* in pasteurisierter Trinkmilch aus Berggebieten



**Rotholz 50a - 6200 Rotholz - Österreich**

☎ +43 (0)5244 62262    📠 +43 (0)5244 62262 29

direktion@rotholz.lebensministerium.at - <http://www.bam-rotholz.at>

**Bundesanstalt für Alpenländische Milchwirtschaft Rotholz**

**Abschlussbericht zu Projekt**  
**BAM 20W/00**  
*Bacillus cereus* in  
**pasteurisierter Trinkmilch aus Berggebieten**

**Projektleiter: Dr. F. Eliskases-Lechner**

**Laufzeit: 2000 bis 2002**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung von <i>B. cereus</i> in pasteurisierter Trinkmilch .....	1
1.2	Risiko-Analyse von <i>B. cereus</i> in pasteurisierter Trinkmilch (Notermans et al. 1997, Notermans 1997).....	3
1.3	Vorkommen in der Rohmilch und pasteurisierter Milch und Kontaminationsquellen.....	5
1.4	Taxonomie und physiologische Eigenschaften .....	7
1.5	Problemstellung .....	9
2	Material und Methodik .....	10
2.1	Probenmaterial.....	10
2.2	Untersuchungsparameter .....	11
2.2.1	Nachweis präsumtiver <i>B. cereus</i> – Koloniezählverfahren.....	11
2.2.2	Nachweis präsumtiver <i>B. cereus</i> - Selektive Anreicherung bei 30 °C .....	11
2.2.3	Nachweis präsumtiver <i>B. cereus</i> - Selektive Anreicherung bei 6 °C .....	11
2.2.4	Unterscheidung zwischen psychrotoleranten und mesophilen Stämmen der <i>B. cereus</i> Gruppe (nach Francis et al. 1998)....	12
2.2.5	Sensorische Analyse .....	13
2.2.6	Temperaturmessung in Haushaltskühlschränken .....	13
3	Ergebnisse.....	14
3.1	Frisch pasteurisierte Milch .....	14
3.1.1	MPN 30 °C .....	14
3.1.2	MPN 6 °C .....	14
3.2	Lagerung bis zum MHD .....	15
3.2.1	Lagerung bei 6 °C.....	15
3.2.2	Lagerung bei 9°C.....	15
3.3	Sensorische Beurteilung .....	18

---

3.4	Durchschnittliche Lagerungstemperatur im Haushalt .....	18
4	Diskussion .....	21
5	Zusammenfassung .....	23
6	Literatur .....	24
7	Anhang: Methodenvergleich .....	27
7.1	Einleitung.....	27
7.2	Material und Methodik .....	27
7.3	Ergebnisse und Diskussion.....	28
7.4	Literatur .....	29

---

## 1 Einleitung

### 1.1 Bedeutung von *B. cereus* in pasteurisierter Trinkmilch

*Bacillus cereus* zählt zu den regelmäßigen Kontaminanten von Milch und kann, vor allem in pasteurisierter Milch oder pasteurisiertem Rahm, Verderberscheinungen verursachen. Die proteolytischen und lipolytischen Enzyme von *B. cereus* rufen Geschmacksfehler, Süßgerinnung und das Ausflocken von Rahm hervor und begrenzen damit die Haltbarkeit. Durch die lipolytische Aktivität wird mittels Lecithinase eine Koagulation des Fettes durch Schädigung der Fettkügelchenmembran bewirkt. Die proteolytische Aktivität von *B. cereus* führt zu einer labartigen Dicklegung durch Abbau des Kaseins, wobei Peptide, Aminosäuren, biogene Amine und Ketosäuren entstehen (Meer et al. 1991).

Neben den organoleptischen Veränderungen können bei Keimzahlen von  $> 10^6/g$  in Lebensmitteln Toxine gebildet werden, die beim Menschen Durchfall, Erbrechen und Kopfschmerzen verursachen. Der Tabelle 1 sind die verschiedenen Varianten von Toxinen bei *B. cereus* zu entnehmen, es kann zwischen „emetischen-“ und „Diarrhoe-Stämmen“ unterschieden werden (zitiert nach Hammer et al. 2001, Notermans und te Giffel, 2000). Das Krankheitsbild Erbrechen wird besonders häufig nach dem Konsum von kontaminiertem Reis und Teigwaren hervorgerufen. Bei Verzehr von kontaminierten Produkten wie Fleisch und Fleischerzeugnissen, Suppen, Gemüse, Pudding, Vanillesoße sowie Milch und Milchprodukten ist hingegen Durchfall das Leitsymptom (Notermans und te Giffel, 2000).

Die Bedingungen zur Toxinproduktion von *B. cereus* in Milch sind aufgrund der Nährstoffzusammensetzung (niedriger Gehalt an freien Aminosäuren, Abwesenheit von Glucose) und der ungenügenden Sauerstoffzufuhr generell nicht günstig. Trotzdem sind Lebensmittelvergiftungen durch *B. cereus* in pasteurisierter Milch relevant. Wiederholt wurde berichtet, daß Erkrankungen durch den Genuss von mit *B. cereus* kontaminierter Milch hervorgerufen worden sind (zitiert nach Notermans 1997). Weiters muss berücksichtigt werden, dass eine Toxinbildung im Dünndarm nach Kolonisation mit toxinbildenden Stämmen erfolgen kann. Vergiftungen werden jedoch selten berichtet, weil nur vereinzelte Ausbrüche in Haushalten vorkommen, relativ milde Symptome

auftreten und keine Zurückverfolgung auf bestimmte Lebensmittel erfolgt (Andersson et al. 1995).

Tabelle 1: Bisher bekannte *B. cereus*-Toxine (modifiziert nach Beutling et al. 1998)

Toxintyp		Eigenschaften	Referenz
<b>Diarrhoe Toxine</b> Inkubationszeit 8 – 16 h, Infektionsdosis: $10^5$ - $10^7$ (total), Klassische Diarrhoe-  Stämme bauen Stärke ab, Bildung im Dünndarm des Wirtes und im Lebensmittel	Enterotoxin (ET)	eine Komponente, nicht hämolytisch inaktivierbar durch Trypsin, Pepsin, niedrigen pH, hitzelabil	Shinagawa et al. (1991)
	Haemolysin BL	3teiliger Komplex (B, L <sub>1</sub> , L <sub>2</sub> ), nur Komplex ist toxisch, Einzelproteine atoxisch B: 38,0 kDa, kodiert durch <i>hblA</i> Gen L <sub>1</sub> , 38,5 kDa, kodiert durch <i>hblC</i> Gen L <sub>2</sub> 43,2 kDa, kodiert durch <i>hblD</i> Gen hämolytisch	Beecher et al. (1994)
	Enterotoxin T	eine Komponente 41,0 kDa, kodiert durch <i>bceT</i> Gen	Agata et al. (1995)
	nicht hämolytisches Enterotoxin (NHE)	3-Komponenten Toxin Komp. 1: 39,0 kDa Komp. 2: 45,0 kDa Komp. 3: 10,5 kDa nicht hämolytisch	Lund et al. (1996)
<b>Emetische Toxine</b> Inkubationszeit 1–5h,  stabil gegenüber Hitze, proteolytischen Enzymen, niedrigem pH, Infektionsdosis: höhere  Keimzahl als bei Diarrhoe Toxinen notwendig: $10^5$ - $10^8$ /g, meist ca. $10^9$ /g, im Lebensmittel präformiert.	Emetisches Toxin	eine Komponente	Melling et al. (1976)
	HEp-2 Vakuolisierungsfaktor	eine Komponente, Vakuolenbildung in HEp-2 Zellen, Erbrechen bei Rhesusaffen	Shinagawa et al. (1992, 1995)
	Cereulid	eine Komponente, 1,2 kDa, zyklisches Dodecadepsipeptid, Vakuolenbildung in HEp-2 Zellen	Agata et al. (1994, 1995)

## 1.2 Risiko-Analyse von *B. cereus* in pasteurisierter Trinkmilch (Notermans et al. 1997, Notermans 1997)

### Risiko-Bestimmung

1. Identifizierung der Gefahren (Identifizierung ob *B. cereus* in pasteurisierter Trinkmilch gesundheitsschädliche Effekte verursachen kann): Erkrankungen, die durch den Genuß von mit *B. cereus* kontaminierter Milch hervorgerufen worden sind, wurden gemeldet. Es hat sich erwiesen, dass *B. cereus* in Milch die Fähigkeit hat, sich leicht zu vermehren und Enterotoxin zu bilden. Weiters hat sich gezeigt, dass Enterotoxin unter jeglichen Wachstumsbedingungen produziert wird. Das heißt, dass *B. cereus* in pasteurisierter Trinkmilch eine Gefahr darstellt: Der Mensch kann potentiell erkranken.
2. Charakterisierung der Gefahren und Dosis-Effekt-Beziehung (Evaluierung der Natur der gesundheitsschädlichen Einflüsse und quantitative Information über die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung nach Exposition mit *B. cereus*): Nach einer Inkubationszeit von 8 – 16 Stunden treten beim Diarrhoe-Toxintyp Bauchschmerzen, wässriger Durchfall, selten Übelkeit und Erbrechen auf. Die Symptome verschwinden wieder nach 12 – 24 h. Von epidemiologischen Analysen lebensmittelbedingter Erkrankungen durch *B. cereus* kann abgeleitet werden, dass Keimzahlen von größer  $10^4$  bis  $10^9$  / Gramm Lebensmittel zu Erkrankungen führen.
3. Gefahrenexposition (Bestimmung der Zahl an *B. cereus* denen der Konsument zum Zeitpunkt der Konsumation der pasteurisierten Milch ausgesetzt ist): Durch Lagerexperimente mit anschließender Bestimmung der Keimzahl von *B. cereus* und Umfrage unter Konsumenten werden die Lagerbedingungen der Milch und das Konsumverhalten aufgezeigt. So zeigte sich in den Niederlanden, dass pasteurisierte Milch 2 bis 13 Tage nach Herstellung konsumiert wird und die Lagertemperaturen von unter +5 °C bis +13 °C variieren. Daraus ergibt sich, dass 7 % der konsumierten Milch über  $10^5$  bzw. 4 % über  $10^6$  *B. cereus*/ml aufweist.
4. Risiko - Charakterisierung (Quantitative Bestimmung der Zahl der Erkrankungen nach dem Genuss von pasteurisierter Trinkmilch, die *B. cereus* enthält): Da genauere Dosis-Effekt-Beziehungen fehlen, wurden in manchen EU-Staaten gesetzliche Grenzwerte von  $10^4$  *B. cereus* / g eingeführt.

## Risiko-Management

1. Risiko-Evaluierung: Obwohl viele Konsumenten Keimzahlen von über  $10^4$  *B. cereus* / ml Milch zu sich nehmen, ist noch immer nicht klar, wann mit *B. cereus* kontaminierte Milch tatsächlich Erkrankungen hervorruft. In einer Untersuchung von Langeveld et al. (1996) wurde Probanden Milch mit *B. cereus*-Keimzahlen zwischen  $10^3$  und  $10^6$  / ml (Aufnahme total:  $10^5$  bis  $10^8$ ) während einer Periode von 3 Wochen verabreicht. Kein Teilnehmer der Studie erkrankte. Das heißt, dass entweder nicht alle *B. cereus* Keime Erkrankungen hervorrufen können, oder dass viele Menschen gegenüber *B. cereus* nicht empfindlich sind. Aufgrund dieser Ergebnisse sind entweder neue Untersuchungen durchzuführen oder es wird entschieden,  $10^4$  *B. cereus* pro ml als Grenzwert festzulegen.
2. Risiko-Management-Optionen: Die Risiko-Faktoren sind die Anfangskeimzahl an *B. cereus* in pasteurisierter Milch, die Lagerzeit und die Lagertemperatur. Die Anfangskontamination kann z.B. durch Bactofugieren der Rohmilch verringert werden. Weitere Optionen sind die Senkung der Lagertemperatur und die Verkürzung der Lagerdauer. Welche Option schließlich gewählt wird, ist von vielen Faktoren abhängig und wird nicht nur durch die Kosten bestimmt.
3. Implementation der gewählten Optionen, Monitoring und Review (Es soll die Effektivität der gewählten und durchgeführten Optionen bestimmt und evaluiert werden): Stimmen die Optionen mit der gewünschten Zielsetzung überein? In diesem Bereich gibt es noch nicht viel Erfahrung mit dem Risiko-Management.

**Risiko-Kommunikation** (Interaktiver Austausch von Informationen und Meinungen): Es müssen Informationen zu Verfügung gestellt werden, wie wirkliche Risiken beseitigt werden können, zum Beispiel wie pasteurisierte Milch aufbewahrt werden soll. Viele Konsumenten achten nicht auf die empfohlene Lagertemperatur und Lagerzeit.



### 1.3 Vorkommen in der Rohmilch und pasteurisierter Milch und Kontaminationsquellen

In der Rohmilch nimmt *B. cereus* nur einen geringen Anteil an der Gesamtflora ein. Durch die Fähigkeit, als Sporen Erhitzungsverfahren zu überleben, wird *B. cereus* zu einem bedeutenden Schadkeim. Dabei spielen aus milchwirtschaftlicher Sicht folgende Punkte eine wichtige Rolle (Andersson et al. 1995):

- Eine geringe Anzahl an *B. cereus*-Sporen in der Milch ist nicht vermeidbar.
- Die Sporen sind stark hydrophob, lagern sich an den Oberflächen von Anlagen und Geräten an und können sich dort vermehren.
- Die Pasteurisation eliminiert die vegetativen Zellen, der Hitzeschock induziert jedoch das Auskeimen der Sporen. Gleichzeitig wird die Konkurrenzflora abgetötet.
- Durch die anschließende Kühlagerung der Milch erhalten psychrotolerante Stämme einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen thermoresistenten Bakterien.
- Die Anforderungen an eine lange Haltbarkeit der pasteurisierten Trinkmilch sind hoch. Bei rekontaminationsfreier Milch limitiert demnach *B. cereus* die Haltbarkeit!

Die Produktionsbedingungen haben einen wesentlichen Einfluss auf den Sporengehalt der Rohmilch. Es werden üblicherweise Sporenzahlen von 2 - 350 im Liter gefunden (Ahmed et al. 1983, Krusch 1989). Laut Crielly et al. (1994) ist eine saisonale Variabilität der *B. cereus* Keimzahlen beobachtet worden, wobei *B. cereus* während der Sommermonate häufiger vorkam. Dies wird vor allem mit der stärkeren Erdverschmutzung der Euter in Zusammenhang gebracht. Auch Christiansson et al. (1999) fanden, daß der Sporengehalt von Rohmilch (Gehalte variierten zwischen < 10 und 880 / L Rohmilch von Einzelkühen) mit dem Grad der Erdverunreinigung der Zitzen assoziiert ist. Während der Weidefütterungsperiode ist besonders zu regenreichen Zeiten die Erdverschmutzung die Hauptkontaminationsquelle (Sporengehalte der Erde schwanken zwischen 50 und 330.000 / g), während der Stallfütterungsperiode hingegen die Kotverschmutzung. Eine geringere Bedeutung haben hingegen Kontaminationen über Futtermittel - dementsprechend gering ist der Gehalt im Kot (max. 800/g). Weiters kann das Einstreumaterial via Erdverschmutzung, Faeces und Futterreste eine Kontaminationsquelle darstellen (te Giffel et al. 1995). Slaghuis et al. (1997) bezeichnen den jahreszeitlichen Einfluss als „Weideeffekt“, da ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Art der Haltung und dem Kontaminationsniveau gefunden wurde. Die Stallhaltung und Fütterung konservierten Futters im Sommer resultierte in niedrigeren

Kontaminationslevels. Die Gerätschaften für die Milchgewinnung sind eher nur punktuell bei einigen Betrieben als Kontaminationsquelle von Bedeutung. Daraus folgt, dass niedrige Sporengehalte in erster Linie der Ausdruck einer guten Melkhygiene sind. Sorgfältige Euterreinigung führt demnach zu einer ausgeprägten Reduktion der *B. cereus*-Keimzahlen der Rohmilch (Van Heddeghem al. 1992).

Neben der Rohmilch spielen noch Kontaminationen in den Molkereibetrieben eine Rolle, wobei hier die Anlagen und Geräte die Hauptquelle sein dürften (te Giffel et al. 1996). Nach der Pasteurisierung kommt es zu einer Vermehrung, wobei die Milch bis zu  $10^5$  *B. cereus* / ml sensorisch kaum verändert scheint, während bei Keimzahlen ab  $10^6$  *B. cereus* / ml die Süßgerinnung auftritt. Allgemein kann gesagt werden, daß die *B. cereus*-Keimzahlen frisch pasteurisierter Milch unter 1/ ml liegen (Krusch 1990). In der Tabelle 2 sind die Literaturdaten über die Gehalte an *B. cereus* in pasteurisierter Trinkmilch zusammengefasst.

Tabelle 2: Vorkommen von *B.cereus* in Rohmilch und pasteurisierter Milch

<b>Probenart</b>	<b>n (% positiv)</b>	<b><i>B.cereus</i> /ml Gehalte der positiven Proben (Anteil in %)</b>	<b>Referenz</b>
pasteurisierte Milch aus dem Handel	100 (35 %)	< 10 – 1000 / ml	Ahmed et al. 1983
pasteurisierte Milch aus Haushaltskühlschränken	334 (40 %)	< 5 /ml (77 %) > 5000 (5 %)	Te Giffel et al. 1997
pasteurisierte Milch 8 Tage bei 7 °C gelagert	458 (56 %)	< 1000 (55 %) $10^3 - 10^4$ (26 %) $10^4 - 10^5$ (12 %) $10^5 - 10^6$ (7 %)	Larsen et al. 1997

#### 1.4 Taxonomie und physiologische Eigenschaften

Bakterien der *B. cereus*-Gruppe umfassen die Species *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides* und *B. anthracis*. Die Species dieser Gruppe weisen neben gleicher Zell- und Sporenmorphologie und einer Serie gleicher physiologischen Eigenschaften eine so hohe DNA Homologie auf, daß sie als eine einzige Species betrachtet werden könnten. Ihre unterschiedliche Bedeutung als Verursacher mehr oder weniger schwerwiegender Erkrankungen bei Mensch, Tier und Insekten sowie als Lebensmittelvergifter rechtfertigen jedoch die Erhaltung der einzelnen Species innerhalb der Gruppe. Innerhalb der *B. cereus*-Gruppe wurde die psychrotolerante Variante von *B. cereus* als neue Species, *B. weihenstephanensis*, anerkannt (Lechner et al. 1998). *B. weihenstephanensis* weist eine sehr niedrige minimale Wachstumstemperatur auf. Ein Wachstum ist im Bereich von 4 °C bis 37 °C möglich mit einem Optimum bei 30°C. Mesophile *B. cereus* Stämme hingegen wachsen nicht unter 7°C. Der Wachstumsbereich liegt meist zwischen 10 °C und 42 °C mit einem Optimum bei 37°C. Zur Unterscheidung psychrotoleranter von mesophilen Stämmen der *B. cereus*-Gruppe wird das Wachstum bei 7°C bei einer Inkubation bis zu 14 Tagen herangezogen. Diese zeitaufwendige Methode kann durch neue molekularbiologische Methoden ersetzt werden (Francis et al. 1998, von Stetten et al. 1998, Mayr et al. 1999). Diese ermöglichen eine rasche und hochspezifische Diskriminierung der beiden Gruppen.

Von Stetten und Mitarbeiter (1999) haben die Verbreitung von mesophilen *B. cereus* und psychrotoleranten *B. weihenstephanensis* in Böden untersucht. Es wurden Bodenproben aus einer tropischen, einer gemäßigten und zwei alpinen Gebieten gezogen. Diese Untersuchung ist von besonderem Interesse, da sich zeigte, dass die geographische Verteilung psychrotoleranter bzw. mesophiler Isolate von der vorherrschenden Jahresmitteltemperatur abhängt. Der Anteil psychrotoleranter Genotypen aus den Tropen lag bei 0%, aus der gemäßigten Zone bei 45 % und aus den alpinen Gebieten bei 86 bzw. 98%. Bei gemäßigter Umgebungstemperatur kommen jedoch auch intermediäre Stämme vor, die mesophile und psychrotolerante Eigenschaften in sich vereinigen (Von Stetten et al. 2001). Extreme Umgebungstemperaturen begünstigen dagegen die Vorherrschaft von rein mesophilen bzw. rein psychrotoleranten Populationen. Eine über lange Zeit konstante Kühlung führt demnach zur Selektion einer psychrotoleranten *Bacillus*-Flora.

Hinsichtlich der Generationszeiten von *B. cereus* in Milch sind die Literaturdaten nicht einheitlich. Krusch (1986) ermittelte bei 10 °C in pasteurisierter Milch eine Generationszeit von 6 Stunden. Laut Griffiths et al. (1990) lagen die Generationszeiten von zwei *B. cereus*-Stämmen in Vollmilch bei 6°C bei 19 bzw. 23 Stunden, bei 10 °C bei

3 bzw. 4 Stunden. Averteck (1990) ermittelte für einen *B. cereus*-Stamm bei 9°C eine Generationszeit von 17,5 Stunden in UHT-Milch. Verschiedene *B. cereus*-Stämme können bei gleichen Temperaturen offensichtlich unterschiedlich wachsen, beispielsweise wiesen Stämme, die in den Sommermonaten isoliert wurden, ein besseres Wachstum auf (Averteck 1990).

## 1.5 Problemstellung

Im Rahmen des Projektes soll der Gehalt an *B. cereus* / *B. weihenstephanensis* am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums (MHD) in Trinkmilch aus Berggebieten - Alpenmilch, Almmilch – im jahreszeitlichen Verlauf untersucht werden. Dadurch sollen folgende Fragestellungen für pasteurisierte Trinkmilch geklärt werden:

- Wie hoch ist der Gehalt an *B. cereus* in Trinkmilch unter alpenländischen Produktionsbedingungen im Vergleich zu den Literaturwerten?
- Wie entwickelt sich die *B. cereus*-Keimzahl während der Lagerung bei 6°C und 9 °C bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum?
- Wie groß ist der Anteil der psychrotoleranten an der Gesamtzahl an *B. cereus*?
- Wie groß sind die jahreszeitlichen Schwankungen?
- Können jahreszeitliche Schwankungen bzw. Unterschiede zu Literaturwerten durch die Produktionsbedingungen (Weidehaltung, Stallhaltung) erklärt werden?

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Probenmaterial**

Im Zeitraum von Mai 2001 bis April 2002 wurden wöchentlich Proben von pasteurisierter Trinkmilch gezogen, um den jahreszeitlichen Verlauf und Futterumstellungen mit zu erfassen. Die Milch stammte aus 3 verschiedenen Gebieten aus drei ausgewählten Molkereien. Zwei der drei Betriebe (B und C) verarbeiten Milch von Almen bzw. Bergbauernhöfen. Die Produzenten dieser „Almmilch“ sind weiters an die Einhaltung von Fütterungsbeschränkungen (kein Gärfutter jeglicher Art etc. - „hartkäsetaugliche Milch“) gebunden. Während der Alpnungsperiode von Juni bis September stammt die Milch von Almen, die auf 1600 bis 2300 m Seehöhe liegen. Die Temperatur im langjährigen Durchschnitt liegt auf 1800 m in diesem Gebiet bei 2,2°C. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass die psychrotoleranten Typen vorherrschen. Der Betrieb A hingegen ist zwar im alpinen Gebiet angesiedelt, füllt aber keine hartkäseitaugliche Milch als Trinkmilch ab.

Untersucht wurde die pasteurisierte Milch bei Einlangen (Betrieb B und C an Tag der Pasteurisation, Betrieb A einen Tag nach der Pasteurisation) und am MHD nach Lagerung bei 6°C und bei 9°C in der Originalverpackung. Das MHD lag von den Betrieben A und C bei 5 Tagen und von Betrieb B bei 7 Tagen.

## 2.2 Untersuchungsparameter

### 2.2.1 Nachweis präsumtiver *B. cereus* – Koloniezählverfahren

Der Nachweis erfolgte mit Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) im Oberflächenausstrich nach § 35 LMBG: L 01.00-72 (Anonymous 2000). Dem Grundnährboden (Bacillus-Cereus-Agar-Basis, Oxoid CM 617) wird ein Supplement (Bacillus-Cereus-Selektiv-Supplement, Oxoid SR 99) und eine Eigelb-Emulsion (Oxoid SR 47) zugesetzt.

Die Kolonien wurden unmittelbar nach der 24-stündigen Bebrütung bei 37 °C beurteilt. Nach einer weiteren Bebrütung für 24 h erfolgte die Endauswertung. Typische Kolonien sind ca. 2 mm bis 5 mm groß, der Rand ist unregelmäßig gekerbt bis wurzelartig, auffällig blau bis blaugrün (pfauenblau) gefärbt, ev. mit einem grauweißen Zentrum der Kolonie und von einer ausgeprägten Eigelb-Präzipitation (Trübungszone durch Lecithinase-Reaktion) der gleichen Farbe umgeben (Präzipitathof bis 3 - 5 mm breit). Typische Kolonien wurden molekularbiologisch bestätigt (je Probe mindestens 3 Kolonien je Kolonietyp).

### 2.2.2 Nachweis präsumtiver *B. cereus* - Selektive Anreicherung bei 30 °C

Es wurde ein MPN Ansatz von 3 x 10 ml, 3 x 1 ml und 3 x 0,1 ml Probe in Trypton Soya Bouillon mit Polymyxin durchgeführt (nach IDF Standard 181:1998). Der 10 ml Ansatz erfolgte in doppeltkonzentrierter Bouillon. Nach der Bebrütung für 48 h bei 30 °C erfolgte ein fraktionierter Drittelausstrich auf PEMBA und die Beurteilung der Kolonien wie oben beschrieben. Die Berechnung der Keimzahl erfolgt mit der MPN Tabelle nach ISO 7218. Typische Kolonien wurden molekularbiologisch bestätigt (von jedem positiven Ausstrich 1 Kolonie je Kolonietyp).

### 2.2.3 Nachweis präsumtiver *B. cereus* - Selektive Anreicherung bei 6 °C

Ein weiterer MPN Ansatz von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml Probe (wie oben beschrieben) wurde bei 6°C für 14 Tage bebrütet.

#### 2.2.4 Unterscheidung zwischen psychrotoleranten und mesophilen Stämmen der *B. cereus* Gruppe (nach Francis et al. 1998)

##### DNA Extraktion aus Plattenabschwemmungen

Eine Kolonie der Agarplatte wurde mit 100 µl Aqua dest (Mili-Q gereinigt) versetzt und auf

95 °C erhitzt. Bis zur Analyse ist eine Lagerung bei –20 °C möglich. Alternativ:

Direktansatz eines stecknadelkopfgroßen Aliquots der zu prüfenden Kolonie.

##### DNA Amplifikation

Es wurden die folgenden Primer eingesetzt (MWG-Biotech):

BcAPF1      GAG GAA ATA ATT ATG ACA GTT

BcFF2      GAG ATT TAA ATG AGC TGT AA

BcAPR1      CTT (C/T)TT GGC CTT CTT CTA A

Die Sequenzen sind der Arbeit von FRANCIS et al. (1998) zu entnehmen.

Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 50µl. Darin enthalten sind 5µl 10x PCR

Puffer (Perkin Elmer), 0,5µl pro Nukleotid (Boehringer), 0,5 µl pro Primer, 0,5µl

AmplitaqGold Polymerase (Perkin Elmer), und 1µl DNA Template aufzufüllen mit Aqua dest.. Die PCR erfolgte mit dem Thermocycler UNO II (Biometra). Die

Heizdeckeltemperatur betrug 105 °C.

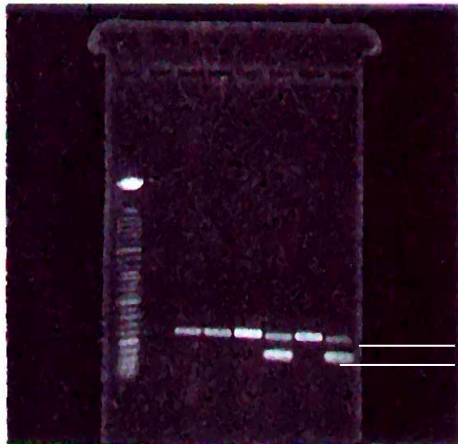
Die Cycling Konditionen waren: Start: 95 °C 11 m, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, Schleife (30 mal): 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72 °C 30 s, Ende: 72 °C 2 m, 4°C.

##### Elektrophorese

Die Analyse der amplifizierten DNA Abschnitte erfolgte mit Agarosegelelektrophorese unter Verwendung von 1,2%igem Agarosegel (MP Agarose, Boehringer) gelöst in Tris-EDTA-Boratpuffer (TBE).

Als Lauf-Puffer wurde TBE herangezogen. Die DNA-Proben wurden mit 20% Dye (0,25% Bromphenolblau, 40% Succroslösung) versetzt. Es wurden 5µl Probe aufgetragen, die Laufzeit betrug ca. 2 h bei 60V. Die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid (Sigma). Die Auswertung erfolgte unter dem Transiluminator bei 254 nm. Es wurde ein 50bp Molecular Weight Marker (Boehringer) als Bezugsgröße verwendet. Die Dokumentation erfolgte über Polaroidfotos. Insgesamt wurde die Flora von 276 positiven Proben identifiziert.





Kälteschockprotein F Gen: charakteristisch für alle *B.cereus* Stämme (284 bp DNA Fragment)

Kälteschockprotein A Gen: nur in psychrotoleranten Stämmen vorhanden (160bp DNA Fragment)

### 2.2.5 Sensorische Analyse

Die bis zum MHD bei 6°C und 9°C gelagerten Milchen wurden sensorisch in Einzelprüfung untersucht.

### 2.2.6 Temperaturmessung in Haushaltskühlschränken

Es wurden die Kühlschranktemperaturen von 49 Tiroler Haushalten erfasst. Die Messung erfolgte am Ort der üblichen Lagerung der pasteurisierten Trinkmilch (meist an der Kühlschranktür) mit einem Temperaturlogger (programmierbarer Datenlogger ebro EBI-3) über einen Zeitraum von 2 Tagen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Frisch pasteurisierte Milch

##### 3.1.1 MPN 30 °C

Die Quantifizierung in der frisch pasteurisierten Milch ergab Keimzahlen zwischen 30 und 100 / L bei 44 % der untersuchten Proben (n = 128). 26 % lagen zwischen 100 und 1000 / L, ebenso lagen 26 % unter der Nachweisgrenze von 30 / L (Abbildung 1). Nur 4 % der Proben wiesen Keimzahlen über 1000 / L auf. Die Identifizierung ergab, dass es sich zu 64 % um mesophile *B. cereus* handelte. Nur 15 % der Isolate wurden als *B. weihenstephanensis* identifiziert, bei 21 % handelte es sich um eine *B. cereus* / *B. weihenstephanensis* Mischflora.

##### 3.1.2 MPN 6 °C

Weiters wurde zur Quantifizierung der Psychrotoleranten in der frisch pasteurisierten Milch eine Kälteanreicherung durchgeführt. Der überwiegende Anteil (74 %) der Proben (n=98) lag unter der Nachweisgrenze von 30 / L, 26 % wiesen Keimzahlen zwischen 30 und 1000 / L auf (Abbildung 2). In keiner Probe waren über 1000 / L nachweisbar. Bei den positiven Proben handelte es sich erwartungsgemäß um die psychrotolerante Art *B. weihenstephanensis*, vereinzelt wurde jedoch auch *B. cereus* identifiziert.

## **3.2 Lagerung bis zum MHD**

### **3.2.1 Lagerung bei 6 °C**

Bei einer Lagerung bei 6°C kommt es zu einer Vermehrung der psychrotoleranten Bacillen. Der überwiegende Teil (87 %) der Proben (n = 144) wies allerdings Keimzahlen von < 1000 / ml auf (Abbildung 3). Nur in 3 Proben konnte die Keimzahl auf über 100.000 / ml ansteigen. Bei allen Proben lag die Keimzahl unter 1 Million / ml. Die Identifizierung ergab eine Reinflora von *B. weihenstephanensis*.

### **3.2.2 Lagerung bei 9°C**

Bei einer Lagerungstemperatur von 9°C bis zum MHD hingegen kam es zu einem weit stärkeren Anstieg der Keimzahlen (Abbildung 4). 76 % der Proben (n = 149) wiesen über 100.000, 47 % über 1 Million und 7 % über 10 Millionen auf. Auffallend ist, dass erhebliche Unterschiede zwischen den Betrieben festgestellt wurden. Während 69 % der Proben von Betrieb C über 1 Million *B. cereus* / ml aufwies, lagen die Werte bei den Betrieben A und B bei 39 % bzw. 34 %. Die Identifizierung ergab ein überwiegendes Vorkommen von *B. weihenstephanensis*, trotz der niedrigen Anfangskeimzahl von meist unter 30 / L. Die mesophilen Stämme spielen bei einer Lagerungstemperatur von 9°C nur eine untergeordnete Rolle. Von 120 Proben wurde in 115 eine *B. weihenstephanensis* Reinflora, in 7 Proben eine Mischflora *B. weihenstephanensis* / *B. cereus* und in nur 2 Proben eine *B. cereus* Reinflora nachgewiesen.

Abbildung 1: Vorkommen von *B.cereus* bzw. *B. weihenstephanensis* in frisch pasteurisierter Trinkmilch nach selektiver Anreicherung bei 30 °C

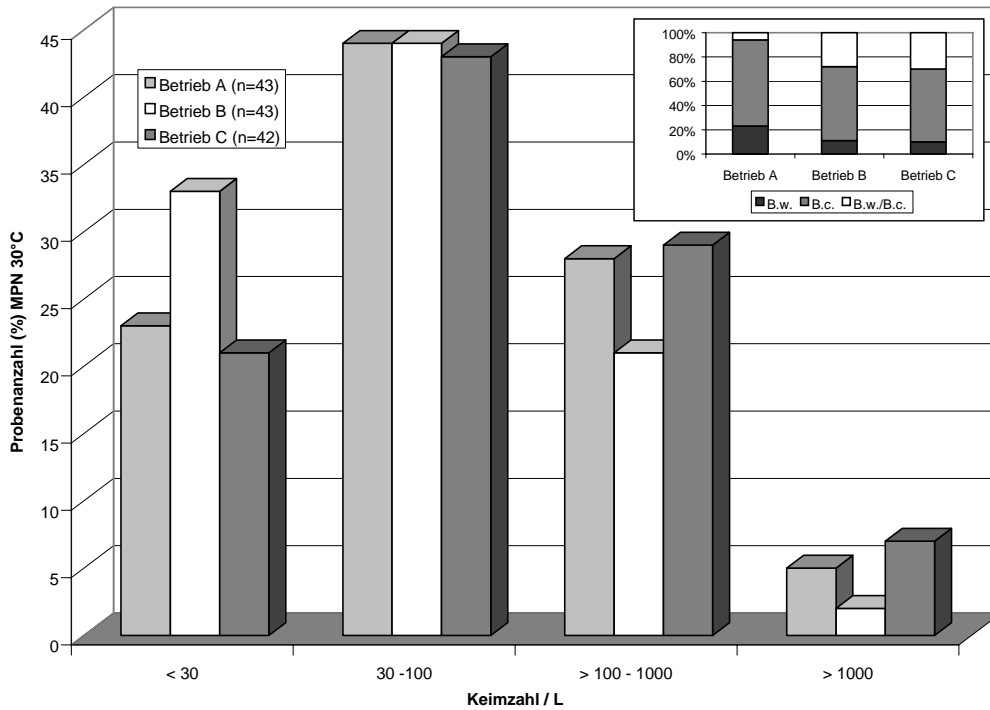


Abbildung 2: Vorkommen von *B.cereus* bzw. *B. weihenstephanensis* in frisch pasteurisierter Trinkmilch aus 3 Betrieben nach selektiver Anreicherung bei 6 °C

**Bacillus cereus in pasteurisierter Trinkmilch aus Berggebieten**

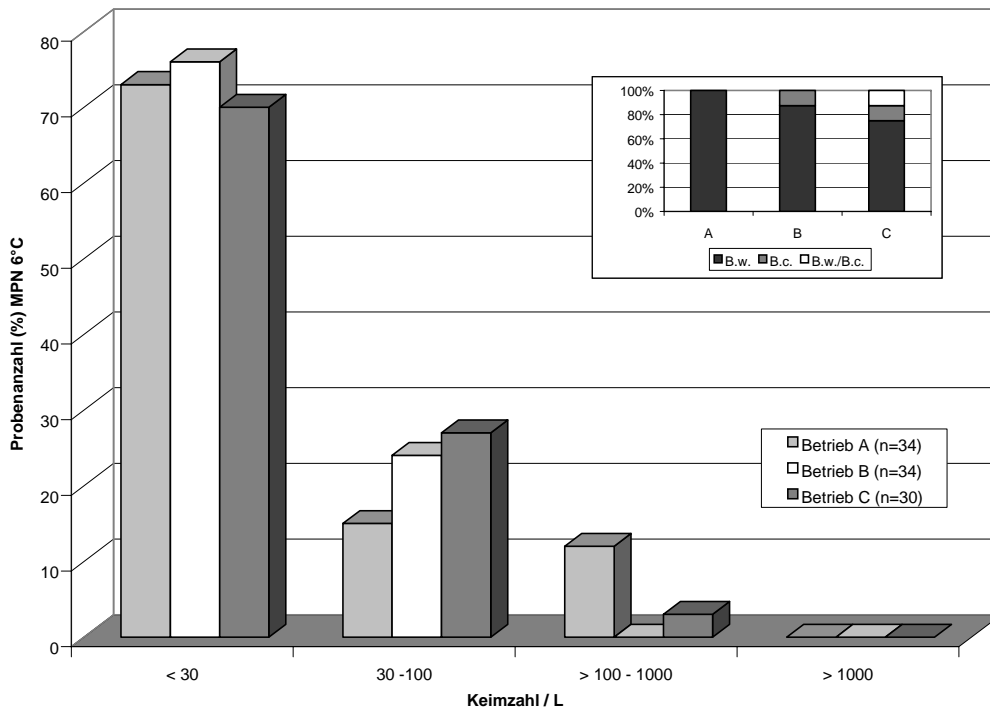


Abbildung 3: *B. weihenstephanensis*-Keimzahl von pasteurisierter Trinkmilch von 3 Betrieben am MHD nach Lagerung bei 6 °C

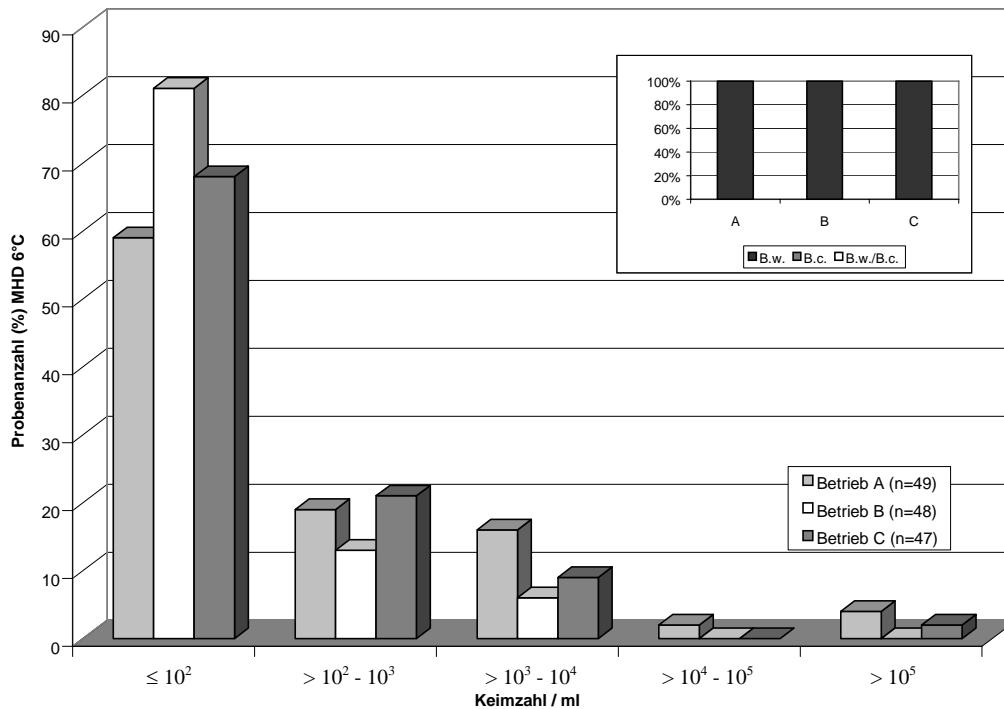
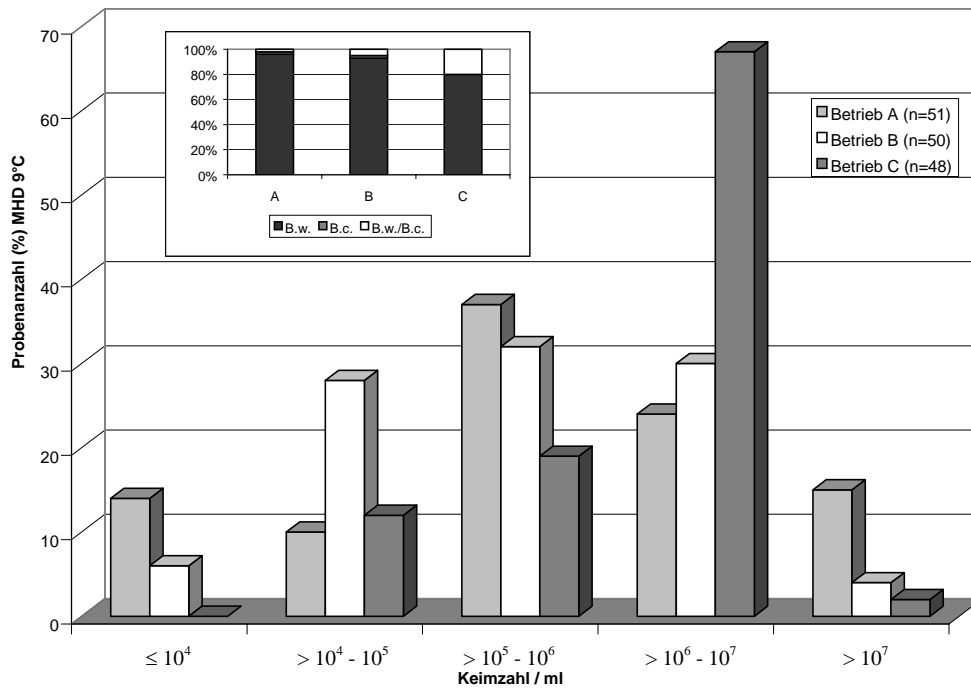


Abbildung 4: *B. cereus* bzw. *B. weihenstephanensis*-Keimzahl am MHD nach Lagerung bei 9 °C



Die Abbildung 5 zeigt den jahreszeitlichen Verlauf der *B. cereus* bzw. *B. weihenstephanensis*-Keimzahl am MHD nach Lagerung bei 9°C. Während der Sommermonate (Juli, August September) waren die Keimzahlen am höchsten, im November wurden in allen 3 Betrieben die niedrigsten Keimzahlen nachgewiesen.

### 3.3 Sensorische Beurteilung

Proben die zwischen 1 Million /ml und 10 Millionen / ml aufwiesen, wiesen überwiegend keine Geschmacksabweichungen auf. Als verdorben wurden nur Proben über 10 Millionen *B. cereus* / ml beurteilt (Geschmacksfehler oder Süßgerinnung).

### 3.4 Durchschnittliche Lagerungstemperatur im Haushalt

Zur Beantwortung der Frage, bei welchen Temperaturen die pasteurisierte Milch in den Haushalten gelagert wird, wurden Messungen am Ort der üblichen Lagerung, meist an der Kühlschranktür vorgenommen (Tabelle 3). Je ca. ein Drittel der Kühlschränke waren auf unter 6°C, zwischen 6 und 9 °C bzw. über 9 °C eingestellt. Auch im Einzelhandel und in Einrichtungen der Gemeinschaftsversorgung werden laut österreichischer

Milchhygieneverordnung Temperaturwerte bis 9 °C toleriert. Es ist daher davon auszugehen, dass 2 Drittel der Milch über 6 °C gelagert wird, hinzu kommt die kurzfristige Erwärmung bei Gebrauch (z.B. Frühstückstisch).

Abbildung 5: Monatsdurchschnitt der *B.cereus* bzw. *B. weihenstephanensis*-Keimzahl am MHD nach Lagerung bei 9°C im jahreszeitlichen Verlauf

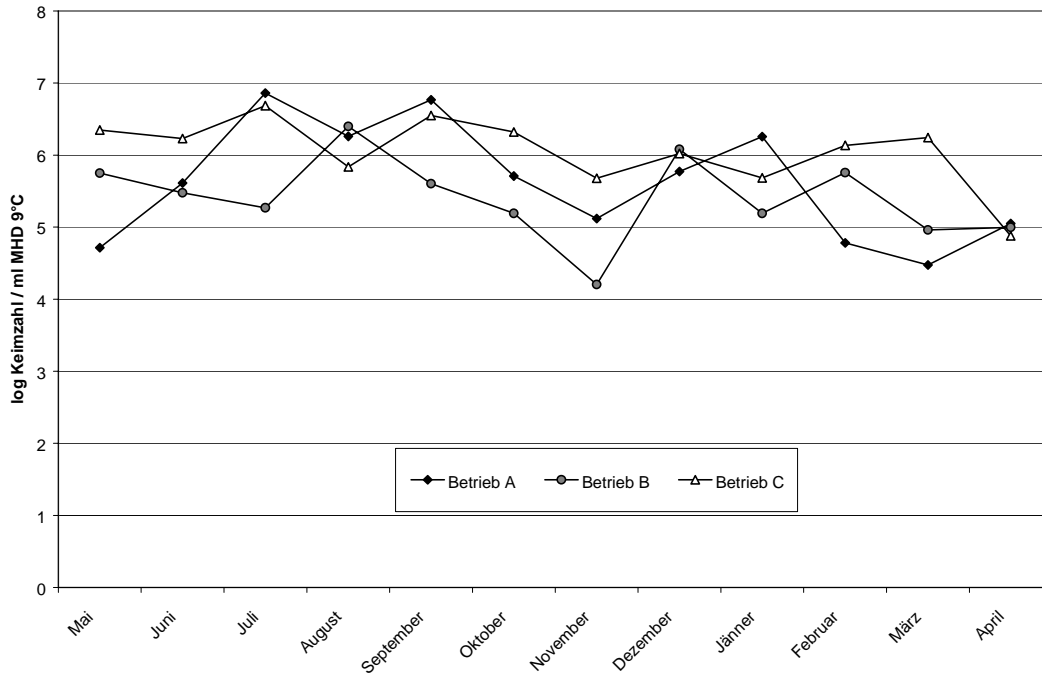


Tabelle 3: Durchschnittliche Lagerungstemperaturen von pasteurisierter Trinkmilch in Haushalten (n = 49)

Lagerungstemperatur	Anteil der Haushalte
unter 6 °C	30,6 %
6 °C bis 9°C	34,7 %
über 9°C	34,7 %



## 4 Diskussion

Die *B. cereus* Keimzahlen der Trinkmilch nach der Pasteurisation lagen überwiegend bei unter 1000 / l. Insbesondere die Gehalte an psychrotoleranten *B. weihenstephanensis* waren sehr niedrig (74% unter der Nachweisgrenze von 30 / l). Im Vergleich zu den Literaturwerten waren keine Unterschiede feststellbar. Demnach dürften sich die alpenländischen Produktionsbedingungen nicht wesentlich auf die Sporengehalte der Milch auswirken. Während der Lagerung bei 6°C bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum kam es nur zu einer eingeschränkten Vermehrung; Keimzahlen die einen Verderb verursachen könnten ( $> 10^6$  KBE / ml), wurden in keinem Fall erreicht. Eine Lagerung bei 9 °C hingegen führte bei ca. der Hälfte der Proben zu Zahlen von über 1 Million / ml am Mindesthaltbarkeitsdatum. Auffallend war, dass sich die Betriebe hinsichtlich der Häufigkeit des Vorkommens von Proben mit über 1 Million / ml unterschieden. Diese Unterschiede lassen sich nicht durch höhere Ausgangskeimzahlen erklären. Es zeigte sich allerdings, dass der Betrieb C bei dem am häufigsten Keimzahlen von über  $10^6$  / ml festgestellt wurden, auch einen höheren Anteil an mesophilen *B. cereus* aufwies.

Bei allen drei Betrieben überwogen in der frisch pasteurisierten Milch die mesophilen und am Mindesthaltbarkeitsdatum die psychrotoleranten Typen. Erwartungsgemäß begünstigten die niedrigen Umgebungstemperaturen bei der Lagerung bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum die Vorherrschaft von psychrotoleranten Populationen. Allerdings dürfte in diesem Zusammenhang die Kühlung der pasteurisierten Milch eine wichtigere Rolle spielen als der vermutete Zusammenhang zwischen der vorherrschenden Jahresmitteltemperatur und dem Vorkommen von mesophilen und psychrotoleranten *B. cereus* in Böden (von Stetten et al. 1999). Weiters fanden Andersen Borge et al. (2001) auch *B. cereus*-Stämme, die nicht der neuen Art *B. weihenstephanensis* zugeordnet werden konnten, die bei 4°, 6° oder 7°C noch zu wachsen vermochten.

In den Sommermonaten kamen in der bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum gelagerten Milch höhere Keimzahlen als in den Wintermonaten vor. Diese jahreszeitlichen Schwankungen können in Zusammenhang mit der unterschiedlichen Haltungform (Weidehaltung, Stallhaltung), der Melkhygiene oder anderen Faktoren wie z.B. den Lagerungsbedingungen am Erzeugerbetrieb stehen. Eingeschränkte Weidehaltung zur Senkung des Vorkommens von *B. cereus* Sporen in der Rohmilch wie von Slaghuis et al. (1997) gefordert, steht jedoch im Widerspruch zur artgerechten Tierhaltung und ist

sicherlich durch entsprechende Melkhygiene kompensierbar. Die gänzliche Vermeidung einer Kontamination der Rohmilch mit aeroben Sporenbildnern ist praktisch jedoch nicht erreichbar.

Aufgrund der Lagerdauer und –temperatur im Handel und in den Haushalten ist davon auszugehen, dass ein hoher Anteil der pasteurisierten Trinkmilch *B. cereus*-Keimzahlen von über einer Million / ml zum Zeitpunkt des Konsums aufweist. Folgende Strategien zur Reduktion des *B. cereus* Gehaltes in pasteurisierter Milch sollten daher kommuniziert werden:

- Die Bedeutung der guten Melkhygiene zur Verringerung der Kontaminationsrate.
- Eine Einbeziehung des Problems in die Qualitätssicherung ist für den Hersteller zwingend erforderlich. Es stellt sich allerdings die Frage, inwieweit gesetzliche Grenzwerte, wie in anderen europäischen Ländern, sinnvoll sind.
- Eine Haltbarkeitsverkürzung der pasteurisierten Milch; diese widerspricht jedoch den Forderungen des Handels.
- Eine Herabsetzung der tolerierten Lagerungstemperatur im Handel auf 6°C. Dies entspricht auch der Forderung des Deutschen Milchindustrie-Verbandes (Von Wiese, 2001)
- Eine Verbraucheraufklärung zur sachgerechten Lagerung von pasteurisierter Milch im Haushalt.

## 5 Zusammenfassung

Es wurden die Keimzahlen der frisch pasteurisierten Milch aus 3 Molkereien (n=149) und nach Lagerung bei 6°C und 9°C bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) ermittelt. Der überwiegende Anteil der untersuchten Proben wies Gehalte zwischen 30/l und 1000/l mesophiler *B. cereus* nach der Pasteurisierung auf, während die Gehalte an psychrotoleranten *B. weihenstephanensis* größtenteils unter 30/l lagen. Während der Lagerung bei 6°C stiegen die Keimzahlen auf 100 bis 10.000/ml an, wobei der überwiegende Teil der Proben (87 %) Keimzahlen von unter 1.000/ml aufwies. Bei einer Lagerungstemperatur von 9°C hingegen kam es zu einer Vermehrung auf über 100.000/ml bei 76 % der Proben, 47 % wiesen Keimzahlen von über 1 Million/ml auf. Die Identifizierung ergab ein überwiegendes Vorkommen der psychrotoleranten Art *B. weihenstephanensis*. Mesophile Stämme spielten bei einer Lagerungstemperatur von 9°C nur eine untergeordnete Rolle. Auffallend war, dass *B. weihenstephanensis*-Keimzahlen von über einer Million am MHD nicht immer zu sensorisch wahrnehmbaren Veränderungen führte.

Die Lagerungstemperaturen in den Haushalten lag bei je einem Drittel der Kühlschränke (n=49) bei unter 6°C, zwischen 6°C und 9°C bzw. bei über 9°C. Es ist daher davon auszugehen, dass zwei Drittel der Milch bei über 6°C gelagert wird. Im Rahmen der Risikokommunikation müssen demnach die Konsumenten bezüglich der Wichtigkeit der Einhaltung der maximalen Kühltemperatur von 6°C aufgeklärt werden. Außerdem sollte die maximal zulässige Kühltemperatur im Handel auf 6°C herabgesetzt werden.

## 6 Literatur

Ahmed, A.H., Moustafa, K., Marth, E.H. (1983). Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. J. Food Prot. 46, 126 – 128.

Anderson Borge, G.I., Skeie, M., Sørhaug, T., Langsrud, T., Granum, P.E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. Int. J. Food Microbiol. 69, 237 – 246.

Andersson, A., Rönner, U., Granum P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? Int. J. Food Microbiol. 28, 145 – 155.

Anonymous (2000). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. L 01.00-72: Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* in Milch und Milchprodukten. Koloniezählverfahren bei 37 °C.

Averbeck, W. (1990). Die aeroben Sporenbildner in Rohmilch von Milchsammeltankwagen unter Berücksichtigung von *Bacillus cereus*. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Dissertation. Zit. nach: Buck et al. (1992). *Bacillus cereus* in wärmebehandelter Schlagsahne. Archiv für Lebensmittelhygiene 43, 25-48.

Beutling, D., Böttcher, C. (1998). *Bacillus cereus* – ein Risikofaktor in Lebensmitteln. Archiv für Lebensmittelhygiene 49, 90 – 96.

Christiansson, A., Bertilsson, J., Syensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J. Dairy Sci. 82, 305 - 314.

Crielly, E.M., Logan, N.A., Anderton, A. (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. J. Appl. Bacteriol. 77, 256 – 263.

Francis, K.P., Mayr, R., von Stetten, F., Stewart, G.S.A.B., Scherer, S. (1998): Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. Appl. Environm. Microbiol., 64, 3525 - 3529.

Griffiths, M.W., Phillips, J.D. (1990). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. J. Soc. Dairy Technol., 43, 62 - 66.

- Hammer, P., Wiebe, C., Walte, H.G., Teufel, P. (2001). Vorkommen und Eigenschaften von *Bacillus cereus*-Stämmen in einem Milchtrocknungsbetrieb – Risikoerörterung und Qualitätssicherung. Kieler milchwirtschaftliche Forschungsberichte 53, 123 – 146.
- International Dairy Federation (1998). Dried milk products. Enumeration of *Bacillus cereus*. Most probable number technique. Brussels: IDF (Fil-IDF Standard no. 181)
- Krusch, U. (1986). *Bacillus cereus* und die Haltbarkeit von pasteurisierter Milch. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 10, 96 – 98. Zit. nach: Buck et al. (1992). *Bacillus cereus* in wärmebehandelter Schlagsahne. Archiv für Lebensmittelhygiene 43, 25-48.
- Krusch, U. (1989). Entwicklung von *Bacillus cereus* in keimarmer Milch. Informationstagung für Fachberater in der Milchwirtschaft, 11. – 14. 4. 1998, Kiel.
- Krusch, U. (1990). Entwicklung von *Bacillus cereus* in keimarmer Milch. Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch, 44, 89 – 93.
- Langefeld, L.P.M., Spronsen, W.A., Berensteijn, E.C.H., Notermans, S.H.W. (1996). Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: A double-blind study. J. Food Prot. 59, 723 – 726.
- Larsen, H.D., Jørgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. Int. J. Food Microbiol. 34, 179 – 186.
- Lechner, S., Mayr, R., Francis, K.P., Prüß, B.M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E., Stewart, G.S.A.B., Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. Int. J. Systematic Bacteriology, 48, 1373 – 1382.
- Mayr, R., von Stetten, F., Francis, K.P., Scherer, S. (1999). Significance of psychrotolerant aerobic sporeformers in food spoilage and methodologies for their detection and identification. Mitt. Lebensm. Hyg. 90, 42 – 61.
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* sp. in fluid milk products: A Review. J. Food Prot. 54, 969 – 979.
- Notermans, S. (1997). Risiko-Analyse als Basis der Herstellung sicherer Lebensmittel. Lebensmittel- & Biotechnologie, 3, 98 – 102.
- Notermans, S.H.W., te Giffel, M.C. (2000). *Bacillus cereus*: its toxins and their significance. IDF-Bulletin 357, 43 - 46.

- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Giffel, M., Peeters Weem, P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. Food Microbiology, 14, 143-151.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Bonestroo, M.H., Rombouts, F.M. (1996). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* in two dairy processing plants. Netherlands Milk & Dairy Journal 50, 479 – 492.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Granum, P.E., Rombouts, F.M. (1997). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. Int. J. Food Microbiol. 34, 307 – 318.
- Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., Slaghuis, B.A., Rombouts, F.M. (1995). Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. Netherlands Milk Dairy J. 49, 125 – 138.
- Slaghuis, B.A., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R., André, G. (1997). Effect of Pastering on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. Int. Dairy Journal 7, 201 – 205.
- Van Heddeghem, A., Vlaemynck, G. (1992). Sources of contamination of milk with *B. cereus* on the farm and in the factory. IDF-Bulletin 275, 19 - 22.
- Von Stetten, F., Francis, K.P., Lechner, S., Neuhaus, K., Scherer, S. (1998): Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. J. Microbiol Methods, 34, 99 – 106.
- Von Stetten, F., Mayr, R., Scherer, S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. Environmental Microbiol 1, 503 – 515.
- Von Stetten, F., Mayr, R., Scherer, S. (2001). *Bacillus weihenstephanensis*. Neues über den wichtigsten Verderbniserreger und Toxinbildner in Milch. dmz Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft 4, 144 – 151.
- Von Wiese (2001). Milch-Forum des Milchindustrie-Verbandes, 27.09.2001, Garmisch-Partenkirchen.

## **7 Anhang: Methodenvergleich**

### **7.1 Einleitung**

Im obigen Abschlussbericht wird eine Einbeziehung des *B. cereus* - Problems in die betriebliche Qualitätssicherung empfohlen. Dies wirft die Frage nach einer geeigneten Nachweismethode auf. Ein Selektivmedium zur Erfassung von aeroben Sporenbildnern steht bedauerlicherweise nicht zur Verfügung. Daher ist es üblich, die Sporen aufgrund ihrer Hitzeresistenz durch eine Laborpasteurisierung (80°C, 10 min) zu isolieren. Für den Nachweis von *B. cereus* hingegen, stehen selektive Nährmedien zur Verfügung.

Ziel des Methodenvergleiches war es daher, einen Keimzahlvergleich mit einem selektiven (PEMBA) und einem nicht selektiven Nährboden (PCA) durchzuführen, jeweils mit und ohne Laborpasteurisierung vor der Untersuchung.

### **7.2 Material und Methodik**

Untersucht wurde pasteurisierte Trinkmilch (n=42), die bis MHD bei 9°C gelagert wurde. Zusätzlich zur Bazillenflora wurde noch die Gram-negativen Keimzahl auf VRBD-Agar (Oberflächenausstrich, 48 h, 30 °C) untersucht.

#### **Nachweis präsumtiver *B. cereus***

Siehe Punkt 6.2.1. des Abschlussberichtes. Es wurden neben den typischen Kolonien (*B. cereus*) auch atypische Kolonien (*Bacillus* spp.) gezählt.

#### **Nachweis der Sporen aerober Sporenbildner laut VDLUFA**

Der Nachweis erfolgte PC-Agar unter Zusatz von Bromkresolpurpur (0,04 g/l) im Oberflächenausstrich. Die Bebrütung erfolgte für 72 h bei 30 °C. Atypische Kolonien wurden mikroskopisch beurteilt.

#### **Laborpasteurisation**

Von der Probe wurden jeweils 5 ml in Reagenzgläser pipettiert. Die Erhitzung erfolgte im Wasserbad für 10 Minuten bei 80 °C. Anschließend wurde die Probe im kalten Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

### 7.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse (Tabelle 1) lassen folgende Schlüsse zu:

- Der Gehalt an Sporen lag generell unter 100/ ml auch wenn der Gehalt an vegetativen *Bacillus* spp. bei über 1 Million lag. Daher führt eine Erhitzung der Probe zu unbrauchbaren Ergebnissen.

Laut Bergère (1992) hängt die schlechte Versporung von *B. cereus* in erster Linie mit dem Sauerstoffgehalt und nicht mit dem Substrat zusammen. Die Pasteurisierung bedingt eine Aktivierung der Sporen; in erhitzter Milch keimen die Sporen dann auch bei niederen Temperaturen aus. Auch im Stadium fortgeschrittenen Verderbs der Milch versport laut Krusch (1990) *B. cereus* in Milch sehr schlecht. Ein *B.cereus* Sporennachweis gelingt in solch verdorbener Milch kaum.

- Auf dem PEMBA wurde mit einer Ausnahme (M29) nur *B. cereus* nachgewiesen. Andere *Bacillus* spp. wurden durch den Zusatz von Polymyxin offensichtlich unterdrückt.
- Bei nur 3 Proben (M27, M29, M39) wurden mit PC-Agar höhere Keimzahlen als mit PEMBA nachgewiesen. *B. cereus* scheint die häufigste Bacillen Art in pasteurisierter Milch zu sein.
- Die *B. cereus*-Keimzahlen wurden auf dem PC-Agar im Vergleich zum PEMBA unterschätzt.
- Auf PC-Agar ist eine Unterscheidung zwischen Bazillen und Gram-negativen Keimen rein visuell nicht möglich, eine mikroskopische Bestätigung ist auf jeden Fall erforderlich.



#### **7.4 Literatur**

Bergère, J. L. (1992). Spore formation and germination of *Bacillus cereus*: the spore cycle. IDF-Bulletin 275, 9 - 14.

Busse, M. (2000) Qualitätssicherung in der Milchwirtschaft. Verlag Th. Mann KG, Gelsenkirchen.

Krusch, U. (1990). Entwicklung von *Bacillus cereus* in keimarmer Milch. Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch, 44, 89 – 93.

VDLUFA, Methodenbuch VI (1993). Milch und Milchprodukte. Bestimmung der Sporen aerober Sporenbildner (*Bacillus*) M 7.17.2

**Bacillus cereus in pasteurisierter Trinkmilch aus Berggebieten**

Tabelle 1: Keimzahlen auf PEMBA und PCA jeweils mit und ohne Laborpasteurisation der Probe.

	PEMBA				PC-Agar		VRBD-Agar
	<i>B. cereus</i> / ml Sporen <sup>1</sup>	gesamt <sup>2</sup>	<i>Bacillus</i> spp. / ml Sporen <sup>1</sup>	gesamt <sup>2</sup>	<i>Bacillus</i> spp. / ml Sporen <sup>1</sup>	gesamt <sup>2</sup>	Gram(-) / ml
M 1	< 10	< 1000	< 10	< 1000	< 10	< 1000	< 10.000
M 2	< 10	<10000	<100	<10000	< 10	< 1000	< 10.000
M 3	< 10	< 1000	< 100	< 1000	< 10	<10 000	< 10.000
M 4	< 10	< 1000	< 10	< 1000	< 10	< 1000	< 10.000
M 5	< 10	6.400.000	<100	6.400.000	<100	N.D.	< 10000
M 6	< 10	14.000.000	<100	14.000.000	<100	N.D.	< 1.000
M 7	< 10	5.700.000	<100	5.700.000	< 10	N.D.	> 300.000
M 8	< 10	15.000.000	< 100	15.000.000	N.D.	560.000	< 1.000
M 9	< 10	< 1000	<100	< 1000	<100	< 1000	< 1.000
M 10	< 10	<10000	<100	<10000	< 10	< 1000	< 1.000
M 11	< 10	2 300 000	<100	2.300.000	<100	N.D.	< 1.000
M 12	< 10	1 400 000	<100	1 400 000	<100	N.D.	< 1.000
M 13	< 10	1 600 000	< 10	1 600 000	< 10	N.D.	> 300.000
M 14	< 10	3 100 000	<100	3 100 000	< 10	N.D.	> 300.000
M 15	< 10	14 000 000	<100	14 000 000	< 10	2 100 000	< 1.000
M 16	< 10	14 000 000	< 10	14 000 000	< 10	2 800 000	< 1.000
M 17	<100	8 000 000	<100	8 000 000	< 10	1 800 000	< 1.000
M 18	< 10	<10000	<100	<10000	< 10	< 1000	< 1.000
M 19	< 10	1 900 000	<100	1 900 000	<100	<10000	< 1.000
M 20	<100	890 000	<100	890 000	< 10	N.D.	< 1.000
M 21	<100	290 000	<100	290 000	<100	N.D.	< 1.000
M 22	< 10	8 500 000	< 10	8 500 000	<100	N.D.	< 1.000
M 23	< 10	13 000 000	<100	13 000 000	<100	N.D.	< 1.000
M 24	< 10	8 400 000	< 10	8 400 000	<100	150 000	< 1.000
M 25	< 10	< 1000	<100	< 1000	<100	< 1000	< 1.000
M 26	< 10	<10000	<100	<10000	< 10	< 1000	< 1.000
M 27	< 10	9 000	< 10	9 000	< 100	30 000	< 1.000
M 28	< 10	9 250 000	< 10	9 250 000	< 100	200 000	< 1.000
M 29	< 10	390 000	< 10	630 000	< 100	> 15000000	> 300 000
M 30	< 10	7 800 000	< 10	7 800 000	< 10	480 000	< 1.000
M 31	< 10	1 100 000	< 10	1 100 000	< 10	88 000	< 1.000
M 32	< 10	24 000	< 10	24 000	< 10	26 000	> 300 000
M 33	< 10	470 000	< 10	470 000	< 10	170 000	> 300 000
M 34	< 10	220 000	< 10	220 000	< 100	130 000	> 300 000
M 35	<100	4 500 000	< 10	4 500 000	< 100	2 500 000	< 1.000
M 36	< 10	800 000	< 10	800 000	< 10	370 000	< 1.000
M 37	< 10	400 000	< 10	400 000	< 10	150 000	> 300 000
M 38	< 10	7 400 000	< 10	7 400 000	ca. 70	6 700 000	< 1.000
M 39	< 10	440 000	< 10	440 000	< 100	9 800 000	< 1.000
M 40	< 10	360 000	< 10	360 000	< 100	18 000	> 300 000
M 41	< 10	> 5 000 000	< 10	> 5 000 000	< 100	70 000	< 1.000
M 42	< 10	6 000 000	< 10	6 000 000	< 10	4 100 000	ca. 1.000

<sup>1</sup> Erhitzung der Probe 10 min 80°C

<sup>2</sup> keine Erhitzung der Probe