nagl.netzreport.com

NACHWEIS VON SPORENBILDNER

1. AEROBE SPORENBILDNER

Aerobe Sporenbildner sind vorwiegend im Erdboden zu finden, kommen aber auch in Fleisch, Milch und pflanzlichen Lebensmitteln vor. Die Enterotoxine von *Bacillus cereus* (>10^5 KBE/ml) verursachen nach bis zu max. 16 Stunden Erbrechen oder Durchfall. Die Enterotoxine werden von *Bacillus cereus* während der logarithmischen Wachstumsphase gebildet und können dann in das Lebensmittel diffundieren. In Form ihrer hitzeresistenten Sporen überleben die Bacillus-Arten die Pasteurisierung. Diese sehr stoffwechselaktiven Keime können schon bei geringen Ausgangszahlen zum Verderb von nicht gesäuerten Lebensmitteln führen (z.B. Süßgerinnung von Milch, Bildung von Bitterstoffen). Manche Stämme von *Bacillus cereus* sind psychrotroph, können sich daher auch in kühlgelagerter Milch vermehren und Geschmacksveränderungen hervorrufen. In sauren Milchprodukten ist dieser Keim nicht von Bedeutung, da er wie die meisten Bacillus-Arten säureempfindlich ist.
Die Sporen von *Bac. stearothermophilus, subtilis, macerans* und *licheniformis* sind besonders hitzeresistent und werden häufig in unsterilen Packungen gefunden.
B. subtilis, B. licheniformis: Durch Abbau von Proteinen entstehen Peptide, die einen bitteren Geschmack haben.
B. cereus, B. coagulans, B. stearothermophilus: Bombagen, fauliger Geschmack
B. coagulans, B. megaterium: Gasbildung und käsiger Geschmack

1.1 Standardmethode zur Erfassung aller aeroben Sporenbildner

Plattenmethode VDLUVA Methodenbuch VI M.7.17.2. (1993)

Anwendung: Milch und Milchprodukte
Probenvorbereitung: 10ml Probelösung in steriler Eprouvette 10 min bei 85°C im Wasserbad heißhalten (Temperaturkontrolle durchführen)
Ansetzen einer Verdünnungsreihe,
Überimpfung im **Plattengussverfahren** auf **PCA-MM**-Agar (Agaranteil zur Eindämmung des Schwärmens auf ca. 3% erhöhen),
Bebrütung: 2-3- Tage bei 30°C
Mesophile Sporenbildner bei 30°C
Thermophile Sporenbildner bei 55°C; je nach Produkt-Anforderungen

Auswertung: 10-300 Kol./ Platte

1.2 Spezieller Nachweis von *Bacillus cereus*

Anwendung: Trinkmilch und Obers, allgem. Lebensmittel – auf Milchpulverbasierdende Produkte (Baby-Kindernahrung, Diät-LM)
Probenvorbereitung – wenn nur Sporen nachgewiesen werden sollen: 10ml Probelösung in steriler Eprouvette 15 min bei 80°C im Wasserbad erhitzen (Temperaturkontrolle durchführen); Ansetzen einer Verdünnungsreihe

<u>Anreicherung und Subkultivierung:</u>
VDLUVA METHODENBUCH VI M.7.17.3.2. (1993), IDF 181:1998

1) **Anreicherung** in Caseinpepton-Sojamehl-Polymyxin-B-Sulfat Bouillon (CASO, engl. Trypton soya polymyxin broth) nach MPN-Verfahren
   Zugabe von 0,1 ml Polymyxin-B-Sulfat / 10ml Bouillon
   Bebrütung 48h bei 37±1°C

nagl.netzreport.com

2) **Subkultivierung:** nur positive Röhrchen (Trübung) werden auf vorgetrocknetem Cereus Selektivagar nach MOSSEL (ev. MYP) mit einer Öse ausgestrichen
Bebrütung: 24-48h bei 37±1°C

Bacillus cereus tritt in Form rauher, trockener Kolonien mit rosa bis purpurfarbenem Untergrund in Erscheinung, die von einem Hof dichten Niederschlages umgeben sind. Bestätigungsreaktionen sind anzuschließen.
Identifizierung: aerober Abbau vom D(+)Glucose, Abbau von Gelatine und positive Nitrat-Reduktion
Kolonien mit gelber Umgebung oder mit einem klaren Hof sind mit Sicherheit keine *Bac. cereus.*

Plattenmethode: VDLUVA METHODENBUCH VI M.7.17.3.1 (1993)

Überimpfung im **Spatelverfahren** auf *Bacillus cereus*-Selektivagar (nach Mossel),
Bebrütung 1-2 Tage bei 37 °C.

Probenvorbereitung und Auswertung der Platten erfolgt wie oben.

2. ANAEROBE SPORENBILDNER

Die anaeroben Sporenbildner (Gattung Clostridium) gelangen über die Rohmilch in die Endprodukte, insbesondere bei Verfütterung von schlechter Silage. Im Hart- und Schnittkäse verursacht vor allem *Clostridium tyrobutyricum* durch den Abbau von Milchsäure zu Buttersäure, Wasserstoff und Kohlendioxid die Spätblähung. Im Schmelzkäse kommt es zu unerwünschter Lochbildung und Bombagen. In Lebensmitteln, die mit Milchpulver hergestellt werden, können anaeroben Sporenbildner zu deren Verderb und zu Toxinbildung führen. *Clostridium sporogenes* kann auf Käse durch Proteolyse schmierige übelriechende Beläge, die sogenannte „Weißfäule“ bilden.

2.1 Nachweis anaerober Sporenbildner (Clostridien) VDLUVA VI M.7.18.2.1 (1996)

Anwendung: Milch und Milchprodukte, allgem. Lebensmittel, genauer als die Weinzirlprobe;

Kulturmedium: RCM Agar zu je 10ml in Röhrchen aufschmelzen, bei 60°C heiß halten und nach **MPN** ansetzen
Oder RCM Bouillon mit Durhamröhrchen; pH 6,8±0,2
Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder Pepton-Kochsalzlösung
Ansatz: MPN, zum Agar oder Bouillon Probe hinzufügen mischen und **10 min bei 75°C im Wasserbad heißhalten** (Temperaturkontrolle durchführen), abkühlen und erstarren lassen, anschließend mit Wasseragar überschichten
Bebrütung: anaerob 3-5 Tage bei 37±1°C
Auswertung:
Bestimmt werden **allgem. anaerobe Sporenbildner**, dafür wird die Gasbildung beurteilt (Zerreißen der Agarsäule und/oder Anhebung des Wasseragar-Stopfens.

Zur **Überprüfung der käsereischädlichen Clostridien** (*Cl. tyrobutyricum, Cl. sporogenes)* wird nach VDLUVA VI M.7.18.3.1 (1996) der pH des RCM Mediums mit Milchsäure auf 5,4±0,1 gesenkt, um selektiv die käsereischädlichen Clostridien zu erfassen. Ansonsten wird wie oben verfahren.

nagl.netzreport.com

2.2 Titerverfahren mit der Weinzirlprobe

VDLUVA Methodenbuch VI M.7.18.2. (1985)

Anwendung: Eignungstest der Milch für Schnittkäseproduktion - max. ein positives Röhrchen von fünf;

5 sterile Eprouvetten werden mit 2 ml Paraffin beschickt,
5 ml Milch werden in jede Eprouvette pipettiert,
15 min bei 80±1°C im Wasserbad erhitzt, abgekühlt und
3-10 Tage bei 37 °C bebrütet.

Positive Röhrchen erkennt man an der Gasbildung (Stopfen ist angehoben), die durch die Verwertung von Lactose entsteht. Zur Klärung nicht eindeutiger Ergebnisse kann es erforderlich sein, die Bebrütungszeit bis zu 10 Tage zu verlängern.

2.3 Nachweis von sulfitreduzierende Clostridien

MPN-Verfahren mit DRCM-Bouillon VDLUVA Methodenbuch VI M.7.18.4. (1988)

Anwendung: Milch und Milchprodukte, allgem. Lebensmittel

Kulturmedium: DRCM mit Agarzusatz oder Bouillon zu je 10ml in Röhrchen aufschmelzen, bei 60°C heiß halten und nach **MPN** ansetzen
Verdünnungslösung: 1/4 starke Ringerlösung (9 ml) oder Pepton-Kochsalzlösung
Ansatz: MPN, zum Agar oder Bouillon Probe hinzufügen, dabei wird die Pipette tief in die Bouillon eingetaucht; NICHT schütteln und **10 min bei 80°C im Wasserbad heißhalten** (Temperaturkontrolle durchführen), abkühlen und erstarren lassen, anschließend mit Wasseragar 2cm überschichten
Bebrütung: anaerob 3-5 Tage bei 37±1°C
Auswertung:
Bestimmt werden **allgem. anaerobe Sporenbildner**, dafür wird die Gasbildung beurteilt (Zerreißen der Agarsäule und/oder Anhebung des Wasseragar-Stopfens.
Bei **sulfitreduzierende anaerobe Sporenbildner** wird nur die schwarze Verfärbung beurteilt.

Das DRCM-Medium enthält Natriumsulfit und Eisen(III)-ammoniumcitrat, welches durch Reduktion von Sulfit als schwarzes Eisensulfid ausfällt. Daneben ist ein Farbindikator (Resazurin) zugesetzt, der zur Kontrolle einer ausreichenden Anaerobiose dient. Das DRCM-Medium wird hauptsächlich zum Nachweis von *Clostridium perfringens* eingesetzt, eignet sich aber auch zur Isolierung von *Clostridium sporogenes*.