



Masterarbeit

Einsatzmöglichkeiten der MALDI-ToF-MS bei der Untersuchung von Speiseinsekten

Fakultät für Naturwissenschaften und Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M.Sc.)

Tomke Marie Asendorf

29.09.2021

Gutachter: Dr. rer. nat. Dirk Benndorf
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
MPI Magdeburg
Prof. Dr. –Ing. Udo Reichl
MPI Magdeburg
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Dr. med. vet. Christine Wind
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg

Betreuer: Dr. med. vet. Christine Wind
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
Dr. rer. nat. Dirk Benndorf
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
MPI Magdeburg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich beim Anfertigen dieser Masterarbeit unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Christine Wind, die meine Arbeit vor Ort betreut und begutachtet hat. Sie stand mir jederzeit bei allen erdenklichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite und hat dabei alles für diese Arbeit Notwendige für mich möglich gemacht. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Benndorf, der meine Arbeit als Betreuer von Seiten der OvGU begleitet und begutachtet hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Elisabeth Becker. Sie hat mich mit anregenden Diskussionen und ganz viel Labor-know-how zu jedem Zeitpunkt unterstützt und mir jederzeit weitergeholfen.

Dieser Dank gilt allen LabormitarbeiterInnen der Abteilung 6 des CVUA Freiburgs, insbesondere Marie-Sophie Schneider, Mary Barthel, Guiseppe Graziano und Meike Rückert, sowie Laura Schiel, die mir für alle Fragen rund um Speiseinsekten und darüberhinaus zur Seite stand.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Ekkehard Hiller vom CVUA Stuttgart für die Einführung in Geneious und der Möglichkeit jederzeit, jede erdenklich Frage stellen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Gerold Schwarz der Firma Bruker für spannende Denkanstöße und das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit. Dieser Dank gilt auch Astrid Erdmann für das Lösen des ein oder anderen MALDI-ToF-MS-Softwareproblems.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern, Regina und Michael Asendorf, für die seelische Unterstützung aus der Ferne und das Korrekturlesen dieser Arbeit.



Fakultät für Naturwissenschaften und Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik

Aufgabenstellung der Masterarbeit

Für Frau Asendorf, Matr.-Nr. 223381

Thema:

Einsatzmöglichkeiten der MALDI-ToF-MS bei der Untersuchung von Speiseinsekten

Erläuterung der Aufgabenstellung: Zunächst soll untersucht werden, ob die Identifizierung der von Speiseinsekten isolierten Mikroorganismen mittels der MALDI-ToF-MS möglich ist. Gegebenenfalls ist hierbei eine Erweiterung der MALDI-ToF-MS Datenbank um nicht direkt identifizierbare Isolate notwendig. Zur Erstellung dieser neuen Datenbankeinträge muss eine Identifizierung der Isolate erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit soll hierfür eine Möglichkeit erarbeitet werden. Die Arbeit soll sich des Weiteren mit dem häufig von Speiseinsekten isolierten Keim *Bacillus cereus* beschäftigen. Ziel ist zum einen die Erarbeitung von Methodiken zum Nachweis des teilweise von dieser Erregergruppe gebildeten Toxins Cereulid. Zum anderen erweist sich die Differenzierung der Spezies der *Bacillus cereus* Gruppe aktuell als nur schwer und etwa mittels MALDI-ToF-MS gar nicht möglich. Entsprechend soll sich die vorgestellte Arbeit mit Möglichkeiten diese Differenzierung zu verbessern bzw. zu ermöglichen beschäftigen.

Betreuer: Dr. rer. nat. Dirk Benndorf

Dr. med. vet. Christine Wind

Beginn der Arbeit: 07.04.2021

Abgabe der Arbeit: 07.10.2021

Unterschrift

Verantwortlicher Hochschullehrer (Prüfer A)

Unterschrift

Betreuerin (Prüferin B)

I ZUSAMMENFASSUNG

Speiseinsekten spielen eine zunehmende Rolle auf dem Lebensmittelmarkt. Mit der Novel-Food-Verordnung (VO 2015/2283) wurde der rechtliche Rahmen für die Einführung von Speiseinsektenprodukten auf den Markt der EU gegeben. Nun gilt es die Einsatzmöglichkeiten der an den Untersuchungsämtern verwendeten Verfahren für Speiseinsekten zu ermitteln, anzupassen und zu erweitern.

Eine in den letzten Jahren immer häufiger in mikrobiologischen Laboren eingesetzte Methode ist dabei die MALDI-ToF-MS. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die von Speiseinsekten isolierten Mikroorganismen mit dieser Methode identifizierbar sind. Es wurden 138 Mikroorganismen isoliert von 22 verschiedenen Speiseinsektenprodukten mit dem MALDI-ToF-MS untersucht. Knapp 70 % der Organismen konnten hierbei auf Speziesebene identifiziert werden. Mit nicht identifizierbaren Isolaten wurde eine PCR mit dem Zielgen *rpoB* durchgeführt und die PCR-Produkte im Anschluss außer Haus sequenziert. Das *rpoB* Gen kodiert für die RNA-Polymerase-Untereinheit β . Es bietet dabei eine höhere phylogenetische Auflösung als das standardmäßig verwendete 16S rRNA Gen. Nahezu alle Isolate konnten so nachträglich identifiziert und in die MALDI-ToF-MS Datenbank eingepflegt werden.

Bei einem Drittel der identifizierten Isolate handelte es sich um Stämme der *Bacillus cereus* Gruppe. Eine genaue Speziesdifferenzierung dieser Gruppe ist bis dato mit der MALDI-ToF-MS nicht und generell nur schwer möglich. Zunächst wurde untersucht, ob eine Unterscheidung der Spezies über die PCR-Produkte der *rpoB* PCR möglich ist. In einem weiteren Versuch wurden Primer für das *pycA* Gen generiert. Das *pycA* Gen kodiert für die Pyruvat-Carboxylase-Untereinheit A und wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen zur Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe verwendet. Im Vergleich zum *rpoB* Gen konnte die Speziesdifferenzierung mit den neu erstellten Primern verbessert werden. Eine eindeutige Speziesidentifizierung war jedoch nicht möglich. Dies ist unter Umständen auf die noch nicht abschließend festgelegte Taxonomie der Gruppe zurückzuführen.

Eine weitere Möglichkeit die *Bacillus cereus* Gruppe näher zu charakterisieren, ist die Untersuchung der Toxinbildungsfähigkeit. In den letzten Jahren hat vor allem das von einigen Vertretern dieser Gruppe gebildete emetische Toxin Cereulid vermehrt zu Lebensmittelintoxikationen geführt. Im Rahmen der Arbeit wurde hierfür zunächst eine

Real-Time PCR zum Nachweis des *ces* Gens für die Routineanwendung im CVUA Freiburg etabliert. Das *ces* Gen steht im engen Zusammenhang mit der Fähigkeit der Stämme, Cereulid zu bilden.

Einige Veröffentlichungen zeigen, dass das emetische Toxin direkt mit der MALDI-ToF-MS nachweisbar ist. Bislang war jedoch der Nachweis von nur schwach Toxin bildenden Stämmen im CVUA Freiburg nicht möglich. Aufgrund dessen wurde innerhalb dieser Arbeit ein Protokoll erstellt, um die Sensitivität der Methode zu erhöhen. Es beinhaltet für die maximale Cereulidproduktion möglichst optimale Kulturbedingungen, die Extraktion des Toxins sowie an den Massebereich des Peptids angepasste MALDI-ToF-MS Einstellungen. Erstellt wurde außerdem ein Modell zur automatischen Klassifizierung der Stämme in der Software ClinProTools.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnten die Untersuchungsmöglichkeiten des CVUA Freiburgs für Speiseinsekten erweitert werden. Das für den Cereulidnachweis mittels der MALDI-ToF-MS erstellte Protokoll stieß bereits bei externen Fachleuten auf Interesse und wird nach Veröffentlichung dieser Arbeit weitergegeben.

II ABSTRACT

Edible insects are playing an increasing role in the food market. The Novel Food Regulation (VO 2015/2283) has provided the legal framework for the introduction of edible insect products onto the EU market. Now the analytical methods of the official food control laboratories for the examination of edible insects need to be identified, adapted and expanded to ensure the food safety of this new food group.

One method that has been increasingly used in microbiological laboratories in recent years is MALDI-ToF-MS. In this work, we investigated whether microorganisms isolated from edible insects could be identified by this method. 138 microorganisms isolated from 22 different edible insect products were analyzed using MALDI-ToF-MS. Almost 70% of the organisms could be identified at the species level. With unidentifiable isolates, PCR was performed using the target gene *rpoB* and the PCR products were subsequently sequenced off-site. The *rpoB* gene encodes the RNA polymerase subunit β . It offers a higher phylogenetic resolution than the standard 16S rRNA gene. Almost all isolates could be subsequently identified and entered into the MALDI-ToF-MS database.

One third of the identified isolates were strains of the *Bacillus cereus* group. To date, accurate species differentiation of this group has not been possible with MALDI-ToF-MS and is generally difficult. First, it was investigated whether a differentiation of the species is possible via the PCR products of the *rpoB* PCR. In a further experiment, primers for the *pycA* gene were generated. The *pycA* gene encodes the pyruvate carboxylase subunit A and has been used in previous studies for species differentiation of the *Bacillus cereus* group. Compared to the *rpoB* gene, species differentiation was improved with the newly constructed primers. However, unambiguous species identification was not possible. This may be due to the taxonomy of the group, which has not yet been finalized.

Another way to further characterize the *Bacillus cereus* group is to study its toxin-forming ability. In recent years, the emetic toxin cereulide, which is produced by some members of this group, has increasingly led to food intoxications. Within the scope of this work, a real-time PCR for the detection of the *ces* gene was initially established for routine use in the CVUA Freiburg. The *ces* gene is closely related to the ability of strains to produce cereulide.

Some publications show that the emetic toxin is directly detectable by MALDI-ToF-MS. However, until now, the detection of only weak toxin-forming strains was not possible

at CVUA Freiburg. Due to this, a protocol was established within this work to increase the sensitivity of the method. It includes optimal culture conditions for maximum cereulide production, extraction of the toxin and MALDI-ToF-MS settings adapted to the mass range of the peptide. A model was also created for automatic classification of the strains in the ClinProTools software.

With the results of this work, the analytical possibilities of the CVUA Freiburg for edible insects could be extended. The protocol created for cereulide detection using MALDI-ToF-MS has already attracted interest from external experts and will be shared after publication of this work.

III ERKLÄRUNG ZUR SELBSTÄNDIGEN ANFERTIGUNG DER ARBEIT UND ZU DEN VERWENDETEN HILFSMITTELN

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Bachelor-/Masterarbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Bachelor-/Masterarbeit eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

IV INHALTSVERZEICHNIS

I	Zusammenfassung	I
II	Abstract	III
III	Erklärung zur selbständigen Anfertigung der Arbeit und zu den verwendeten Hilfsmitteln	V
IV	Inhaltsverzeichnis	VI
V	Abbildungsverzeichnis	IX
VI	Tabellenverzeichnis	XI
VII	Abkürzungsverzeichnis	XII
1	Ziel der Arbeit	1
2	Hintergrund und Theorie	3
2.1	Speiseinsekten	3
2.2	<i>Bacillus cereus</i>	5
2.2.1	Taxonomie der <i>Bacillus cereus</i> Gruppe	5
2.2.2	Emetisches Toxin (Cereulid)	8
2.3	Polymerase-Kettenreaktion	9
2.3.1	Real-time PCR	10
2.4	MALDI-ToF-Massenspektrometrie	11
2.4.1	Funktionsweise	11
2.4.2	Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelüberwachung	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Herkunft der Proben	15
3.1.1	Isolation von Mikroorganismen von Speiseinsektenproben	15
3.1.2	Mikroorganismen aus der hausinternen Stammsammlung	15
3.2	Mikrobiologische Techniken	16
3.2.1	Reinkulturgewinnung	16
3.2.2	Stichkultur	16
3.2.3	Stammsammlung	16

3.3	Molekularbiologische Techniken	17
3.3.1	Zielgene für die Sequenzierung	17
3.3.2	Oligonukleotide	17
3.3.3	Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese	20
3.3.5	Real-time PCR des <i>ces</i> Gens	21
3.4	MALDI-ToF-MS	23
3.4.1	Speziesidentifizierung	23
3.4.2	Erstellung neuer Datenbankeinträge	25
3.4.3	Nachweis des emetischen Toxins Cereulid in <i>B. cereus</i> Isolaten	25
3.5	MALDI-ToF-MS Datenauswertung	26
3.5.1	Speziesidentifizierung	26
3.5.2	Datenbankeinträge	26
3.5.3	Klassifizierung Cereulid bildender <i>Bacillus cereus</i> Isolate	27
3.5.4	Statistik	28
3.6	Sequenzanalyse	28
3.6.1	Primeranalyse	29
3.6.2	Primerdesign	30
3.6.3	Sangersequenzierungsauswertung	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Teil I: Mikrobiologische Untersuchung der Speiseinsekten	32
4.1.1	Identifizierte Mikroorganismen	32
4.1.2	Nicht identifizierte Mikroorganismen	35
4.2	Teil II: Sequenzanalyse	36
4.2.1	<i>rpoB</i> Gen Sequenzierung	36
4.2.2	<i>pycA</i> Gen Sequenzierung	45
4.3	Teil III: <i>ces</i> Real-time PCR	53
4.3.1	Verifizierung und Etablierung	53

4.3.2	Untersuchung der <i>Bacillus cereus</i> Isolate der Speiseinsektenproben.	55
4.4	Teil IV: Cereulidtoxin-Nachweis mittels MALDI-ToF-MS	56
4.4.1	Entwicklung Cereulidnachweisprotokoll für MALDI-ToF-MS	57
4.4.2	Zusammenfassung.....	74
5	Diskussion	77
5.1	Teil I: Mikrobiologische Untersuchungen.....	77
5.1.1	Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte Mikroorganismen	77
5.1.2	Mittels MALDI-TOF-MS nicht identifizierte Mikroorganismen	78
5.2	Teil II: Sequenzanalyse	79
5.2.1	<i>rpoB</i> Gen Sequenzierung.....	79
5.2.2	<i>pycA</i> Gen Sequenzierung	82
5.2.3	Zusammenfassung.....	85
5.3	Teil III: <i>ces</i> Real-time PCR	86
5.4	Teil IV: Cereulidtoxin-Nachweis mittels MALDI-ToF-MS	88
5.4.1	Entwicklung Cereulidnachweisprotokoll für MALDI-ToF-MS	88
5.4.2	Cereulidnachweis auf Isolatn der Speiseinsektenprodukte	93
5.4.3	Zusammenfassung.....	94
6	Fazit und Ausblick	96
7	Literaturverzeichnis	98
A.	Speiseinsekten	109
B.	Sequenzanalyse	125
C.	<i>ces</i> Real-time PCR.....	135
D.	Cereulidtoxin-Nachweis mittels MALDI-ToF-MS	140
E.	Literaturverzeichnis	144

V ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Funktionsweise der MALDI-ToF-MS.....	13
Abbildung 4-1: Mit MALDI-ToF-MS identifizierte Mikroorganismen.	33
Abbildung 4-2: Distanzmatrix der <i>rpoB</i> PCR Produkte.	37
Abbildung 4-3: Beispielhafte E-Gel Ergebnisse zur Überprüfung der <i>rpoB</i> PCR.	39
Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der <i>rpoB</i> PCR-Produkte der <i>Bacillus (B.) cereus</i> Isolate.....	44
Abbildung 4-5: Distanzmatrix der <i>pycA</i> PCR Produkte.....	47
Abbildung 4-6: Beispielhafte E-Gel Ergebnisse zur Überprüfung der <i>pycA</i> PCR.	48
Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der <i>pycA</i> PCR-Produkte der <i>Bacillus (B.) cereus</i> Isolate.	51
Abbildung 4-8: Amplifikationsplots der <i>ces</i> Real-time PCR von <i>Bacillus cereus</i> Isolaten der Stammsammlung vom CVUA Freiburg und CVUA Stuttgart.	54
Abbildung 4-9: Amplifikationsplot der <i>ces</i> Real-time PCR von <i>Bacillus cereus</i> Isolaten der Speiseinsektenproben.	56
Abbildung 4-10: Verschiedene Extraktionen zum Cereulidtoxinnachweis im MALDI-ToF-MS. Durchführung in an Anlehnung an Döllinger et al. (Doellinger et al. 2020). 60	
Abbildung 4-11: Verschiedene Untersuchungen zur LDI-ToF-MS Messung vom Cereulid Standard (1 µg/mL und 10 µg/mL). ..	67
Abbildung 4-12: Mit MALDI/LDI-ToF-MS aufgenommene Spektren des Cereulid Standards in unterschiedlichen Konzentrationen (1 µg/mL und 10 µg/mL).	68
Abbildung 4-13: Spektren der <i>Bacillus</i> spp. Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Gemessen mittels MALDI-ToF-MS nach Auftragung mit erweiterten Direkttransfer..	69
Abbildung 4-14: Spektren der <i>Bacillus</i> spp. Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Gemessen mittels MALDI-ToF-MS nach einer Cereulidextraktion. .	70
Abbildung 4-15: Schwach Cereulid bildendes <i>Bacillus cereus</i> Isolat (BC 37) gemessen mit unveränderten Ausgangseinstellungen und neu erarbeiteten MALDI-ToF-MS Einstellungen.....	71
Abbildung 4-16: Ermittlung der Cereulidnachweisgrenze des MALDI-ToF-MS Geräts. Bild oben: Messung mit Ausgangseinstellungen. Bild unten: Messung mit neu erarbeiteten Einstellungen.	72
Abbildung 4-17: Nicht-emetische (grün) und emetische (rot) <i>Bacillus cereus</i> Isolate gemessen im MALDI-ToF-MS nach einer Cereulidextraktion. Darstellung in FlexAnalysis (Bruker, Version 3.4 (Build 79)).	73

Abbildung 4-18: Vergleich ursprünglicher MALDI-ToF-MS Methode zum Nachweis von Cereulid (links) mit neu erarbeiteter Methode (rechts).....	76
Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der <i>rpoB</i> PCR-Produkte der <i>Bacillus (B.) cereus</i> Isolate. Schwarze Linien markieren von Carroll et al. vorgestellte Spezieszuordnung. (Carroll et al. 2020).	82
Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der <i>pycA</i> PCR-Produkte der <i>Bacillus (B.) cereus</i> Isolate. Schwarze Linien markieren von Carroll et al. vorgestellte Spezieszuordnung. (Carroll et al. 2020).	85

VI TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1: 22 in der Literatur erwähnte <i>Bacillus cereus</i> Spezies (Liu et al. 2017; Carroll et al. 2020). Erstellt nach Vorbild vom Vortrag des BfR am 15.6.2021 auf dem Symposium der nationalen Referenzlaboratorien (NRL-Symposium)(Frentzel 2021).	7
Tabelle 3-1: Übersicht der für Real-time PCR und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide.....	18
Tabelle 3-2: Komponenten der PCR.....	20
Tabelle 3-3: Temperatur-Zeit-Profil der PCR.....	20
Tabelle 3-4: PCR-Ansatz der <i>ces</i> Real-time PCR.	22
Tabelle 3-5: Temperatur-Zeit-Profil der <i>ces</i> -Real-time PCR.	23
Tabelle 3-6: Spezies der für die Untersuchung verwendeten 18 Vollgenomsequenzen. Zusammengestellt vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Detaillierte Auflistung s. Anhang Tabelle B- 1.	29
Tabelle 4-1: Genaue Bezeichnung der mittels MALDI-ToF-MS identifizierten Mikroorganismen von Speiseinsekten.....	33
Tabelle 4-2: Mittels MALDI-ToF-MS nicht eindeutig identifizierte Mikroorganismen von Speiseinsekten.	35
Tabelle 4-3: Durch <i>rpoB</i> Gen Sequenzierung identifizierte Spezies.	40
Tabelle 4-4: BLAST-Ergebnisse (Auswahl) der mit Primern für das <i>rpoB</i> Gen sequenzierten <i>Bacillus cereus</i> Isolate..	42
Tabelle 4-5: Eigenschaften neu designer Primer zur Speziesdifferenzierung der <i>Bacillus cereus</i> Gruppe über das <i>pycA</i> Gen.....	46
Tabelle 4-6: Gegenüberstellung der BLAST-Ergebnisse der Sequenzen der <i>rpoB</i> bzw. <i>pycA</i> Sequenzierung der <i>Bacillus cereus</i> Isolate im Abgleich mit der eigens erstellten <i>Bacillus cereus</i> Datenbank.	49
Tabelle 4-7: Zur Verifizierung der <i>ces</i> Real-time PCR verwendete Stämme der hausinternen Stammsammlung des CVUA Freiburgs, der vom CVUA Stuttgart zur Verfügung gestellten Stämme und des Stamms der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Stamm DSM 4312-1218-001).....	53
Tabelle 4-8: Auswahl der Ergebnisse der <i>ces</i> Real-time PCR der insgesamt 34 <i>Bacillus cereus</i> Isolate der Speiseinsektenproben.....	55

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a. U.	arbitrary Unit
ACN	Acetonitril
AL	Aufarbeitungsleerwert
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BTS	Kalibrationsstandard für Massebereich 3,6 – 17 kDa (engl. Bacterial Test Standard, Fa. Bruker)
CASO	Casein-Soja-Pepton-Agar
CBL	Columbia-Blutagar (mit 5% Schafblut)
Ct	Schwellwertzyklus (engl. Cycle threshold)
CVUA	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt
Da	Dalton
dDDH	Digitale DNA:DNA Hybridisierung
dNTPs	Desoxynucleosid-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic Acid)
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. European Food Safety Authority)
EU	Europäische Union
F	Vorwärtsprimer (engl. Forward Primer)
FAM	6-FAM-phosphoramidit (Reporter)
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
GS	Gigasample
h	Stunden
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure
IAC	Interne Amplifikationskontrolle (engl. Internal amplification control)

KbE/g	Kolonie bildende Einheiten pro Gramm
LHL	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
MALDI-ToF-MS	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF) Massenspektrometrie
MLST	Multi-locus-Sequenztypisierung (engl. Multilocus sequence typing)
MSP	Datenbankeinträge für Massenspektrometer (engl. Main Spectra Profiles)
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen
NTC	Reagenzien-Kontrolle
P	Sonde (engl. Probe)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PCS II	Kalibrationsstandard für Massebereich 700 – 3200 Da (engl. Peptide Calibration Standard II, Fa. Bruker)
PEP	gepuffertes Peptonwasser
PV	Prüfverfahren
<i>pycA</i>	Gen, codiert für Pyruvat-Carboxylase-Untereinheit A (UniProt Consortium 2021).
QSY	Quencher (Fa. ThermoFisher Scientific)
R	Rückwärtsprimer (engl. Reverse Primer)
Rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>rpoB</i>	Gen, codiert für DNA-gesteuerte RNA-Polymerase-Untereinheit β . Zielgen für phylogenetische Analysen und Identifizierungen von Bakterien (Adékambi et al. 2009).
<i>SD</i>	Standardabweichung
TaqM	Taqman™ PCR-Technologie
TFA	Trifluoressigsäure
TRBA	Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe

1 ZIEL DER ARBEIT

Ziel der vorgestellten Arbeit ist die Untersuchung der Einsatzmöglichkeiten der MALDI-ToF-MS bei der Untersuchung von Speiseinsekten. Aufgabe ist die Verbesserung und Erweiterung der Untersuchungsmöglichkeiten von Speiseinsekten im CVUA Freiburg. Zunächst werden hierfür von Speiseinsekten isolierte Mikroorganismen mittels der MALDI-ToF-MS untersucht. Dabei ist festzustellen, ob und bis zu welchem Grad die Identifizierung dieser speiseinsektenspezifischen Isolate mit dieser Methode möglich ist. Gegebenenfalls ist hierbei eine Erweiterung der Datenbank, um nicht eindeutig identifizierbare Spezies notwendig. Dafür soll eine Methode erarbeitet werden, um die Speziesbezeichnung der Isolate, die durch das MALDI-ToF-MS-Gerät nicht identifizierbar sind, zu ermitteln. Ansatzpunkt ist das Erstellen einer PCR, mit dem ein Genabschnitt amplifiziert wird, mit dem bei allen Isolaten eine Speziesbestimmung möglich ist.

Schwerpunkt der Arbeit liegt des Weiteren auf der Untersuchung des häufig auf Speiseinsekten isolierten Keims *Bacillus cereus*. Das CVUA Freiburg plant auch hier die Untersuchungsmethoden zu erweitern. Realisiert werden soll dies zum einen durch die Etablierung von Nachweismethoden des teilweise von dieser Keimgruppe gebildeten Toxins Cereulid. Hier soll eine Real-time PCR zum Nachweis des im Zusammenhang mit der Toxinbildungsfähigkeit stehenden *ces* Gens in die Routine des CVUA Freiburgs eingeführt werden. Das Cereulidtoxin kann außerdem theoretisch mit Hilfe der MALDI-ToF-MS schneller und kostengünstiger als mit der Realtime-PCR nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit ist somit die Erarbeitung einer Methode, um den Cereulidtoxinnachweis mittels der MALDI-ToF-MS im CVUA Freiburg zu realisieren.

Zum anderen ist aktuell die genaue Speziesdifferenzierung innerhalb der *Bacillus cereus* Gruppe nur schwer und mit der MALDI-ToF-MS gar nicht möglich. Um etwa den gesundheitsgefährdenden Keim *Bacillus anthracis* schneller identifizieren zu können, soll innerhalb dieser Arbeit eine Möglichkeit zur Speziesdifferenzierung erarbeitet werden. Ansatzpunkt wäre auch hier das Erstellen einer PCR, um einen Genabschnitt zu amplifizieren, mit dem die Speziesdifferenzierung dieser Gruppe möglich ist.

Insgesamt soll diese Arbeit die mikrobiologischen, molekularbiologischen und massenspektrometrischen Untersuchungsmöglichkeiten von Speiseinsekten im CVUA

Freiburg unterstützen. Hauptaugenmerk liegt auf der Untersuchung des häufig auf Speiseinsekten nachgewiesenen Erregers *Bacillus cereus*.

2 HINTERGRUND UND THEORIE

2.1 SPEISEINSEKTEN

Der Begriff Speiseinsekt beschreibt für den menschlichen Verzehr bestimmte (und als Lebensmittel zugelassene) Insekten (Europäisches Parlament und Rat 28.01.2002, Artikel 2). Der Verzehr von Insekten wird als Entomophagie bezeichnet (Evans et al. 2015). Als für den Menschen essbar gelten ca. 2000 Arten (Stand 2017) (Jongema 2017). In der europäischen Union (EU) als Lebensmittel zugelassen ist seit Juni 2021 nur der Mehlwurm (*Tenebrio molitor* im Larvenstadium) in getrockneter Form (Europäische Kommission 01.06.2021). Aufgrund der in der Novel-Food-Verordnung festgelegten Übergangsregelungen ist darüber hinaus das Inverkehrbringen folgender Spezies in der jeweils beantragten Form in der EU aktuell gestattet: Heimchen (*Acheta domestica*), Buffalowurm (*Alphitobius diaperinus* im Larvenstadium), Drohnenbrut der Honigbiene (*Apis mellifera* im Puppenstadium), Kurzflügelgrille (*Gryllodes sigillatus*), Schwarze Soldatenfliege (*Hermetia illucens* im Larvenstadium), Europäische Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) und der Mehlwurm (*Tenebrio molitor* im Larvenstadium) (s. Übergangsregelungen der VO 2015/2283 Art. 35 Abs. 2) (Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2015; Europäisches Parlament und Rat 15.11.2005). Eine ausführlichere Darstellung der aktuellen Rechtslage findet sich im Anhang (s. Anhang A 1).

Insekten als Nahrungsmittel besitzen eine Vielzahl an Vorteilen. Hinsichtlich ihrer Nährwerte weisen sie beispielsweise je nach Spezies und Entwicklungsstadium einen Proteingehalt von bis zu 70 % auf und decken dabei überwiegend alle für den Menschen essentiellen Aminosäuren ab. Hinzukommt ein zumeist hoher Ballaststoffgehalt von bis zu 30 % und ein hoher Gehalt an Vitaminen und Spurenelementen (Rumpold und Schlüter 2013).

Außerdem gelten sie als umweltfreundlichere Alternative zu anderen herkömmlichen tierischen Proteinquellen wie etwa Rindern. So geht die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (engl. Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]) davon aus, dass bei der Produktion von Insekten weniger Treibhausgase ausgestoßen werden wie etwa im Vergleich zu Rindern. Hinzu kommt ein geringerer Platzbedarf und eine effizientere Verwertung von Futter (van Huis et al. 2013, S. 60). Der essbare Anteil liegt bei Insekten bei 80 %, bei Rindern nur bei 40 % (Benning et al. 2019, S. 45).

Neben den Vorteilen gibt es bei Insekten als neuartige Lebensmittel aber auch Risiken, die z. B. von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. European Food Safety Authority [EFSA]) in einem 2015 veröffentlichten Risikoprofil dargestellt werden. Benannt werden darin, die von Speiseinsekten ausgehenden biologischen, chemischen und Umwelt-Gefahren. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen ist vor allem die mögliche mikrobiologische Belastung relevant. Kontaminationen können hierbei sowohl vom Tier selbst oder dem Substrat, auf dem sie gezüchtet wurden, ausgehen, als auch bei ihrer Verarbeitung entstehen. Die natürliche mikrobiologische Flora von Insekten besteht z. B. aus den Gattungen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* und *Acinetobacter*. Da Insekten genetisch von Menschen und anderen Säugetieren weit genug entfernt sind, wurden für Insekten pathogene Mikroorganismen als für den Menschen ungefährlich eingestuft (van Huis et al. 2013). Für den Menschen gefährliche Mikroorganismen und ihre Toxine gelangen demnach höchst wahrscheinlich erst durch die Haltung und Verarbeitung der Insekten in die Produkte (EFSA Scientific Committee 2015).

In einer belgischen Studie konnten in gezüchteten Insekten vor ihrer Verarbeitung hohe Keimzahlen von 10^7 KbE/g für die Gesamtkeimzahl aerober Bakterien nachgewiesen werden (FASFC's Scientific Committee 2014). Dabei konnten z. B. Sporen bildende Bakterien wie etwa *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* und *Bacillus cereus* sowie Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* isoliert werden. Im Risikoprofil der Niederlande zum Verzehr von Insekten wird z. B. eine Studie aufgegriffen, im Rahmen derer unverarbeitete Speiseinsekten untersucht wurden. Mit einer Konzentration von 10^6 KbE/g überschritten hier 59 % der Insektenprodukte die in der zugelassenen Hygienevorschrift vorgegebenen Werte für aerobe Bakterien in rohen Materialien in der Fleischproduktion (10^3 KbE/g) (EFSA Scientific Committee 2015; Director Office for Risk Assessment & Research 2021). In 93% der untersuchten Proben war die Konzentration von *Bacillus cereus* kleiner als 100 KbE/g (EFSA Scientific Committee 2015). Andere Untersuchungen bestätigen die generell hohe Konzentration an Sporen bildenden Bakterien, weisen dabei aber auch auf eine höhere Konzentration von *Bacillus cereus* hin (Garofalo et al. 2019; Grabowski und Klein 2017; Fasolato et al. 2018).

Die Verarbeitung von Speiseinsekten, bestehend zumeist aus einem Dehydratationsschritt durch Erhitzung oder Gefriertrocknung, führt zu einer deutlichen

Verringerung der Keimzahlen (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) 12.05.2015; Garofalo et al. 2019). Nachgewiesen werden konnten anschließend *Bacilli*, vornehmlich *Bacillus cereus*, sowie verschiedene *Enterobacteriaceae* und *Staphylococci*. Vereinzelt konnte außerdem *Listeria spp.* und *Listeria ivanovii* nachgewiesen werden (Grabowski und Klein 2017; Garofalo et al. 2019).

2.2 BACILLUS CEREUS

Bacillus cereus ist ein ubiquitär in der Umwelt vorkommendes grampositives Bakterium der Gattung *Bacillus*. Sein Name leitet sich aus den lateinischen Begriffen „Bacillus“ (=Stäbchen) und „cereus“ (=wachsfarben) ab, was zwei weitere Eigenschaften des Mikroorganismus beschreibt (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 15). Es handelt sich um eine Gruppe nahverwandter Spezies mit zum Teil sehr heterogenen Eigenschaften. So sind die meisten Vertreter der Gruppe psychrophil oder mesophil, während *Bacillus cytotoxicus* mit einem Temperaturmaximum von +52°C als thermotolerant eingestuft werden kann (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 18–19). Für die Lebensmittelindustrie besonders heikel sind einige Spezies, die auch noch bei Temperaturen um 5°C zum Wachstum fähig sind (Thorsen et al. 2009). Insgesamt ist die Resistenz der vegetativen Zellen dieser Gruppe gegenüber Hitze, Trockenheit und chemischen Einflüssen eher gering. Das gilt nicht für die von der Gruppe gebildeten Sporen. Sie überstehen Erhitzungsprozesse und stellen damit eine ernsthafte Herausforderung für die Lebensmittelsicherheit dar (Durak et al. 2006). Besonders belastet sind dabei kohlenhydratreiche Lebensmittel und Milchprodukte. Da der Keim ubiquitär vorkommt, lässt er sich in einer Vielzahl von Lebensmittelgruppen nachweisen (Rouzeau-Szynalski et al. 2020). Aufgrund einer zunehmenden Anzahl an klinischen Fallberichten, rückt der Keim Zusehens in den Fokus der Human- und Veterinärmedizin (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 5).

2.2.1 Taxonomie der *Bacillus cereus* Gruppe

Die Spezies der Gruppe *Bacillus cereus*, auch bekannt als *Bacillus cereus sensu lato*, lassen sich nur schwer unterscheiden (Liu et al. 2015). So ist eine Unterscheidung über die Kulturmorphologie nicht möglich, weswegen in der mikrobiologisch-kulturellen Diagnostik von „präsumtivem *Bacillus cereus*“ gesprochen wird (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 17). In den folgenden Formulierungen wird hierfür die

Bezeichnung *Bacillus cereus* verwendet, gemeint ist aber immer präsumtive *Bacillus cereus*, da auch die in dieser Arbeit verwendeten Methodiken eine Speziesdifferenzierung der Gruppe nicht zulassen.

Insgesamt besteht außerdem noch kein wissenschaftlicher Konsens zu einer genauen Klassifizierung der Gruppe. In der 2020 veröffentlichten Norm DIN ISO 7932:2020 -11 zum Zählverfahren von *Bacillus cereus* wird von sieben phylogenetischen Gruppen und einer wachsenden Anzahl von Spezies ausgegangen (DIN EN ISO 7932:2020-11, Absatz 1). Die Festlegung auf diese sieben Gruppen wurde über fluoreszierende, amplifizierende Fragmentlängenpolymorphismus-Muster (engl. amplified fragment-length polymorphism (AFLP)), ribosomale Gene von housekeeping Genen und über die *panC* Gene ausgeführt. Sie resultiert in einer Unterscheidung der Spezies vornehmlich nach ihren Wachstumstemperaturen und ihrer Zytotoxizität (Guinebretière et al. 2008). Neuere Untersuchungen machen sich die sich immer weiterentwickelnden Möglichkeiten der Bioinformatik zu Nutze und vergleichen eine Vielzahl vollständiger Genome miteinander. Liu et al. nutzte etwa Multilocus sequence typing (MLST) sowie die Berechnung der digitalen DNA:DNA Hybridisierung und der durchschnittlichen Nukleotidentität (engl. Average nucleotide identity (ANI)) (Liu et al. 2017). Carroll et al. berechnete den ANI von 2231 *Bacillus cereus* Genomen. Mit einem neuen Grenzwert von 92,5 ANI war es hier möglich Genomsspeziescluster mit minimaler Überlappung zu erzeugen. Wie in Tabelle 2-1 dargestellt, ergaben sich hierbei nochmal neue Spezieszuordnungen. Ergänzt wurden diese mit medizinisch relevanten Subspezies, sowie der Beschreibung von wichtigen Eigenschaften über eine Biovarbezeichnung.

Tabelle 2-1: 22 in der Literatur erwähnte *Bacillus cereus* Spezies (Liu et al. 2017; Carroll et al. 2020). Erstellt nach Vorbild vom Vortrag des BfR am 15.6.2021 auf dem Symposium der nationalen Referenzlaboratorien (NRL-Symposium) (Frentzel 2021).

<i>B. cereus sensu stricto</i> (s.s.) ^{2,3}	<i>B. albus</i> ¹	<i>B. paramycooides</i> ¹
<i>B. thuringiensis</i> ¹	<i>B. paranthracis</i> ¹	<i>B. luti</i> [†]
<i>B. anthracis</i> ³	<i>B. pacificus</i> ¹	<i>B. manliponensis</i>
<i>B. mycooides</i> ²	<i>B. mobilis</i> ¹	<i>B. bingmayongensis</i>
<i>B. weihenstephanensis</i> ²	<i>B. tropicus</i> ¹	<i>B. gaemokensis</i>
<i>B. pseudomycooides</i> ¹	<i>B. wiedmannii</i> [†]	<i>B. clarus</i>
<i>B. cytotoxicus</i> ¹	<i>B. nitrati-reducens</i> ¹	
<i>B. toyonensis</i> ¹	<i>B. proteolyticus</i> ¹	

^{1,2,3}= Risikogruppen nach Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) 466 (Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe; Bundesministerium für Arbeit und Soziales 21.12.2020). Einordnung in Risikostufe 3 von *B. cereus* s.s. durch einige ungewöhnliche Stämme die Antraxtoxine bilden können (Frentzel 2021).

[†] = noch nicht klassifiziert (Stand 21.12.2020)

Neue Zuordnung nach Carroll et al:

Bacillus cereus (s.s.)

Bacillus mosaicus

Bacillus mycooides

Grau: neu definierte Spezies (Liu et al. 2017; Carroll et al. 2020) (alle nicht grau markierten Spezies sind aktuell vom BfR verwendete Speziesklassifikationen, lediglich *B. weihenstephanensis* wird als Synonym von *B. mycooides* behandelt. Das ergibt aktuell 17 klassifizierte Spezies. (Liu et al. 2018; Frentzel 2021; Bundesinstitut Für Risikobewertung 2020))

Zur sogenannten *Bacillus cereus* Gruppe zählen aktuell 17 anerkannte, eng verwandte Spezies. Sie lassen sich nur durch aufwendige wie etwa durch Guinebretière et al. beschriebene Laboruntersuchungen voneinander unterscheiden (Guinebretière et al. 2008). Bis 2016 zählten hierzu die Spezies *Bacillus* (*B.*) *cereus* (*sensu stricto* [*s.s.*]), *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. wiedmannii*, *B. anthracis*, *B. mycooides* und *B. pseudomycooides*. 2017 kamen neun weitere Spezies hinzu: *B. paranthracis*, *B. pacificus*, *B. tropicus*, *B. albus*, *B. mobilis*, *B. luti*, *B. proteolyticus*, *B. nitrati-reducens* und *B. paramycooides* (Liu et al. 2017). Diese neuen Spezies lassen sich untereinander und von den bereits etablierten Spezies nur durch Methodiken der Vollgenomanalyse voneinander unterscheiden (Bundesinstitut Für Risikobewertung 2020; Liu et al. 2017). Seit 2018 wird die Spezies *B. weihenstephanensis* als synonym

für *B. mycoides* betrachtet (Liu et al. 2018). Hinzukommen vier weitere Speziesbezeichnungen die aktuell vom BFR allerdings noch nicht als anerkannte Spezies geführt werden (*B. manliponensis*, *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis*, *B. clarus*) (Liu et al. 2018; Carroll et al. 2020). Die Untersuchungen von Carroll et al. ergeben eine neue Spezieszuordnung und eine Beschreibung der Spezies über ihre Biovare (Carroll et al. 2020). Diese sehr aktuelle Publikation lässt vermuten, dass sich die Taxonomie der *Bacillus cereus* Gruppe in den nächsten Jahren weiter verändert (Bundesinstitut Für Risikobewertung 2020).

Wie auch immer bezeichnet, ist die für die Human- und Veterinärmedizin entscheidendste Information die Fähigkeit der Stämme zur Bildung unterschiedlicher Gifte. Besonders gefährlich ist dabei das Milzbrand-auslösende Anthraxtoxin, gebildet wird es vornehmlich von *Bacillus anthracis* bzw. Spezies mit biovar anthracis nach Carroll et al. (Carroll et al. 2020). Als Insektizid eingesetzt werden außerdem die Bt-Toxine (Cry- und Cyt-Toxin) der Spezies *Bacillus thuringiensis* bzw. Spezies mit biovar thuringiensis nach Carroll et al. (Carroll et al. 2020). Hinzukommen drei Enterotoxine (nonhämolytisches Enterotoxin (NHE), hämolytisches BL-Enterotoxin (HBL), Cytotoxin K (CytK)), die das „diarrhöische Syndrom“ auslösen können und in einem Großteil aller *Bacillus cereus* Isolate nachgewiesen werden konnten. Dem gegenüber steht das Erbrechen auslösende (emetische) Cereulidtoxin, dem Carroll et al. die Biovarbezeichnung emeticus zuordnet (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 33; Carroll et al. 2020). Die Spezies sind aktuell mittels der MALDI-ToF-MS nicht unterscheidbar (Danner et al. 2019). Mittels der MALDI-ToF-MS nachweisbar ist aber etwa das genannte Cereulidtoxin (Ulrich et al. 2019).

2.2.2 Emetisches Toxin (Cereulid)

Bei diesem Toxin handelt es sich im Gegensatz zu den diarrhöischen Enterotoxinen um ein Hitze- und pH-stabiles Toxin, das nicht erst im Darm, sondern bereits im Lebensmittel selbst gebildet wird. Nach einer Inkubationszeit von 0,5 bis sechs Stunden nach Aufnahme des Toxins führt es zu Erbrechen. Die Symptomatik ähnelt dabei Lebensmittelvergiftungen ausgelöst durch die Toxine von *Staphylococcus aureus*. Ausgelöst wird sie von 10 – 1280 ng/g Toxinkonzentration im Lebensmittel (Agata et al. 2002). Das Toxin bleibt auch noch 150 Minuten bei 100°C in einem breiten pH-Bereich aktiv. Einmal durch Hitze inaktiviert, bleibt seine Struktur erhalten. Seine Toxizität kann sich anschließend regenerieren (Rajkovic et al. 2008; Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014).

Durch seine geringe Größe von 1200 Da kann das Toxin außerdem nicht etwa durch Filtration in der Lebensmittelprozessierung entfernt werden (Messelhäußer und Ehling-Schulz 2014, S. 33; Agata et al. 1994).

Strukturell handelt es sich um ein Dodecadepsipeptid bestehend aus sechs α -Hydroxysäurereste, die in drei sich wiederholenden Tetrapeptideinheiten angeordnet sind, [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃. Diese Struktur gibt dem Toxin seine Fähigkeit mit den Alkalimetallen Lithium, Natrium und Kalium sowie Ammoniumionen Komplexe zu bilden und erklärt auch seine biologische Funktion als starker Kalium-Ionophor (Agata et al. 1994; Marxen et al. 2015). Es konnten außerdem 18 homologe Strukturen nachgewiesen werden, wovon es sich bei mindestens sieben um Isoformen mit unterschiedlichen Toxizität des Peptids handelt (Marxen et al. 2015).

Cereulid wird enzymatisch von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (engl. non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)) synthetisiert (Ehling-Schulz et al. 2005). Das sogenannte Cereulid Synthetase Gencluster (ces Gencluster) befindet sich dabei auf einem 208-kb großen Plasmid, der Homologien zum Plasmid pXO1 von *Bacillus anthracis* aufweist. Das ces Gen Cluster selbst ist 24 kb groß und fasst sieben kodierende DNA Sequenzen zusammen. *cesA* und *cesB* sind dabei strukturgebende Gene, die für das Zusammensetzen der Peptide verantwortlich sind (Dommel et al. 2011). Mit einer für emetische *Bacillus cereus* Stämme spezifischen Insertion am *cesA1* Gen wurde von Frickers et al. eine für den Nachweis von Cereulid bildenden Stämmen einsetzbare Real-time PCR entwickelt (Fricker et al. 2007). Weitere Nachweisverfahren des Toxins bzw. der Fähigkeit der Stämme dieses zu bilden sind das Hep-2-Bioassay und die quantitative Messung des Toxins mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Flugzeitanalyse (HPLC-ToF-MS) (Stark et al. 2013; Fricker et al. 2007). In den letzten Jahren hinzugekommen ist außerdem der Nachweis des Toxins mit der MALDI-ToF-MS (Ulrich et al. 2019; Ducrest et al. 2019; Doellinger et al. 2020). Cereulid wird hier über sein Kaliumaddukt bei 1191 m/z bzw. sein Natriumaddukt bei 1175 m/z nachgewiesen (Ulrich et al. 2019; Doellinger et al. 2020; Hillenkamp und Peter-Katalinic 2013; Gross 2013, 2013, S. 563).

2.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) ermöglicht die in vitro Amplifikation von DNA. Die Funktionsweise der PCR beruht auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA (dsDNA), an der sich am 3'- und 5'-Ende

des zu amplifizierenden Bereichs spezifische Oligonukleotidmoleküle (sogenannte Primer) anlagern (eng. Annealing). Ausgehend von diesen Primern wird mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase mit freien Desoxynucleosid-Triphosphaten (dNTPs) eine Kopie dieses DNA-Abschnitts generiert (Elongation). Die Elongation ausgehend von den Primern wird durch eine erneute Denaturierung der DNA durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C unterbrochen. Eine Abkühlung der Inkubationstemperatur auf die Schmelztemperatur der eingesetzten Primer ermöglicht das erneute Anlagerung der Primer an den neu erzeugten und den Ausgangs-DNA-Strang. Es kommt wieder zur Verlängerung der Primer und der Synthetisierung eines neuen DNA-Strangs. Durch das erneute Anlagern der Primer im nächsten Zyklus entsteht dann das gewünschte PCR-Produkt als Doppelstrang. Mit steigender Zyklusanzahl wird das PCR-Produkt exponentiell vermehrt (Müller und Prange 2016, S. 2–3; Saiki et al. 1985).

Die initiale Denaturierung der dsDNA erfolgt über 1 - 5 Minuten, um eine vollständige Trennung der Stränge zu gewährleisten. Für weitere Denaturierungsschritte reichen etwa 30 Sekunden aus. Die Temperatur im Annealingschritt hängt von der Schmelztemperatur und Sekundärstruktur der eingesetzten Primer ab. Sie liegt ca. 5 - 10°C unter der Schmelztemperatur der Primer. Als DNA-Polymerase im Elongationsschritt kommt zumeist eine *Taq*-Polymerase zum Einsatz, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Die Dauer des Elongationsschritts hängt vom gewünschten PCR-Produkt ab. Die PCR findet zumeist automatisiert in einem Thermocycler statt (Mülhardt 2013, S. 82–85).

2.3.1 Real-time PCR

Die Real-time PCR stellt eine Möglichkeit dar, den Fortschritt der PCR zu überwachen und nachzuvollziehen. Eingesetzt werden hierbei fluoreszierende Moleküle (Fluorophore), die an sequenzspezifische Oligonukleotide gekoppelt sind. Je nach Fragestellung können unterschiedliche Systeme zum Einsatz kommen. Ein Beispiel ist das TaqMan™ System. Verwendet wird hier eine doppelmarkierte Real-time-Sonde, an dessen 5'-Ende ein Fluorophor und am 3'-Ende ein Quencher-Molekül eingesetzt ist. Durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase wird während der Elongation das Fluorophor vom Quencher getrennt und emittiert durch Anregung Licht, das durch optische Detektoren gemessen werden kann (Müller und Prange 2016, S. 66–68). Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur amplifizierten DNA-Menge zu und erlaubt so einen Rückschluss auf den Amplifikationsfortschritt. Zur Bewertung, ob

eine Probe den gesuchten, zu amplifizierenden DNA-Bereich aufweist, wird der Schwellwertzyklus (engl. Cycle Threshold, Ct) herangezogen. Dies ist der Zyklus ab dem eine exponentielle Vermehrung des Fluoreszenzsignals und damit des gesuchten DNA-Bereichs erkennbar ist. Ab einem Ct-Wert größer 35 - 40 kann von einem negativen Befund ausgegangen werden (Kubista et al. 2006).

Zum Einsatz kommen können PCR-Assay in der Mikrobiologie etwa beim Nachweis von bestimmten Genen, die im Zusammenhang mit Pathogenitätsfaktoren stehen. Ein Beispiel ist etwa die von Frickers et al. entwickelte Real-time PCR für das *ces* Gen von *Bacillus cereus*, welches im Zusammenhang mit der Fähigkeit das Toxin Cereulid zu bilden steht (Fricker et al. 2007).

2.4 MALDI-ToF-MASSENSPEKTROMETRIE

1985 das erste Mal erwähnt, stellt die Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Massenspektrometrie (MALDI-MS) heute eine wichtige Untersuchungsmethode für die Biowissenschaften ebenso wie die Polymerforschung und viele weitere Gebiete dar (Gross 2013, S. 545–546; Karas et al. 1985). In Kombination mit einem Flugzeitanalysator (engl. Time-of-Flight (ToF)) ist die Analyse von Molekülen von ca. 500 000 Da möglich, was diese Methode für die Untersuchung von großen Biomolekülen besonders attraktiv macht (Gross 2013, S. 545). Sie ist dabei eine von zwei „weichen“ Ionisierungstechniken neben der Elektrosprayionisation. Diese erlauben nicht nur die Analyse von besonders großen, sondern auch von nicht-flüchtigen und labilen Molekülen (Hillenkamp und Peter-Katalinic 2013, S. 4). Als MALDI-Imaging eingesetzt, ist mit diesem Prinzip auch die räumlich getrennte Analyse einer Probe möglich (Gross 2013, S. 585–587).

2.4.1 Funktionsweise

Abbildung 2-1 stellt die Funktionsweise der MALDI-ToF-MS schematisch dar. Wie der Name der Methode schon vermuten lässt, spielt dabei die Matrix eine entscheidende Rolle. Es handelt sich meist um eine niedermolekulare organische Säure (z. B. α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)), deren Absorptionsmaximum möglichst im Wellenlängenbereich des eingesetzten Lasers liegt. Sie wird mit den Analytmolekülen gemischt auf den Probenträger (Target) aufgetragen. Während der Verdunstung des Lösungsmittels kokristallisieren Matrix- und Analytmoleküle. Die Analytmoleküle werden idealerweise durch die Matrix voneinander separiert und eingebettet (Hillenkamp und Peter-Katalinic 2013, S. 4).

Im Anschluss wird das Target im Vakuum des Massenspektrometers auf 10 bis 20 kV aufgeladen. Es folgt der Beschuss der Probe mit Laserlichtpulsen. Zum Einsatz kommen meist Stickstofflaser oder Nd:Yag-Laser. Die benötigte Bestrahlungsintensität variiert zwischen verschiedenen Proben stark. Sie kann mittels eines variablen Dämpfungsglieds reguliert werden. Die Laserpulse sind möglichst kurz (3 – 10 ns), um eine thermische Zersetzung des Analyts zu vermeiden (Gross 2013, S. 546). Die eingesetzte Matrix absorbiert die Laserenergie und leitet sie homogen auf die Analytmoleküle weiter. Dies führt zu einer möglichst unfragmentierten Desorption der großen Analytmoleküle (Hillenkamp und Peter-Katalinic 2013, S. 4). Der Vorgang wird auch als Überschallexpansion bezeichnet, bei dem eine zunächst heiße, sich sehr schnell ausdehnende Desorptionswolke entsteht, die sich aufgrund des adiabatischen Vorgangs im Vakuum schnell abkühlt. Der genaue Mechanismus der Ionenerzeugung ist noch nicht abschließend geklärt. Möglich ist die Ionisierung durch De- / Protonierung, Elektronenaufnahme / -abgabe, durch die Anlagerung eines Metall-Kations oder durch Photoionisation bei UV-Licht absorbierenden Analyten. Durch ein elektrisches Feld werden die erzeugten Ionen anschließend in Richtung des Flugzeitanalysators beschleunigt. Zwischen Ionenerzeugung und vor dem Einschalten der Beschleunigungsspannung kann eine kurze Verzögerungszeit von wenigen hundert Nanosekunden die Auflösung des Massenspektrums verbessern. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass laserinduzierte Reaktionen vor der Ionenbeschleunigung abgeschlossen sind (Gross 2013, S. 142–143). Die Ionenbeschleunigung wird über das Anlegen eines elektrischen Felds realisiert. Durch die Erzeugung eines Ionenstrahls werden die Ionen fokussiert. Dabei werden diese im elektrischen Feld zwischen zwei gegensätzlich geladenen Kondensatorplatten in Richtung der Platte mit ihnen entgegengesetzter Ladung beschleunigt. In dieser befindet sich ein Loch oder Spalt, wodurch der Ionenstrahl entsteht. Auf diese Weise können je nach Polarität der Platten positive oder negative Ionen extrahiert werden. Die anziehende Platte ist aus praktischen Gründen meist geerdet, während die andere unter Hochspannung steht (s. Abbildung 2-1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Ionenoptische Linsen können die Extraktion der Ionen und die Form des Ionenstrahls verbessern (Gross 2013, S. 131–132). Die Polarität der beschleunigten Ionen hängt somit von der eingesetzten Beschleunigungsspannung ab. Insgesamt liegen in der Desorptionswolke am häufigsten einfach positiv geladenen Ionen vor. Zum einen weil die sich schnell bewegenden Elektronen schneller aus der Wolke verloren gehen, zum

anderen weil nach dem Lucky-Survivor-Modell die Neutralisation einfach geladener Ionen später als bei mehrfach geladenen Ionen erfolgt (Gross 2013, S. 552–555). Nach der Beschleunigung gelangen die Ionen in eine feldfreie Flugröhre. Hier werden die Teilchen entsprechend ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses getrennt. Da die Ladung wie beschrieben meist einfach ist, hängt die Geschwindigkeit der Teilchen vornehmlich von ihrer Masse ab (Gross 2013, S. 553).

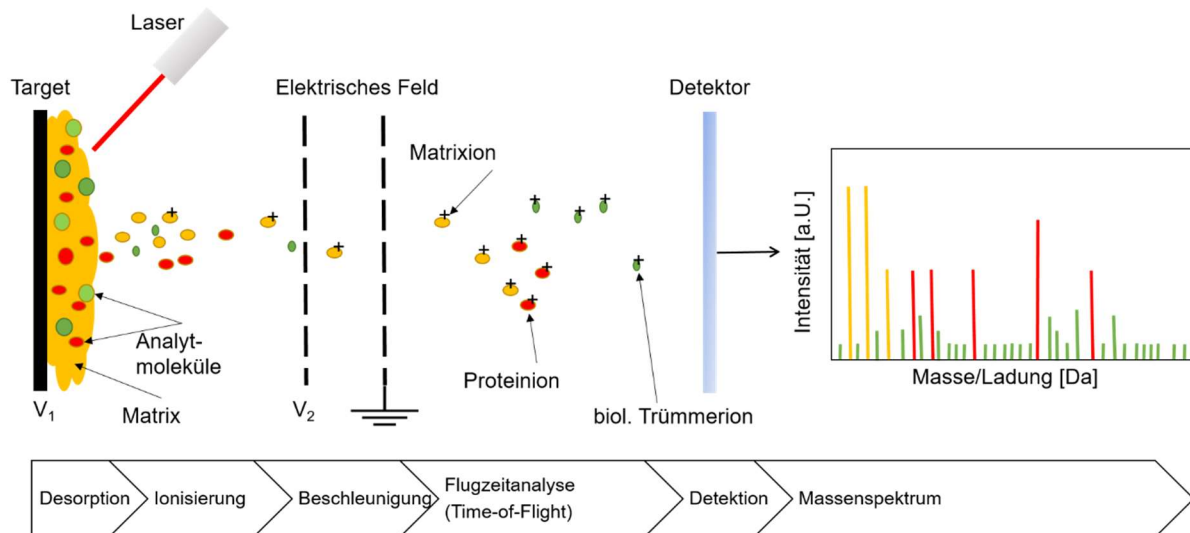


Abbildung 2-1: Funktionsweise der MALDI-ToF-MS. Analytmoleküle auf Target mit Matrix kokristallisiert. Target wird aufgeladen (V₁); Desorption mit anschließender Ionisierung durch Beschuss mit Laser; Beschleunigung der Ionen im elektrischen Feld (V₂ und geerdete Elektrode); Trennung der Ionen nach Masse/Ladungs-Verhältnis in feldfreier Röhre (Time-of-Flight); Schwere Ionen erreichen Detektor langsamer als leichte; es ergibt sich charakteristisches Massenspektrum der Probe. Prozess findet im Vakuum statt. Bild entworfen nach (Parchen und Valk 2019).

Im linearen Betrieb treffen die Ionen nach dem linearen Flugrohr direkt auf den Detektor. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wird derselbe Targets spot mehrfach beschossen und gemessene Spektren aufaddiert (Gross 2013, S. 550). Verfügt das Massenspektrometer über einen Reflektor, gelangen die Ionen zunächst in ein leicht gewinkeltes elektrisches Feld. Durch dieses Verfahren wird die Auflösung des Massenspektrums verbessert, da unterschiedliche Startenergien von Ionen mit einem gleichen m/z -Verhältnis ausgeglichen werden (Hillenkamp und Peter-Katalinic 2013, S. 43–44). Am Detektor werden durch eintreffende Ionen elektrische Signale erzeugt, die in Relation zur Flugzeit in ein entsprechendes m/z -Verhältnis umgewandelt werden. Der sogenannte Digitizer misst dabei Pulsankunftszeit sowie Form und Amplitude des Signals (Spectrum Instrumentation GmbH 2021). Die

Ausgabe ist ein für den Analyten charakteristisches Spektrum. Auf der Abszisse wird das Masse-Ladungs-Verhältnis in m/z oder Dalton (Da) und auf der Ordinate die Intensität des jeweiligen Signals mit der willkürlichen Einheit (engl. Arbitrary unit [a. U.]) dargestellt.

2.4.2 Anwendungsmöglichkeiten in der Lebensmittelüberwachung

In der Lebensmittelüberwachung wird die MALDI-ToF-MS zum einen zur Qualitätskontrolle untersuchter Proben verwendet. Im Falle von Speiseinsekten kann etwa eine Speziesbestimmung sicherstellen, dass Herstellerangaben zur Insektenspezies korrekt sind und es sich bei dieser Spezies um eine in Deutschland zugelassene Spezies handelt (Ulrich et al. 2017).

Zum anderen ist über die Messung intakter Bakterienzellen im MALDI-ToF-MS (engl. Intact Cell MALDI-ToF-MS (ICMS)) die Identifizierung verschiedenster Lebensmittelpathogene möglich (Maier et al. 2006). Bei den im MALDI-ToF-MS gemessenen Peptiden handelt es sich überwiegend um ribosomale Moleküle mit einer Größe von 2 bis 20 kDa (Ryzhov und Fenselau 2001). Auf diese Weise entstehen speziesspezifische Proteinspektren, die mit einer Referenzdatenbank abgeglichen werden können. Es handelt sich somit eher um eine Mustererkennung als eine spezifische Proteinanalyse (Böhme et al. 2017).

Letztere kann etwa für den Nachweis einzelner von Lebensmittelpathogenen gebildeter Toxinen eingesetzt werden (Ulrich et al. 2019).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 HERKUNFT DER PROBEN

3.1.1 Isolation von Mikroorganismen von Speiseinsektenproben

Im Auftrag des Regierungspräsidiums Tübingen, Stabstelle für Tiergesundheit und Verbraucherschutz, wurden insgesamt 22 Speiseinsektenprodukte am CVUA Freiburg untersucht. Der Fokus lag hierbei auf ganzen Speiseinsekten, bzw. Mehl von ganzen Speiseinsekten. Vorangegangen zum Untersuchungsauftrag stand eine Recherche des Regierungspräsidiums zu möglichen Herstellern von Speiseinsekten, die Speiseinsekten über das Internet anbieten und deren Produkte nach Deutschland lieferbar sind. Bestellt wurde bei zwei Herstellern aus Baden-Württemberg, zwölf Herstellern aus ganz Deutschland und vier Herstellern außerhalb von Deutschland. 20 der 22 untersuchten Proben wurden auf diese Weise beschafft, 2 weitere Produkte wurden aus Supermärkten in Konstanz bzw. Lörrach bezogen.

Eine genaue Auflistung der Produkte befindet sich im Anhang (s. Tabelle A- 5). Die amtliche Untersuchung der 22 Proben erfolgte vor Beginn dieser Masterarbeit durch das Labor „Mikrobiologie Lebensmittel“ des CVUA Freiburg. Das genaue Vorgehen ist dabei im hausinternen Prüfplan vorgegeben (s. Anhang Tabelle A- 1). Mit dem beschriebenen Prüfplan wurden 144 Mikroorganismen aus den 22 Speiseinsektenprodukten isoliert. Die Isolate wurden als Reinkultur auf einem Stichagar bei 4°C aerob oder anaerob bis zur weiteren Untersuchung im Rahmen dieser Masterarbeit gelagert.

3.1.2 Mikroorganismen aus der hausinternen Stammsammlung

Dem CVUA Freiburg steht eine Stammsammlung mit insgesamt 46 Stämmen der Gattung *Bacillus* zur Verfügung. Darin enthalten sind elf *ces*-positive Stämme aus der *Bacillus cereus* Gruppe. In dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden außerdem sieben *ces*-positive *Bacillus cereus* Stämme aus der Stammsammlung des CVUA Stuttgart, sowie der *ces*-positive Referenzstamm *Bacillus cereus* DSM 4312, der bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben wurde ($n_{\text{gesamt}} = 54$, genaue Auflistung s. Anhang Tabelle C- 1).

3.2 MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN

3.2.1 Reinkulturgewinnung

Ist eine Kontamination der Kultur zu erkennen, werden zunächst mit Hilfe des Dreiösenausstrichs reine Subkulturen erstellt. Hierfür wird mit einer 5 µl Impföse Koloniematerial von einer abgrenzbar, reinen Kolonie entnommen und auf die Hälfte einer Blut-Platte (Columbia-Nährboden mit 5 % Schafblut, Fa. Oxoid, CBL) aufgetragen. Durch diesen Ausstrich wird eine neue Impföse geführt. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die Kulturen werden dann bei 37°C für 24 Stunden aerob oder anaerob inkubiert.

3.2.2 Stichkultur

Von reinen Kulturen wird mit einer 10 µl Impföse Material entnommen. Die Impföse wird anschließend senkrecht in ein mit festem Nähragar (1,6 % Agar, eigene Herstellung, Zusammensetzung s. Anhang Tabelle A- 2) befülltes Kulturröhrchen gestochen. Das Kulturröhrchen wird mit einem Schraubverschluss verschlossen je nach vorangegangener Kultivierung entweder aerob bei 37°C für 24 Stunden oder anaerob bei 37°C für 24 Stunden kultiviert. Anschließend werden die Röhrchen bei 4°C aerob oder anaerob gelagert.

3.2.3 Stammsammlung

Die hausinterne *Bacillus*-Stammsammlung des CVUA Freiburg wird bei -70°C in Kryogefäßen (z.B. Microbank™-System, Fa. MAST Diagnostik) gelagert. Zum Auftauen der Kulturen wird zunächst eine Perle mit Hilfe einer Pinzette aus dem Kryogefäß entnommen und in ein mit Hirn-Herz-Infusions-Boullion (Fa. Oxoid, engl. Brain heart infusion broth, BHI) gefülltes Reagenzglas gegeben. Die Reagenzgläser werden anschließend bei 37°C für mindestens 24 Stunden inkubiert. Eine Trübung der Flüssigkeit weist auf das erfolgreiche Anwachsen der Kulturen hin. Die Kulturen werden anschließend bei 4°C für ein bis zwei Monate gelagert. Zur Untersuchung werden die Kulturen wie in Abschnitt 3.2.1 bereits beschrieben mit einem Dreiösenausstrich auf dem jeweils beschriebenen Festmedium ausgestrichen und inkubiert.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN

3.3.1 Zielgene für die Sequenzierung

Das häufig zur Sequenzierung herangezogenen 16s rRNA Gen reicht für die Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe nicht aus (Liu et al. 2015). Auch bei anderen klinischen Mikroorganismen ist mit diesem Gen eine Identifizierung zum Teil nur auf Gattungsebene zuverlässig (Adékambi et al. 2009). Entsprechend wird in dieser Arbeit das *rpoB* Gen zur Identifikation der Isolate herangezogen. Es kodiert für die RNA-Polymerase-Untereinheit β und weist eine höhere phylogenetische Auflösung als das 16s rRNA Gen auf (Rowland et al. 1993; Adékambi et al. 2009). So ist etwa die Unterscheidung von *Escherichia coli* und *Escherichia fergusonii* anhand des 16s rRNA Gens nicht, mit Hilfe des *rpoB* Gens aber sehr wohl möglich (Adékambi et al. 2009). Es wurde in anderen Veröffentlichungen außerdem bereits als housekeeping Gen für die Taxonomyanalyse der *Bacillus cereus* Gruppe eingesetzt (Liu et al. 2017; Wahab et al. 2005). Der in dieser Arbeit untersuchte Bereich des Gens von 2300 bp bis 3300 bp wurde als besonders geeignet für die Identifikation von Mikroorganismen auf Spezies- bzw. Subspeziesebene eingestuft (Adékambi et al. 2009; Yasmon et al. 2020).

Danner et al. stellte 2019 außerdem das *pycA* Gen als mögliches Zielgen zur Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe vor. Dieses Gen kodiert für die Pyruvat-Carboxylase-Untereinheit A, ein Enzym, dass die Addition von Kohlenstoffdioxid an Pyruvat katalysiert (Müller-Esterl 2018, S. 579). Da etwa auch Liu et al. auf dieses Gen zur Differenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe aufmerksam gemacht hat, wird es in dieser Arbeit ebenfalls zur Untersuchung der *Bacillus cereus* Isolate herangezogen (Liu et al. 2015).

3.3.2 Oligonukleotide

Innerhalb dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Dargestellt sind hier die jeweilige Bezeichnung, das Zielgen, das mit Hilfe dieser Oligonukleotide amplifiziert werden soll, die Sequenz des Oligonukleotids, die Fragmentlänge des synthetisierten PCR-Produkts, die Schmelztemperatur, sowie die jeweils zugrundeliegende Literatur. Die neu erstellten Primer für das *pycA* Gen werden in Tabelle 4-5 im Ergebnisteil dargestellt.

Tabelle 3-1: Übersicht der für Real-time PCR und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide. Dargestellt sind die jeweilige Bezeichnung, das zu amplifizierende Zielgen, die Sequenz, die Länge in Basenpaaren (bp), die Schmelztemperatur (Tm) sowie die zugrundeliegende Literatur. Alle Oligonukleotide erworben bei ThermoFisher Scientific.

Name	Ziel-gen	Sequenz (5'-3')	Fragment-länge [bp]	Tm [°C]	Literatur
Primer C2700 F	<i>rpoB</i>	CGW ATG AAC ATY GGB CAG GT	344	45 - 55	(Khamis et al. 2004; Carroll et al. 2019)
Primer C3130 R		TCC ATY TCR CCR AAR CGC TG			
Primer ces-TaqM F	<i>ces</i>	CGCCGAAAGTGATTATACCA A	103	55	(Fricker et al. 2007)
Primer ces-TaqM F		TATGCCCCGTTCTCAAACCTG			
Sonde ces-TaqM		QSY - GGGAAAATAACGAGAAATGC A-FAM			
IAC pUC 18-F	<i>pUC 19</i> Plasmid -vector	TGT CGT GCC AGC TGC ATT A	83	55	(Mäde et al. 2008)
IAC pUC 18-R		GAG CGA GGA AGC GGA AGA G			
IAC pUC 18-P		VIC-AAT CGG CCA ACG CGC GG-QSY			

IAC		Ziel-DNA für IAC pUC 18			
pUC19					
Vector					

F: Vorwärtsprimer (engl. Forward Primer); R: Rückwärtsprimer (engl. Reverse Primer); TaqM: Taqman™ PCR-Technologie; P: Sonde; FAM: 6-FAM-phosphoramidit (Reporter); QSY: Quencher; IAC: Internal amplification control; VIC: Reporter; PUC18 und PUC19 sind identisch, mit der Ausnahme, dass sie in entgegengesetzter Richtung angeordnete Polyklonierungsstellen enthalten.

3.3.3 Standard Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.3.3.1 Probenauswahl und Kultur

Aus den 144 reinen Subkulturen, isoliert aus den Speiseinsektenproben, werden jene Kulturen für die *rpoB* PCR und anschließende Sequenzierung ausgewählt, die nach dem Ergebnis der MALDI-ToF-MS Messung zur Gattung des Sporenbildners *Bacillus* gehören oder mittels der MALDI-ToF-MS nicht eindeutig bestimmbar sind. Bevorzugt werden dabei Kulturen, bei denen das MALDI-ToF-MS Ergebnis eine Vielzahl an möglichen Spezies ergibt und keine weitere Subkultur aus der Speiseinsektenprobe mit einem ähnlichen Ergebnis existiert. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass ein Datenbankeintrag für diese Spezies fehlt. Zum anderen ist so sichergestellt, dass derselbe Stamm nicht mehrfach untersucht wird.

Zusätzlich werden aus der hausinternen Stammsammlung die Stämme ausgewählt, bei denen noch keine eindeutige Speziesbestimmung erfolgt ist und die MALDI-ToF-MS Messung auf einen Vertreter der *Bacillus cereus* Gruppe hindeutet. Insgesamt wurden auf diese Weise 30 Isolate ausgewählt. Für die *pycA* PCR werden alle *Bacillus cereus* Isolate aus der Auswahl der Isolate für die *rpoB* PCR ausgewählt (n=18).

Die beschriebenen Kulturen werden bei 37°C für 24 Stunden auf CBL-Agar frisch kultiviert. Sind sie im Prüfplan anaerob angewachsen, so erfolgt die Kultivierung für die jeweilige PCR ebenfalls anaerob. Anderenfalls werden die Proben aerob kultiviert.

3.3.3.2 *rpoB*- und *pycA* PCR

Die *rpoB* PCR erfolgt in Anlehnung an die von Carroll et al. verwendete *rpoB* PCR (Carroll et al. 2019). Die Primer für die *pycA* PCR (Primer 9 *pycA* F und R) werden wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben erstellt. Die Extraktion der DNA wird automatisiert mit Hilfe des Extraktions-/ reinigungsgeräts QiaCube der Firma Qiagen (DNeasy Blood and Tissue Kit) ausgeführt. Für jede Probe wird die extrahierte DNA (Template) im

Doppelansatz amplifiziert. Die Einzelkomponenten und ihre jeweilige Endkonzentration sowie die pro Ansatz zugefügte Menge in μl sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2: Komponenten der PCR

	Endkonzentration im PCR-Ansatz	Menge in μl
Mastermix Kit (z.B. HotStarTaq der Fa. QIAGEN)	1x	12,5
Primer C2700 F bzw. Primer 9 pycA F	10 μM	1
Primer C3130 R bzw. Primre 9 pycA R	10 μM	1
Template		5
Wasser (für PCR, steril)		5,5
Total		25

Tabelle 3-3: Temperatur-Zeit-Profil der PCR

	Zeit	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	
Initiale Denaturierung	3 min	94	
Denaturierung	30 s	94	40 Zyklen
Annealing	30 s	55 – 45	
Extension	1 min	72	

Während des Annealings wird die Temperatur in den ersten 20 Zyklen von 55°C bei jedem Zyklus um $0,5^{\circ}\text{C}$ erniedrigt. In den folgenden 20 Zyklen wird die Temperatur auf 45°C gehalten (s. Tabelle 3-3).

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zu Überprüfung der PCR wird eine Elektrophorese mittels eines 2,0 %-igen Agarosegels durchgeführt. Zum Einsatz kommen hierbei das E-Gel™ precast Agarose Electrophoresis System der Firma ThermoFisher Scientific. 5 μl des PCR Produkts

jeder Probe werden hierfür mit 15 µl des E-Gel™ Probenpuffers vermischt und die Taschen des E-Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wird der E-Gel™ 50 bp DNA Ladder verwendet.

Das erhaltene PCR-Produkt wird anschließend zur Sangersequenzierung an die Firma Microsynth AG geschickt. Pro Probe werden hierbei zwei Reaktionen in Auftrag gegeben. Jeweils eine mit dem jeweiligen Forward Primer und eine mit dem Reverse Primer. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgt mit der Bioinformatik Software Geneious (s. Abschnitt 3.6.3).

3.3.5 Real-time PCR des *ces* Gens

Zum Nachweis des *ces* Gens, das für die Cereulid-Peptid-Synthetase in Stämmen der *Bacillus cereus*-Gruppe codiert, kommt ein Real-Time PCR zum Einsatz. Die Durchführung richtet sich nach der Norm DIN EN ISO 7932:2020-11 Anhang D Abschnitt 2 (DIN EN ISO 7932:2020-11; Fricker et al. 2007).

3.3.5.1 Kultur

Mit der *ces* Real-time PCR werden alle Proben der Stammsammlung, inklusive der Proben aus dem CVUA Stuttgart sowie alle im MALDI-ToF-MS als *Bacillus cereus* identifizierte Proben untersucht.

Zur Verifizierung der Methode werden zunächst alle für diese Arbeit zur Verfügung stehenden *Bacillus*-Isolate der Stammsammlungen vom CVUA Freiburg und CVUA Stuttgart untersucht ($n_{\text{emetisch}} = 19$, $n_{\text{nicht-emetisch}} = 35$, $n_{\text{gesamt}} = 54$). Die Kulturen werden wie in Norm DIN EN ISO 7932:2020-11 Abschnitt 9.2.4 (DIN EN ISO 7932:2020-11) beschrieben 18 bis 24 Stunden bei 30°C auf CBL-Agar bebrütet.

3.3.5.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wird zunächst mit Hilfe einer 10 µl Impföse Koloniematerial vom Festmedium entnommen und in 1 ml sterilen DNA-freiem Wasser suspendiert. Ab diesem Punkt wird ein Aufarbeitungsleerwert (AL) in Form von DNA-freiem Wasser ohne Probenmaterial mitgeführt, mit dem die Reinheit des verwendeten Wassers überprüft wird. Die Suspension wird anschließend in einem Thermoblock (Fa. Thermo Scientific, Drybath stdrd) für 10 Minuten bei 100°C erhitzt. Es folgt eine Zentrifugation bei 16215 rcf für 1 Minute (Zentrifuge 5424, Seriennummer: 5424DG556505, Fa. Eppendorf). Der Überstand wird anschließend abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -24°C eingefroren.

3.3.5.3 **Polymerasekettenreaktion**

Für jede Probe wird die extrahierte DNA (Template) im Doppelansatz amplifiziert. Falsch positive Ergebnisse durch etwa eine Verunreinigung des PCR-Ansatzes (s. Tabelle 3-4) werden durch das Mitführen einer Reagenzien-Kontrolle (NTC), bestehend nur aus 20 µl PCR-Ansatz ohne Zusatz von Template-DNA überprüft.

3.3.5.4 **PCR-Ansatz**

Tabelle 3-4: PCR-Ansatz der ces Real-time PCR.

	Endkonzentration im PCR-Ansatz	Menge in µl
Mastermix Kit z.B. QuantiTect Multiplex PCR Kit (2x)	1x	12,5
Wasser (für PCR, steril)		0,5
ces-TaqM fw (10 pmol/µl)	500 nM	1,25
ces-TaqM re (10 pmol/µl)	500 nM	1,25
Sonde ces-TaqM (10 pmol/µl)	200 nM	0,5
IAC pUC 18-F (10 pmol/µl)	500 nM	1,25
IAC pUC 18-R (10 pmol/µl)	500 nM	1,25
IAC pUC 18-P (10 pmol/µl)	200 nM	0,5
IAC pUC19 (100 Kopien pro µl)	100 Kopien	1
Total		20

fw bzw. F: Vorwärtsprimer (engl. Forward Primer); re bzw. R: Rückwärtsprimer (engl. Reverse Primer); TaqM: TaqmanTM PCR-Technologie; P: Sonde; IAC: Internal amplification control; PUC18 und PUC19 sind identisch, mit der Ausnahme, dass sie in entgegengesetzter Richtung angeordnete Polyklonierungsstellen enthalten. Genaue Beschreibung der Olikonukleotide s. Tabelle 3-1.

Anschließend werden in die Reaktionskammern entsprechend je 20 µl des Mastermix pipettiert und jeweils 5 µl Template zugegeben. Das Reaktionsvolumen beträgt somit 25 µl.

3.3.5.5 *Temperatur-Zeit-Profil*

Die PCR-Reaktion wird in einem Real-time-PCR-Cycler (Quantstudio™ 5, Fa. ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Das verwendete Temperatur-Zeit-Profil ist Tabelle 3-5 zu entnehmen.

Tabelle 3-5: Temperatur-Zeit-Profil der ces-Real-time PCR.

	Zeit	Temperatur [°C]	
Initiale Denaturierung	10 min	95	
Denaturierung	15 s	95	45 Zyklen
Annealing & Extension	60 s	55	

3.3.5.6 *Auswertung*

Eine positive Amplifikation des Zielgens zeigt sich durch einen sichtbaren exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals vor ca. 30-40 Zyklen. Die Anzahl der Zyklen bis ein deutlicher Anstieg messbar ist, wird als Ct-Wert (engl. Cycle threshold) bezeichnet (Mülhardt 2013, S. 105–106).

3.4 MALDI-ToF-MS

3.4.1 Speziesidentifizierung

3.4.1.1 *Kultur*

Zur Speziesbestimmung mit Hilfe der MALDI-ToF-MS werden reine Subkulturen, der auf den jeweils beschriebenen Selektivmedium gewachsenen Kulturen (s. Anhang Tabelle A- 4) auf CBL ausgestrichen und für 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Als Positivkontrolle wird ein Escherchia coli Isolat (DSM 1103) mitgeführt.

3.4.1.2 *Probenpräparation*

Für alle Probenpräparationen werden die durch Bruker, den Hersteller des verwendeten MALDI Biotyper-Systems, empfohlenen und verifizierten Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße des Herstellers Eppendorf verwendet.

Direkttransfer

Die Auftragung der Kulturen erfolgt zunächst mit dem Direkttransfer. Hierfür wird mit Hilfe eines Holzzahnstochers etwas Koloniematerial vom Festmedium entnommen

und jeweils in Doppelspots auf einen Probenträger (Ground steel MALDI target, 96 well, Fa. Bruker) aufgetragen. Es folgt eine Überschichtung der Proben mit 1 µl Matrix Lösung (α-Cyano-4-hydroxymethylsäure, HCCA, Fa. SunChrome, in 50 % [v/v] ACN, 47 % [v/v] Wasser und 2,5 % [v/v] TFA, [Standard solvent, Fa. Bruker]).

Ameisensäure-Extraktion

Ist mit der Direkttransfer-Methode keine eindeutige Speziesidentifizierung möglich oder soll mit der Messung ein neuer Datenbankeintrag erfolgen, so wird eine Ameisensäure-Extraktion durchgeführt.

Hierfür werden 300 µl analysereines Wasser (LC-MS Chromasolv®, Fa. Sigma-Aldrich) in 2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Eine Einzelkolonie oder bis zu 10 mg Koloniematerial werden darin durch pipettieren oder vortexen suspendiert. Nach der Zugabe von 900 µl Ethanol (absolut, Fa. Sigma-Aldrich) werden die Proben noch einmal gevortext und der Überstand bei 16215 rcf für 2 Minuten zentrifugiert, anschließend dekantiert und abgenommen. Dieser Schritt wird wiederholt, um den Überstand restlos zu entfernen. Die Pellets werden bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten getrocknet. Anschließend werden entsprechend der Pelletgröße 1 bis 80 µl einer 70%igen Ameisensäure (Fa. Sigma-Aldrich) zugefügt und das Pellet darin resuspendiert. Es folgt die Zugabe von reinem Acetonitril (ACN, LC-MS Chromasolv®, Fa. Sigma-Aldrich) in der gleichen Menge wie die Ameisensäure. Die Proben werden dann für 2 Minuten bei 16215 rcf zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Extrakte können nun bei -24°C gelagert oder direkt im MALDI-ToF-MS analysiert werden. Hierfür wird 1 µl Extrakt jeweils auf Doppelspots aufgetragen. Nach dem Trocknen wird die Probe mit 1 µl Matrix Lösung überschichtet.

3.4.1.3 MALDI-ToF-MS Einstellungen

Alle Messungen, die in dieser Arbeit Erwähnung finden, werden mit dem MALDI-ToF Massenspektrometer mircoflex™ (Seriennummer 269944.00464, Fa. Bruker) aufgenommen. Die Steuerung erfolgt über die Software FlexControl (Version 3.4 (Build 206.67), Fa. Bruker).

Der Massebereich zur Erstellung von Spektren zur Speziesidentifizierung und damit auch von neuen Datenbankeinträgen liegt bei 2000–20 000 Da. Die Detektorverstärkung ist 14,3-fach und linear bei 2904 V. Die Laserfrequenz wird auf 60 Hz gesetzt. Es werden 0,5 GS/s aufgenommen. Die Ionenquelle 1 wird auf 19,98 kV eingestellt, während die Ionenquelle 2 18,13 kV erreicht. Die Linse erreicht eine Spannung von -0,14 kV. Die Verzögerung zwischen Ionen generierenden Laserpuls

und der anschließenden Beschleunigung liegt bei 130 ns. Das globale Dämpfungsglied des Lasers steht auf 20% mit einer Spannweite bis 30%. Der Digitizer (BD0G5-1 (8-bit mode) Seriennummer: 273574.003978, Fa. Bruker) arbeitet mit einer Sensitivität von 100 mV und einem analogen, linearen Offset von 1,7 mV. Die Detektorspannung liegt bei 2500 V (Linear).

Diese Methode wird routinemäßig wöchentlich mit dem Bacterial Test Standard (BTS, Fa. Bruker) im quadric mode kalibriert.

3.4.2 Erstellung neuer Datenbankeinträge

Das Vorgehen zur Erstellung neuer Datenbankeinträge richtet sich nach der Herstelleranleitung von Bruker (Bruker 2013).

Die Kulturbedingungen sowie die MALDI-ToF-MS Einstellungen stimmen mit denen der Speziesidentifizierung überein.

Für die Anfertigung von MALDI-ToF-MS Spektren für neue Datenbankeinträge werden die Extrakte der Ameisensäure-Extraktion (s. Abschnitt 3.4.1.2) verwendet. Um möglichst unverfälschte Spektren zu erhalten, werden nach Möglichkeit nur frisch gewonnene Extrakte eingesetzt. Vor jeder Messung wird das MALDI-ToF Massenspektrometer mit dem BTS kalibriert. Die Extrakte werden jeweils zehnmal aufgetragen. Jeder Spot wird dabei dreimal gemessen, sodass pro Probe 30 Spektren aufgenommen werden. Bei der Auftragung wird der Rand des Probenträgers möglichst ausgespart, um Kontaminationen auszuschließen. Zur Überprüfung der Kalibration wird außerdem bei jeder Messung zusätzlich ein BTS aufgetragen.

3.4.3 Nachweis des emetischen Toxins Cereulid in *Bacillus cereus* Isolaten

Da die Methode zum Nachweis nur schwach Cereulid produzierender Bakterienstämme nicht ausreicht, wird im Rahmen dieser Arbeit ein neues Protokoll ausgearbeitet. Die einzelnen Anpassungen werden im Ergebnisteil (s. Abschnitt 4.4.1) dieser Arbeit dargestellt.

3.4.3.1 Kultur

Zu untersuchende *Bacillus cereus*-Isolate werden bei 25°C für 24 Stunden auf CBL-Agar kultiviert und anschließend direkt gemessen, um einen etwaigen Proteinabbau durch längere Lagerung im Kühlschrank zu verhindern.

3.4.3.2 Probenpräparation

Mit einem Holzzahnstocher wird etwas Koloniematerial der reinen Kultur entnommen und in Doppelspots auf das Target aufgetragen. Anschließend wird das Koloniematerial mit 1 µl einer 70%igen Ameisensäurelösung überschichtet. Ist diese vollständig getrocknet, folgt eine erneute Überschichtung mit 1 µl HCCA.

3.4.3.3 MALDI-ToF-MS Einstellungen

Die Methode zum Nachweis des Toxins Cereulid wird im Laufe dieser Arbeit optimiert. Die Grundeinstellungen vor der Optimierung werden im Folgenden beschrieben. Die finalen Geräteeinstellungen sind in den Ergebnissen (s. Abschnitt 4.4.1.11) aufgeführt. Der Massebereich wird auf 600 – 2000 Da gesetzt. Es wurden nur Spektren aufgenommen, wenn Peaks zwischen 700 bis 800 Da mit einer Intensität größer 400 a. U. detektiert werden. Die Detektorverstärkung ist 2,85-fach und linear bei 2659 V. Die Rate, mit der Spektren aufgenommen werden, liegt bei 0,5 GS/s und der analoge Offset des Digitizers bei 1,7 mV. Die Ionenquelle 1 erreicht eine Spannung von 9,99 kV und Ionenquelle 2 erreicht eine Spannung von 9,04 kV. Die Linse ist auf 3 kV eingestellt. Es findet keine Verzögerung zwischen Laserpuls und Beschleunigung der Ionen statt. Die Einstellungen des Lasers, des Digitizers sowie des Detektors stimmen mit den Einstellungen der Methode zur Speziesidentifizierung überein. Diese Methode wird mit dem Peptide Calibration Standard II (PCS II, Fa. Bruker) im quadric mode kalibriert.

3.5 MALDI-ToF-MS DATENAUSWERTUNG

3.5.1 Speziesidentifizierung

Zur Speziesidentifizierung aufgenommene Spektren (s. Abschnitt 3.4.1) werden mit der Software MALDI Biotyper Compass Explorer (Version 4.1 (Build 100), Fa. Bruker) geöffnet und gegen die dem CVUA Freiburg zu Verfügung stehenden Datenbanken (kommerzielle Datenbank: Biotyper DB, 8468 Einträgen [engl. Main spectra Profils [MSP]], Fa. Bruker, Klinische security-relevant [SR] Datenbank, 59 MSP und die hauseigene Datenbank vom CVUA Freiburg, 33 MSP, Stand 2021) abgeglichen.

3.5.2 Datenbankeinträge

Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, aufgenommene Spektren werden zunächst einer Qualitätskontrolle in FlexAnalysis (FlexAnalysis Version 3.4 [Build 78], Fa. Bruker Daltonik GmbH) unterzogen. Hierfür werden die Spektren mit der Methode

„MBT_FAnalysis.FAMSMethode“ geöffnet. Bei dieser Methode wird der Savitzky Golay Algorithmus mit einer Weite von 2 m/z und 10 Zyklen für die Glättung und der TopHat Algorithmus für die Basisliniensubstraktion verwendet. Zur Überprüfung der Kalibration werden die Kalibrierkonstanten des BTS mit denen der Probenspektren abgeglichen. Anschließend werden Nulllinien und Ausreißer aussortiert. Hierfür werden im Massebereich von 3000-10000 m/z in 1000er Schritten der Massenshift der Einzelspektren überprüft. Überschreitet dieser 500 ppm wird das entsprechende Spektrum aussortiert.

Aus den übrigen Spektren werden mit Hilfe der Software MALDI Biotyper Compass (Explorer 4.1 [Build 100], Fa. Bruker) Datenbankeinträge erzeugt (engl. Main spectra Profiles, MSP).

3.5.3 Klassifizierung Cereulid bildender *Bacillus cereus* Isolate

Eine visuelle Kontrolle der Spektren auf die für Cereulid charakteristischen Peaks bei 1191 m/z und 1175 m/z erfolgt zunächst in FlexAnalysis. Die Spektren werden hierfür mit der Software geöffnet. Die Glättung erfolgt dann mit dem Savitzky-Golay Algorithmus mit einer Weite von 0,15 m/z und einem Zyklus, sowie einer TopHat Basisliniensubstraktion. Sind die charakteristischen Peaks vorhanden, wird das Isolat als positiv eingestuft.

Zur automatischen Klassifizierung wurde bereits vor dieser Arbeit die Software ClinProTools 3.0 (Build 22, Fa. Bruker) verwendet. Die Einstellungen für die Spektrumpräparation sind dabei wie folgt. Die Auflösung liegt bei 1000. Es wird eine Top Hat Basisliniensubstraktion mit 10 % minimalen Basislinienweite durchgeführt. Der Massebereich ist von 1000–2000 eingestellt. Die Glättung erfolgt mit dem Savitzky-Golay Algorithmus mit einer Weite von 2.0 m/z und 5 Zyklen. Das Ausschließen von Nullspektren ist aktiviert. Zur Peakberechnung werden folgende Einstellungen verwendet: Die Peaks werden in Abhängigkeit des Durchschnitts aller Spektren ausgewählt. Der Signal-zu-Rausch-Grenzwert (engl. Signal-to-Noise-Threshold [S/N]) liegt bei fünf und die Anzahl der maximal ausgewählten Peaks wird auf 20 begrenzt. Die Peakberechnung erfolgt über die Fläche unter den Peaks. Der Integrationstyp ist auf Zero Level festgelegt.

Die Klassifizierung der Isolate erfolgt zunächst mit einem fertigen Modell des CVUA Stuttgarts. Dieses Modell wurde mit dem Genetic Algorithmus erstellt. Es wurde 1 Peak zur Modellgenerierung genutzt. Dieser lag in einem Massebereich von 1188,54 bis 1197,59 m/z. Es wurden maximal 40 Generationen erzeugt, mit einer Mutationsrate

von 0,2 und einer Crossoverrate von 0,5. Die Anzahl an Nachbarn wurde auf 1 gesetzt (vgl. (Ulrich et al. 2019)).

Die im Rahmen dieser Arbeit erarbeitenden Modelleinstellungen werden im Ergebnisteil unter Abschnitt 4.4.1.12 aufgeführt.

3.5.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Unterschiede der jeweils untersuchten Methoden zum besseren Nachweis von Cereulidbildenden *Bacillus cereus* Isolaten wird in ClinProTools ausgeführt. Die Einstellungen zu Spektrumpräparation und Peakberechnung lassen sich Abschnitt 3.5.3 entnehmen.

Die Spektren werden pro veränderter Kondition in eine Modellgenerierungsklasse geladen. Spektren von Isolaten, die etwa 24 Stunden kultiviert wurden, kommen somit zum Beispiel in Klasse 1. Spektren von Isolaten kultiviert für 48 Stunden kommen in Klasse 2. Der von ClinProTools ausgegebene Peakstatistikbericht gibt die jeweiligen Statistikparameter aus. Entscheidend für die Analyse der Spektren nach Cereulid bildenden Isolaten sind dabei der Peak bei 1191 ± 2 m/z und 1175 ± 2 m/z. Bei diesen beiden Peaks wird zunächst der P-Wert des Anderson-Darling tests (PAD) ausgelesen. Ist dieser Wert größer als das gewählte Signifikanzniveau von 0,05 wird die Verteilung der Intensität dieses Peaks als normalverteilt angenommen und der P-Wert des t-tests bzw. Anova-tests wird ausgelesen. Ist dieser Wert kleiner als das Signifikanzniveau von 0,05 liegt ein statistisch signifikanter Unterschied der Peakintensitäten zwischen den Klassen vor. Zeigt der PAD keine Normalverteilung, wird der P-Wert des Wilcoxon tests ausgelesen. Auch hier gilt der Unterschied zwischen den untersuchten Spektrenklassen als signifikant, wenn der Wert kleiner als 0,05 ist.

3.6 SEQUENZANALYSE

Die im Folgenden beschriebenen Schritte werden mit der Software Geneious Prime (Version 2021.1.1, Fa. Biomatters Ltd.) ausgeführt. Die für die Untersuchung verwendeten 18 Vollgenomsequenzen wurden dem CVUA Stuttgart vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Verfügung gestellt (s. Tabelle 3-6).

Tabelle 3-6: Spezies der für die Untersuchung verwendeten 18 Vollgenomsequenzen. Zusammengestellt vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Detaillierte Auflistung s. Anhang Tabelle B- 1.

<i>Bacillus albus</i>	<i>Bacillus paramycoides</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus paranthracis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus proteolyticus</i>
<i>Bacillus cytotoxicus</i>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
<i>Bacillus luti</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Bacillus mobilis</i>	<i>Bacillus toyonensis</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus tropicus</i>
<i>Bacillus nitratireducens</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
<i>Bacillus pacificus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>

Eine genaue Auflistung der Spezies samt genauer Typ-Stamm- und Genombezeichnung findet sich im Anhang Tabelle B- 1. Jede der aktuell vom BfR anerkannten 17 Spezies ist einmal als Sequenz vertreten. Zusätzlich wird die Sequenz des *Bacillus weihenstephanensis* mitgeführt, auch wenn diese seit 2018 zur Spezies *Bacillus mycoides* gezählt wird (Bundesinstitut Für Risikobewertung 2020; Liu et al. 2018; Liu et al. 2017).

3.6.1 Primeranalyse

Um zu überprüfen, ob die von Khamis et al. (Khamis et al. 2004) erstellten Primer (Primer C2700 F und Primer C3130 R) ein Abschnitt des *rpoB* Gens amplifizieren, der zur Differenzierung der Spezies der *Bacillus cereus* Gruppe ausreicht, werden die Sequenzen dieser Primer zunächst in Geneious als Primer hinterlegt. Auch die 18 Vollgenomsequenzen werden in Geneious abgespeichert. Jede Sequenz wird anschließend mit den beschriebenen Primern getestet. Die Primer sollen dabei frei irgendwo an der Sequenz binden. Maximal drei Nichtübereinstimmungen werden erlaubt. Ansonsten werden die Standardeinstellungen von Geneious übernommen. Binden die Primer erfolgreich an die Sequenz wird das PCR-Produkt extrahiert und extra abgespeichert. Abschließend wird ein multiples Alignment der auf diese Weise erzeugten 18 PCR-Produkte der *Bacillus cereus* Spezies erzeugt. Zum Einsatz kommt dabei der Geneious Alignment Algorithmus. Der Alignmenttyp ist ein globales Alignment mit freien Endlücken. Die Kostenmatrix wird auf 65 % Ähnlichkeit eingestellt.

Kosten für offene Lücken werden auf 12, für jede Lückenverlängerung auf 3 gesetzt. Es werden zwei Verbesserungsiterationen ausgeführt.

In der Distanzansicht, bzw. nach Erstellen eines phylogenetischen Baums können die Basenunterschiede der PCR-Produkte ausgelesen werden.

3.6.2 Primerdesign

Um zu überprüfen, ob das von Danner et al. (Danner et al. 2019) vorgestellte *pycA* Gen zur Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe geeignet ist, werden zunächst neue Primer für dieses Gen designt. Als Referenzsequenz dient dabei ein *Bacillus cereus* Genom (Genombezeichnung: ASM2120v1) der Referenzdatenbank vom National Center for Biotechnology Information (NCBI). Mit Hilfe der Annotationsfunktion von Geneious wird das *pycA* Gen aus der Sequenz extrahiert und noch einmal mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) von NCBI überprüft (Altschul et al. 1997). Die Gensequenz wird anschließend als Referenz in Geneious hinterlegt. Innerhalb der zuvor beschriebenen 18 *Bacillus cereus* Sequenzen wird mit Hilfe dieser Referenz die *pycA* Gensequenz ausfindig gemacht und für jede der 18 Sequenzen extrahiert. Wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben wird ein multiples Alignment mit den 18 Genabschnitten ausgeführt. Da die extrahierten Sequenzbereiche mit 3447 bp sehr lang sind, kommt hierbei der MUSCLE Aligner (Muscle, Version 3.8.425 von Robert C. Edgar) zum Einsatz. Es wird mit den Standardeinstellungen von Geneious gearbeitet. Auf Grundlage dieses Alignment werden anschließend neue Primerpaare entworfen. Die Produktgröße wird dabei auf 800 bis 1300 bp festgelegt. Es werden maximal fünf Primerpaare erzeugt. Um zu ermöglichen, dass die Primer an allen 18 Sequenzen binden wird eine Degeneriertheit der Primer von 300 zugelassen. Die auf diese Weise erzeugten Primerpaare werden hinsichtlich ihrer Qualität (Anzahl und Position der Mismatches, Guanin und Cytosin-Gehalt) überprüft und ausgewählt. Eine BLAST-Suche der generierten Primersequenzen wird ebenfalls durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Primer spezifisch am *pycA* Gen der *Bacillus cereus* Gruppe binden.

3.6.3 Sangersequenzierungsauswertung

Zur Sequenzierung der Amplifikate der *rpoB* und *pycA* PCR werden jeweils die Forward- und Reverseprimer verwendet. Dementsprechend werden pro Amplifikat zwei Sequenzen erzeugt. Bei beiden Sequenzen werden die Enden mit geringer Sequenzierungsqualität über die Trimfunktion von Geneious entfernt. Anschließend

wird ein paarweises Alignment beider Sequenzen erstellt. Hierfür wird der Geneious Alignment Algorithmus mit seinen Standardeinstellungen verwendet. Aus diesem Alignment wird die Konsensussequenz extrahiert. Diese Sequenz wird mit BLAST gegen die Referenzdatenbank und die Nukleotidkollektion von NCBI sowie gegen eine eigens erstellte Datenbank, bestehend aus den 18 *Bacillus cereus* Sequenzen, abgeglichen.

4 ERGEBNISSE

4.1 TEIL I: MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER SPEISEINSEKTEN

Der als Positivkontrolle mitgeführte *Escherichia coli* (DSM 1103) konnte bei jeder Messung richtig identifiziert werden. Von den 144 ursprünglich gewonnenen Kulturen sind nach dem erneuten Ausstreichen drei Kulturen nicht mehr angewachsen. Bei drei Kulturen (Kurznummer: 104-106, s. Anhang Tabelle A- 4) konnte auch nach mehrfacher Subkultivierung keine reine Kultur erstellt werden, was die MALDI-ToF-MS Messung von Probe 106 bestätigt. Von den übrigen 138 Proben ist bei 99 Proben eine Identifizierung der Spezies mit Hilfe des MALDI-ToF-MS möglich. Das ergibt einen Anteil von 71,7 % der Isolate die mittels des MALDI-ToF-MS identifizierbar waren. Von den restlichen 39 Proben werden zunächst Messungen für Datenbankeinträge, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, erstellt. Ihre Identifizierung erfolgt dann über eine Sequenzanalyse (s. Abschnitt 4.2). Auf diese Weise wird die dem MALDI-ToF-MS hinterlegte Datenbank um insektenspezifische Mikroorganismen erweitert.

4.1.1 Identifizierte Mikroorganismen

Laut Gerätehersteller sind Isolate, deren Abgleich mit der Datenbank einen Score größer gleich 2 ergeben sehr wahrscheinlich eindeutig identifiziert. Sie erscheinen im Ergebnisbericht der Auswertungssoftware grün. Die eindeutige Übereinstimmung mit einer Spezieszuordnung ist also sehr hoch.

Insgesamt konnten 53 der 99 identifizierten Isolate der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden. 33 hiervon gehörten zur *Bacillus cereus* Gruppe. Damit machte diese Gruppe ein Drittel aller identifizierten Isolate aus. Bei dem Großteil der Isolate handelte es sich um Grampositive Bakterien (90 von 99 Isolaten). Neben der Gattung *Bacillus*, waren auch Vertreter der Gattungen *Clostridium* (15 Isolate), *Enterococcus* (18 Isolate), sowie 3 *Micrococcus luteus* und 1 *Staphylococcus warneri* zu finden. Bei den gramnegativen Bakterienisolaten handelte es sich hauptsächlich um *Enterobacteriaceae* (7 von 9 gramnegativen Isolaten), sowie zwei *Moraxellaceae* (s. Abbildung 4-1). Insgesamt überwiegt damit der Anteil an Sporenbildner mit 68 % aller identifizierten Isolate. Die Speziesbezeichnungen der einzelnen Isolate kann Tabelle 4-1 entnommen werden. Vertreter der *Bacillus cereus* Gruppe werden in den folgenden Beschreibungen als *Bacillus cereus* zusammengefasst.

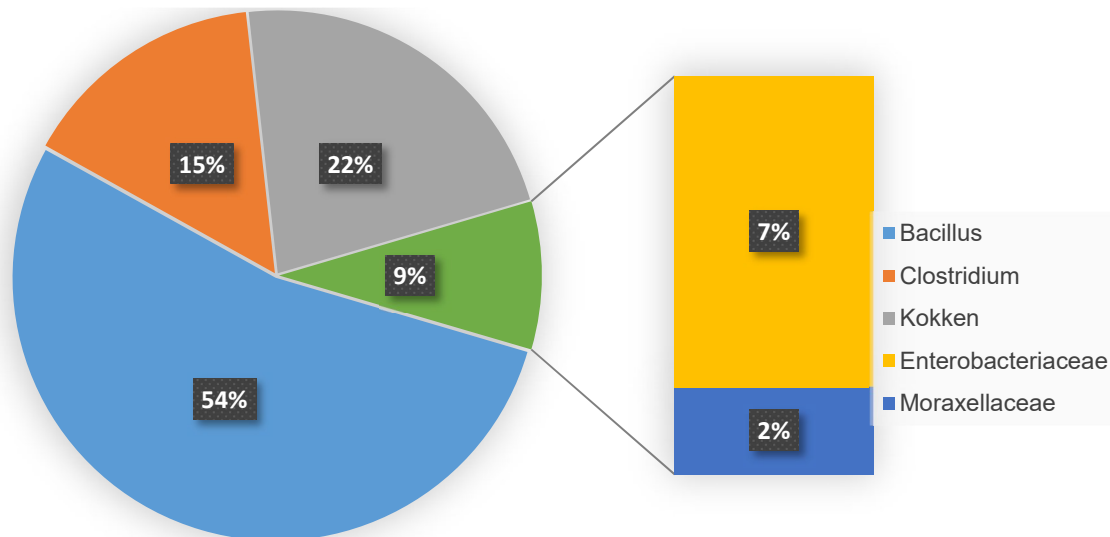


Abbildung 4-1: Mit MALDI-ToF-MS identifizierte Mikroorganismen isoliert von Speiseinsekten. Dargestellt sind jeweils die Gattungen (*Enterococcus*, *Micrococcus luteus* sowie *Staphylococcus warneri* sind zu Kokken zusammengefasst), bzw. Familien (*Enterobacteriaceae* und *Moraxellaceae*) der identifizierten Isolate.

Tabelle 4-1: Genaue Bezeichnung der mittels MALDI-ToF-MS identifizierten Mikroorganismen von Speiseinsekten

Bezeichnung	Anzahl
Grampositiv	90
Stäbchen	68
<i>Bacillus</i>	53
<i>Bacillus cereus</i>	33
<i>Bacillus licheniformis</i>	5
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> spp. <i>plantarum</i>	4
<i>Bacillus subtilis</i>	3
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	1
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	1
<i>Bacillus flexus</i>	1
<i>Paenibacillus</i> sp.	1
<i>Paenibacillus stellifer</i>	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1
<i>Bacillus circulans</i>	1

<i>Clostridium</i>	15
<i>Clostridium sporogenes</i>	8
<i>Clostridium bifermentans</i>	5
<i>Clostridium perfringens</i>	1
<i>Clostridium subterminale</i>	1
Kokken	22
<i>Enterococcus</i>	18
<i>Enterococcus mundtii</i>	7
<i>Enterococcus gallinarum</i>	4
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4
<i>Enterococcus durans</i>	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1
Verschiedene Kokken	4
<i>Micrococcus luteus</i>	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
Gramnegativ	9
<i>Enterobacteriaceae</i>	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	2
<i>Enterobacter bugandensis</i>	1
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
<i>Escherichia hermannii</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Moraxellaceae</i>	2
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1
<i>Moraxella osloensis</i>	1
Gesamt	99

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Produkte (Gesamtwassergehalt, Rohproteinanteil, Fettanteil, Salzgehalt) und der Belastung der Speiseinsekten mit Mikroorganismen feststellen. Auch die Art der Verarbeitung, in diesem Fall als Mehl oder gefriergetrocknet als ganze Insekten, ließ keinen Schluss

auf die Keimzahl oder Art der identifizierten Mikroorganismen zu. Eine Auflistung der Proben mit Ergebnissen der von der Abteilung für tierische Lebensmittel des CVUA Freiburgs durchgeführten Nährwertuntersuchungen, sowie der mikrobiologischen Untersuchungen, befindet sich im Anhang (s. Tabelle A- 3 und Tabelle A- 5).

4.1.2 Nicht identifizierte Mikroorganismen

Ein Score größer gleich 1,7 aber kleiner 2 zeigt lediglich eine wahrscheinliche Speziesidentifikation an. Die Ausgabe der Ergebnisse ist in diesem Fall gelb.

Insgesamt war dies bei 26 der Isolate der Fall. Schwierigkeiten einer genauen Spezieszuordnung sowie einer sicheren Gattungsbezeichnung ergaben sich vor allem bei den Spezies *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* und *Enterococcus faecium*. Auch bei den Gattungen *Brevibacillus* sowie *Paenibacillus* war die Spezieszuordnung nicht eindeutig. Eine genaue Darstellung aller nicht eindeutig identifizierter Isolate ist im Anhang in Tabelle 4-2 dargestellt. Auch bei diesen Isolaten sind die Mehrheit der Isolate Sporenbildner (21 von 26 Isolaten).

Tabelle 4-2: Mittels MALDI-ToF-MS nicht eindeutig identifizierte Mikroorganismen von Speiseinsekten.

Bezeichnung	Anzahl
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3
<i>Bacillus pumilus</i>	3
<i>Bacillus sp.</i>	2
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	3
<i>Bacillus circulans</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Brevibacillus centrosporus</i>	2
<i>Brevibacillus agri</i>	2
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	2
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	1
<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i>	3
Gesamt	26

Bei 13 Isolaten war mittels des MALDI-ToF-MS keine verlässliche Identifikation möglich. Diese Ergebnisse zeichneten sich durch einen Score kleiner 1,7 in der Auswertesoftware aus. Im Ergebnisbericht wurden sie rot dargestellt. In diesem Fall ist keine Identifikation des Organismus möglich gewesen.

4.2 TEIL II: SEQUENZANALYSE

Um im MALDI-ToF-MS nicht eindeutig bestimmbare Isolate zu identifizieren und eine bessere Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe zu ermöglichen, wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt.

4.2.1 *rpoB* Gen Sequenzierung

Für die PCR mit anschließender Sequenzierung des PCR Produkts mit Primern für das *rpoB* Gen wurden die Isolate ausgewählt, die der Gruppe der Sporenbildner zuzuordnen sind und/oder bei denen keine verlässliche Identifikation durch das MALDI-ToF-MS möglich war. Hinzu kam außerdem eine Auswahl an durch das MALDI-ToF-MS als *Bacillus cereus* identifizierte Isolate. Diese Isolate stammten sowohl aus den Speiseinsektenprodukten als auch aus der hausinternen Stammsammlung.

	B.wiedmanni	B.weihenstephanensis	B.tropicus	B.toyonensis	B.thuringiensis	B.pseudomycoloides	B.proteolyticus	B.paranthracis	B.paramycoloides	B.pacificus	B.nitratireducens	B.mycoloides	B.mobilis	B.luti	B.cytotoxikus	B.cereus	B.anthraxis	B.albus
B.wiedmanni		6	4	4	5	16	5	3	8	3	7	6	1	2	24	4	3	1
B.weihenstephanensis	6		6	4	7	16	3	5	6	5	5	0	7	4	20	6	5	7
B.tropicus	4	6		4	5	16	5	1	8	1	7	6	3	4	24	4	3	3
B.toyonensis	4	4	4		3	12	3	3	4	3	5	4	3	4	22	2	5	3
B.thuringiensis	5	7	5	3		15	6	4	5	4	8	7	4	5	24	3	6	4
B.pseudomycoloides	16	16	16	12	15		15	15	14	15	17	16	15	16	26	14	17	15
B.proteolyticus	5	3	5	3	6	15		4	7	4	2	3	6	3	19	5	4	6
B.paranthracis	3	5	1	3	4	15	4		7	0	6	5	2	3	23	3	2	2
B.paramycoloides	8	6	8	4	5	14	7	7		7	9	6	7	8	24	6	9	7
B.pacificus	3	5	1	3	4	15	4	0	7		6	5	2	3	23	3	2	2
B.nitratireducens	7	5	7	5	8	17	2	6	9	6		5	5	8	21	7	6	8
B.mycoloides	6	0	6	4	7	16	3	5	6	5	5		7	4	20	6	5	7
B.mobilis	1	7	3	3	4	15	6	2	7	2	8	7		3	25	3	4	0
B.luti	2	4	4	4	5	16	3	3	8	3	5	4	3		22	4	3	3
B.cytotoxikus	24	20	24	22	24	26	19	23	24	23	21	20	25	22		24	21	25
B.cereus	4	6	4	2	3	14	5	3	6	3	7	6	3	4	24		5	3
B.anthraxis	3	5	3	5	6	17	4	2	9	2	6	5	4	3	21	5		4
B.albus	1	7	3	3	4	15	6	2	7	2	8	7	0	3	25	3	4	

Abbildung 4-2: Distanzmatrix der rpoB PCR Produkte der 18 Bacillus cereus Spezies. Dargestellt sind die Basenpaarunterschiede. Grün: >17 Basenpaarunterschiede, Gelb: ≥8 Basenpaarunterschiede, Rot: <8 Basenpaarunterschiede (jeweils in Dritteln der Maximaldistanz).

4.2.1.1 In silico Analyse

Um zu überprüfen, ob die zur Verfügung stehenden Primer einen Bereich des *rpoB* Gens amplifizieren, der zur Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe ausreicht, wurde zunächst eine in silico Analyse mit der Bioinformatik Software Geneious ausgeführt. Die Analyse ergab Basenpaarunterschiede für die meisten der 18 untersuchten Sequenzen (s. Abbildung 4-2).

Lediglich zwischen *Bacillus mycoides* und *weihenstephanensis*, sowie zwischen *Bacillus pacificus* und *paranthracis* und *Bacillus mobilis* und *albus* ließen sich keine Basenpaarunterschiede feststellen. Für alle Sequenzen ergab sich eine theoretisch zu erwartende Produktgröße von 344 bp. Eine Darstellung des phylogentischen Baums der PCR-Produkte aller 18 Referenzsequenzen befindet sich im Anhang (s. Abbildung B- 3).

4.2.1.2 Gel-Elektrophorese

Um zu überprüfen, ob durch die PCR ein PCR-Produkt in der durch die in der in silico Analyse bestimmten Basenpaargröße amplifiziert wurde, wurde von allen für die Sequenzierung des *rpoB* Genabschnitts ausgewählten Isolaten nach der PCR zunächst ein E-Gel angefertigt (s. Abbildung 4-3). Sowohl der während der PCR mitgeführte Aufarbeitungsleerwert (AL) als auch die Negativkontrolle zeigten in allen E-Gels keine Banden. Bei 28 der 30 ausgewählten Isolate zeigte sich eine Bande bei ca. 350 bp. Bei Isolat 107 war nur eine sehr schwache Bande ebenfalls bei ca. 350 bp zu erkennen. Bei Isolat 100 war die Bande bei ca. 400 bp zu erkennen.

(NCBI ID 38893) und *Paenibacillus* (NCBI ID ASM75868v1)) ergab einen Basenpaarunterschied von 92 bp. Bei beiden konnte ein theoretisches PCR Produkt mit einer Länge von 344 bp erzeugt werden und die Primersequenzen mit weniger als 3 Mismatches angelegt werden.

Tabelle 4-3: Durch rpoB-Gen Sequenzierung identifizierte Spezies. Rot/ oben: Vor Sequenzierung nicht identifizierbare Spezies. Gelb/ unten: Vor Sequenzierung nur Gattungszuordnung möglich. Anzahl an untersuchten Isolaten. In Klammern: Nicht zur MALDI-ToF-MS Datenbank zugefügt, da nicht eindeutig differenzierbar.

Bezeichnung	Anzahl
<i>Bacillus subtilis</i>	6
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	1
(<i>Enterococcus lactis</i> oder <i>faecium</i>	1)
<i>Bacillus circulans</i>	2
<i>Bacillus</i> sp.	4
(<i>Enterococcus lactis</i> oder <i>faecium</i>	1)
(<i>Paenibacillus stellifer</i> oder <i>sabinae</i>	2)
<i>Bacillus circulans</i>	1
<i>Bacillus paralicheniformis</i>	1
<i>Bacillus altitudinis</i>	1
<i>Bacillus safensis</i>	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	1
<i>Glutamicibacter protophormiae</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	2
<i>Bacillus vini</i>	1
Gesamt	27

Die Spezies *Enterococcus lactis* und *faecium* konnten mit Hilfe dieses Primerpaars nicht unterschieden werden, der Bit-Score beider Ergebnisse war bei allen 3 Isolaten jeweils gleich hoch. Eine Unterscheidung der Spezies *Paenibacillus stellifer* und *sabinae* war ebenfalls nicht möglich.

Generell war der Abgleich aller Isolatsequenzen nur mit der freizugänglichen Nucleotide Collection von NCBI möglich. Die überprüfte Referenzdatenbank von NCBI lieferte bei keiner der Sequenzen einen Treffer.

Insgesamt konnten 25 Isolate für die Erstellung neuer Datenbankeinträge verwendet werden. Die Datenbank wurde dabei um neun speiseinsektenspezifische Mikroorganismenspezies erweitert (s. Tabelle 4-3).

4.2.1.4 Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe

Durch die *rpoB* Sequenzierung war eine Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe teilweise möglich. Es ergaben sich hierbei einzelne Gruppen, die durch diesen Genabschnitt nicht differenzierbar waren. In Tabelle 4-4 dargestellt ist eine repräsentative Auswahl der 18 untersuchten *Bacillus cereus* Isolate. Die vollständige Tabelle befindet sich im Anhang (s. Tabelle B- 2). Zur besseren Einschätzbarkeit der sich ergebenden Ergebnisse sind jeweils die besten Treffer mit identischen Bit-Score sowie die zweitbesten Treffer dargestellt. Bei den dargestellten Treffern handelt es sich um eine Auswahl der mehr als zweimal auftretenden Genome. Der Genombezeichnung ist jeweils in Klammern hintern den BLAST-Ergebnissen angegeben. Zusätzlich zum Bit-Score ist der Grad der Übereinstimmung der Isolatsequenz mit dem jeweiligen Datenbankeintrag in Klammern hinter dem Bit-Score-Wert angegeben. Geneious berechnet diesen Prozentsatz aus der Anteil der Suchsequenz, der mit der Datenbanksequenz abgeglichen wurde (effektive Größe der vergleichenden Sequenz, engl. Query Coverage), dem Erwartungswert, dass eine Suchanfrage mit gleicher Sequenz- und Datenbanklänge zufällig den gleichen Bit-Score ausgibt (E-Wert) und der Übereinstimmung der Suchsequenz mit der Datenbanksequenz (Identität), wobei diese Werte jeweils mit 0,5, 0,25 und 0,25 gewichtet sind. Bei der NCBI Ausgabe war die zugrundeliegende Datenbank die Nucleotide collection. Der Abgleich mit der Referenzdatenbank (RefSeq Representative genomes) ergab keinen Treffer bei keinem der Isolate. Zusätzlich wurde mit den 18 erhaltenen *Bacillus cereus* Referenzsequenzen eine eigene *Bacillus cereus* Datenbank erzeugt, gegen die die Isolatsequenzen ebenfalls abgeglichen wurden (s. Tabelle 3-6). Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 4-4 dargestellt.

Tabelle 4-4: BLAST-Ergebnisse (Auswahl) der mit Primern für das *rpoB* Gen sequenzierten *Bacillus cereus* Isolate. Genombezeichnung des jeweiligen Ergebnisses ist in Klammern hinter der Speziesbezeichnung angegeben. NCBI Datenbank: Nucleotide Collection. *Bacillus cereus* Datenbank erstellt aus 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen zu Verfügung gestellt vom BfR. Angegeben ist der von BLAST ausgegebene Bit-Score sowie der Grad der Übereinstimmung in Klammern unter dem Bit-Score-Ergebnis.

ID	NCBI Ausgabe	Bit-Score (Grade)	<i>Bacillus cereus</i> Datenbank Ausgabe	Bit-Score (Grade)
21	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP035727)			
	<i>Bacillus wiedmannii</i> (CP032365)	579,122	<i>Bacillus wiedmannii</i>	579,122
	<i>Bacillus wiedmannii</i> biovar	(100%)		(100%)
	<i>thuringiensis</i> (CP024684)			
22		573,582		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP041071)	(99,8%)	<i>Bacillus mobilis</i>	573,582
			<i>Bacillus albus</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	580,968
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP070476)	580,968	<i>Bacillus pacificus</i>	(100%)
		(100%)		575,428
	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)		<i>Bacillus tropicus</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP002508)			
44	<i>Bacillus cereus</i> (CP065881)	580,968	<i>Bacillus paranthracis</i>	569,888
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP054568)	(100%)	<i>Bacillus pacificus</i>	(99,7%)
	<i>Bacillus anthracis</i> (CP031643)		<i>Bacillus anthracis</i>	
		575,968		564,348
48	<i>Bacillus cereus</i> (CP000001)	(99,8%)	<i>Bacillus wiedmannii</i>	(99,5%)
		547,729		547,729
	<i>Bacillus cytotoxicus</i> (CP066194)	(99%)	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	(98,7%)
		481,249		481,249
136	<i>Bacillus anthracis</i> (CP066168)	(97,1%)	<i>Bacillus proteolyticus</i>	(97,1%)
	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)	580,428	<i>Bacillus toyonensis</i>	575,428
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	(100%)	<i>Bacillus cereus</i>	(99,8%)

		575,428		569,888
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743)	(99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
		580,968		
	<i>Bacillus albus</i> (CP040344)	(100%)	<i>Bacillus mobilis</i>	580,968
BC		575,428		(100%)
6	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,8%)	<i>Bacillus albus</i>	
				575,428
			<i>Bacillus wiedmannii</i>	(99,8%)
			<i>Bacillus</i>	
	<i>Bacillus mycoides</i> (CP065877)	565,502	<i>weihenstephanensis</i>	562,502
		(99,5%)		(99,5%)
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>		<i>Bacillus mycoides</i>	
BC		545,882		
12	<i>Bacillus cereus</i> (CP065881)	(99%)	<i>Bacillus proteolyticus</i>	545,882
			<i>Bacillus</i>	(99%)
			<i>nitratireducens</i>	

Abbildung 4-4 stellt die sich hier ergebenden Unterscheidungsschwierigkeiten schematisch dar. Die folgende Auswertung bezieht sich auf die Ergebnisse des Abgleichs mit der eigens aus 18 Referenzsequenzen erstellten *Bacillus cereus* Datenbank, da es sich hierbei um vom BfR kuratierte Zusammenstellung handelt, während die Nucleotide Collection der NCBI-Datenbank nicht überarbeitet und somit nicht gesichert korrekt ist.

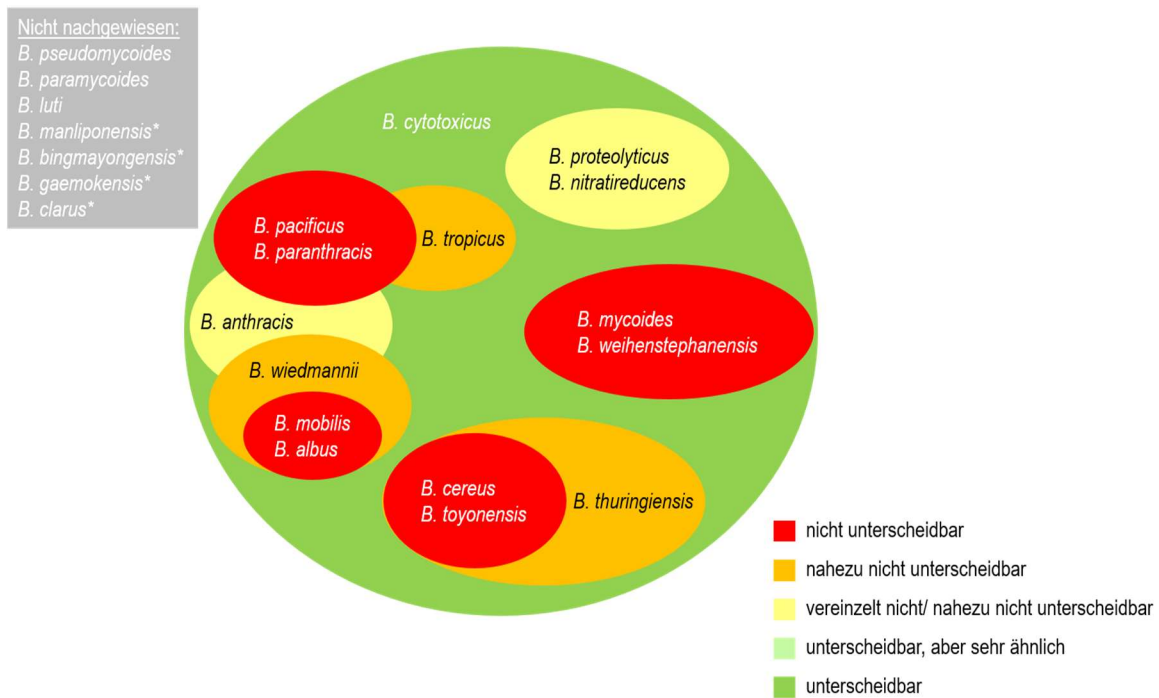


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der *rpoB* PCR-Produkte der *Bacillus (B.) cereus* Isolate. Ergebnisse des Abgleichs mit eigens aus 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen erstellten Datenbank. Nicht unterscheidbar (rot): vollständige Übereinstimmung der ersten Treffer, immer gepaart; nahezu nicht unterscheidbar (orange): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; vereinzelt nicht/ nahezu nicht unterscheidbar (gelb): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, vereinzelt gepaart; unterscheidbar, aber sehr ähnlich (hellgrün): Übereinstimmungsdifferenz > 0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; unterscheidbar (grün): Übereinstimmungsdifferenz > 0,2 Prozentpunkten, keine Paarung. *= vom BfR nicht anerkannte Spezies, in Datenbank nicht hinterlegt. *B. cereus* isoliert von Speiseinsektenprodukten. *B. cereus* s.s. als *B. cereus* dargestellt.

Insgesamt wiesen alle Spezies eine sehr hohe Übereinstimmung auf. Die BLAST-Ergebnisse waren alle in einem Bereich von 97 -100 % Übereinstimmung. Aufgrund eines identischen Bit-Scores nicht unterscheiden ließen sich die Speziespaare *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis*, *B. cereus* und *B. toyonensis*, *B. mobilis* und *B. albus* sowie *B. pacificus* und *B. paranthracis*. Die Ergebnisse stimmten somit insgesamt mit der in Abbildung 4-2 dargestellten in silico Analyse der Referenzsequenzen überein. So bildete sich hier ebenfalls ein Cluster aus den Spezies *B. tropicus*, *B. pacificus*, *B. paranthracis*, *B. anthracis*, *B. wiedmannii*, *B. mobilis* und *B. albus* in dem eine spezifische Spezieszuordnung nicht bis vereinzelt

nahezu nicht möglich war. Die Übereinstimmung von Isolat 21 zu *B. wiedmannii* lag bei 100 %, für *B. mobilis* und *B. albus* bei 99,8 %. Die Sequenz von Isolat 44 stimmte zu 99,7 % mit der von *B. paranthracis*, *B. pacificus* und *B. anthracis* überein. Die Übereinstimmung mit *B. wiedmannii* lag bei 99,5 %. Hier nicht dargestellt ist die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen der *Bacillus cereus* Datenbank und der NCBI Nucleotide Collection. NCBI ordnete die Isolate 44 und 75 den Spezies *B. cereus* bzw. *B. thuringiensis* mit einer Übereinstimmung von jeweils 100 % zu.

Ein Cluster ergab sich außerdem für die drei Spezies *B. cereus* (s.s.), *B. toyonensis*, *B. thuringiensis*. So lag etwa die Übereinstimmung der Sequenz von Isolat 136 für *B. toyonensis* und *B. cereus* bei 99,8 % und für *B. thuringiensis* bei 99,7 %. Bei Isolat BC 12 war die Übereinstimmung zu den Sequenzen der Spezies *B. proteolyticus* und *B. nitratireducens* mit 99 % identisch zueinander. Die Sequenz dieses Isolat stimmte außerdem zu 99,5 % mit den Sequenzen der Spezies *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* überein. Mit 1,6 Prozentpunkten zum nächstbesten Ergebnis war die Spezies *B. cytotoxicus* am deutlichsten von den anderen Spezies zu differenzieren (s. Isolat 48 in Tabelle 4-4).

4.2.2 *pycA* Gen Sequenzierung

Da die Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe mit Hilfe der Primer für das *rpoB* Gen zu keinem eindeutigen Ergebnis geführt hat, wurde eine weitere Literaturrecherche nach einem anderen möglichen Primerpaar bzw. Zielgen ausgeführt. Eine Veröffentlichung von Charles River Laboratories zeigte dabei vielversprechende Ergebnisse mit der Sequenzierung des *pycA* Gens (Danner et al. 2019). Die Arbeitsgruppe gab allerdings keine Primersequenzen preis. Dementsprechend wurden innerhalb dieser Arbeit eigene Primer für das *pycA* Gen der *Bacillus cereus* Gruppe designt, wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben.

4.2.2.1 *In silico Analyse*

Die sich ergebenden Primersequenzen sind in Tabelle 4-5 dargestellt.

Tabelle 4-5: Eigenschaften neu designter Primer zur Speziesdifferenzierung der Bacillus cereus Gruppe über das pycA Gen.

						GC-		
						Sequenz	Gehalt	Schmelz-
Name	Sequenz					-länge	[%]	temperatur [°C]
pycA								
Forward	RAA	RTG	GGT	DCA	RGA			
Primer	TCA	AAA	NCG	TGT		27	40,9	60,6 - 67,5
pycA								
Reverse	RCG	RCG	RTA	CAT	YAC			
Primer	TTT	HAC	TTC	ATC		27	40,9	58 - 66,3

Die Primer lagen im Rahmen von den empfohlenen 18–30 Basen. Der Anteil von Guanin und Cytosin war im Bereich der Empfehlung von 40–60 %. Darüber hinaus gab es keine vier gleichen Basen hintereinander und die Schmelztemperatur lag im empfohlenen Bereich von 55–80 °C und unterschied sich zwischen den beiden Primern nicht wesentlich. Durch ein paarweises Alignment wurde die Eigenkomplementarität der Primer überprüft. Die Distanz zwischen den beiden Sequenzen lag dabei bei 10 bp. Es ergaben sich keine Sekundärstrukturen wie etwa Hairpins oder Eigendimerisierung (Mülhardt 2013, S. 93–103).

Eine Überprüfung der Primerspezifität mit Primer-BLAST war nicht möglich, da dieses nur für Ambiguitäten mit N ausgelegt ist (Ye et al. 2012). Die Spezifität der Primer wurde stattdessen mit einer BLASTn-Suche der Primersequenzen überprüft. Die Primersequenzen banden dabei spezifisch einmal an das jeweilige *Bacillus cereus* Genom. Die ermittelte PCR-Produktlänge der *Bacillus cereus* Gruppe lag bei 1018 bp. Ein multiples Alignment der PCR-Produkte ergab Basenpaarunterschiede zwischen allen Spezies. Die Distanzen reichten dabei von 9 bis 158 bp. Die Distanz zwischen *Bacillus nitratreducens* und *proteolyticus* sowie zwischen *Bacillus paranthracis* und *pacificus* war mit 9 bp am geringsten gefolgt von der Distanz zwischen *Bacillus weihenstephanensis* und *mycoides* mit 11 bp. *Bacillus cytotoxicus* und *Bacillus pseudomycoides* unterschieden sich am deutlichsten von den anderen *Bacillus cereus* Spezies mit Distanzen von 106 bis 158 bp (s. Abbildung 4-5).

	<i>B. cytotoxicus</i>	<i>B. wiedmannii</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. tropicus</i>	<i>B. toyonensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. pseudomycoides</i>	<i>B. proteolyticus</i>	<i>B. paranthracis</i>	<i>B. paranycooides</i>	<i>B. pacificus</i>	<i>B. nitratireducens</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. mobilis</i>	<i>B. luti</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. albus</i>
<i>B. cytotoxicus</i>		151	145	144	155	155	138	146	139	158	138	144	145	151	154	150	142	136
<i>B. wiedmannii</i>	151		73	57	64	60	118	44	47	78	45	43	76	20	58	57	56	43
<i>B. weihenstephanensis</i>	145	73		69	83	70	117	48	70	60	67	52	11	74	78	71	77	66
<i>B. tropicus</i>	144	57	69		86	71	120	56	40	83	40	53	74	57	81	55	47	43
<i>B. toyonensis</i>	155	64	83	86		72	119	72	81	85	77	69	88	68	70	68	88	79
<i>B. thuringiensis</i>	155	60	70	71	72		118	69	73	73	71	68	67	72	76	48	75	60
<i>B. pseudomycoides</i>	138	118	117	120	119	118		121	113	126	113	118	120	119	124	109	121	106
<i>B. proteolyticus</i>	146	44	48	56	72	69	121		48	74	44	9	53	47	69	72	51	43
<i>B. paranthracis</i>	139	47	70	40	81	73	113	48		84	9	45	77	48	78	62	30	37
<i>B. paranycooides</i>	158	78	60	83	85	73	126	74	84		80	76	55	85	84	82	85	75
<i>B. pacificus</i>	138	45	67	40	77	71	113	44	9	80		41	74	44	74	64	32	32
<i>B. nitratireducens</i>	144	43	52	53	69	68	118	9	45	76	41		57	44	68	67	50	40
<i>B. mycooides</i>	145	76	11	74	88	67	120	53	77	55	74	57		79	83	72	84	71
<i>B. mobilis</i>	151	20	74	57	68	72	119	47	48	85	44	44	79		61	65	57	46
<i>B. luti</i>	154	58	78	81	70	76	124	69	78	84	74	68	83	61		73	79	75
<i>B. cereus</i>	150	57	71	55	68	48	109	72	62	82	64	67	72	65	73		71	58
<i>B. anthracis</i>	142	56	77	47	88	75	121	51	30	85	32	50	84	57	79	71		40
<i>B. albus</i>	136	43	66	43	79	60	106	43	37	75	32	40	71	46	75	58	40	

Abbildung 4-5: Distanzmatrix der *pycA* PCR Produkte der 18 *Bacillus cereus* Spezies. Dargestellt sind die Basenpaarunterschiede.

Grün: >105 Basenpaarunterschiede, Gelb: ≥52 Basenpaarunterschiede, Rot: <52 Basenpaarunterschiede (jeweils in Dritteln der Maximaldistanz).

Eine Darstellung des phylogentischen Baums aller 18 Referenzsequenzen des gesamten *pycA* Gens und der PCR-Produkte der neu erstellten Primer befindet sich im Anhang (s. Abbildung B- 2 und Abbildung B- 3).

4.2.2.2 Temperatur-Zeit-Profil und Gel-Elektrophorese

Das bereits für die *rpoB* PCR verwendete Temperatur-Zeit-Profil (s. Abschnitt 3.3.3.2) stellte sich als das auch für diese PCR am besten geeignetste Profil heraus. So waren die Banden bei diesem Profil am deutlichsten zu erkennen. Es zeichnete sich dabei bei fast allen Isolaten eine einzelne Bande bei ca. 1000 bp ab. Lediglich bei Isolat 136 und 107 war keine Bande zu erkennen. Beim AL und der Negativkontrolle bildete sich keine Bande (s. Abbildung 4-6).

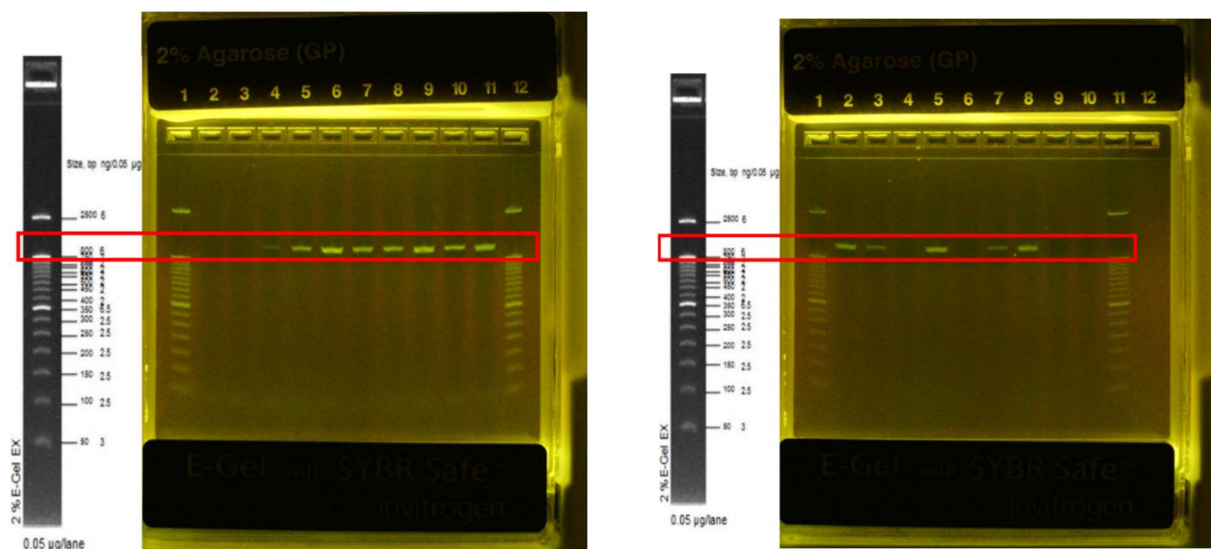


Abbildung 4-6: Beispielhafte E-Gel Ergebnisse. Beide Bilder: erste und letzte Spur ist jeweils der Ladder geladen. Bild links: Spur 2: AL, Spur 3: Negativkontrolle, Spur 4: Isolat 140, Spur 5: Isolat BC 3, Spur 6: Isolat 35, Spur 7: Isolat 21, Spur 8: Isolat BC 6, Spur 9: Isolat 44, Spur 10: Isolat 103, Spur 11: Isolat 137; Bild rechts: Spur 2: Isolat BC 5, Spur 3: Isolat BC 9, Spur 4: Isolat 136, Spur 5: Isolat 90, Spur 6: Isolat 107, Spur 7: Isolat BC 12, Spur 8: Isolat 81, Spur 9: AL, Spur 10: Negativkontrolle; Die genauen Isolatbeschreibungen lassen sich der Tabelle C- 1 und Tabelle A- 4 im Anhang entnehmen. Rote Markierung: Bande bei ca. 1000 bp.

4.2.2.3 Bacillus cereus Speziesdifferenzierung

Die Sequenzierung der Isolate führte bei fast allen Isolaten zu einer Sequenz. Bei Isolat 107 konnte keine Sequenz erstellt werden. Bei Isolat 136 war die Sequenzierung nur mit dem Forwardprimer erfolgreich.

In Tabelle 4-6 dargestellt ist ein Vergleich der Ergebnisse der *rpoB* Sequenzierung und der *pycA* Sequenzierung. Zur besseren Übersichtlichkeit ist nur eine repräsentative Auswahl der BLAST-Ergebnisse des Abgleichs mit der eigens erstellten *Bacillus cereus* Datenbank dargestellt.

Tabelle 4-6: Gegenüberstellung der BLAST-Ergebnisse der Sequenzen der rpoB bzw. pycA Sequenzierung der Bacillus cereus Isolate im Abgleich mit der eigens erstellten Bacillus cereus Datenbank. Es handelt sich um eine repräsentative Auswahl. Dargestellt sind jeweils die zwei besten Treffer.

ID	rpoB Sequenzierung		pycA Sequenzierung	
	<i>Bacillus cereus</i> Datenbank Ausgabe	Bit-Score (Grade)	<i>Bacillus cereus</i> Datenbank Ausgabe	Bit-Score (Grade)
48		547,729		1624,33
	<i>Bacillus cytotoxikus</i>	(98,7%)	<i>Bacillus cytotoxikus</i>	(97,8%)
	<i>Bacillus proteolyticus</i>	481,249 (97,1%)	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	1098,03 (93%)
				1668,64
21			<i>Bacillus mobilis</i>	(98,3%)
	<i>Bacillus wiedmannii</i>	579,122 (100%)	<i>Bacillus wiedmannii</i>	1657,57 (98,2%)
				1596,63
			<i>Bacillus albus</i>	(97,6%)
	<i>Bacillus mobilis</i>	573,582		
	<i>Bacillus albus</i>	(99,8%)		
22	<i>Bacillus paranthracis</i>	580,968 (100%)	<i>Bacillus paranthracis</i>	1783,14 (99,3%)
				1744,36
	<i>Bacillus pacificus</i>		<i>Bacillus pacificus</i>	(98,9%)
		575,428		
44	<i>Bacillus paranthracis</i>	569,888 (99,7%)	<i>Bacillus anthracis</i>	1727,74 (99%)
	<i>Bacillus pacificus</i>		<i>Bacillus paranthracis</i>	1666,8 (98,4%)

			1661,26
	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus pacificus</i>	(98,4%)
	564,348		
	<i>Bacillus wiedmannii</i>		(99,5%)
			1541,23
	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	(99,5%)
	575,428		
	(99,8%)		1308,55
136	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(97,1%)
	569,888		
	<i>thuringiensis</i>		(99,7%)
			1720,35
	<i>Bacillus mobilis</i>	<i>Bacillus mobilis</i>	(98,9%)
	580,968		
	(100%)		1670,49
BC 6	<i>Bacillus albus</i>	<i>Bacillus wiedmannii</i>	(98,4%)
	575,428		
	<i>Bacillus wiedmannii</i>		(99,8%)
			1604,01
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	(97,8%)
	562,502		
	(99,5%)	<i>Bacillus weihen-</i>	1587,39
	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>stephanensis</i>	(97,6%)
BC 12			1568,93
	<i>Bacillus proteolyticus</i>	<i>Bacillus paramycoides</i>	(97,4%)
	545,882		
	<i>Bacillus nitratreducens</i>		(99%)

Abbildung 4-7 stellt die in Tabelle 4-6 aufgelisteten BLAST-Ergebnisse der *pycA* Sequenzierung schematisch dar.

Die folgende Auswertung bezieht sich auf die Ergebnisse des Abgleichs mit der eigens aus 18 Referenzsequenzen erstellten *Bacillus cereus* Datenbank.

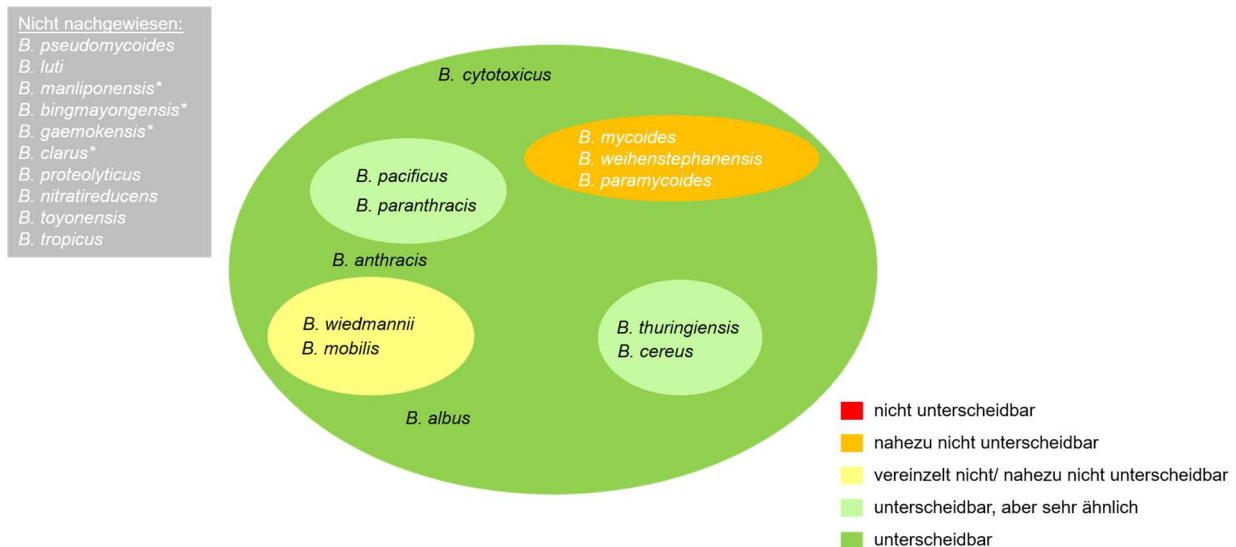


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der *pycA* PCR-Produkte der *Bacillus* (*B.*) *cereus* Isolate. Ergebnisse des Abgleichs mit eigens aus 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen erstellten Datenbank. Nicht unterscheidbar (rot): vollständige Übereinstimmung der ersten Treffer, immer gepaart; nahezu nicht unterscheidbar (orange): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; vereinzelt nicht/ nahezu nicht unterscheidbar (gelb): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, vereinzelt gepaart; unterscheidbar, aber sehr ähnlich (hellgrün): Übereinstimmungsdifferenz > 0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; unterscheidbar (grün): Übereinstimmungsdifferenz > 0,2 Prozentpunkten, keine Paarung. *= vom BfR nicht anerkannte Spezies, in Datenbank nicht hinterlegt. *B. cereus* isoliert von Speiseinsektenprodukten. *B. cereus* s.s. als *B. cereus* dargestellt.

Im Gegensatz zur Sequenzierung mit Primern für das *rpoB* Gen ergaben sich bei der Sequenzierung mit Primern für das *pycA* Gen keine Treffer mit identischem Bit-Score. Der Grad der Übereinstimmung lag insgesamt in einem Bereich von 96,9 %–99 %. Während die Unterscheidung von *Bacillus* (*B.*) *paranthracis* und *B. pacificus* anhand des *rpoB* Gens nicht möglich war (s. z. B. Isolat 22) ergaben sich bei der Sequenzierung des *pycA* Gens kleine Unterschiede. So liegt der Grade bei Isolat 22 für *B. paranthracis* bei 99,3% und bei *B. pacificus* bei 98,9%.

Vereinzelt wurde Isolate mit dieser Spezieszuordnung außerdem *B. anthracis* als Spezies zugeordnet. Dies war etwa bei den Isolaten 44 und 75 der Fall. In beiden Fällen war die Übereinstimmung für *B. anthracis* mit 99 % (Isolat 44) bzw. 98,8 % (Isolat 75) am höchsten. Die Speziesübereinstimmung mit *B. paranthracis* und *B. pacificus* folgte bei beiden Isolaten im Abstand von 0,6 Prozentpunkten. Die

Sequenzen stimmten damit in einem hohen Maß überein. Die Übereinstimmung zu *B. paranthracis* und *B. pacificus* war bei beiden Isolaten identisch (s. Tabelle 4-6). Wie bereits bei der *rpoB* Sequenzierung (s. Abschnitt 4.2.1.4) ergab sich auch hier eine Diskrepanz der Ergebnisse zwischen der *Bacillus cereus* Datenbank und der NCBI Nucleotide Collection. NCBI ordnete die Isolate 44 und 75 erneut den Spezies *B. cereus* und *B. thuringiensis* in diesem Fall aber auch *B. anthracis* mit einer Übereinstimmung von jeweils 99,4 % zu.

Eine ebenfalls sehr hohe Übereinstimmung zeigten außerdem die Spezieszuordnungen von *B. mobilis* und *B. wiedmannii*. So lag die Sequenzübereinstimmung von Isolat BC 5 zur Referenzsequenz von *B. mobilis* bei 98,4 % und bei 98,3 % zur Referenzsequenz von *B. wiedmannii*. Eine etwas geringere aber dennoch hohe Übereinstimmung zeigten diese Spezies auch bei Isolat BC 6. Hier lag die Übereinstimmung zur Referenzsequenz von *B. mobilis* mit 98,9 % nur 0,5 Prozentpunkte über der Übereinstimmung zur Referenzsequenz von *B. wiedmannii*. Vereinzelt gepaart, aber aufgrund größerer Sequenzunterschiede besser von diesen zwei Spezies unterscheidbar trat in diesem Zusammenhang die Spezieszuordnung zur Spezies *B. albus* auf. Hier lag etwa die Übereinstimmung von Isolat 21 zu *B. albus* bei 97,6 % und bei 98,3 % zu *B. mobilis* bzw. bei 98,2 % zu *B. wiedmannii* (s. Tabelle 4-6). Die Spezieszuordnung zu *B. cereus* und *B. thuringiensis* unterschieden sich in ihrer jeweiligen Übereinstimmung um mehr als zwei Prozentpunkte, traten aber immer gepaart auf. So lag die Übereinstimmung von Isolat 81 zu *B. cereus* bei 99,5 % und zu *B. thuringiensis* bei 97 %. Bei Isolat 90 lag die Übereinstimmung zur *B. cereus* bei 99,1 % und zu *B. thuringiensis* bei 96,9 % (s. Tabelle 4-6).

Ein Cluster bildeten außerdem die Spezies *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis* und *B. paramycoides*. Hier unterschied sich die Übereinstimmung der Sequenzen bei Isolat BC 12 jeweils um 0,2 Prozentpunkte mit 97,8 % Übereinstimmung zur *B. mycoides*, 97,6 % Übereinstimmung zu *B. weihenstephanensis* und 97,4 % Übereinstimmung zu *B. paramycoides*. Diese Zuordnung wurde jedoch nur einmal beobachtet (s. Tabelle 4-6 und Abbildung 4-7). Mit 4,8 Prozentpunkten zum nächstbesten Ergebnis war die Identifikation Spezies *B. cytotoxicus* am eindeutigsten möglich (s. Isolat 48 Tabelle 4-6).

4.3 TEIL III: CES REAL-TIME PCR

4.3.1 Verifizierung und Etablierung

Zur Verifizierung und Etablierung der ces Real-time PCR für das Labor „Molekularbiologie“ des CVUA Freiburgs wurde die von Frickers et al. vorgestellte und in der DIN EN ISO NORM 7932:2020-11 in Anhang D 2 aufgenommene Methode mit allen zur Verfügung stehenden bereits als ces-positiv oder -negativ bestimmten *Bacillus cereus* Isolaten durchgeführt (Fricker et al. 2007; DIN EN ISO 7932:2020-11). Damit eingeschlossen war die gesamte hausinterne Stammsammlung des CVUA Freiburgs bestehend aus 46 *Bacillus* Isolaten, 7 *Bacillus cereus* Isolaten, die vom CVUA Stuttgart zur Verfügung gestellt wurden, 1 *Bacillus cereus* Stamm der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Stamm DSM 4312-1218-001). Das genaue Vorgehen ist in Abschnitt 3.3.5 beschrieben.

Ces-positiv bzw. -negativ beschreibt dabei das Vorhandensein, des ces Gens, das durch die ces Real-time PCR detektiert werden soll. Ist dieses Gen vorhanden, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass das *Bacillus cereus* Isolat in der Lage ist, Cereulid zu bilden (Ehling-Schulz et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4-7 und Abbildung 4-8 dargestellt.

Tabelle 4-7: Zur Verifizierung der ces Real-time PCR verwendete Stämme der hausinternen Stammsammlung des CVUA Freiburgs, der vom CVUA Stuttgart zur Verfügung gestellten Stämme und des Stamms der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ, Stamm DSM 4312-1218-001).

Bakterienspezies	Getestete Stämme	Erwartetes Ergebnis	Ergebnis ces-Real-time PCR	
<i>Bacillus (B.) cereus</i> Gruppe			positiv	negativ
- Nicht-emetische <i>B. cereus</i>	9	negativ	0%	100%
- Emetische <i>B. cereus</i>	19	positiv	100%	0%
<i>Bacillus (B.) sp.</i>				
- <i>B. subtilis</i>	5	negativ	0%	100%
- <i>B. sporothermodurans</i>	20	negativ	0%	100%
- <i>B. atrophaeus</i>	1	negativ	0%	100%
Gesamt	54			

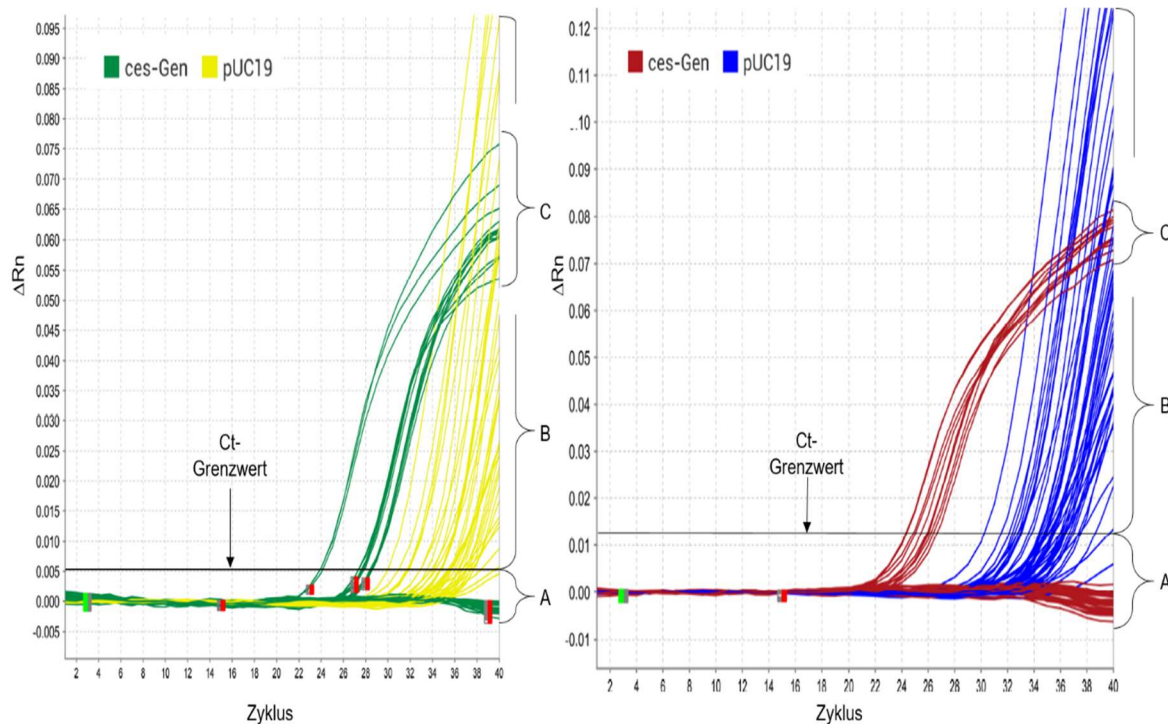


Abbildung 4-8: Amplifikationsplots der ces Real-time PCR. Bereiche A: ces-negative *Bacillus cereus* Isolate, unbestimmbare pUC19 (negative interne Amplifikationskontrolle (IAC)), B: bestimmbarer pUC19 (positive IAC), C: ces-positive *Bacillus cereus* Isolate. Bild links: Ergebnisse der *Bacillus cereus* Isolate vom CVUA Stuttgart, Grün: ces Gen, Gelb: pUC19. Bild rechts: Ergebnisse der *Bacillus cereus* Isolate vom CVUA Freiburg, rot: ces Gen, blau: pUC 19. ΔRn : Intensität des normalisierten Reportersignals (Intensität des Reporter-Farbstoffs dividiert durch Intensität der Fluoreszenzemission des passiven Reporterfarbstoffs, Größenordnung des Signals, das mit gegebenen PCR-Bedingungen generiert wird), Ct-Grenzwert: ΔRn -Wert unter dem ein Signal als unbestimmbar angenommen wird; Bild links Ct-Grenzwert = 0,05; Bild rechts Ct-Grenzwert = 0,013.

Die vorgestellte ces Real-time PCR zeigte dabei eine Sensitivität und Spezifität von 100%. Damit stimmten die den Isolaten zugeordneten Deklarationen zu 100% mit den Ergebnissen der ces PCR überein. Die PCR wurde zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit denselben Ergebnissen durchgeführt. Bei der internen Amplifikationskontrolle (IAC) handelte es sich um eine nicht-kompetitive IAC. Das Zielgen der IAC pUC19 und das Zielgen ces wurden mit unterschiedlichen Primern amplifiziert. Vereinzelt war dabei der ΔRn -Wert der IAC kleiner als der Ct-Grenzwert. Wie in Abbildung 4-8 zu sehen, war dies bei den Isolaten vom CVUA Stuttgart und vom CVUA Freiburg bei jeweils einer ces-positiven Probe der Fall. Bei allen

Durchlaufen kam es weder bei der Negativkontrolle noch beim AL zu einer Amplifikation des *ces* Gen.

4.3.2 Untersuchung der *Bacillus cereus* Isolate der Speiseinsektenproben

Die 34 *Bacillus cereus* Isolate aus den Speiseinsektenproben sowie ein *Bacillus safensis* wurden mit der *ces* Real-time PCR untersucht. Wie in Tabelle 4-8 und Abbildung 4-9 dargestellt stellten sich vier (ID 22, 24, 25, 26) der 34 Isolate dabei als *ces*-positiv heraus.

Tabelle 4-8: Auswahl der Ergebnisse der ces Real-time PCR der insgesamt 34 Bacillus cereus Isolate der Speiseinsektenproben. Rote Markierung: positive Ergebnisse. Ct - Grenzwert: 0,003. Ergebnisse aller Isolate befindet sich im Anhang (s. Tabelle C- 1 und Tabelle C- 2).

ID	Zielgen	CT (Schwellenwertzyklus)	ID	Zielgen	CT (Schwellenwertzyklus)
21	<i>ces Gen</i>	unbestimmt	25	<i>ces Gen</i>	20,327
21	pUC19	35,443	25	pUC19	unbestimmt
21	<i>ces Gen</i>	unbestimmt	25	<i>ces Gen</i>	20,653
21	pUC19	unbestimmt	25	pUC19	38,679
22	<i>ces Gen</i>	21,099	26	<i>ces Gen</i>	23,066
22	pUC19	unbestimmt	26	pUC19	33,974
22	<i>ces Gen</i>	20,933	26	<i>ces Gen</i>	23,178
22	pUC19	unbestimmt	26	pUC19	unbestimmt
23	<i>ces Gen</i>	unbestimmt	BC 44	<i>ces Gen</i>	20,353
23	pUC19	33,816	BC 44	pUC19	39,027
23	<i>ces Gen</i>	unbestimmt	AL	<i>ces Gen</i>	unbestimmt
23	pUC19	35,964	AL	pUC19	35,572
24	<i>ces Gen</i>	18,587	neg Ko	<i>ces Gen</i>	unbestimmt
24	pUC19	unbestimmt	neg Ko	pUC19	35,936
24	<i>ces Gen</i>	18,768	pos Ko	<i>ces Gen</i>	31,742
24	pUC19	unbestimmt	pos Ko	pUC19	34,656

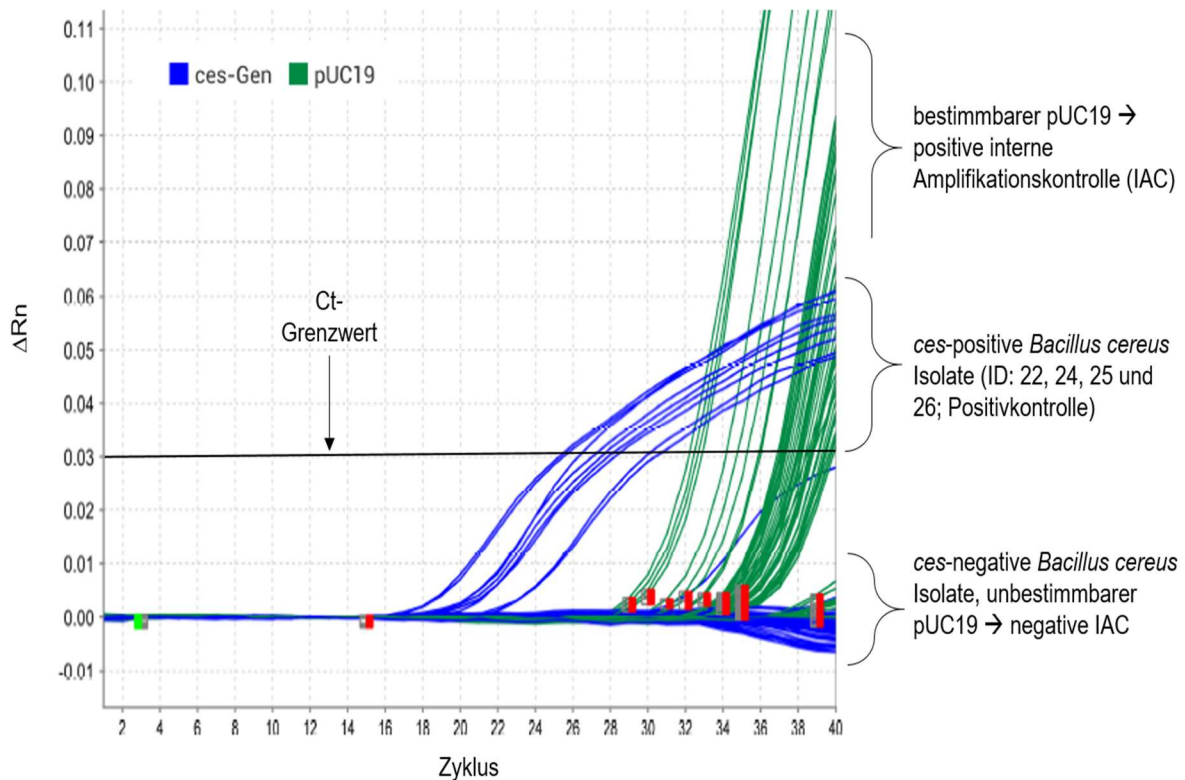


Abbildung 4-9: Amplifikationsplot der *ces* Real-time PCR von *Bacillus cereus* Isolaten der Speiseinsektenproben. Blau: *ces* Gen, Grün: pUC19. ΔRn : Intensität des normalisierten Reportersignals (Intensität des Reporter-Farbstoffs dividiert durch Intensität der Fluoreszenzemission des passiven Reporterfarbstoffs, Größenordnung des Signals, das mit gegebenen PCR-Bedingungen generiert wird). Ct-Grenzwert unter dem ΔRn -Wert als unbestimmbar angenommen wird: 0,03.

Auch diese Ergebnisse konnten bei einer zweiten Durchführung bestätigt werden. Bei den als *ces*-positiv identifizierten Isolaten 22 und 24 war die IAC auch im Doppelsatz nach erneuten Wiederholung des Experiments nicht bestimmbar. Bei allen anderen Isolaten war die IAC mindestens in einem der beiden Ansätze bestimmbar. Die Negativkontrolle sowie der AL waren in beiden Durchläufen negativ. Der vom der DSMZ erworbene *ces*-positive *Bacillus cereus* Stamm DSM 4312-1218-001 wurde als Positivkontrolle eingesetzt und zeigte in beiden Durchläufen eine Amplifikation des *ces* Gens. Mitgeführt wurde außerdem der *ces*-positive Stamm BC 44 aus Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Auch dieser Stamm wurde in allen Durchläufen als *ces*-positiv bestätigt.

4.4 TEIL IV: CEREULIDTOXIN-NACHWEIS MITTELS MALDI-ToF-MS

Ulrich et al. und Ducrest et al. haben bereits eine Methode zum Nachweis des Cereulidtoxins mittels des MALDI-ToF-MS vorgestellt (Ulrich et al. 2019; Ducrest et al.

2019). Diese wurde vom CVUA Stuttgart aufgegriffen und an die hausinternen Bedingungen angepasst. Diese Methode stellte die Ausgangsmethode dar, die in Abschnitt 3.4.3 beschrieben wurde. Mit dieser Methode war es im CVUA Freiburg bis jetzt allerdings nicht möglich alle Toxinbildner zu identifizieren. Vor allem Stämme, die nur eine geringe Menge Cereulid absondern, aber in der *ces* Real-time PCR sicher positiv sind, konnten nicht eindeutig als Toxinbildner klassifiziert werden.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Döllinger et al. bildeten die Grundlage der in dieser Arbeit erarbeiteten Methode. In ihrem 2020 veröffentlichten Paper evaluieren sie die Arbeit von Ducrest et al. und stellen eigene Methoden zu Detektion von Cereulid im MALDI-ToF-MS vor. Unterschieden wird dabei eine Methodik zum Nachweis von Cereulid anhand einer Methode zur Bakterientypisierung sowie den Toxinnachweis über die Extraktion von Cereulid (Doellinger et al. 2020). Angaben zu verschiedenen Medien und Temperaturen wurden außerdem den Arbeiten von Häggblom et al. und Agata et al. entnommen (Häggblom et al. 2002; Agata et al. 1999). Deren Untersuchungen beziehen sich nicht auf den Cereulidnachweis mittels der MALDI-ToF-MS. Sie geben aber dennoch Aufschluss über möglicherweise optimale Kulturbedingungen für eine maximale Cereulidproduktion.

4.4.1 Entwicklung Cereulidnachweisprotokoll für MALDI-ToF-MS

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen fanden in Anlehnung an Döllinger et al. statt. Es wurde dabei auf eine möglichst genaue Wiederholung der Versuche geachtet. Vereinzelt stand jedoch nicht exakt die gleiche Ausstattung zur Verfügung. Abweichungen werden in den jeweiligen Abschnitten erwähnt. Standardmäßig wurden die Isolate außerdem in Anlehnung an das in Abschnitt 3.4.3 beschriebene Protokoll bei 25°C statt der von Döllinger et al. beschriebenen 37°C kultiviert. Die Untersuchungen wurden jeweils mit vier *ces*-positiven *Bacillus cereus* Stämmen der hausinternen Stammsammlung vom CVUA Freiburg durchgeführt. Es handelte sich dabei jeweils um einen schwach Toxin bildenden Stamm (ID: BC 37), um einen sehr stark Toxin bildenden Stamm (ID: BC 44) und zwei mittel stark Toxin bildende Stämme (ID: BC 41, BC 42). Abschließend wurden alle zur Verfügung stehenden *Bacillus* Isolate (CVUA Freiburg: n = 46, CVUA Stuttgart: n=7, Isolate aus Insektenproben: n= 34; Gesamt: n = 87) in zwei unabhängigen Messungen mit dem final ausgearbeiteten Protokoll untersucht.

4.4.1.1 *Art der Extraktion*

Döllinger et al. stellt verschiedene Probenvorbereitungen bzw. verschiedene Extraktionen vor. Um zu ermitteln welche Probenbehandlung die höchste Intensität des für Cereulid charakteristischen Peaks bei 1191 m/z bzw. 1175 m/z generiert, wurden alle beschriebenen Protokolle mit den vier ces-positiven Stämmen jeweils in 5 Ansätzen durchgeführt. Als Positivkontrolle der MALDI-ToF-MS Messung wurde bei allen Messungen ein Cereulidstandard (1 µg/mL in Acetonitril, Produkt-ID CX20422, Fa. Chiralix) mitgeführt und wie die Extrakte auf das Target aufgetragen und mit HCCA überschichtet.

Grundlage der Methode zur Bakterientypisierung war die in Abschnitt 3.4.1.2 beschriebene Ameisensäure-Extraktionsmethode. Döllinger et al. stellte vier Variationen dieser Methode vor. Das exakte Protokoll der Ameisensäure-Extraktion führte in den Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe zu keinem Cereulidpeak und wurde dementsprechend bei den folgenden Untersuchungen vernachlässigt. In Variante 1 wurde 1 µL, der durch die nach der Zugabe von 900 µL Ethanol entstehenden 75%-igen Ethanolfraktion, direkt auf das Target aufgetragen und mit HCCA überschichtet. In Variante 2 wurde diese Ethanollösung zunächst getrocknet und dann in 20 µL purem Acetonitril (Lot-Nr.: SHBM9832, Fa. Sigma-Aldrich) gelöst. Davon wurde wieder 1 µL auf das Target aufgetragen und mit HCCA überschichtet. In Variante 3 wird Variante 1 mit 1200 µL Acetonitril statt mit Ethanol und Wasser ausgeführt. Variante 4 beschreibt ebenso das gleiche Vorgehen wie Variante 2 nur mit Acetonitril statt Ethanol aus Lösungsmittel.

Des Weiteren beschrieb Döllinger et al. eine neue Extraktion von Cereulid mit verschiedenen Lösungsmitteln. Aceton, Acetonitril und Ethanol ergaben in dieser Veröffentlichung die höchsten Intensitäten des Cereulidpeaks bei 1190 m/z bzw. 1175 m/z. Aceton kann im MALDI-ToF-MS zur Bildung von großen Matrixkristallen führen, was die Reproduzierbarkeit der Methode einschränkt (Doellinger et al. 2020). Dementsprechend wurde die Extraktion mit Acetonitril und Ethanol aufgegriffen und im Folgenden wiederholt. Zunächst wurden hierfür drei 10 µL Impfösen Kulturmaterial in 500 µL organischen Lösungsmittel (Acetonitril bzw. Ethanol) durch vortexen gelöst. Die Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad behandelt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 x rcf. Der Überstand wurde in einem Vakuumkonzentrierer getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 20 µL Acetonitril gelöst. Für die Messung im MALDI-ToF-MS wurde dann jeweils 1 µL

Extrakt pro Spot auf das Target aufgetragen und mit 1 μ L HCCA überschichtet. Da kein Vakuumkonzentrierer zur Verfügung stand, wurden die Proben bei 80°C getrocknet. Es gab außerdem keine genauen Angaben zur Verwendung des Ultraschallbads. Verwendet wurde dementsprechend das zur Verfügung stehende Sonorex Super (Gerätetyp DK 102, Fa. Bandelin). Bei dem von Döllinger et al. verwendeten MALDI-ToF-MS handelte es sich um ein *Autoflex I* Massenspektrometer (Bruker). Für diese Arbeit stand ein *Microflex* Massenspektrometer (Bruker) zur Verfügung. Es wurden die in Abschnitt 3.4.3.3 beschriebenen MALDI-ToF-MS Einstellungen verwendet.

Abbildung 4-10 zeigt die Durchschnittsspektren der verschiedenen Extraktionen. Variante 3 führte bei allen Extrakten zu keinem messbarem Ergebnis und ist nicht dargestellt. Die neu beschriebene Cereulidextraktion führte zu den höchsten Durchschnittsintensitäten. Die Extraktion mit Acetonitril zeigte die höchste Peakintensität mit 214, 95 a. U. (*SD*: 133.05 %) für den Peak bei 1191 m/z. Die Extraktion mit Ethanol zeigte die höchste Peakintensität für den Peak bei 1175 m/z mit 45, 14 a. U. (*SD*: 29.38 %). Es ließ sich keine Normalverteilung der Intensitäten für jeweils beide Peaks zwischen den Extraktionen feststellen (Anderson-Darlingtest $p < 0.000001$, $\alpha = 0.05$). Die Intensitäten für den Peak bei 1191 m/z zeigten einen statistischen signifikanten Unterschied (Kruskal-Wallistest $p = 0.00667$, $n = 4$ Isolate für jede Extraktion, $\alpha = 0.05$) zwischen den verschiedenen Extraktionen. Dies war für den Peak bei 1175 m/z nicht der Fall (Kruskal-Wallistest: $p = 0.0815$, $n = 4$ Isolate für jede Extraktion, $\alpha = 0.05$). Der Cereulidstandard zeigte in allen Messungen die cereulidcharakteristischen Peaks.

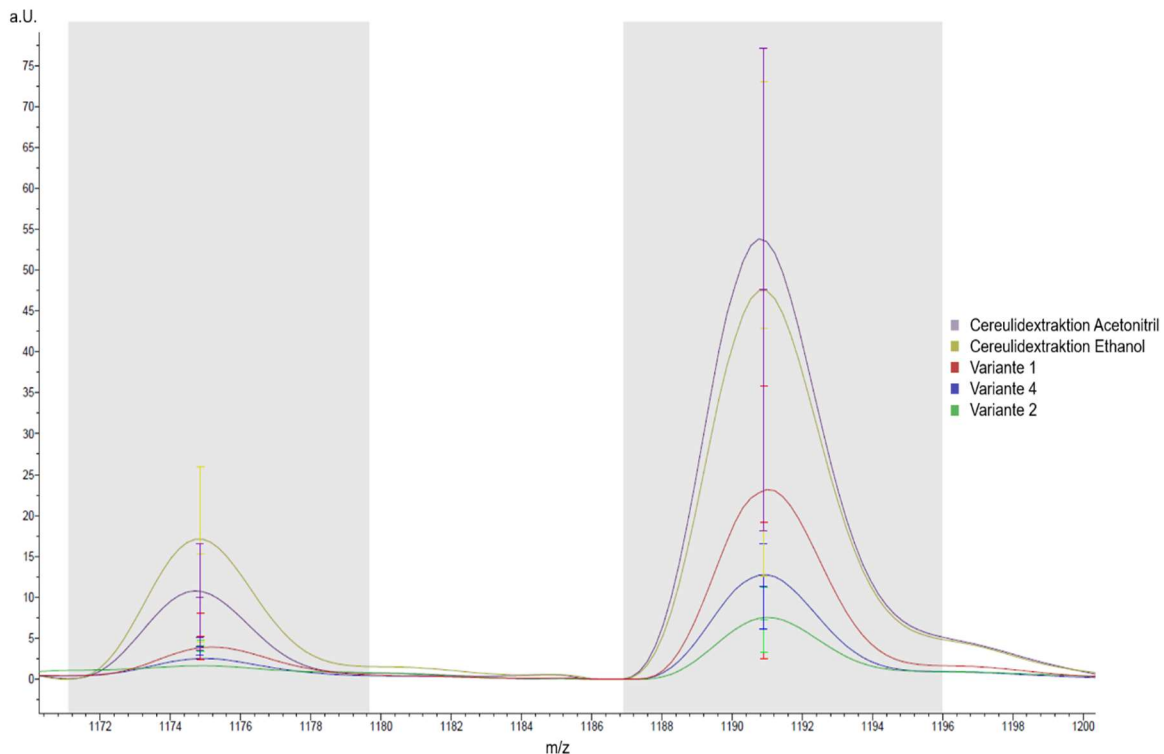


Abbildung 4-10: Verschiedene Extraktionen zum Cereulidtoxinnachweis im MALDI-ToF-MS. Durchführung in an Anlehnung an Döllinger et al. (Doellinger et al. 2020). Cereulidextraktion Acetonitril: Extraktion mit 500 µl Acetonitril (SD: Peak 1: 29.38 %; Peak 2: 133.05 %); Cereulidextraktion Ethanol: Extraktion mit 500 µL Ethanol (SD: Peak 1: 48.3 %; Peak 2: 136.55 %); Variante 1: Ethanolfraktion der Ameisensäure-Extraktion (SD: Peak 1: 12.76 %; Peak 2: 75.13 %); Variante 2: Ethanolfraktion der Ameisensäure-Extraktion getrocknet und anschließend in 20 µL Acetonitril gelöst (SD: Peak 1: 3.01 %; Peak 2: 17.73 %); Variante 4: Extraktion mit Acetonitril statt Ethanol, Extrakte erneut getrocknet und in 20 µL Acetonitril gelöst (SD: Peak 1: 4.9 %; Peak 2: 23.76 %). Spots überschichtet mit HCCA und gemessen mit MALDI ToF-MS Einstellungen beschrieben in Abschnitt 3.4.3.3. Cereulid nachgewiesen mit Natriumaddukt $[M + NA]^+$ bei 1175 m/z (Peak 1) und dem Kaliumaddukt $[M + K]^+$ bei 1191 m/z (Peak 2). Dargestellt sind Durchschnittsspektren mit den jeweiligen Standardabweichungen von vier verschiedenen *Bacillus cereus* Isolaten von denen jeweils pro Extraktion auf fünf verschiedenen Spots Spektren aufgenommen wurden.

Im Vergleich der von Döllinger et al. vorgestellten Extraktionsmethoden kristallisierte sich in diesen Untersuchungen die neue Cereulidextraktion mit Acetonitril als Lösungsmittel als vielversprechendste Methode mit den höchsten Peakintensitäten heraus. Hier waren die Peakintensitäten für den Peak bei 1191 m/z am höchsten. Dieser Peak hat insgesamt die höchste Intensität der beiden für Cereulid

charakteristischen Peaks. So lag bei diesen Untersuchungen die Intensität des Peaks bei 1191 m/z im Schnitt bei 182, 17 a. U. zu 51, 01 a. U. vom Peak bei 1175 m/z. Im Folgenden wurden die einzelnen Schritte des Protokolls verfeinert bzw. für die Routine vereinfacht und an die Gegebenheiten des Labors vor Ort angepasst. Hierbei wurde immer das gesamte Protokoll wie in Abschnitt 4.4.1.1 beschrieben durchgeführt und lediglich die einzelnen Konditionen verändert. Ziel war es hierbei möglichst hohe Peakintensitäten auch bei nur schwach Toxin bildenden Isolaten zu erhalten, um alle Toxinbildner sicher identifizieren zu können. Das Protokoll sollte dabei möglichst einfach und schnell durchführbar sein.

4.4.1.2 Medium

Hägglom et al. stellte fest, dass die Cereulidproduktion in rotierenden Flüssigkulturen deutlich höher war als in statischer Kultur. So bildete ein Stamm $21,98 \pm 2,21 \mu\text{g/mL}$ Cereulid in rotierender Flüssigkultur, während derselbe Stamm lediglich $0,16 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$ Cereulid in statischer Flüssigkultur bildete (Hägglom et al. 2002). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Intensitäten der Cereulidpeaks nach der Kultur in statischer Casein-Soja-Pepton-Bouillon (CASO, Lot.-Nr.: 1880840, Fa. Biomerieux) und rotierender CASO-Bouillon verglichen. Des Weiteren stellte Döllinger et al. fest, dass die gemessenen Peakintensitäten der Cereulidpeaks gemessen im MALDI-ToF-MS von Isolaten kultiviert auf CASO-Agar im Vergleich zu Blut-Agar bzw. Luria-Bertani (LB)-Agar deutlich höher waren (Doellinger et al. 2020). Die Ergebnisse bestätigt auch Apetroaie-Constantin et al. (Apetroaie-Constantin et al. 2008). Hier war die Menge an Cereulid, gemessen mittels einer Flüssigchromatographie-Ionenfallen-Massenspektrometrie (LC-MS) auf CASO- und Blut-Agar, am höchsten. Um das optimale Medium für den Cereulidnachweis zu ermitteln, wurden neben den erwähnten Flüssigkulturen somit auch die Peakintensitäten von Isolaten kultiviert auf Blut- und CASO-Agar (Fa. Oxoid, Art-Nr.: CM0131) verglichen. Extrahiert wurden dabei wieder vier *Bacillus cereus* Isolate (ID: BC 37, BC 41, BC 42, BC 44), die jeweils in Doppelspots aufgetragen wurden. Die Messung wurde einmal wiederholt.

Sowohl die statischen als auch die rotierenden Flüssigkulturen führten zu kaum messbaren Peaks. Die durchschnittliche Peakintensität der statischen Kultur lag bei 37,39 a. U. (*SD*: 99,11 %) für den Peak bei 1191 m/z. Die Peakintensität der rotierenden Kulturen lag mit 30,39 a. U. (*SD*: 54,16 %) noch darunter. Im Vergleich aller Isolate war die Peakintensität für den beschriebenen Peak zwischen CASO-Agar und Blut-Agar nahezu identisch. So war die Peakintensität von Isolaten kultiviert auf

CASO-Agar durchschnittlich 337,19 a. U. (*SD*: 168,26 %). Die Peakintensität von Isolaten kultiviert auf Blut-Agar lag bei 341,92 a. U. (*SD*: 151,98 %). Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallistest: $p = 0.975$, $n = 4$ Isolate für jede Extraktion, $\alpha = 0.05$). Die Peakintensität des nur schwach Toxin bildenden Isolats BC 37 war nach der Kultur auf CASO-Agar etwas höher. Diese lag im Durchschnitt bei 71,62 a. U. (*SD*: 21,5 %) für CASO-Agar und bei 63,44 a. U. (*SD*: 38,36 %) für Blut-Agar. Auch dieser Effekt war statistisch nicht signifikant (One-way ANOVA: $p = 0.769$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

4.4.1.3 Temperatur

Das Ausgangsprotokoll des CVUA Stuttgart bezieht sich auf die Arbeiten von Häggblom et al., der ein Temperaturoptimum für die maximale Cereulidextraktion bei 21°C festgestellt hat (Häggblom et al. 2002). Dieses Ergebnis bestätigt auch Apetraie-Constantin et al. (Apetroaie-Constantin et al. 2008). Hier lag das Temperaturoptimum bei 20-23°C. Da sich diese Ergebnisse gegenseitig bestätigen, wurde von einer Untersuchung der Temperatur abgesehen und die Temperatur von 25°C aus dem Ausgangsprotokoll beibehalten. Dabei war festzustellen, dass die Stämme der Art *Bacillus sporothermodurans* aus der *Bacillus* Stammsammlung bei 25°C nicht wachsen. Auch bei 37°C bildete sich erst nach sieben Tagen genug Koloniematerial, um eine Extraktion durchzuführen.

Nach 15 Tagen Lagerung der Isolate in BHI bei 4°C war die Peakintensität des Isolats BC 37 deutlich geringer. Sie sank von durchschnittlichen 132,57 a. U. (*SD*: 97.33 %) auf 26,61 a. U. (*SD*: 22 %). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.9$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

Um generell den Einfluss der Vorkulturtemperatur auf die Cereulidproduktion zu untersuchen wurden vier *Bacillus cereus* Isolate (ID: BC 37, BC 41, BC 42, BC 44) nach einer 24 stündigen Inkubation bei 25°C und 37°C in BHI untersucht. Verglichen wurden diese Ergebnisse außerdem mit Isolaten, die nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37°C und 48 Stunden bei 4°C gelagert wurden. Die Unterschiede der Peakintensitäten des Peaks bei 1191 m/z waren dabei statistisch nicht signifikant (One-way ANOVA: $p = 0.312$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0,05$). Die durchschnittliche Peakintensität war nach der Lagerung bei 4°C am geringsten (383,62 a.U., *SD*: 155,68). Die Lagerung bei 25°C bzw. 37°C führte zu nahezu identischen Peakintensitäten (481,02 a.U. *SD*: 88,58 % bzw. 475,47 a.U. *SD*: 54,77 %).

4.4.1.4 Zeit

Die Inkubation der Isolate für 48 statt 24 Stunden führte zu einer etwas höheren Intensität des Peaks bei 1191 m/z. Dieser lag nach 24 Stunden bei 310,3 a. U. (SD: 180.37 %) und nach 48 Stunden bei 455,41 a. U. (SD: 58.89 %). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.233$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Die Extraktion des Schwachproduzierers BC 37 führte bei dieser Untersuchung sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden zu keinen messbaren Cereulidpeaks.

4.4.1.5 Menge Koloniematerial

Das von Döllinger et al. vorgestellte Extraktionsprotokoll sah das Lösen von drei Impfösen Koloniematerial in 500 μ L Acetonitril vor. Um zum einen eine gegebenenfalls höhere Cereulidkonzentration zu erhalten und um weniger Koloniematerial zu benötigen, wurde im Folgenden untersucht, ob das Lösen von einer Impföse in 100 μ L Acetonitril zu einer höheren oder vergleichbaren Peakintensität führt. Im Vergleich aller vier untersuchten Isolate konnte dabei kein Unterschied zwischen beiden Bedingungen festgestellt werden. So lag die Intensität des Peaks bei 1191 m/z nach der Extraktion von einer Impföse in 100 μ L Acetonitril bei 337,38 a. U. (SD: 174.94 %) und nach der Extraktion mit drei Impfösen in 500 μ L bei 349,52 a. U. (SD: 198,14 %) (Kruskal-Wallistest: $p = 0.862$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Für den Schwachproduzierer BC 37 ließ sich ein kleiner Unterschied zu Gunsten des Lösens einer Impföse in 100 μ L Acetonitril feststellen (16,83 a.U. zu 13,03 a. U. (SD: 11,86 % und 1,92 %)) (Kruskal-Wallistest: $p = 0.943$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). In den folgenden Untersuchungen wurde mit dem Lösen einer Impföse Koloniematerial in 100 μ L Acetonitril gearbeitet.

4.4.1.6 Ultraschallbad

Döllinger et al. ging nicht weiter auf die genauen Einstellungen und Geräteparameter des verwendeten Ultraschallbads ein. Die folgenden Untersuchungen sollten klären ob das verwendete Ultraschallbad einen Einfluss auf die Intensität der Cereulidpeaks hat. Dabei stellte sich heraus, dass die Peakintensität bei einer Extraktion ohne das Ultraschallbad im Schnitt höher waren (429,71 a.U. (SD: 127.64 %) zu 400,99 a. U. (SD: 169.09 %)). Der Effekt war statistisch allerdings nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.862$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Dieser Effekt war auch für den Schwachproduzierer BC 37 zu beobachten (200,73 a.U. (SD: 50.86 %))

zu 151,9 a.U. (*SD*: 38.07 %). Auch hier war der Effekt statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.686$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

4.4.1.7 Zentrifugation

Zunächst wurde untersucht, welche Fraktion nach der Zentrifugation zu den höchsten Cereulidpeaks führt. Verglichen wurden hierbei die Peakintensitäten des Peaks bei 1191 m/z gemessen nach Auftragung des Pellets, des Überstands und einem Gemisch aus beidem. Untersucht wurden wieder die vier bereits erwähnten Isolate. Die Messung wurde zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt. Hierbei wurden die höchsten Peakintensitäten nach der Messung des Überstands generiert (353,75 a. U. *SD*: 137.99 %). Die niedrigsten Peakintensitäten ergaben sich nach der Messung des Pellets (234,24 a. U. *SD*: 138.32 %). Das Ergebnis des Gemisches lag mit 261,13 a. U. (*SD*: 120.07 %) dazwischen. Der Unterschied zwischen den Peakintensitäten der unterschiedlichen Fraktionen war statistisch signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.000709$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Dieser Unterschied zwischen den Fraktionen war auch beim Schwachproduzierer BC 37 zu beobachten. Die Peakintensität nach Messung des Überstands war mit 181,9 a. U. (*SD*: 89.85 %) im Vergleich zur Peakintensität des Pellets mit 146,44 a. U. (*SD*: 129.64 %) und des Gemisches mit 65,73 a. U. (*SD*: 28.72) deutlich höher. Dieser Unterschied zwischen den Fraktionen war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.205$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

Um zu überprüfen, ob eine Zentrifugation mit höherer Beschleunigung zu höheren Peakintensitäten führt, wurde das Protokoll mit einem Zentrifugationsschritt von 5 Minuten mit 18 000 x rcf statt 4000 x rcf durchgeführt. Dies führte zu keinem signifikanten Unterschied der Peakintensitäten. Die durchschnittliche Peakintensität nach der höheren Beschleunigung war mit 320,38 a. U. zu 337,38 a.U. bei der normalen Beschleunigung sogar etwas niedriger (*SD*: 180.23 % und 174.94 %; Kruskal-Wallistest: $p = 0.938$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Dieser Effekt war auch bei der Betrachtung des Schwachproduzierers BC 37 zu beobachten. Hier ergab sich eine durchschnittliche Peakintensität von 45,89 a. U. (*SD*: 4.78 %) nach der maximalen Beschleunigung und eine durchschnittliche Peakintensität von 89,38 a. U. (*SD*: 37,82 %) nach der normalen Beschleunigung von 4000 x g. Auch dieser Effekt war statistisch nicht signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.357$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

4.4.1.8 Aufkonzentrieren

Döllinger et al. verwendete in seinem Protokoll einen Vakuumkonzentrier (Döllinger et al.). Ein solches Gerät stand für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung. Die Proben wurden stattdessen auf einem Thermoblock (Katalognummer.: 88870005, Fa. ThermoScientific) bei 80°C getrocknet. Um sicherzustellen, dass dieser Schritt das Messergebnis nicht beeinflusst, wurden zunächst zwei Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit den vier beschriebenen Isolaten mit dem Trocknungsschritt bei 80°C und einer Trocknung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Trocknung bei 80°C dauerte dabei 15 Minuten. Bei Raumtemperatur war der Überstand erst nach 24 ± 2 Stunden getrocknet. Es konnten keine Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Peakintensitäten des Peaks bei 1191 m/z durch die unterschiedlichen Trocknungstemperaturen beobachtet werden. Die Peakintensität lag nach der Trocknung bei 80°C im Schnitt bei 164,56 a. U. (SD: 87.79 %) und bei Raumtemperatur bei 169,53 a. U. (SD: 116.01 %) (One-way ANOVA: $p = 0.743$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Auch bei der Extraktion des Schwachproduzierers BC 37 ließ sich nahezu kein Unterschied ausmachen. Die durchschnittliche Peakintensität lag nach der Trocknung bei 80°C bei 46,61 a. U. (SD: 38.87 %) und bei 34,56 a. U. (SD: 18.1 %) nach der Trocknung bei Raumtemperatur (Kruskal-Wallistest: $p = 0.667$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

Da das Aufkonzentrieren aufwendiger ist, wurde in der Absicht das Protokoll für die Routine zu vereinfachen, untersucht, ob dieser Schritt notwendig ist. In diesem Fall wurde 1 µL des Überstand nach der Zentrifugation direkt auf das Target aufgetragen, nach dem Trocknen mit 1 µL HCCA überschichtet und gemessen. Die durchschnittliche Peakintensität war dabei nicht signifikant unterschiedlich zwischen Extraktionen mit und ohne Aufkonzentrationsschritt. Die Peakintensität lag im Schnitt bei allen Isolaten bei 299,94 a. U. (SD: 127.04 %) für die Messung ohne Aufkonzentration und bei 336,64 a. U. (SD: 174.47 %) für die Messung mit Aufkonzentration (One-way ANOVA: $p = 0.743$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Für den Schwachproduzierer BC 37 war die Peakintensität ohne Aufkonzentrationsschritt mit 127,63 a. U. (SD: 18.54 %) zu 89,38 a.U. (SD: 37.82 %) für die Messung mit Aufkonzentration etwas höher, wenn auch nicht statistisch signifikant (Kruskal-Wallistest: $p = 0.667$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

4.4.1.9 Minimalprotokoll

In der folgenden Untersuchung wurde das Protokoll auf das Suspendieren von Koloniematerial in Acetonitril reduziert. Es wurde eine Impföse Koloniematerial in 100 μL Acetonitril suspendiert und anschließend gevortext. Ohne einen weiteren Schritt wurde 1 μL des Gemischs dann auf das Target aufgetragen und nach dem Trocknen mit 1 μL HCCA überschichtet und im MALDI-ToF-MS gemessen. Parallel dazu wurden die vier bereits beschriebenen Isolate mit dem normalen Protokoll aufgearbeitet. Diese Messung wurde zweimal zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt. Die Extrakte wurden jeweils in Doppelspots auf das Target aufgetragen. Es zeigte sich dabei, dass die Aufarbeitung mit dem in Abschnitt 4.4.1.1 beschriebenen Protokoll im Vergleich zu dem hier beschriebenen Minimalprotokoll zu im Schnitt signifikant höheren Peakintensitäten führte. So lag die durchschnittliche Peakintensität des Peaks bei 1191 m/z mit dem vollständigen Protokoll bei 349,53 a. U. (SD : 138.91 %), während sie bei dem Minimalprotokoll bei 232,04 a. U. (SD : 106.33 %) lag (One-way ANOVA: $p < 0.0001$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$). Dieser Effekt war nur bei der Betrachtung des Durchschnitts aller Isolate zu beobachten. Der Unterschied der Peakintensitäten des Schwachproduzierers BC 37 allein war nicht signifikant. Hier lag die durchschnittliche Peakintensität für das vollständige Protokoll bei 88,43 a. U. (SD : 61.02 %) und beim Minimalprotokoll bei 89,17 a. U. (SD : 73.69 %) (Kruskal-Wallistest: $p = 0.956$, $n = 4$ Isolate für jede Bedingung, $\alpha = 0.05$).

4.4.1.10 LDI-ToF-MS Messung

Sowohl Ducrest et al. als auch Döllinger et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass eine Messung vom Cereulidtoxin auch ohne Matrix möglich ist (LDI-ToF-MS). Ducrest et al. zeigte dabei eine 1000-fach geringere Nachweisgrenze für das Toxin im LDI-ToF-MS (30 ng/mL zu 30 pg/mL). Döllinger et al. zeigte eine 5-25-fach geringere Nachweisgrenze mit der LDI-ToF-MS Messung (0,25 ng zu 0,05 bis 0,01 ng) (Ducrest et al. 2019; Doellinger et al. 2020). Da eine so deutlich geringere Nachweisgrenze vor allem für die nur schwach Toxin bildenden *Bacillus cereus* Isolate interessant wäre, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um das Toxin auch ohne Matrix messen zu können. Wie in *Abbildung 4-11* beschrieben wurden hierfür zunächst je 1 μL eines 1 $\mu\text{g/mL}$ Cereulidstandards und eines 10 $\mu\text{g/mL}$ Cereulid Standards auf jeweils sechs Spots des Targets ohne und zum Vergleich auch mit Matrix aufgetragen. Bei der Auftragung mit Matrix konnten für Cereulid charakteristische Spektren generiert werden. Die höhere Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ des Cereulid Standards

führte zu einer höheren Intensität der für Cereulid charakteristischen Peaks bei 1191 m/z und 1175 m/z (s. *Abbildung 4-12*).

Die LDI-ToF-MS Messung führte auf allen Spots zu Nulllinien. Auch mit manuellen, großflächigen Abtasten der Spots konnte kein Spektrum aufgenommen werden. Nach Rücksprache mit dem MALDI-ToF-MS Hersteller Bruker wurden verschiedene Untersuchungen ausgearbeitet, um eine LDI-ToF-MS Messung des Cereulid Standards dennoch zu ermöglichen. Vorgegangen wurde dabei wie in *Abbildung 4-11* beschrieben. Zunächst wurden 12 Spots mit einem weichen Bleistift (Stärke 6HB, Fa. Moleskine) behandelt und jeweils auf die Hälfte Cereulid Standard 1 µg/mL und auf die andere Hälfte Cereulid Standard 10 µg/mL aufgetragen. Um sicher zu stellen, dass die Messung nicht durch mögliche Verunreinigungen des Targets inhibiert wurden, wurden außerdem verschiedene Waschschriffe durchgeführt.

	Cereulid Standard 1 µg/mL						Cereulid Standard 10 µg/mL					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mit Matrix												
Ohne Matrix												
Ohne Matrix + Bleistift												
Ohne Matrix + Waschschritt TFA												
Ohne Matrix + Waschschritt Kal												
Ohne Matrix + Waschschritt dH ₂ O												
Ohne Matrix + Waschschritt ddH ₂ O												

Abbildung 4-11: Verschiedene Untersuchungen zur LDI-ToF-MS Messung vom Cereulid Standard (1 µg/mL und 10 µg/mL). TFA: Trifluoressigsäure, Kal: Kaliumiodid, dH₂O: einfach destilliertes Wasser, ddH₂O: doppelt destilliertes Wasser und nach vorheriger Behandlung mit Bleistift.

Hierbei wurde jeweils 1 µL der beschriebenen Flüssigkeit mit einer Pipette aufgenommen, auf den Spot aufgetragen und direkt wieder mit der Pipette entfernt. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt. Zum Einsatz kamen Trifluoressigsäure (TFA), Kaliumiodid (Kal), als möglicher Kalium-Ionen-Geber, und einfach (dH₂O) sowie doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O). Mit keinem der beschriebenen Schritte konnte

ein Spektrum des Cereulids gemessen werden. Ein weiterer Ansatz war die Verwendung von Einmaltargets (MALDI Biotarget 48, Bruker). Hier wurde 1 $\mu\text{g/mL}$ Cereulidstandard jeweils in Doppelspots mit Matrix, ohne Matrix und ohne Matrix mit vorheriger Behandlung des Spots mit einem Bleistift aufgetragen. Zusätzlich wurde der Spot manuell mit dem Laser abgetastet, so dass Positionen, auf denen Cereulidpeaks aufgenommen werden konnten, mehrfach gemessen wurden und Positionen, auf denen lediglich Nulllinien generiert wurden, nicht weiter gemessen wurden.

Abbildung 4-12 zeigt, dass in diesem Fall auf den Spots, die zuvor mit einem Bleistift behandelt wurden, die Aufnahme von Cereulidpeaks ohne Matrix möglich war.

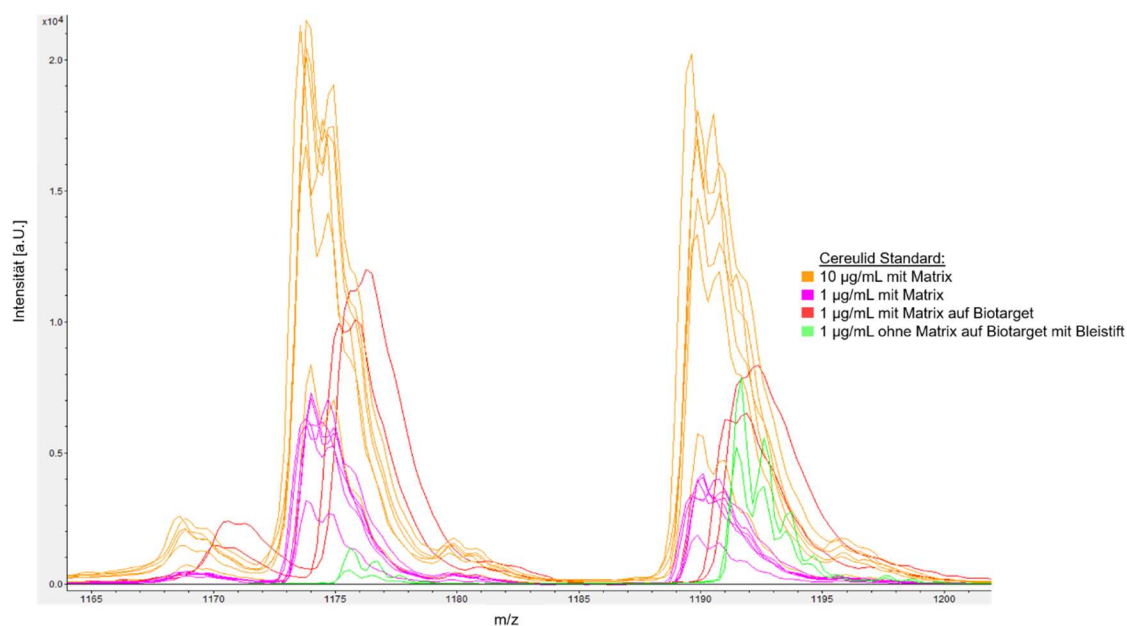


Abbildung 4-12: Mit MALDI-/LDI-ToF-MS aufgenommene Spektren des Cereulid Standards in unterschiedlichen Konzentrationen (1 $\mu\text{g/mL}$ und 10 $\mu\text{g/mL}$). Zusätzliche Messungen auf Einmaltarget (MALDI Biotarget 48, Bruker) und nach vorheriger Behandlung mit Bleistift.

Die Abbildung 4-12 zeigt außerdem, dass die ohne Matrix gemessenen Intensitäten für den Peak bei 1175 m/z höher und für den Peak bei 1191 m/z nahezu gleich im Vergleich zur Messung mit Matrix waren. Zu erkennen ist außerdem, dass die Intensitäten der auf dem Einmaltarget aufgenommenen Spektren etwas höher und im Vergleich zum Stahltarget um ca. einen Dalton verschoben waren.

4.4.1.11 MALDI-ToF-MS Einstellungen

Da es sich bei dem vom Döllinger et al. verwendeten Massenspektrometer um ein anderes Modell als das für diese Arbeit zur Verfügung stehende Microflex LT MALDI

ToF-MS handelte, wurden die Einstellungen für die Cereulidmessung zunächst, wie in Abschnitt 3.4.3.3 beschrieben, beibehalten und nicht an das Protokoll von Döllinger et al. angepasst. Diese Standardeinstellung vom CVUA Freiburg war auf den Evaluationsmassebereich von 700 bis 800 m/z eingestellt. Konnten hier keine Peaks gemessen werden, wurden gemessene Spektren nicht aufaddiert und kein Summenspektrum aufgenommen. Dieser Bereich ergab sich aus vorangegangenen Beobachtungen bei der Messung von *Bacillus cereus* Isolaten mit dem erweiterten Direkttransfer.

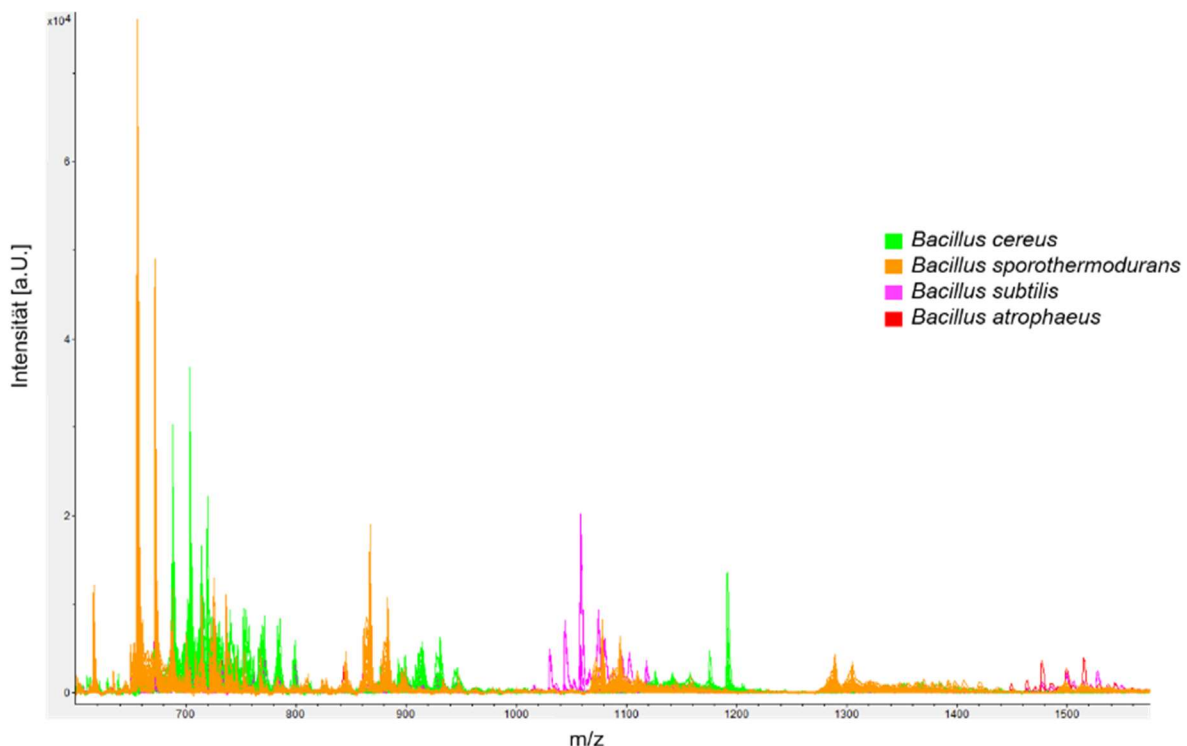


Abbildung 4-13: Spektren der *Bacillus* spp. Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Gemessen mittels MALDI-ToF-MS nach Auftragung mit erweitertem Direkttransfer.

Wie Abbildung 4-13 zu erkennen, liegen in diesem Massebereich bei *Bacillus cereus* Isolate Peaks mit deutlich messbarer Intensität. Spektren von *Bacillus sporothermodurans* Isolaten, *Bacillus subtilis* Isolaten und des *Bacillus atrophaeus* Isolats (ID: BC 35) weisen jedoch Peaks mit höherer Intensität vor 700 m/z auf. Nach der Cereulidextraktion wurden außerdem vielfach bei augenscheinlich deutlich messbaren Cereulidpeaks sowie bei Nicht-*Bacillus cereus* Isolaten keine Spektren aufgenommen (s. Abbildung 4-14).

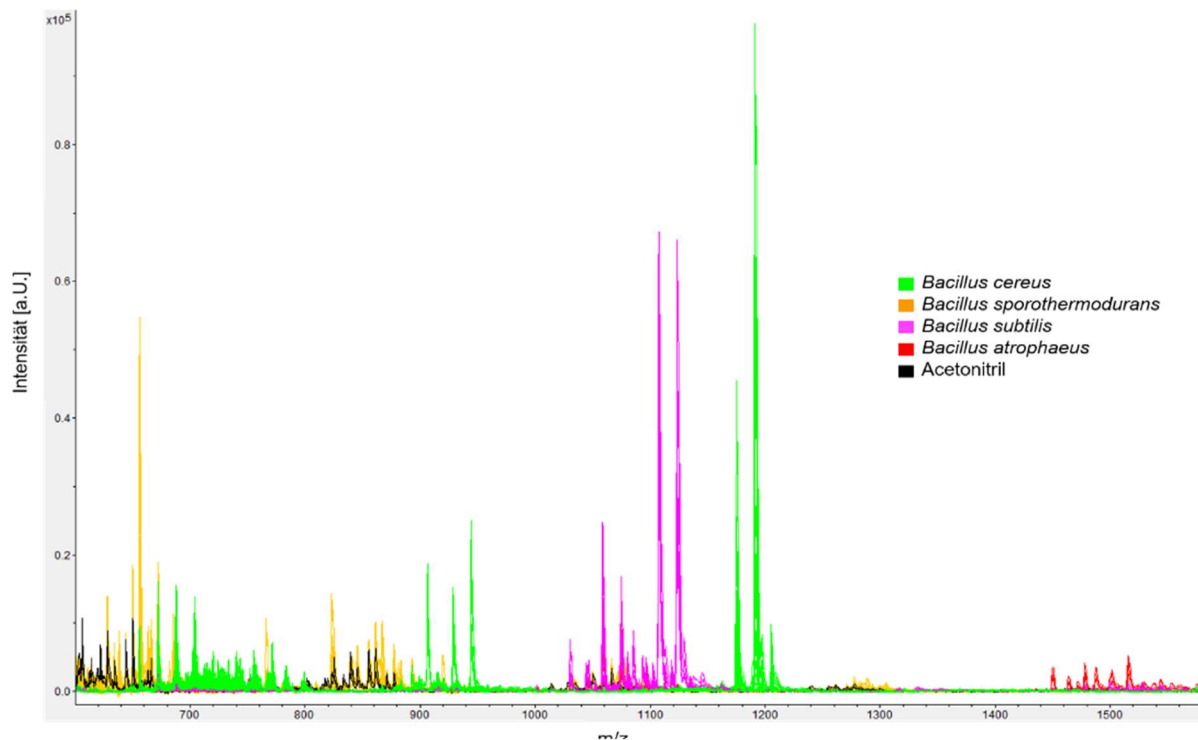


Abbildung 4-14: Spektren der *Bacillus* spp. Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Gemessen mittels MALDI ToF-MS nach einer Cereulidextraktion.

Der Evaluationsbereich wurde dementsprechend auf 0–2000 m/z angepasst. Mit diesem Bereich konnten bei allen Isolaten auch nach der Extraktion Spektren aufgenommen werden. Zu beachten ist hierbei, dass auch das Lösemittel der Extraktion, Acetonitril, in diesem Fall zu einem Spektrum führt. Es wird also in jedem Fall ein Spektrum erfasst.

Mit Unterstützung des MALDI-ToF Software Supports von dem Hersteller des verwendeten MALDI-ToF-MS Geräts (Bruker) wurde außerdem die Detektorverstärkung von dem 2,85-fachen auf eine Verstärkung von 10,3 und einer Spannung von 2854 V angehoben. Die Linse wurde von 3 kV auf 0 kV umgestellt. Die initiale Laserenergie wurde auf 15 % heruntersetzt. Für die Evaluation der Peaks wurde der Zentroid- statt des SNAP-Algorithmus eingesetzt. Es konnte beobachtet werden, dass Cereulid sehr konzentriert auf einer Stelle des Spots trocknet. Um einen größeren Bereich des Targetsports zu untersuchen, wurde dementsprechend die Laserbewegung von einem festen hexagonalen Muster auf einen Zufallslauf mit 10 Laserschüssen pro untersuchter Stelle umgestellt. Mit den neuen Einstellungen allein konnte bereits eine höhere Intensität der Cereulidpeaks erreicht werden.

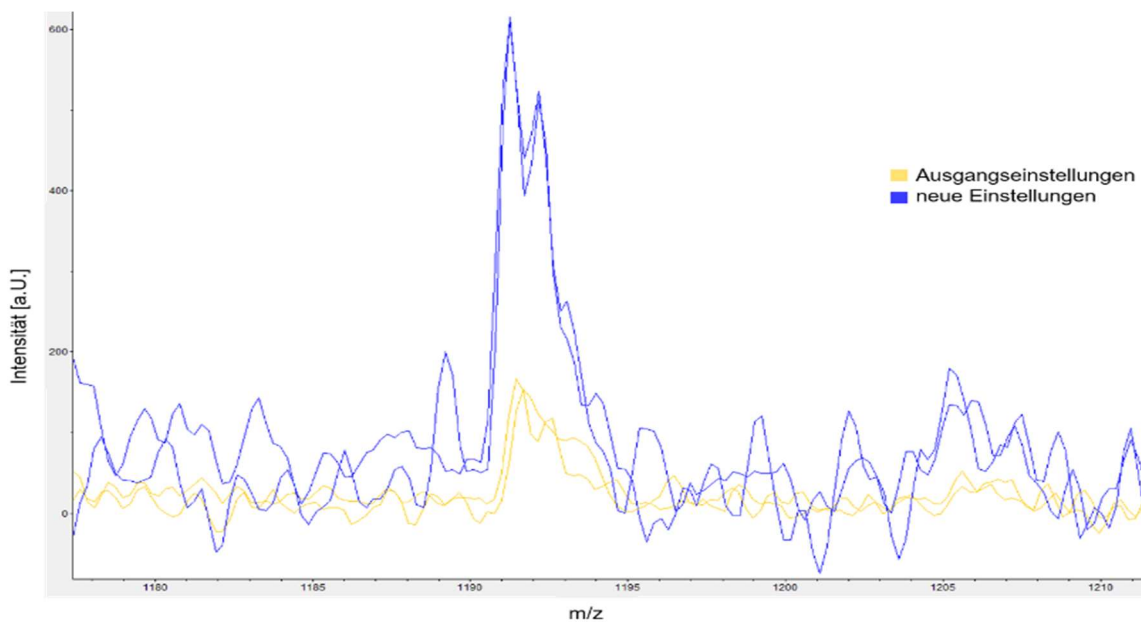


Abbildung 4-15: Schwach Cereulid bildendes *Bacillus cereus* Isolat (BC 37) gemessen mit unveränderten Ausgangseinstellungen und neu erarbeiteten MALDI-ToF-MS Einstellungen. Gemessen mit erweiterter Direkttransfer (direktes Auftragen des Koloniematerials, Überschichten mit 1 μL 70%iger Ameisensäure, Überschichten mit HCCA).

Das in *Abbildung 4-15* dargestellte Spektrum des schwach Toxin bildenden *Bacillus cereus* Isolats BC 37 zeigt nach der Messung mit den neuen Einstellungen einen um 400 a. U. höheren Peak bei 1191 m/z. Diese Spektren wurde alle mit dem in Abschnitt 3.4.3.2 beschriebenen erweiterter Direkttransfer aufgenommen. Um sicherzustellen, dass die Mehrfachmessung eines Spots keinen Einfluss auf die Peakintensitäten hat, wurde die Mehrfachmessung außerdem mit einer Cereulidstandard (Konzentration: 1 $\mu\text{g/mL}$) getestet. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede der Cereulidpeaks zwischen den Messungen. Durch die Mehrfachmessung entstand jedoch ein Peak bei 920 m/z, dessen Intensität mit der Anzahl der wiederholten Messungen zunahm (s. *Anhang Abbildung D- 3*).

Bei der Messung des Cereulidstandards ergab sich außerdem eine um 50 bis 100-fach geringere Nachweisgrenze des Toxins. So konnte ab einer Konzentration kleiner als 0,1 $\mu\text{g/mL}$ mit den Ausgangseinstellungen kein Cereulidpeak mehr ermittelt werden. Mit den neuen Einstellungen war nicht nur die Intensität der Peaks mehr als fünfmal so hoch, es wurden auch noch Konzentrationen von 0,005 bis 0,001 $\mu\text{g/mL}$ Cereulid nachgewiesen (s. *Abbildung 4-16*).

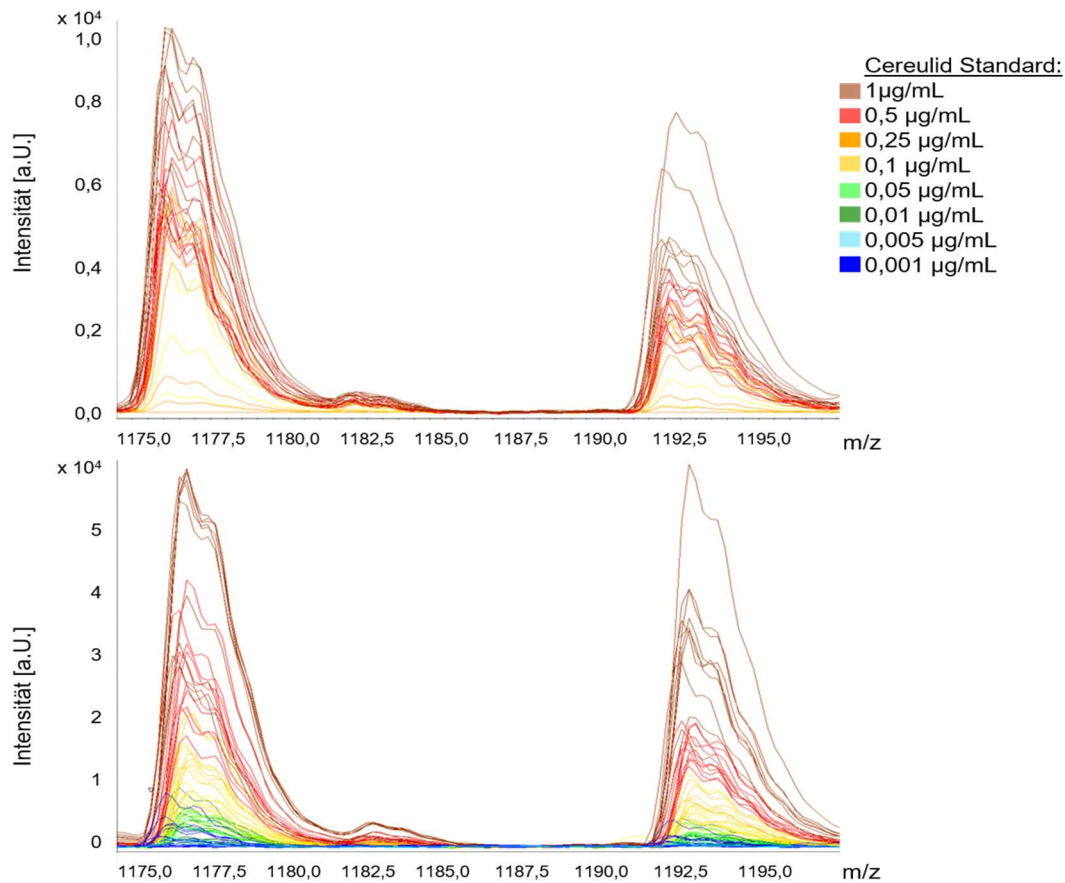


Abbildung 4-16: Ermittlung der Cereulidnachweisgrenze des MALDI-ToF-MS Geräts. Bild oben: Messung mit Ausgangseinstellungen. Bild unten: Messung mit neu erarbeiteten Einstellungen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse (Bild oben: 0–1 x 10⁴; Bild unten: 0–6 x 10⁴).

Mit dieser Messung ließ sich außerdem ein Zusammenhang zwischen Cereulidkonzentration und Peakintensität feststellen (s. Anhang Abbildung D- 1).

4.4.1.12 Software

Zur Untersuchung der aufgenommenen Spektren wurden zunächst verschiedene Software getestet. Als Open Source Software kamen dabei Openchrom und MicrobeMS zum Einsatz (Wenig und Odermatt 2010; Lasch et al. 2015). Dem CVUA Freiburg steht außerdem ClinProTools 3.0 sowie die FLEX Series Software von Bruker zur Verfügung. Da diese Software bei allen CVUAs in Baden-Württemberg zum Einsatz kommt und zudem nach einem kurzen Test am benutzerfreundlichsten schienen, wurde mit diesen Programmen weitergearbeitet.

Zur manuellen, optischen Beurteilung der aufgenommenen Spektren kam die Software FlexAnalysis (Bruker, Version 3.4 (Build 79)) zum Einsatz. Mit Hilfe vom Software Support des Herstellers (Bruker) wurde eine Methode entwickelt, die für den

untersuchten Peptidbereich von 1170 bis 1200 m/z angepasst ist. Für die Glättung kam hierfür der Savitzky Golay Algorithmus zum Einsatz mit einer Weite von 0,15 m/z und einem Zyklus. Die Glättung wurde dabei sehr schwach gewählt, um die Auflösung der gesuchten Peaks nicht zu verschlechtern und die Peakmitte möglichst nicht zu verschieben.

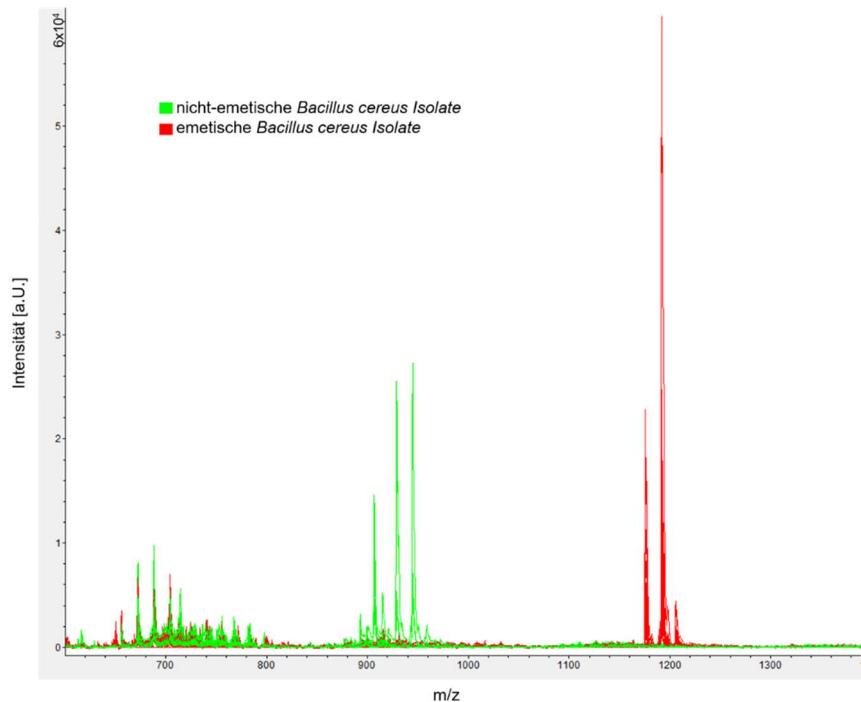


Abbildung 4-17: Nicht-emetische (grün) und emetische (rot) *Bacillus cereus* Isolate gemessen im MALDI ToF-MS nach einer Cereulidextraktion. Darstellung in FlexAnalysis (Bruker, Version 3.4 (Build 79)).

Mit Hilfe dieser Methode war es möglich die charakteristischen Peaks bei 1175 ± 2 m/z und 1191 ± 2 m/z manuell zu identifizieren. Auf diese Weise konnten emetische und nicht-emetische *Bacillus cereus* Isolate voneinander differenziert werden (s. Abbildung 4-17). Es fällt hierbei außerdem ein Peak bei 1205 m/z auf, der nur bei emetischen Stämmen nicht aber bei Cereulidstandard auftritt.

Zur weiteren Vereinfachung der Identifizierung von Cereulid bildenden *Bacillus cereus* Isolaten in der Routine wurde ClinProTools 3.0 (Bruker, Build 22) eingesetzt. Mit Hilfe dieser Software ist eine automatische Klassifizierung der Isolate möglich. In Anlehnung an Ulrich et al. wurde hierfür ein Modell mit Hilfe des Genetic Algorithmus der Software generiert (Ulrich et al. 2019). Die folgenden Einstellungen wurden hierfür verwendet: Maximalanzahl der Peaks: 2, Maximalanzahl der Generationen: 40, Mutationsrate: 0,2,

Crossoverrate: 0,5. Zur Modellerstellung wurde der Peak bei 1191 ± 2 m/z und der Peak bei 1171 ± 2 m/z verwendet. Das Modell wurde mit den Isolaten der Stammsammlung des CVUA Freiburgs erstellt. Es handelte sich hierbei 46 *Bacillus* spp., wovon 11 Isolate zur Cereulidbildung fähig waren. Diese 46 Isolate wurden in zwei voneinander unabhängigen Aufarbeitungen zunächst nach der in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Methode extrahiert und jeweils in Doppelspots im MALDI-ToF-MS gemessen. Die externe Validierung des Modells wurde mit den *Bacillus cereus* Isolaten aus den Insektenproben ($n_{\text{gesamt}} = 34$, $n_{\text{emetisch}} = 4$) sowie den Isolaten des CVUA Stuttgarts ($n_{\text{gesamt/emetisch}}=7$) ausgeführt, die wieder nach der beschriebenen Methode in zwei Aufarbeitungen jeweils in Doppelspots gemessen wurden. Es konnten dabei alle Isolate richtig zugeordnet werden. Die Receiver Operating Charakteristik (ROC) von Peak 1191 m/z lag bei 1 AUC (Area Under Curve) und von Peak 1175 m/z bei 0,99 AUC.

4.4.2 Zusammenfassung

Die beschriebenen Untersuchungen führten zu folgendem Protokoll für die Differenzierung von *Bacillus cereus* Isolaten in Cereulid bildende und nicht-Cereulid bildende Stämme:

Präsumtive *Bacillus cereus* Isolate wurden bei 25°C für 48 Stunden auf CASO-Agar kultiviert. Anschließend wurde eine 10 µL Impföse Koloniematerial in 100 µL Acetonitril gelöst, gevortext und bei 4000 x rcf für 5 Minuten zentrifugiert. 1 µL des Überstands wurde dann auf das Target aufgetragen und nach dem Trocknen mit 1 µL HCCA-Matrix überschichtet.

Die Extrakte werden mit den in Abschnitt 4.4.1.11 beschriebenen neuen MALDI-ToF-MS Einstellungen gemessen, bei denen vornehmlich die Laserenergie auf 15 % herabgesetzt wurde, während die Detektorverstärkung auf das 10,3- Fache angehoben wurden. Außerdem wurde die Bewegung des Lasers über den Targetspot mit einem Zufallslauf und damit mehr abgefahrenen Schritten pro Spot an das Trocknungsverhalten von Cereulid angepasst.

Die so aufgenommenen Spektren konnten anschließend mit der neu angepassten FlexAnalysismethode manuell ausgewertet werden. Hierbei wurde vor allem die Glättung der Peaks reduziert, um die Auflösung der Peaks hochzuhalten und eine Differenzierung der Peaks leichter zu machen.

Eine automatische Klassifizierung der Isolate wurde über die Erstellung eines neuen ClinProTool-Modells gewährleistet. Mit dem erstellten Modell konnten alle extrahierten

Isolate eindeutig einer Klasse zugeordnet werden. Die Ergebnisse stimmten dabei mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% mit den Ergebnissen der *ces* Real-time PCR überein. *Abbildung 4-18* zeigt, dass mit der neu erarbeiteten Methode eine Klassifizierung des nur schwach Cereulid bildenden Stamms BC 37 als Cereulidbildner möglich war. Der Gelview zeigt, dass mit der Extraktion die Intensität des Cereulidpeaks erhöht und Rauschen (Peaks generiert durch Zellbestandteile etc.) verringert werden konnte. Auch die *Bacillus cereus* Isolate der Speiseinsektenprodukte, die in der *ces* Real-time PCR positiv waren, zeigten hier das Vorhandensein des Toxins. Lediglich ein Isolat des CVUA Stuttgarts wies zwar das *ces* Gen auf, es konnte aber weder in der HPLC-Untersuchung des CVUAs in Stuttgart noch in der MALDI-ToF-MS Messung Cereulidtoxin nachgewiesen werden. Hier stimmten die MALDI-ToF-MS Ergebnisse jedoch zu 100% mit den HPLC Ergebnissen überein.

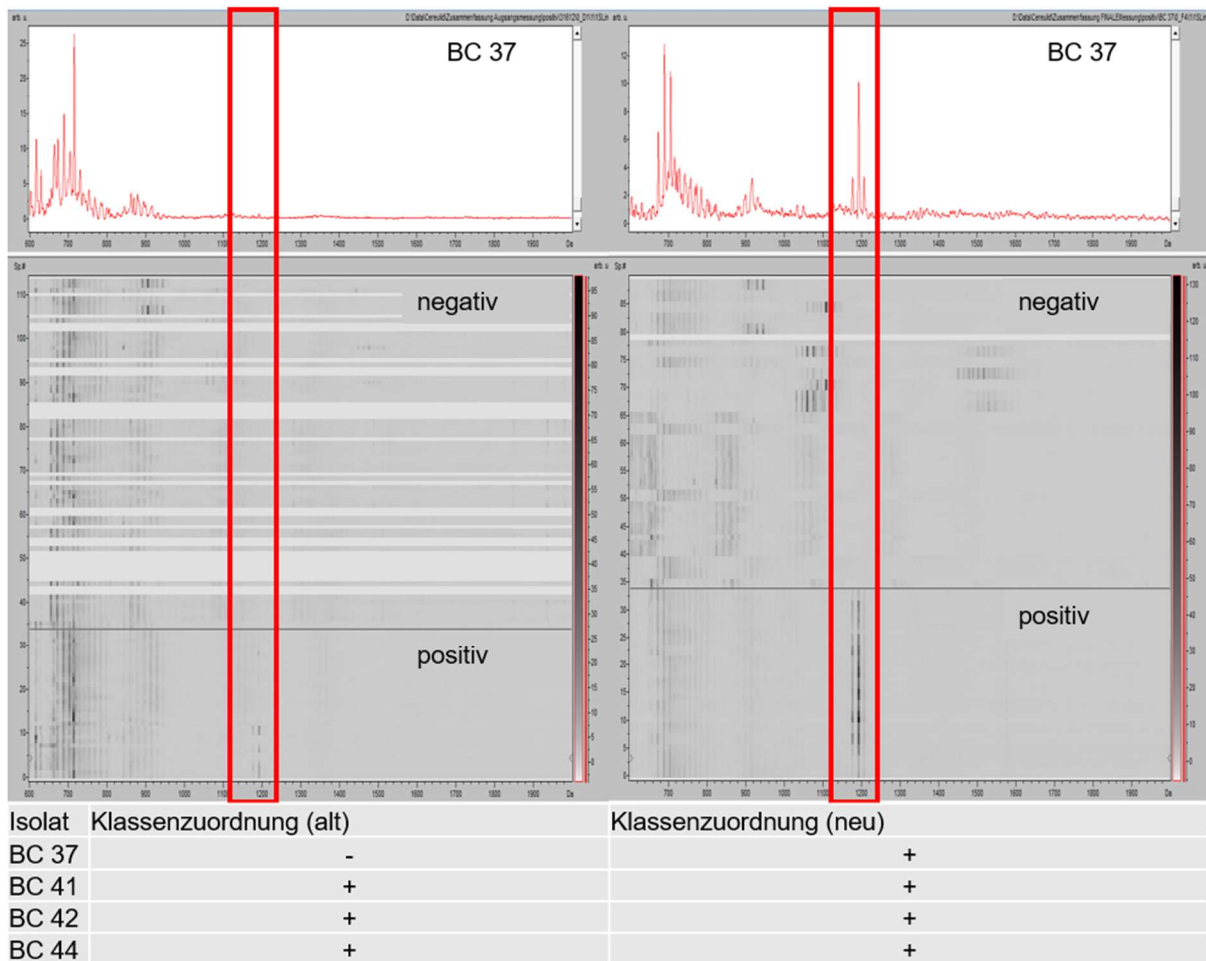


Abbildung 4-18: Vergleich ursprünglicher Methode (links) mit neu erarbeiteter Methode (rechts). Bilder oben: Spektren schwach Cereulid bildender Bacillus cereus Stamm BC 37. Bild Mitte: Gelview der gemessenen Spektren in ClinProTools 3.0. Tabelle unten: Zuordnung der Klassen (+ = Cereulid bildend, - = nicht Cereulid bildend; alle Stämme in ces Real-time PCR als Cereulidbildner [+] identifiziert). Ursprüngliche Methode: Ausgangsprotokoll s. Abschnitt 3.4.3, FlexAnalysis Einstellungen s. Abschnitt 3.5.3, ursprüngliche ClinProtTools Einstellungen s. (Ulrich et al. 2019). Neu erarbeitete Methode: s. Abschnitt 5.4.3.

5 DISKUSSION

5.1 TEIL I: MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

5.1.1 Mittels MALDI-TOF-MS identifizierte Mikroorganismen

Insgesamt konnten 71,7 % aller gemessenen Isolate mittels des MALDI-ToF-MS identifiziert werden. Die Erkennung von Spezies isoliert aus Speiseinsekten ist mit dem MALDI-ToF-MS somit grundsätzlich gut möglich. Die in der Durchführungsverordnung zum Inverkehrbringen von *Tenebrio molitor* genannten kritischen Mikroorganismen waren auf den Speiseinsektenprodukten nicht nachweisbar oder konnten durch die MALDI-ToF-MS im ausreichenden Maß identifiziert werden (Europäische Kommission 01.06.2021). Dabei nicht nachweisbar waren *Escherchia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* sowie *Styphylococcus aureus* (koagulasepositive Staphylokokken). Diese Befunde decken sich mit Untersuchungen von Grabowski und Klein (Grabowski und Klein 2017). Identifizierbar waren *Bacillus cereus* (präsumtiv) sowie *Enterobacteriaceae*.

Insgesamt decken sich die isolierten Spezies mit den Untersuchungen aus bereits bestehender Literatur (Garofalo et al. 2019; Grabowski und Klein 2017; EFSA Scientific Committee 2015; Fasolato et al. 2018). Mit 68 % waren über die Hälfte der identifizierten Isolate Sporenbildner. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Speiseinsektenprodukte bei ihrer Verarbeitung wahrscheinlich stark erhitzt werden. Diesen Prozess überstehen vor allem die Sporen der Sporenbildner. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Untersuchungen (Grabowski und Klein 2017; Garofalo et al. 2019). Auch hier wurden vornehmlich Sporenbildner in den untersuchten Speiseinsektenprodukten nachgewiesen. *Bacillus cereus* war auch hier ein vorherrschender Keim. Eine genauere Spezieszuordnung innerhalb der *Bacillus cereus* Gruppe ist mit dem MALDI-ToF-MS nicht möglich. Fasolato et al. wies vor allem *Bacillus cereus s.s.*, sowie *Bacillus thuringiensis* und *Bacillus cytotoxicus* auf Speiseinsekten nach (Fasolato et al. 2018). Die Bestätigung dieser Befunde ist erst möglich, wenn eine Methode zur Speziesdifferenzierung für *Bacillus cereus* etabliert ist. Grabowski und Klein wiesen außerdem *Pseudomonas sp.* sowie *Listeria ivanovii* in den Speiseinsektenprodukten nach. *Pseudomonas sp.* konnte auch in einer Untersuchung von *Comadia redtenbacheri* Larven nachgewiesen werden (Hernández-Flores et al. 2015). Gehäuft nachgewiesen wurde außerdem *Staphylococcus aureus* (Garofalo et al. 2019). Diese Spezies konnten in den hier durchgeführten

Untersuchungen nicht isoliert werden. Die Untersuchungen von Grabowski und Klein ebenso wie von Garofalo et al. umfassten allerdings eine Vielzahl sehr unterschiedlich verarbeiteter Produkte, während sich Hernández-Flores auf die Untersuchung von *Comadia redtenbacheri* Larven beschränkte, die hier nicht untersucht wurden, da sie in der EU als Speiseinsekten bisher keine Rolle spielen. Gegebenenfalls führen weitere Untersuchungen von einem noch breiteren Spektrum von Speiseinsektenprodukten zu einer genaueren Übersicht an möglicherweise auftretenden Mikroorganismen. Bei solchen Untersuchungen isolierte Spezies könnten außerdem zur Erweiterung der Datenbank der MALDI-ToF-MS beitragen. Von Bedeutung wäre dabei die Untersuchung des natürlichen, gegebenenfalls speziesspezifischen Mikrobioms von Insekten, um etwa speziesspezifische Verarbeitungsempfehlungen geben zu können und das Vorkommen von pathogenen Keimen zu untersuchen (Garofalo et al. 2019).

Die untersuchten Parameter (Gesamtwassergehalt, Rohproteinanteil, Fettanteil, Salzgehalt) geben darüberhinaus nicht genug Aufschluss über mögliche Ursachen einer bestimmten Bakterienzusammensetzung auf den Produkten. Die verwendeten Methoden sind allerdings noch nicht für Speiseinsekten validiert und müssen noch weiter an die Probenbeschaffenheit von Speiseinsekten angepasst werden. Hinzukommt, dass es sich um nur 20 Produkte mit wenig Variation in der Verarbeitung (entweder als Mehl oder gefriergetrocknet) handelt. Um eine gesicherte Aussage zum Zusammenhang des Speiseinsektenprodukts zu seiner mikrobiologischen Besiedlung machen zu können, ist eine weitreichende Untersuchung von mehr und mehr variierenden Speiseinsektenprodukten notwendig.

5.1.2 Mittels MALDI-TOF-MS nicht identifizierte Mikroorganismen

Die Schwierigkeit die Subspezies *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* und *amyloliquefaciens* mit Hilfe des MALDI-ToF-MS zu unterscheiden, lässt sich dadurch erklären, dass sich beide Spezies sehr ähnlich sind und beide zur Gruppe *Bacillus subtilis* gezählt werden. Diese Gruppe kann mittels des MALDI-ToF-MS generell nur schwer unterschieden werden (Fernández-No et al. 2013). Für eine bessere Unterscheidung ist das Einpflegen weiterer Datenbankeinträge von dieser Gruppe in die Datenbank des MALDI-ToF-MS notwendig. Eine Unterscheidung der Subspezies ist außerdem über eine Modellerstellung in ClinProTools möglich (Huang et al. 2016). Die Ähnlichkeit von *Bacillus pumilus* zu *Bacillus safensis* erklärt die unsichere Spezieszuordnung durch das MALDI-ToF-MS. Hier ist für eine genaue

Spezieszuordnung eine weitere Analyse der Peaks nötig (Branquinho et al. 2014). *Enterococcus sp.* sollte für eine Spezieszuordnung in ausreichendem Maße in der Datenbank hinterlegt sein und die Speziesdifferenzierung von *Enterococcus sp.* sollte mit MALDI-ToF-MS möglich sein (Stępień-Pyśniak et al. 2017). Da vor allem die Differenzierung der Spezies *Enterococcus hirae* und *Enterococcus faecium* nicht eindeutig möglich war, ist das Ergänzen der Datenbank um Spektren dieser Spezies für eine bessere Zuordnung empfehlenswert. Unter Umständen haben auch die Speiseinsekten als ungewöhnliche Matrix einen Einfluss auf das Proteom und damit auf die Spektren der Isolate. Hierzu bedarf es aber weiterer Untersuchungen. Vorerst ist es sinnvoll weitere Datenbankeinträge von den *Enterococcus sp.* Isolat von Speiseinsektenprodukte anzufertigen.

Dies gilt auch für eine verbesserte Spezieszuordnung der Gattungen *Brevibacillus* sowie *Paenibacillus*.

5.2 TEIL II: SEQUENZANALYSE

5.2.1 *rpoB* Gen Sequenzierung

5.2.1.1 Identifizierung speiseinsektenspezifischer Mikroorganismen

Die versetzte Bande bei Isolat 100 bestätigt sich auch in der Sequenzierung. Die Sequenzlänge des PCR Produkt liegt bei 400 bp. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei dem Isolat um eine genetisch vom *Bacillus cereus* weiter entfernte Spezies handelt. So wird *Bacillus cereus* dem Phylum der Firmicutes zugeordnet während *Glutamicibacter protophormiae* zum Phylum der Actinobacteria gehört.

Die nur schwach erscheinende Bande des Isolats 107 hat zu einem Sequenzierungsergebnis geführt. Es war also genug Produkt vorhanden. Die geringe Menge lässt sich unter Umständen durch eine geringe DNA-Konzentration im Extrakt des Isolats erklären. So war etwa die Menge an zur Verfügung stehenden Koloniematerial sehr gering.

Die Sequenzierung des Isolats 88 zeigt insgesamt eine schlechte Qualität in Geneious. Es ist fraglich, ob das damit erhaltene BLAST-Ergebnis zuverlässlich ist. Die Primersequenzen ließen sich zwar theoretisch mit weniger als drei Mismatches bei beiden Sequenzen anlegen. Diese lagen allerdings bei der *Lysinibacillus*-Sequenz beim Forwardprimer zu Beginn des 3'-Endes, was eine korrekte Anlagerung des Primers an die Sequenz erschwert haben könnte (Ye et al. 2012). Da die MALDI-ToF-MS Zuordnung nicht eindeutig war, kann es sich außerdem um eine Spezies handeln,

an dessen Sequenz die verwendeten *rpoB* Primer nicht binden. Möglich ist aber auch eine Verunreinigung des Isolats oder eine geringe DNA-Konzentration im Extrakt. Gegebenenfalls ist außerdem die Sequenzierung mit anderen Primerpaaren zur besseren Unterscheidung von *Enterococcus faecium* und *lactis* sowie *Paenibacillus stellifer* und *sabinae* nötig. Der Abgleich aller Sequenzen war darüberhinaus nur mit der allgemein zugänglichen Nucleotide Collection von NCBI möglich. Da hier keine Überprüfung der hinterlegten Sequenzen gewährleistet ist, sind auch die Ausgabeergebnisse nicht gesichert.

5.2.1.2 Bacillus cereus Speziesdifferenzierung

Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den besten Ergebnissen für jeweils ein Isolat zu gering, um eine für die Routine ausreichende Spezieszuordnung vornehmen zu können. Die Schwierigkeiten die Spezies voneinander differenzieren zu können lässt sich gegebenenfalls dadurch erklären, dass das *rpoB* Gen an sich für eine Speziesdifferenzierung dieser Gruppe ungeeignet ist. Möglich ist auch, dass die verwendeten Primer keinen für eine Differenzierung ausreichenden polymorphen Bereich des *rpoB* Gens amplifizieren. Ein Grund könnte außerdem sein, dass die aktuelle Taxonomie die tatsächlichen genetischen Unterschiede der Gruppe nicht korrekt widerspiegelt.

Die Taxonomie ist nach wie vor Gegenstand von weiteren Untersuchungen (Carroll et al. 2020; Liu et al. 2017; Guinebretière et al. 2008). Die Norm zum Zählverfahren von *Bacillus cereus* (DIN EN ISO 7932:2005-03) nennt etwa die Gruppenzuordnung von Guinebretière et al. (Guinebretière et al. 2008). Diese Veröffentlichung teilt die Gruppe anhand ihrer Temperatortoleranz in sieben Gruppen ein, wobei es zu mehrfach Nennung der Spezies in den verschiedenen Gruppen kommt. Da zum Zeitpunkt der Veröffentlichung lediglich sechs der heute 17 anerkannten Arten bekannt waren, ist ein Vergleich der Zuordnungen schwer. In weiteren Untersuchungen müssten die hier gewonnenen Sequenzen mit dem von der Arbeitsgruppe vorgestellten Online-Tool (<https://www.tools.symprevius.org/Bcereus/english.php>) abgeglichen werden. Auf diese Weise ließe sich ermitteln, ob die sich ergebenden Cluster mit den von Guinebretière et al. vorgestellten Gruppen übereinstimmen. Veröffentlichungen neueren Datums machen sich Methodiken der Vollgenomanalyse zu Nutze. Carroll et al. stellt eine völlig neue *Bacillus cereus* Taxonomie vor (Carroll et al. 2020). Abbildung 5-1 gibt einen schematischen Überblick der sich ergebenden Unterscheidungsschwierigkeiten innerhalb der hier vorgestellten Arbeit im Abgleich mit

der von Carroll et al. vorgeschlagenen Taxonomie. In der Veröffentlichung von Carroll et al. wurden zwischen allen öffentlich zugänglichen *Bacillus cereus* Vollgenomsequenzen (n=2231) die ANI-Werte berechnet, gefolgt von der Erstellung einer Ähnlichkeitsmatrix, die als hierarchisches Cluster dargestellt wurde. Mit Hilfe eines Grenzwerts von 92,5 ANI, oberhalb dessen Spezies zu einer Spezies zusammengefasst werden, ist hier die nahezu eindeutige Zuordnung aller Genome möglich. Die sich auf diese Weise ergebenden neuen Spezieszuordnungen stimmen weitestgehend mit den in dieser Arbeit vorgestellten Clustern überein. So fügt Carroll et al. die Spezies *B. cereus* (s.s.) und *B. thuringiensis* zur Spezies *B. cereus* (s.s.) zusammen. Mit den Methoden der vorliegenden Arbeit waren diese Spezies ebenfalls nahezu nicht unterscheidbar. Allerdings ergab sich ein Cluster zusätzlich mit der Spezies *B. toyonensis*, was Carroll et al. nicht bestätigt. Die Veröffentlichung von Liu et al. zeigt jedoch ebenfalls eine hohe genetische Ähnlichkeit dieser Spezies zu den anderen zwei Spezies. Hier wurde eine Multi-locus-Sequenztypisierung (engl. Multilocus Sequence typing, MLST) anhand von sieben housekeeping Genen durchgeführt (Liu et al. 2017).

Carroll et al. fasst außerdem *B. albus*, *B. anthracis*, *B. mobilis*, *B. pacificus*, *B. paranthracis*, *B. tropicus* und *B. wiedmannii* zur neuen Spezies *B. mosaicus* zusammen. Dieses Ergebnis zeigt sich in dieser Arbeit (s. Abbildung 5-1). Auch die Zusammenfassung der Spezies *B. mycoides*, *B. nitratireducens*, *B. proteolyticus* und *B. weihenstephanensis* zu *B. mycoides* spiegelt sich in den Ergebnissen wider. Allerdings wurden die Speziesbezeichnungen nur einem Isolat zugeordnet (s. Isolat BC 12 in Tabelle 4-4). Für eine sichere Aussage ist die Analyse weiterer Isolate notwendig.

Die Einstufung von *B. cytotoxicus* als eigene Spezies durch Carroll et al. findet sich in den vorgestellten Ergebnissen wieder. Auch die Veröffentlichung von Liu et al. zeigt eine klare Abgrenzung dieser Spezies (Carroll et al. 2020; Liu et al. 2017).

Andere Spezies der *Bacillus cereus* Gruppe wurden den untersuchten Isolaten nicht zugeordnet. Die von Carroll et al. bestätigten Spezies *B. bingmayongensis*, *B. gaemokensis*, *B. manilaponensis* und *B. clarus* waren bei der Erstellung der verwendeten Referenzsequenzen durch das BfR noch nicht offiziell anerkannt und wurden dementsprechend bei der in silico Analyse nicht berücksichtigt. Keines der untersuchten Isolate wurde einer dieser neuen Spezies zugeordnet, was darauf

hinweisen könnte, dass sie nur selten vorkommen oder in der NCBI hinterlegten Datenbank noch nicht häufig genug hinterlegt sind.

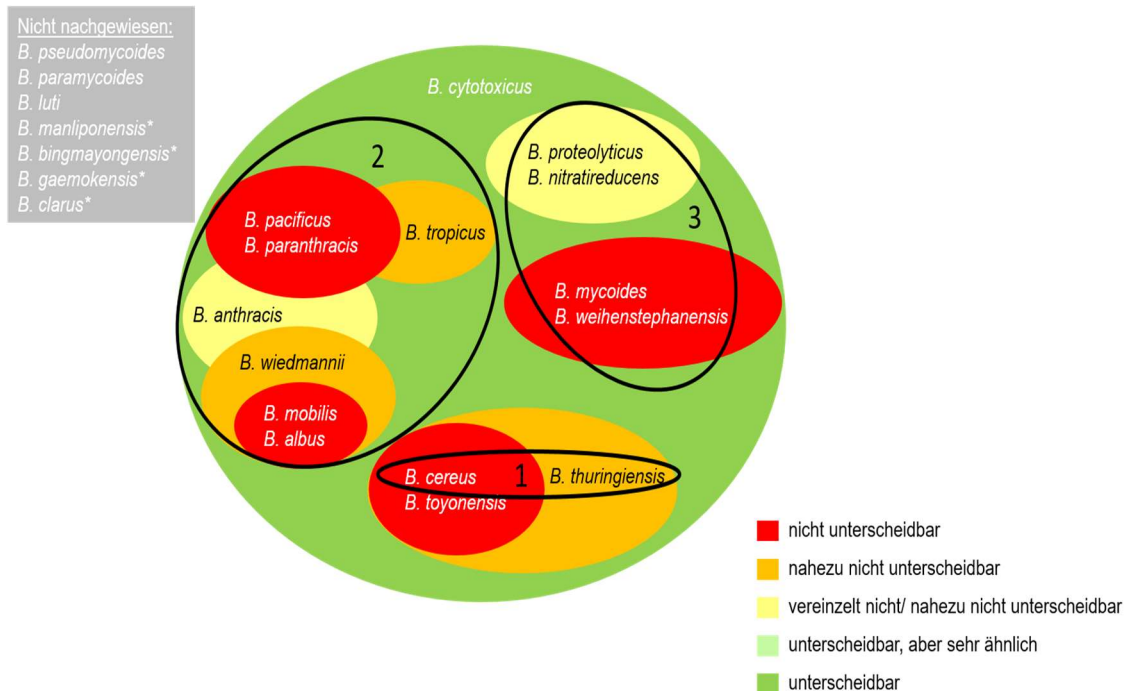


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der *rpoB* PCR-Produkte der *Bacillus* (*B.*) *cereus* Isolate. Ergebnisse des Abgleichs mit eigens aus 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen erstellten Datenbank. Nicht unterscheidbar (rot): vollständige Übereinstimmung der ersten Treffer, immer gepaart; nahezu nicht unterscheidbar (orange): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; vereinzelt nicht/ nahezu nicht unterscheidbar (gelb): Übereinstimmungsdifferenz von 0,1–0,2 Prozentpunkten, vereinzelt gepaart; unterscheidbar, aber sehr ähnlich (hellgrün): Übereinstimmungsdifferenz von > 0,2 Prozentpunkten, immer gepaart; unterscheidbar (grün): Übereinstimmungsdifferenz von > 0,2 Prozentpunkten, keine Paarung. * = vom BfR nicht anerkannte Spezies, in Datenbank nicht hinterlegt. *B. cereus* isoliert von Speiseinsektenprodukten. *B. cereus* s.s. als *B. cereus* dargestellt. Schwarze Linien markieren von Carroll et al. vorgestellte Spezieszuordnung. 1 = *B. cereus* s.s., 2 = *B. mosaicus*, 3 = *B. mycoides* (Carroll et al. 2020).

5.2.2 *pycA* Gen Sequenzierung

Die fehlende Bande bei Isolat 107 lässt sich damit erklären, dass es sich hierbei um einen *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* handelt (Ergebnis der MALDI-ToF-MS Messung sowie der *rpoB* Sequenzierung). Das Testen einer Referenzsequenz

dieser Spezies (Genombezeichnung: CP053376) mit den *pycA* Primern in Geneious zeigte, dass ein Binden dieser Primer an diese Sequenz nicht möglich war, was das Fehlen eines PCR Produkts dieses Isolats erklärt (Ergebnis nicht dargestellt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Primer nur an *Bacillus cereus* Sequenzen binden können. Für die Sequenzierung anderer Organismen sind sie somit nicht geeignet. Warum die Sequenzierung von Isolat 136 mit dem Reverseprimer zu keiner Sequenz geführt hat, bleibt unklar. Möglich wäre ein Fehler bei der Sequenzierung an sich.

Zu diskutieren ist ebenfalls, ob der zur Definition der Unterscheidbarkeit eingesetzte Grenzwert von 0,2 Prozentpunkten Differenz zwischen den zugeordneten Spezies entsprechend des längeren PCR-Produkts bei dieser Sequenzierung angepasst werden muss. Für eine gesicherte Speziesidentifikation für Routineuntersuchungen ist diese Differenz höchstwahrscheinlich zu gering.

Insgesamt führt die PCR und anschließende Sequenzierung der *Bacillus cereus* Isolate mit den neu erstellten *pycA* Primern zu einer etwas eindeutigeren Speziesdifferenzierung als dies bei der Sequenzierung mit den Primern für das *rpoB* Gen der Fall war. Dennoch sind die Unterschiede zwischen den Spezies sehr klein. Für eine sichere Spezieszuordnung in der Routine reichen sie nicht aus. Sie geben aber einen Hinweis auf die mögliche Spezieszuordnung der Isolate.

Wie schon im Abschnitt 4.2.1.4 für die *rpoB* Sequenzierung beschrieben, findet sich auch bei dieser Sequenzierung die neu vorgestellte Taxonomie von Carroll et al. weitestgehend wieder (s. Abbildung 5-1 und) (Carroll et al. 2020).

So bestätigt sich in den Ergebnissen die Zusammenfassung der Spezies *B. cereus* (s.s.) und *B. thuringiensis* zu *B. cereus* (s. s.). Die Speziesbezeichnungen werden in der Auswertung immer den gleichen Isolaten zugeordnet. Bei dieser Sequenzierung waren jedoch die Übereinstimmungen zu den Speziesbezeichnungen größer. Zudem fällt die zusätzliche Zuordnung der Spezies *B. toyonensis* bei diesen Isolaten weg, was bei der *rpoB* Sequenzierung noch der Fall war, sich aber mit der Taxonomie von Carroll et al. nicht deckt. Die Ergebnisse der Sequenzierung mit den neu erstellten Primern sind bei dieser Spezies somit näher an der neu vorgestellten Taxonomie als bei der *rpoB* Sequenzierung (s. Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2 sowie Tabelle 4-6) (Carroll et al. 2020).

Als Cluster ebenfalls zu erkennen sind Spezies, die Carroll et al. als neue Spezies *B. mosaicus* zusammenfasst. So treten *B. pacificus* und *B. paranthracis* immer als Paar auf. Teilweise ist die Übereinstimmung der Isolatsequenzen, die diesen Spezies

zugeordnet wurden, mit der Spezies *B. anthracis* sehr hoch. So ergab diese Sequenzierung eine mögliche Spezieszugehörigkeit der Isolate 44 und 75 (Ergebnisse nicht dargestellt) zu *Bacillus anthracis*, ein S3-Keim (TRBA 466). Beide Isolate waren durch die *rpoB* Sequenzierung im Abgleich mit der NCBI Datenbank den Spezies *Bacillus cereus* oder *Bacillus thuringiensis* zugeordnet worden. Mit der *pycA* Sequenzierung stieg zum einen die Übereinstimmung dieser Isolate zur Sequenz von *B. anthracis* im Abgleich mit der *Bacillus cereus* Datenbank, aber auch im Abgleich mit NCBI. Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenfalls von Liu et al. gemacht werden. Hier wurden zuvor als *Bacillus cereus* bzw. *thuringiensis* identifizierte Stämme nach einer digitalen DNA:DNA Hybridisierung (dDDH) zu *Bacillus anthracis* zugeordnet. Liu et al. beschreibt diese Stämme also möglicherweise „ungewöhnliche“ *Bacillus anthracis* Stämme, die sich in einer Koevolution mit Chromosomen und Virusfaktoren von Menschen und herbivoren Säugetieren weiterentwickelt haben. Diese wurden in einem Vortrag des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) aufgegriffen (Frentzel 2021). Eine genaue Zuordnung dieser Spezies steht noch aus (Liu et al. 2015). Spannend ist, dass die neu entworfenen Primer diese unter Umständen für den Menschen gefährliche Spezies möglicherweise detektieren können. Als Konsequenz wurden diese Isolate anschließend im entsprechenden S3-Labor gelagert. Mit der *rpoB* Sequenzierung waren die Übereinstimmungen zu den harmloseren S2-Keimen *B. paranthracis* und *B. pacificus* gleich hoch und hätten nicht zu erhöhter Vorsicht geführt. Warum hier die Ergebnisse der beiden Datenbanken voneinander abweichen, bleibt unklar, lässt sich aber unter Umständen mit diesen als „ungewöhnlich“ eingestuften *B. cereus* Stämmen erklären.

Schwierigkeiten der Speziesdifferenzierung ergaben sich auch bei den Spezies *B. wiedmannii* und *B. mobilis* sowie teilweise auch *B. albus*. Insgesamt deuten die Ergebnisse eher auf zwei Cluster, eins mit *B. paranthracis*, *B. pacificus* und *B. anthracis* und eins mit *B. wiedmannii*, *B. mobilis* und *B. albus* hin (s. Abbildung 5-2). Dies entspricht nicht der Zuordnung von Carroll et al. alle diese Spezies zu einer Spezies zusammenzufassen (Carroll et al. 2020). Die Menge an untersuchten Sequenzen reicht allerdings nicht aus, um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

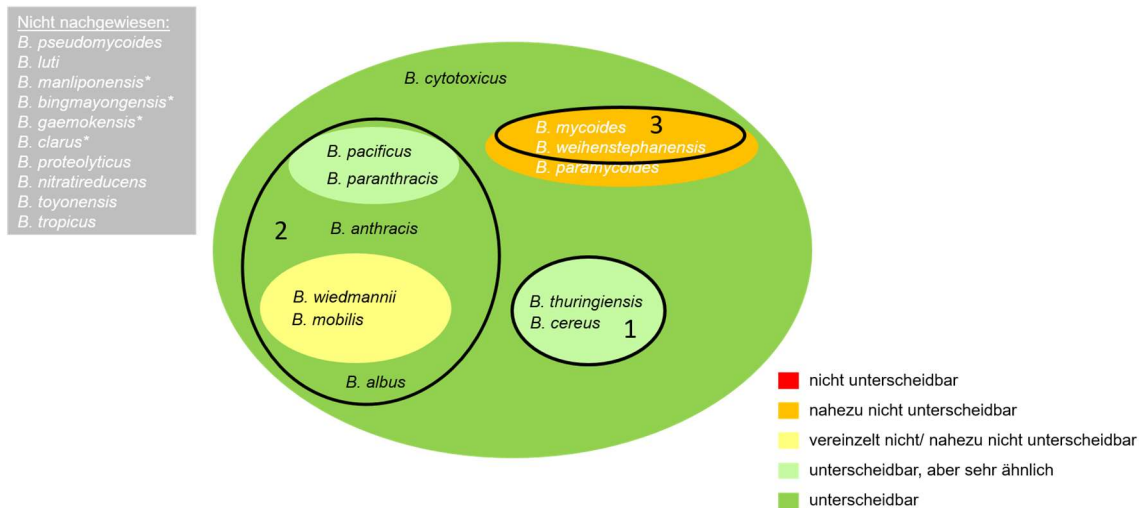


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Unterscheidbarkeit der *pycA* PCR-Produkte der *Bacillus* (*B.*) *cereus* Isolate. Der Abstand der einzelnen Bereiche weist auf die Bit-Score-Unterschiede hin. *B. cereus* isoliert von Speiseinsektenprodukten. *B. cereus* s.s. als *B. cereus* dargestellt. Schwarze Linien markieren von Carroll et al. vorgestellte Spezieszuordnung. 1 = *B. cereus* s.s., 2 = *B. mosaicus*, 3 = *B. mycoides* (Carroll et al. 2020).

Die Zusammenfassung von *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* bestätigt sich in den Ergebnissen ebenfalls (Liu et al. 2018). Die Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass die Spezies *B. paramycoides* ebenfalls sehr hohe Übereinstimmungen zu diesen Spezies aufweist. Carroll et al. belässt *B. paramycoides* allerdings als eigene Spezies. In den Untersuchungen von Liu et al. zeigt sich hingegen die hohe Übereinstimmung der Sequenzen dieser Spezies in der MLST (Carroll et al. 2020; Liu et al. 2017). Da bei den hier vorgestellten Ergebnissen allerdings nur ein Isolat diesen Spezies zugeordnet wurde, ist eine gesicherte Aussage nicht möglich (s. Tabelle 4-6). Hier sind weitere Untersuchungen mit mehr *B. cereus* Sequenzen nötig. Die Bestätigung von Carroll et al. von *B. cytotoxicus* als eigenständige Spezies bestätigt sich in den Ergebnissen (Carroll et al. 2020). Mit den neue erstellten Primer ist zwar die Übereinstimmung der analysierten Sequenz zum Referenzgenom von *B. cytotoxicus* geringfügig kleiner, der Abstand zum nächstbesten Treffer ist hier allerdings deutlich höher. Die eindeutige Identifizierung dieser Spezies mit den neu erstellten Primern ist hier besser möglich als mit den *rpoB* Primern.

5.2.3 Zusammenfassung

Das *pycA* Gen als Zielgen für die Speziesdifferenzierung erscheint hier als eine vielversprechende Möglichkeit. Gegebenenfalls ist das Design weiterer Primerpaare

für dieses Gen mit einer größeren Anzahl an *Bacillus cereus* Referenzsequenzen sinnvoll, um einen zwischen den Spezies heterogeneren Bereich des Gens amplifizieren und sequenzieren zu können. Dies schließt Sequenzen der 2017 neu definierten Spezies mit ein (Liu et al. 2017). Zur weiteren Überprüfung von der von Carroll et al. vorgestellten Taxonomie wäre außerdem das Erstellen neuer Primer auf Grundlage dieser Spezieszuordnung denkbar. Gegebenenfalls lassen sich hiermit die Spezies besser differenzieren.

Möglich wäre außerdem eine weitere Untersuchung der Isolate mit in der Literatur bereits vorgestellten Primern für das *pycA* Gen (Fiedoruk et al. 2016; Liu et al. 2017). Inwieweit die gefundenen Spezieszuordnungen mit den von Guinebretiére et al. vorgeschlagenen sieben Gruppen übereinstimmen, bedarf einer weiteren Analyse. Angemerkt sei dabei allerdings, dass diese Zuordnung in Zukunft durch neuere Untersuchungsmethoden unter Umständen ohnehin abgelöst wird, da sie nicht mit den Vollgenomanalysen der letzten Jahre übereinstimmt (Liu et al. 2017; Carroll et al. 2020).

Ob insgesamt eine sichere Speziesdifferenzierung möglich ist, die etwa auch als Grundlage zum Aufbau einer MALDI-ToF-MS Methode zur Differenzierung der Spezies dienen kann, bleibt fraglich. Für die amtliche Lebensmitteluntersuchung interessant sind jedoch vor allem die verschiedenen durch die *Bacillus cereus* Gruppe produzierten Gifte. Gegebenenfalls ist die Analyse der Proben auf das Vorliegen dieser Gifte mit Hilfe des MALDI-ToF-MS möglich und für die Lebensmitteluntersuchung sogar entscheidender als die exakte Spezieszuordnung. Der Nachweis des emetischen Toxins Cereulid mittels des MALDI-ToF-MS wird in dieser Arbeit optimiert und in der Routine etabliert. Der Nachweis des Lethalfaktorproteins des Anthraxtoxins wurde in anderen Untersuchungen bereits vorgestellt (Gallegos-Candela et al. 2018). Diese Methode müsste jedoch noch für die Anwendung in der Routine untersucht werden.

5.3 TEIL III: CES REAL-TIME PCR

Die Ergebnisse der vorgestellten ces Real-time PCR stimmten zu 100% mit den bereits bekannten Werten überein. Die Methode konnte damit für das Labor für Molekulare Lebensmittelmikrobiologie des CVUA Freiburg validiert werden. Ein entsprechendes hausinternes Prüfverfahren (PV) wurde im Rahmen dieser Arbeit erstellt.

Bei der verwendeten IAC handelte es sich um eine nicht-kompetitive IAC. Die Primersequenzen für das gesuchte *ces* Gen und die Primersequenzen der IAC waren also ähnlich, aber nicht gleich. Eine nicht bestimmbare IAC deutet auf eine Inhibition der PCR-Reaktion hin. Da bei den Versuchen die IAC immer dann nicht bestimmbar war, wenn das Zielgen deutlich amplifiziert wurde, kann eine Inhibition der Amplifikation hier ausgeschlossen werden. Die negative IAC deutet in diesen Proben eher daraufhin, dass die Konzentration des Zielgens *ces* deutlich höher war als die der IAC, so dass Nukleotide und Taqman-Polymerase bereits bei der Amplifikation des Zielgens aufgebraucht waren, eine Amplifikation der IAC also nicht mehr oder nicht bestimmbar stattfinden konnte (Hoorfar et al. 2004). Vermeidbar ist dies durch den Einsatz geringerer Konzentrationen des Zielgens, indem etwa weniger Koloniematerial verwendet wird.

Bei der Anwendung des PVs auf die aus den Speiseinsektenprodukten isolierten *Bacillus cereus* Stämmen zeigte sich, dass nur etwa 11 % der Isolate über das *ces* Gen verfügten. Zu beachten ist hierbei, dass diese Isolate vom selben Produkt und von der selben Agarplatte gewonnen wurden. Die Wahrscheinlichkeit ist also hoch, dass es sich hier um den selben Stamm handelt. Damit wäre der Anteil *ces*-positiver Stämme an allen isolierten *Bacillus cereus* Stämmen eher bei 2 %. In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Angaben zum Anteil emetischer Stämme in untersuchten Lebensmitteln. Eine Studie mit 1863 aus unterschiedlichster Matrix isolierten *Bacillus cereus* Stämmen konnte einen Anteil von 1,5 % emetischer Stämme nachweisen (Hoton et al. 2009). Eine groß angelegte Studie von Lebensmitteln, die gesammelt über sieben Jahre, in Zusammenhang mit Erbrechenssymptomen gebracht wurden, ergab ein Anteil von 1% der Proben, in denen emetische *Bacillus cereus* Stämme nachgewiesen wurden (Messelhäusser et al. 2014). Mit einer positiven Probe von 20 untersuchten Speiseinsektenprodukten läge der Anteil bei diesen Untersuchungen bei 5 %. Damit wäre der Anteil im Verhältnis recht hoch. Erklärbar ist dies unter Umständen über die Verarbeitung der Produkte. Die starke Erhitzung könnte zu einer Selektion von Sporen von emetischen Stämmen führen (Carlin et al. 2006). Für eine gesicherte Aussage sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

5.4 TEIL IV: CEREULIDTOXIN-NACHWEIS MITTELS MALDI-ToF-MS

5.4.1 Entwicklung Cereulidnachweisprotokoll für MALDI-ToF-MS

Generell fiel bei allen Untersuchungen die recht hohen Standardabweichungen von etwa 17.73 % bis zu 136.55 % für den Peak bei 1191 m/z bei unterschiedlichen Extraktionen auf. Diese lassen sich vornehmlich dadurch erklären, dass sich die untersuchten Stämme untereinander stark in ihrer Fähigkeit Cereulid zu produzieren unterscheiden. Bei den Untersuchungen wurde außerdem vor allem auf möglichst hohe Peakintensitäten der Cereulidpeaks geachtet. Sie erleichtern die Auswertung der Spektren, sind aber nicht darüber hinaus mit höheren Cereulidkonzentrationen gleichzusetzen. Sie korrelieren aber wie in *Abbildung D- 1* im Anhang zu erkennen miteinander. Höhere Peakintensitäten lassen sich allerdings ebenfalls durch verbesserte Geräteeinstellungen erzielen ohne, dass die Isolate mehr Cereulid produzieren (s. *Abbildung 4-15*).

5.4.1.1 Art der Extraktion

Das Lösen von etwas Koloniematerial in 1200 µL Acetonitril (Variante 3) führte bei keinem der Isolate zu einem messbaren Ergebnis. Erklärbar ist dies zum einen mit der starken Verdünnung des Koloniematerials. Diese war jedoch auch bei Variante 1 gleich hoch und führte hier zu auswertbaren Spektren. Die MALDI-ToF-MS Messungen beider Varianten wurden mit den in Abschnitt 3.4.3.3 beschriebenen Ausgangseinstellungen durchgeführt. Unter Umständen war die Konzentration an Koloniematerial zu gering, um Peaks im Evaluationsbereich von 700 bis 800 m/z messen zu können. Gegebenenfalls würde eine Wiederholung dieser Extraktion mit anschließender Messung der Extrakte mit der neu erarbeiteten Messmethode zu einem Spektrum führen. Durch die starke Verdünnung ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass selbst wenn Cereulidpeaks messbar sind, diese in einer geringeren Intensität auftreten, als bei der neu erarbeiteten Cereulidextraktion.

Die Cereulidextraktion ausgeführt mit Ethanol statt Acetonitril als Lösungsmittel führte zum im Vergleich zu allen anderen Extraktionsvarianten höchsten Peak bei 1175 m/z. Bei diesem Peak handelt es sich um das Natriumaddukt des Cereulids (Ducrest et al. 2019). Erklärbar wäre dies mit einer höheren Konzentration an Natriumionen bei dieser Messung. Möglich wäre dies etwa dadurch, dass für diese Extraktion das Koloniematerial zunächst in analysereinem Wasser gelöst wurde. Im Gegensatz zum ebenfalls analysereinem Acetonitril, wurde dieses jedoch in kleinere Glasgefäße

aliquotiert. Unter Umständen kam es hierbei zu einer höheren Kontamination des Wassers mit Natrium durch etwa das Glasgefäß selbst oder Schweiß. Da der Peak bei 1175 m/z im Vergleich zum höheren Peak bei 1191 m/z (Kaliumaddukt des Cereulids) allerdings vor allem bei nur schwach Toxin bildenden Isolaten schwerer vom Rauschen zu differenzieren ist, wurde der Peak bei 1191 m/z als für den Toxinnachweis entscheidender betrachtet. Damit erscheint es sinnvoll die Extraktion mit Acetonitril durchzuführen, die zur höchsten Peakintensität des Peaks bei 1191 m/z führte.

5.4.1.2 Medium

Die Erkenntnis von Häggblom et al. und Agata et al., dass *Bacillus cereus* in rotierender Flüssigkultur die höchste Cereulidproduktion aufweist, ließ sich nicht bestätigen (Häggblom et al. 2002; Agata et al. 2002). Die rotierende Flüssigkultur führte insgesamt sogar zu den geringsten gemessenen Cereulidpeakintensitäten. Dies würde mit den Untersuchungen von Rajkovic et al. übereinstimmen, in denen eine 10-fach geringere Cereulidkonzentration in rotierenden Kulturen festgestellt wurde (Rajkovic et al. 2006). Allerdings sind die Ergebnisse insgesamt miteinander nur schwer zu vergleichen. Die Untersuchungen von Häggblom et al. und Rajkovic et al. wurden mit einer HPLC-MS durchgeführt, die im Gegensatz zum hier verwendeten MALDI-ToF-MS eine quantitative Bestimmung des Cereulids zulässt. Des Weiteren wurde hier jeweils ein völlig anderes Probenaufarbeitungsprotokoll verwendet. Rajkovic et al. und Agata et al. kultivierten die Isolate zudem auf Nahrungsmitteln statt in Bouillion. Es ist möglich, dass für die Flüssigkultur eine andere Extraktion nötig ist, als für Kulturen von Agarplatten. Eine solche Extraktion müsste neu ausgearbeitet und an die Bedingungen des CVUA Freiburg angepasst werden. Interessant wäre außerdem die Untersuchung von Lebensmittelproben direkt auf das Cereulidtoxin. Hierfür ist die Erarbeitung einer neuen Methode ebenfalls nötig.

Die Intensitäten der Cereulidpeaks nach der Kultur auf Blut- bzw. CASO-Agar waren vergleichbar hoch. Da der Fokus dieser Untersuchung allerdings auf die schwach Toxin bildenden Isolate gerichtet war, ist die Wahl des CASO-Agars als Medium für diesen Nachweis sinnvoller, da im Schnitt der niedrig produzierende Stamm hier die höchsten Cereulidpeaks aufwies.

5.4.1.3 Temperatur

Die längere Lagerung der Isolate in BHI spielt für die Routine keine Rolle. Isolierte präsumtive *Bacillus cereus* Stämme werden hier direkt weiteruntersucht. Falls es

dennoch zu einer längeren Lagerung der Isolate bei 4°C kommt, sollte die abnehmende Cereulidproduktion jedoch beachtet werden. Die verringerte Peakintensität von Cereulid nach längerer Lagerung im Kühlschrank (s. Abschnitt 5.4.1.3) könnte allerdings auf den Abbau von Cereulid hinweisen, der unter Umständen so auch in den Lebensmitteln nach Kühlschranklagerung stattfindet. Die Untersuchung der Proben auf mögliche Abbauprodukte des Toxins wäre somit auch interessant.

Die von Häggblom et al. vorgestellte Temperatur von 25°C wurde durch die Untersuchung von Kranzler et al. in Frage gestellt (Kranzler et al. 2016). Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Cereulidproduktion verschiedener *Bacillus cereus* Stämme bei unterschiedlichen Temperatur in 3°C-Schritten. Sie erhielten hierdurch ein wesentlich detaillierteres Bild der Temperaturoptima der Cereulidproduktion unterschiedlicher Stämme. In diesen Untersuchungen stellte sich die Temperaturen von 33°C und 37°C als für die Mehrheit der *Bacillus cereus* Stämme optimale Temperatur für eine maximale Cereulidproduktion heraus. Kranzler et al. maß die Cereulidkonzentration nicht nach einer festen Zeitspanne sondern nach Erreichen einer festgelegten OD₆₀₀ von 5 bis 7. Die Untersuchungen sind untereinander nur schwer zu vergleichen. Da in den Untersuchungen von Häggblom et al. lediglich die Temperatur bei 11°C, 21°C, 40°C und 42°C nach 24 Stunden Kultur untersucht wurden, ist hier keine Aussage über die Temperatur bei 33°C und 37°C zu finden. Eine kurze Untersuchung der vier *Bacillus cereus* Isolate nach der Kultur bei 25°C und bei 37°C nach 48 Stunden brachte keine signifikanten Unterschiede in der Cereulidpeakintensität (Ergebnisse s. Anhang Tabelle D- 1). Möglich wäre, dass sich die Cereulidkonzentration nach 48 Stunden Kultur bei beiden Temperaturen ausgleicht. Eine Untersuchung, ob die Cereulidpeakintensität bei einer Kultur bei 37°C nach 24 Stunden bereits so hoch ist, wie bei 25°C nach 48 Stunden wäre interessant und würde das Aufarbeitungsprotokoll gegebenenfalls weiter verkürzen.

Bacillus sporothermodurans Isolate, die hier als Negativkontrolle für den Cereulidtoxinnachweis eingesetzt wurden, wuchsen bei 25°C innerhalb 48 Stunden auf CASO-Agar nicht an. Da in der Routine ausschließlich bereits als präsumtive *Bacillus cereus* identifizierte Isolate untersucht werden, ist dies nicht weiter von Bedeutung. Es zeigt lediglich, dass diese Spezies als Negativkontrolle für diesen Nachweis ungeeignet war. Hier eignen sich nicht-emetische *Bacillus cereus* Isolate besser.

5.4.1.4 Zeit

Der Unterschied der durchschnittlichen Cereulidpeakintensitäten war nach 48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden nicht signifikant höher. Da sich dennoch ein kleiner Unterschied zeigte und der Mehraufwand einer längeren Kultur nicht entscheidend ist, ist die längere Kultur für eine höhere Cereulidkonzentration sinnvoll. Da die Extrakte des schwach Toxin-bildnenden Stammes BC 37 bei diesen Untersuchungen zu Nulllinien führten, konnte nicht untersucht werden, ob es einen signifikanten Effekt bei diesem Stamm gibt. Eine Wiederholung der Untersuchung mit diesem Stamm bei höheren Temperaturen wäre dementsprechend interessant, um eine deutlichere Aussage treffen zu können.

5.4.1.5 Ultraschallbad

Die gemessenen Effekte waren bei allen Stämmen im Durchschnitt nicht signifikant. Da der Einsatz des Ultraschallbads das Aufarbeitungsprotokoll jedoch aufweniger macht und dabei sogar eher zu geringeren Cereulidpeakintensitäten führte, ist es sinnvoll, diesen Schritt aus dem Protokoll zu streichen. Möglich wäre eine Untersuchung der Effekte mit den exakten Angaben zum Ultraschallbad von Döllinger et al.. Da das Aufarbeitungsprotokoll jedoch auch ohne den Einsatz eines Ultraschallbads zu auswertbaren Spektren führte, wäre diese Untersuchung nur aus wissenschaftlichem Interesse sinnvoll.

5.4.1.6 Aufkonzentrieren

Da der von Döllinger et al. verwendete Vakuumkonzentrier für diese Untersuchungen nicht zur Verfügung stand, ist fraglich ob die Trocknung der Extrakte bei 80°C zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Der Trocknungsschritt führte im Durchschnitt aller Isolate zu einer etwas, aber nicht signifikant höheren Cereulidpeakintensität. Da die Intensitäten beim schwach Toxin bildenden Stamm BC 37 zwischen Extrakten mit und ohne Trocknungsschritt nahezu gleich waren, ist das Auslassen dieses Schritts dennoch vertretbar. Der zusätzliche Aufwand führt hier nicht zu einem ausreichend besseren Ergebnis.

5.4.1.7 Minimalprotokoll

Das Minimalprotokoll führte zwar im Durchschnitt aller Isolate zu signifikant geringeren Cereulidpeakintensitäten, beim Isolat BC 37 zeigte sich jedoch kein Unterschied zum deutlich aufwendigeren Standardprotokoll. Hier sind weitere Untersuchungen sinnvoll,

um diese Ergebnisse zu überprüfen. Durch seine Einfachheit wäre dieses Minimalprotokoll für die Routine von Vorteil.

5.4.1.8 LDI-ToF-MS Messung

Die Messung von Cereulidstandard ohne Matrix gestaltete sich sehr aufwendig und schlecht reproduzierbar. Durch die Notwendigkeit den Targetspot außerdem manuell mit dem Laser nach Cereulidbestandteilen abzusuchen, ist diese Methode für die Routine ungeeignet. Das ist auch das Fazit von Döllinger et al. (Doellinger et al. 2020). Die höheren Peakintensitäten gemessen auf dem Einmaltarget sind interessant und könnten weiter untersucht werden. Der Peakshift um 1 Da kann auf die unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit des Einmaltargets zurückzuführen sein. Möglich ist aber auch eine fehlerhafte Kalibration des MALDI-ToF-MS Geräts bei dieser Messung.

5.4.1.9 MALDI-ToF-MS Einstellungen

Die Erweiterung des Evaluationsbereichs auf 0–2000 m/z führt dazu, dass immer ein Spektrum aufgenommen wird. Dies ist auch der Fall, wenn kein Isolat im Extrakt vorhanden ist. Um die Extraktion und die Messung zu überprüfen wäre das Mitführen einer Negativkontrolle in Form von Acetonitril sinnvoll. Mit dem davon aufgenommenen Spektrum könnten die Spektren der Extrakte verglichen werden, um sicherzustellen, dass es sich nicht nur um das Spektrum vom Acetonitril handelt. Auch der Einsatz einer Positivkontrolle in Form eines gesichert Cereulid bildenden Stammes, der bei jeder Aufarbeitung mitgeführt wird, wäre möglich.

Die Überprüfung der Spezies ist mit dieser Messung nicht mehr möglich, aber auch nicht nötig, da dies in der Routine bereits im Vorfeld durchgeführt wird. Den Evaluationsbereich auf diesen Bereich einzustellen ist also vertretbar.

Die Laserenergie und Detektorverstärkung müssen laufend an die sich verändernden Geräteparameter angepasst werden. Sinnvoll wäre hier eine Überprüfung einmal im Quartal, wie sie auch bei den anderen Methoden durchgeführt wird. Die Kalibration der Methode mit dem PCS II vor jeder Messung ist hierbei ebenfalls empfehlenswert, um mögliche Peakverschiebungen auszugleichen.

Der nach der Mehrfachmessung entstehende Peak bei 920 m/z ist auffällig. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um ein Fragment vom Cereulid oder vom Acetonitril handelt, müsste die Messung mit reinem Acetonitril wiederholt werden. Möglich wäre,

dass es sich hier um ein Analytmolekül handelt, dass erst nach mehrfachem Beschuss mit dem Laser in die Gasphase übergeht.

Insgesamt führt die Optimierung der MALDI-ToF-MS Einstellungen zu besser auswertbaren Cereulidpeaks. Durch weitere Anpassungen etwa durch noch mehr Schussschritte pro Targetsport oder einer feineren Justierung der Laserenergie könnten die Intensitäten der Cereulidpeaks weiter erhöht werden.

5.4.1.10 Software

Sowohl die Differenzierung der Isolate mit FlexAnalysis als auch mit ClinProTools ist eindeutig möglich und für die Routine gut anwendbar. Die Wahl dieser Software erscheint insofern sinnvoll, als dass keine weitere Schulung des Laborpersonals notwendig ist und die Vergleichbarkeit zwischen den CVUAs in Baden-Württemberg gesichert wird.

Bei dem in FlexAnalysis zusätzlich sichtbaren Peak bei 1205 m/z handelt es sich um das Kaliumaddukt von Isocereulid A und/oder Isocereulid F (Doellinger et al. 2020; Marxen et al. 2015). Die relative Zytotoxizität dieser Isoform ist deutlich höher als von Cereulid (Marxen et al. 2015). Weitere Untersuchungen könnten klären, ob alle untersuchten Isolate diese Isoformen produzieren können oder ob es Unterschiede zwischen den Stämmen gibt. Eine Untersuchung auf weitere Isoformen des Toxins könnte die Methode noch robuster machen.

Das ClinProToolsmodell könnte durch weitere Messungen erweitert und so noch sensitiver gemacht werden. Möglich wäre etwa die Auftragung der Extrakte ähnlich der Erstellung eines Datenbankeintrags (s. Abschnitt 3.5.2). Eine weitere Möglichkeit wäre Spektren in das Modell einzupflegen, die etwa nach einem erweiterten Direkttransfer erstellt wurden. Auf diese Weise wäre eine Klassifizierung von Isolaten auch mit dieser Aufarbeitungsmethode möglich.

5.4.2 Cereulidnachweis auf Isolaten der Speiseinsektenprodukte

Bei den vier in der *ces* Real-time PCR als *ces*-positiv identifizierten *Bacillus cereus* Isolaten konnte das Cereulidtoxin mit der erarbeiteten Methode mittels der MALDI-ToF-MS nachgewiesen werden. Mit einer Keimzahl von 1×10^3 KBE/g lag die Probe allerdings noch in einem für die Toxinbildung höchstwahrscheinlich noch nicht kritischen Bereich (Bundesinstitut Für Risikobewertung 2020; Messelhäuser und Ehling-Schulz 2014; Messelhäuser et al. 2014). Da außerdem nur vier der sechs *Bacillus cereus* Isolate dieser Probe *ces*-positiv waren, ist der Anteil an emetischen

Stämmen nochmal geringer. Die Produktion von einer kritischen Menge Toxin ist damit unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen (Messelhäusser et al. 2014). Interessehalber wurde dieses Produkt im CVUA Stuttgart mittels der HPLC auf Cereulid untersucht. Hier konnte kein Toxin nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Es stand allerdings nur noch eine sehr geringe Menge an Probenmaterial zur Verfügung. Interessant wäre die Untersuchung von Lebensmittelproben auf Cereulid direkt im MALDI-ToF-MS. Wissenschaftlich interessant wäre hierbei die Untersuchung, ob Speiseinsekten als Matrix für die Cereulidproduktion förderlich oder eher hemmend sind. Ein enger Zusammenhang zwischen Lebensmittelmatrix und dem Gehalt an Cereulid wurde bereits festgestellt (Messelhäusser et al. 2014). Ob Speiseinsekten den hier als für Cereulidproduktion besonders förderlichen Kriterien entsprechen (Hoher Gehalt an Stärke, Kohlenhydrate, Vitaminen, Spurenelementen, ein neutraler pH-Wert sowie ein mittlerer bis hoher a_w -Wert) muss weiter untersucht werden, wenn mehr Probenmaterial zur Verfügung steht und die entsprechenden Untersuchungsmethoden für Speiseinsekten validiert wurden (Messelhäusser et al. 2014). Der hohe Fettgehalt der Speiseinsekten von bis zu 77 % ermittelt von Rumpold und Schlüter bzw. bis zu 32,09 % der hier untersuchten Produkte könnte z. B. die Hitzestabilität von Cereulid erhöhen und damit darauf hindeuten, dass die Untersuchung der Proben auf Cereulid für die Lebensmittelsicherheit relevant sein könnte (Rumpold und Schlüter 2013; Rajkovic et al. 2008).

5.4.3 Zusammenfassung

Insgesamt wurde eine Methode erstellt, mit der die Erkennung von Cereulid bildenden *Bacillus cereus* Stämmen mit Hilfe des MALDI-ToF-MS einwandfrei möglich ist. Das Protokoll ist einfach anzuwenden und mit den im CVUA Freiburg zur Verfügung stehenden Mitteln durchführbar. Andere Veröffentlichungen erreichen zwar sehr hohe Cereulidkonzentrationen, benötigen dafür allerdings zum Teil sehr aufwendige Aufarbeitungen (Stark et al. 2013) oder können nur schwach Toxin bildende *Bacillus cereus* Stämme nicht identifizieren (Ulrich et al. 2019). Die Argumentation, dass solche Stämme allerdings ein geringeres bis gar kein Gesundheitsrisiko darstellen, lässt sich damit relativieren, dass bis heute keine eindeutige Aufnahmemenge für eine toxische Wirkung von Cereulid festgestellt werden konnte und es auch Nachweise von Erkrankungen mit sehr geringen Cereulidmengen gibt (Hägglom et al. 2002).

Es wurde ein hausinternes Prüfverfahren (PV) erstellt, und in die Routine etabliert. Damit stellt dieses Verfahren eine einfache, kostengünstige und schnelle Alternative

zur *ces* Real-time PCR und der Messung mittels der HPLC dar. Sie ist außerdem wie die HPLC fähig, das Toxin direkt zu messen, statt wie die *ces* Real-time PCR nur das *ces* Gen nachzuweisen.

6 FAZIT UND AUSBLICK

Die MALDI-ToF-MS stellt eine gute Möglichkeit zur Untersuchung von Speiseinsekten dar. Die Identifizierung der von Speiseinsekten isolierten Mikroorganismen war zum großen Teil auf Speziesebene möglich. Durch eine fortlaufende Erweiterung der MALDI-ToF-MS Datenbank um speiseinsektenspezifische Mikroorganismen kann die Untersuchung von diesen Produkten in Zukunft noch weiter verfeinert werden.

Die Speziesidentifizierung der vom MALDI-ToF-MS nicht eindeutig identifizierbaren Mikroorganismen isoliert von Speiseinsektenprodukten konnte mit Hilfe der verwendeten *rpoB* PCR nahezu vollständig realisiert werden. Die Ergebnisse der Sequenzierung konnten als neue Datenbankeinträge eingepflegt werden. Auf diese Weise ist die Identifizierung von aus Speiseinsekten gewonnenen Isolate in zukünftigen Untersuchungen besser möglich. Zur Bestimmung der Gattungen *Enterococcus* sowie *Paenibacillus* auf Speziesebene ist unter Umständen der Einsatz anderer Primer nötig. Hierfür sind weitere Untersuchungen sinnvoll. Hilfreich ist gegebenenfalls die kombinierte Untersuchung mehrerer housekeeping Gene.

Die Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe war hingegen nicht eindeutig möglich. Die Sequenzierung der PCR-Produkte der *rpoB* PCR führte zwar zu einer etwas differenzierteren Spezieszuordnung als dies mittels der MALDI-ToF-MS möglich ist. Diese kann lediglich die Gruppe an sich identifizieren, aber keine gesicherte Spezieszuordnung treffen. Eine eindeutige Speziesbenennung der Isolate war jedoch nicht möglich. Die im Rahmen der Arbeit erstellten Primer zur Amplifikation des *pycA* Gens führten zu etwas besseren Ergebnissen. Hier unterschieden sich die in Frage kommenden Spezies im Grad ihrer Übereinstimmung, allerdings nur minimal. Für eine sichere Spezieszuordnung in der Routine reichen die Unterschiede nicht aus. Zu beachten ist, dass die aktuelle *Bacillus cereus* Taxonomie noch im Wandel ist und sich in den nächsten Jahren gegebenenfalls mehr an die genetischen Unterschiede der Gruppe anpassen wird.

Kann auf diese Weise die Speziesdifferenzierung der *Bacillus cereus* Gruppe möglich gemacht werden, wäre die Erarbeitung einer Methode mit der eine Differenzierung über eine MALDI-ToF-MS Messung möglich ist, ein spannender nächster Schritt. Hierfür müssten für jede *Bacillus cereus* Spezies MALDI-ToF-MS Spektren aufgenommen und als Datenbankeinträge hinterlegt werden. Mit zunehmender

Spektralanzahl pro Spezies, könnte so die Identifizierung durch die MALDI-ToF-MS ermöglicht werden. Denkbar wäre auch die Erstellung eines Modells zur automatischen Klassifizierung der Spezies über die Software ClinProTools. Unter Umständen lassen sich durch die MALDI-ToF-MS Messung speziesspezifische Peaks identifizieren, die zur Differenzierung der Gruppe beitragen könnten.

Die Untersuchung der Nachweismöglichkeiten der Toxine der *Bacillus cereus* Gruppe mittels der MALDI-ToF-MS wäre ebenfalls interessant.

Zum Nachweis von einem dieser Toxine war es Ziel dieser Arbeit die entsprechende Real-Time PCR zum Nachweis des *ces* Gens in die Routine des CVUA Freiburgs zu etablieren. Das *ces* Gen weist auf die Fähigkeit der untersuchten Stämme hin das emetische Toxin Cereulid zu bilden. In den vorliegenden Untersuchungen konnte mittels dieser Methode eine Sensitivität von 100 % erreicht werden. Entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein hausinternes Prüfverfahren erstellt und in die Routine des CVUA Freiburgs eingeführt.

Die Bestimmung des vom *Bacillus cereus* gebildeten Toxins Cereulid mit Hilfe der MALDI-ToF-MS war mit dem im Rahmen dieser Arbeit erstellten Protokoll ebenfalls möglich. Es konnten dabei auch *Bacillus cereus* Isolate als Cereulidbildner identifiziert werden, die nur eine geringe Toxinmenge bilden. Damit stellt die erarbeitete Methode eine wichtige Erweiterung der Untersuchungsmöglichkeiten vom häufig auf Speiseinsektenprodukten isolierten *Bacillus cereus* Keim dar. Einen Überblick dieser Methode wurde bereits auf dem 1. Freiburger Insektenforum am 17. 06.2021 vorgestellt. Zwei Gäste bekundeten daraufhin Interesse an einer Zusammenarbeit. Geplant ist aktuell eine Hospitation eines Untersuchungsamts aus Hessen im CVUA Freiburg, um die Methodik weiterzugeben, sowie eine Zusammenarbeit mit einem Speiseinsektenhersteller, um weitere Untersuchungsmöglichkeiten von Speiseinsekten mittels der MALDI-ToF-MS zu ermitteln. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wäre es außerdem interessant zu untersuchen, ob der Toxinnachweis im Lebensmittel direkt mit Hilfe der MALDI-ToF-MS möglich ist. Dabei kann untersucht werden, ob Speiseinsektenprodukte zu einer erhöhten Cereulidbildung führen können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adékambi, Toïdi; Drancourt, Michel; Raoult, Didier (2009): The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. In: *Trends in microbiology* 17 (1), S. 37–45. DOI: 10.1016/j.tim.2008.09.008.

Agata, Norio; Mori, Masashi; Ohta, Michio; Suwan, Sathorn; Ohtani, Ikuko; Isobe, Minoru (1994): A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. In: *FEMS Microbiology Letters* 121, S. 31–34.

Agata, Norio; Ohta, Michio; Mori, Masashi; Shibayama, Keigo (1999): Growth Conditions of and Emetic Toxin Production by *Bacillus cereus* in a Defined Medium with Amino Acids. In: *Microbiology and Immunology* 43 (1), S. 15–18.

Agata, Norio; Ohta, Michio; Yokoyama, K. (2002): Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. In: *International journal of food microbiology* 73, S. 23–27. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00692-4.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic acids research* 25 (17), S. 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.

Apetroaie-Constantin, Camelia; Shaheen, Ranad; Andrup, Lars; Smidt, Lasse; Rita, Hannu; Salkinoja-Salonen, Mirja (2008): Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. In: *International journal of food microbiology* 127 (1–2), S. 60–67. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.006.

Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe; Bundesministerium für Arbeit und Soziales (21.12.2020): Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen, TRBA 466, vom 9. Fundstelle: Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe. In: GMBI.

Benning, Reinhild; Chemnitz, Christine; Duman, Nuray; Herr, Sophie; Hörning, Bernhard; Idel, Anita et al. (2019): Fleischatlas 2018. Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel. 5. Aufl. Hg. v. Heinrich-Böll-Stiftung, Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland und Le Monde Diplomatique.

Böhme, Karola; Fernández-No, Inmaculada C.; Calo-Mata, Pilar; Barros-Velázquez, Jorge (2017): Proteomics of Food Spoilage Pathogens. In: *Proteomics in Food Science*: Elsevier, S. 417–431.

Branquinho, Raquel; Sousa, Clara; Lopes, João; Pintado, Manuela E.; Peixe, Luísa V.; Osório, Hugo (2014): Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* using MALDI-TOF-MS. In: *PloS one* 9 (10), e110127. DOI: 10.1371/journal.pone.0110127.

Bruker (Hg.) (2013): Erstellung von Datenbankeinträgen. Version 1.

Bundesinstitut Für Risikobewertung (2020): *Bacillus cereus*-Bakterien in Lebensmitteln können Magen-Darm-Erkrankungen verursachen: Stellungnahme Nr. 048/2020 des BfR vom 30. Oktober 2020. Unter Mitarbeit von Bundesinstitut Für Risikobewertung.

Carlin, Frédéric; Fricker, Martina; Pielaat, Annemarie; Heisterkamp, Simon; Shaheen, Ranad; Salonen, Mirja Salkinoja et al. (2006): Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. In: *International journal of food microbiology* 109 (1-2), S. 132–138. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022.

Carroll, Laura M.; Wiedmann, Martin; Kovac, Jasna (2020): Proposal of a Taxonomic Nomenclature for the *Bacillus cereus* Group Which Reconciles Genomic Definitions of Bacterial Species with Clinical and Industrial Phenotypes. In: *mBio* 11 (1). DOI: 10.1128/mBio.00034-20.

Carroll, Laura M.; Wiedmann, Martin; Mukherjee, Manjari; Nicholas, David C.; Mingle, Lisa A.; Dumas, Nellie B. et al. (2019): Characterization of Emetic and Diarrheal *Bacillus cereus* Strains From a 2016 Foodborne Outbreak Using Whole-Genome Sequencing: Addressing the Microbiological, Epidemiological, and Bioinformatic Challenges. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 144. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00144.

Danner, Joseph; Hong, Sunhee; Verghese, Bindhu; Farrance, Christine E. (2019): Species Differentiation of the *Bacillus Cereus* Group using the *pycA* Gene Sequence and an Assessment of its Operational Impact for Pharmaceutical Manufacturers. Hg. v. Charles River. Charles River. Rockville.

Director Office for Risk Assessment & Research (2021): Advisory report on the risks associated with the consumption of massreared insects. Hg. v. Netherlands Food and

Consumer Product Safety Authority. Ministry of Economic Affairs. Utrecht The Netherlands.

Doellinger, Joerg; Schneider, Andy; Stark, Timo D.; Ehling-Schulz, Monika; Lasch, Peter (2020): Evaluation of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Cereulide From *Bacillus cereus* Cultures. In: *Frontiers in microbiology* 11, S. 511674. DOI: 10.3389/fmicb.2020.511674.

Döllinger, Jörg; Schneider, Andy; Stark, Timo; Ehling-Schulz, Monika; Lasch, Peter: Evaluation of MALDI-ToF Mass Spectrometry for Rapid Detection of Cereulide from *Bacillus cereus* Cultures. Supporting Information.

Dommel, Monica K.; Lücking, Genia; Scherer, Siegfried; Ehling-Schulz, Monika (2011): Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. In: *Food microbiology* 28 (2), S. 284–290. DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.001.

Ducrest, P. J.; Pfammatter, S.; Stephan, D.; Vogel, G.; Thibault, P.; Schnyder, B. (2019): Rapid detection of *Bacillus ionophore* cereulide in food products. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 5814. DOI: 10.1038/s41598-019-42167-0.

Durak, M. Zeki; Fromm, Hazel I.; Huck, Jason R.; Zadoks, Ruth N.; Boor, Kathryn J. (2006): Development of Molecular Typing Methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Isolated from Fluid Milk Products. In: *Journal of Food Science* 71 (2), M50-M56. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08907.x.

EFSA Scientific Committee (2015): Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. In: *EFSA Journal* 13 (10), S. 4257. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4257.

Ehling-Schulz, Monika; Vukov, Natasa; Schulz, Anja; Shaheen, Ranad; Andersson, Maria; Märklbauer, Erwin; Scherer, Siegfried (2005): Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (1), S. 105–113. DOI: 10.1128/AEM.71.1.105-113.2005.

TRBA 466, 2015: Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen.

Europäische Kommission (01.06.2021): DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2021/882 DER KOMMISSION vom 1. Juni 2021 zur Genehmigung des

Inverkehrbringens getrockneter Larven von *Tenebrio molitor* als neuartiges Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates sowie zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission. Fundstelle: Amtsblatt der Europäischen Union.

Europäisches Parlament und Rat (28.01.2002): Verordnung Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, Lebensmittelbasisverordnung. Fundstelle: ABl. L 31 vom 1.2.2002, S. 1–24. In: EGV.

Europäisches Parlament und Rat (15.11.2005): VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Fundstelle: Amtsblatt der Europäischen Union, Anhang I Kapitel 1.1 bis 1.3. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=de>, zuletzt geprüft am 21.07.2021.

Evans, J.; Alemu, M. H.; Flore, R.; Frøst, M. B.; Halloran, A.; Jensen, A. B. et al. (2015): 'Entomophagy': an evolving terminology in need of review. In: *Journal of Insects as Food and Feed* 1 (4), S. 293–305. DOI: 10.3920/JIFF2015.0074.

FASFC's Scientific Committee (Hg.) (2014): Food safety aspects of insects intended for human consumption. Superior Health Council. Belgien. Online verfügbar unter <https://bit.ly/2VtReB5>.

Fasolato, Luca; Cardazzo, Barbara; Carraro, Lisa; Fontana, Federico; Novelli, Enrico; Balzan, Stefania (2018): Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the *Bacillus cereus* group. In: *Food microbiology* 76, S. 296–303. DOI: 10.1016/j.fm.2018.06.008.

Fernández-No, I. C.; Böhme, K.; Díaz-Bao, M.; Cepeda, A.; Barros-Velázquez, J.; Calo-Mata, P. (2013): Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. In: *Food microbiology* 33 (2), S. 235–242. DOI: 10.1016/j.fm.2012.09.022.

Fiedoruk, Krzysztof; Daniluk, Tamara; Fiodor, Angelika; Drewicka, Ewa; Buczynska, Katarzyna; Leszczynska, Katarzyna et al. (2016): MALDI-TOF MS portrait of emetic

and non-emetic *Bacillus cereus* group members. In: *Electrophoresis* 37 (15-16), S. 2235–2247. DOI: 10.1002/elps.201500308.

French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) (12.05.2015): Opinion of ANSES on "the use of insects as food and feed and the review of scientific knowledge on the health risks related to the consumption of insects". Maisons-Alfort, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94701 Maisons-Alfort Cedex. Online verfügbar unter <https://www.anses.fr/en/system/files/BIORISK2014sa0153EN.pdf>, zuletzt geprüft am 26.07.2021.

Frentzel, Hendrik (2021): Aktuelles aus dem Labor für Sporenbildner. Wissenschaftliches Symposium der mikrobiologischen Nationalen Referenzlaboratorien und Konsiliarlabore. Labor für Sporenbildner. Bundesinstitut Für Risikobewertung. Berlin, 15.06.2021.

Fricker, Martina; Messelhäuser, Ute; Busch, Ulrich; Scherer, Siegfried; Ehling-Schulz, Monika (2007): Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (6), S. 1892–1898. DOI: 10.1128/AEM.02219-06.

Gallegos-Candela, Maribel; Boyer, Anne E.; Woolfitt, Adrian R.; Brumlow, Judy; Lins, Renato C.; Quinn, Conrad P. et al. (2018): Validated MALDI-TOF-MS method for anthrax lethal factor provides early diagnosis and evaluation of therapeutics. In: *Analytical biochemistry* 543, S. 97–107. DOI: 10.1016/j.ab.2017.12.007.

Garofalo, Cristiana; Milanović, Vesna; Cardinali, Federica; Aquilanti, Lucia; Clementi, Francesca; Osimani, Andrea (2019): Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. In: *Food research international (Ottawa, Ont.)* 125, S. 108527. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108527.

Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Hg.) (2015): Summary of applications and notifications. Summary of the applications submitted within the meaning of Article 10(1) of Regulation (EU) 2015/2283. Europäische Kommission. Online verfügbar unter https://ec.europa.eu/food/food/novel-food/authorisations/summary-applications-and-notifications_de, zuletzt geprüft am 20.07.2021.

- Grabowski, Nils Th; Klein, Günter (2017): Microbiology of processed edible insect products - Results of a preliminary survey. In: *International journal of food microbiology* 243, S. 103–107. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.005.
- Gross, Jürgen H. (2013): Massenspektrometrie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Guinebretière, Marie-Hélène; Thompson, Fabiano L.; Sorokin, Alexei; Normand, Philippe; Dawyndt, Peter; Ehling-Schulz, Monika et al. (2008): Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. In: *Environmental microbiology* 10 (4), S. 851–865. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x.
- Hägglblom, Max M.; Apetroaie, Camelia; Andersson, Maria A.; Salkinoja-Salonen, Mirja S. (2002): Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 68 (5), S. 2479–2483. DOI: 10.1128/AEM.68.5.2479–2483.2002.
- Hernández-Flores, L.; Llanderal-Cázares, C.; Guzmán-Franco, A. W.; Aranda-Ocampo, S. (2015): Bacteria Present in *Comadia redtenbacheri* Larvae (Lepidoptera: Cossidae). In: *Journal of medical entomology* 52 (5), S. 1150–1158. DOI: 10.1093/jme/tjv099.
- Hillenkamp, Franz; Peter-Katalinic, Jasna (2013): MALDI MS - A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications. Weinheim: Wiley-Blackwell.
- Hoorfar, J.; Malorny, B.; Abdulmawjood, A.; Cook, N.; Wagner, M.; Fach, P. (2004): Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. In: *Journal of clinical microbiology* 42 (5), S. 1863–1868. DOI: 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004.
- Hoton, Florence M.; Fornelos, Nadine; N'guessan, Elise; Hu, Xiaomin; Swiecicka, Izabela; Dierick, Katelijne et al. (2009): Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains. In: *Environmental microbiology reports* 1 (3), S. 177–183. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00028.x.
- Huang, Chien-Hsun; Huang, Lina; Chang, Mu-Tzu; Chen, Kuo-Lung (2016): Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of *Bacillus subtilis* group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology. In: *Molecular and cellular probes* 30 (5), S. 312–319. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.08.002.

Jongema, Yde (2017): List of edible insects of the world. Hg. v. Universität Wageningen. Laboratory of Entomology. Wageningen. Online verfügbar unter <https://bit.ly/38XequQ>, zuletzt aktualisiert am 01.04.2017, zuletzt geprüft am 21.07.2021.

Karas, Michael.; Bachmann, Doris.; Hillenkamp, Franz. (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. In: *Analytical chemistry* 57 (14), S. 2935–2939. DOI: 10.1021/ac00291a042.

Khamis, Atieh; Raoult, Didier; La Scola, Bernard (2004): rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. In: *Journal of clinical microbiology* 42 (9), S. 3925–3931. DOI: 10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004.

Kranzler, Markus; Stollewerk, Katharina; Rouzeau-Szynalski, Katia; Blayo, Laurence; Sulyok, Michael; Ehling-Schulz, Monika (2016): Temperature Exerts Control of *Bacillus cereus* Emetic Toxin Production on Post-transcriptional Levels. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1640. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01640.

Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Molecular aspects of medicine* 27 (2-3), S. 95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007.

Lasch, Peter; Wahab, Tara; Weil, Sandra; Pályi, Bernadett; Tomaso, Herbert; Zange, Sabine et al. (2015): Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. In: *Journal of clinical microbiology* 53 (8), S. 2632–2640. DOI: 10.1128/JCM.00813-15.

Liu, Yang; Du, Juan; Lai, Qiliang; Zeng, Runying; Ye, Dezan; Xu, Jun; Shao, Zongze (2017): Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67 (8), S. 2499–2508. DOI: 10.1099/ijsem.0.001821.

Liu, Yang; Lai, Qiliang; Göker, Markus; Meier-Kolthoff, Jan P.; Wang, Meng; Sun, Yamin et al. (2015): Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. In: *Scientific reports* 5, S. 14082. DOI: 10.1038/srep14082.

Liu, Yang; Lai, Qiliang; Shao, Zongze (2018): Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*.

In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 68 (1), S. 106–112. DOI: 10.1099/ijsem.0.002466.

Mäde, Dietrich; Reiting, R.; Strauch, E.; Ketteritzsch, K.; Wicke, A. (2008): A real-time PCR for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food combined with an Universal Internal Amplification Control System. In: *J. Verbr. Lebensm.* 3 (2), S. 141–151. DOI: 10.1007/s00003-008-0341-9.

Maier, Thomas; Klepel, Stefan; Renner, Uwe; Kostrzewa, Markus (2006): Fast and reliable MALDI-TOF MS–based microorganism identification. In: *Nat Methods* 3 (4), S. i–ii. DOI: 10.1038/nmeth870.

Marxen, Sandra; Stark, Timo D.; Frenzel, Elrike; Rüttschle, Andrea; Lücking, Genia; Pürstinger, Gabriel et al. (2015): Chemodiversity of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 407 (9), S. 2439–2453. DOI: 10.1007/s00216-015-8511-y.

Messelhäußer, U.; Ehling-Schulz, P.D.M. (2014): *Bacillus cereus*: Vorkommen, Nachweis und Präventionsstrategien: Behr's Verlag DE (Pathogene Mikroorganismen). Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=AEM3BAAAQBAJ>.

Messelhäusser, Ute; Frenzel, Elrike; Blöching, Claudia; Zucker, Renate; Kämpf, Peter; Ehling-Schulz, Monika (2014): Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). In: *BioMed research international* 2014, S. 465603. DOI: 10.1155/2014/465603.

DIN EN ISO 7932:2020-11, 2020-11: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln.

DIN EN ISO 7932:2005-03, 2005-03: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln.

Mülhardt, Cornel (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Der Experimentator).

Müller, Hans-Joachim; Prange, Daniel Ruben (2016): *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. 2. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Müller-Esterl, Werner (2018): Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Parchen, R. G.; Valk, C. G. de (2019): The Ongoing Revolution of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Molecular Diagnostics. In: E. van Pelt-Verkuil, W. B. van Leeuwen und R. te Witt (Hg.): Molecular Diagnostics. Singapore: Springer Singapore, S. 387–409.

Rajkovic, A.; Uyttendaele, M.; Vermeulen, A.; Andjelkovic, M.; Fitz-James, I.; Veld, P. in 't et al. (2008): Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. In: *Letters in applied microbiology* 46 (5), S. 536–541. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02350.x.

Rajkovic, Andreja; Uyttendaele, Mieke; Ombregt, Sylvie-Anne; Jaaskelainen, Elina; Salkinoja-Salonen, Mirja; Debevere, Johan (2006): Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. In: *Journal of food protection* 69 (4), S. 847–852. DOI: 10.4315/0362-028x-69.4.847.

Rouzeau-Szynalski, Katia; Stollewerk, Katharina; Messelhäusser, Ute; Ehling-Schulz, Monika (2020): Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. In: *Food microbiology* 85, S. 103279. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103279.

Rowland, G. C.; Aboshkiwa, M.; Coleman, G. (1993): Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of the DNA-dependent RNA polymerase beta subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. In: *Biochemical Society transactions* 21 (1), 40S. DOI: 10.1042/bst021040s.

Rumpold, Birgit A.; Schlüter, Oliver K. (2013): Nutritional composition and safety aspects of edible insects. In: *Molecular nutrition & food research* 57 (5), S. 802–823. DOI: 10.1002/mnfr.201200735.

Ryzhov, V.; Fenselau, C. (2001): Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. In: *Analytical chemistry* 73 (4), S. 746–750. DOI: 10.1021/ac0008791.

Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science (New York, N.Y.)* 230 (4732), S. 1350–1354. DOI: 10.1126/science.2999980.

Spectrum Instrumentation GmbH (Hg.) (2021): Moderne Digitizer in der Massenspektrometrie. Application Note. Online verfügbar unter https://spectrum-instrumentation.com/sites/default/files/download/an_massenspektroskopie.pdf, zuletzt geprüft am 31.08.2021.

Stark, Timo; Marxen, Sandra; Rüttschle, Andrea; Lücking, Genia; Scherer, Siegfried; Ehling-Schulz, Monika; Hofmann, Thomas (2013): Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEP-2 bioassay. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (1), S. 191–201. DOI: 10.1007/s00216-012-6485-6.

Stępień-Pyśniak, Dagmara; Hauschild, Tomasz; Róžański, Paweł; Marek, Agnieszka (2017): MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Useful Tool for Identification of *Enterococcus* spp. from Wild Birds and Differentiation of Closely Related Species. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 27 (6), S. 1128–1137. DOI: 10.4014/jmb.1612.12036.

Thorsen, Line; Budde, Birgitte Bjørn; Henrichsen, Lars; Martinussen, Torben; Jakobsen, Mogens (2009): Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. In: *International journal of food microbiology* 134 (1-2), S. 133–139. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.023.

Ulrich, Sebastian; Gottschalk, Christoph; Dietrich, Richard; Märtlbauer, Erwin; Gareis, Manfred (2019): Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. In: *Food microbiology* 82, S. 75–81. DOI: 10.1016/j.fm.2019.01.012.

Ulrich, Sebastian; Kühn, Ulrike; Biermaier, Barbara; Piacenza, Nicolo; Schwaiger, Karin; Gottschalk, Christoph; Gareis, Manfred (2017): Direct identification of edible insects by MALDI-TOF mass spectrometry. In: *Food Control* 76, S. 96–101. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.01.010.

UniProt Consortium (Hg.) (2021): UniProtKB - U6ECW5 (U6ECW5_9EURY). Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprot/U6ECW5>, zuletzt aktualisiert am 02.06.2021.

van Huis, Arnold; van Itterbeeck, Joost; Klunder, Harmke; Mertens, Esther; Halloran, Afton; Muir, Giulia; Vantomme, Paul (2013): Edible insects: future prospects for food

and feed security. In: *FAO Forestry Paper* 171. Online verfügbar unter <http://www.fao.org/3/i3253e/i3253e.pdf>, zuletzt geprüft am 21.07.2021.

Wahab, Tara; Hjalmarsson, Sandra; Wollin, Ralfh; Engstrand, Lars (2005): Pyrosequencing *Bacillus anthracis*. In: *Emerging infectious diseases* 11 (10), S. 1527–1531. DOI: 10.3201/eid1110.041316.

Wenig, Philip; Odermatt, Juergen (2010): OpenChrom: a cross-platform open source software for the mass spectrometric analysis of chromatographic data. In: *BMC bioinformatics* 11, S. 405. DOI: 10.1186/1471-2105-11-405.

Yasmon, Andi; ROSANA, YEVA; USMAN, DONI; INTA PRILANDARI, L. U.H.; HARTONO, TEGUH SARRY (2020): Short Communication: Identification and phylogenetic analysis of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from Jakarta, Indonesia based on partial *rpoB* gene. In: *Biodiversitas* 21 (7). DOI: 10.13057/biodiv/d210726.

Ye, Jian; Coulouris, George; Zaretskaya, Irena; Cutcutache, Ioana; Rozen, Steve; Madden, Thomas L. (2012): Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. In: *BMC bioinformatics* 13, S. 134. DOI: 10.1186/1471-2105-13-134.

ANHANG

A. SPEISEINSEKTEN

1. RECHTSLAGE

In der europäischen Union (EU) als Lebensmittel zugelassen ist seit Juni 2021 nur der Mehlwurm (*Tenebrio molitor* im Larvenstadium) in getrockneter Form (Europäische Kommission 01.06.2021). Der Antrag wurde von der SAS EAP Group unter Vertraulichkeit gestellt. Dementsprechend darf für die nächsten fünf Jahre nur der Antragsteller das zugelassene Produkt unter den im Antrag genannten Spezifikationen und Verwendungsbedingungen auf den Markt bringen. Da allerdings zwei weitere Anträge zur Vermarktung von Mehlwürmern vorliegen, dürfen diese von anderen Herstellern unter den genannten Bedingungen und Spezifikationen weiter verkauft werden (Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2015; Europäisches Parlament und Rat 15.11.2005). Generell ist die Zulassung von Insekten als Lebensmittel durch die Vorgaben der Verordnung 2015/2283 (sogenannte Novel-Food-Verordnung) geregelt, die seit dem 1. Januar 2018 in Kraft getreten ist. In den Verkehr gebracht werden dürfen Insekten allerdings erst nach einer Zulassung und Sicherheitsprüfung durch die Europäische Kommission und der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl. European Food Safety Authority (EFSA)). Das gilt auch für Speiseinsektenprodukte, die in Ländern außerhalb der EU bereits als traditionelle Speise etabliert sind. Hier ist der Zulassungsprozess verkürzt und wird über eine Meldung als traditionelles Lebensmittel aus einem Drittland ermöglicht. Produkte, die bereits vor dem 1. Januar 2018 auf dem Markt waren und mit Inkrafttreten der neuen Verordnung als Novel-Food gelten, dürfen weiter verkauft werden bis eine Entscheidung der Europäischen Kommission über die entsprechenden Anträge vorliegt. Dies gilt nur für die Speiseinsektenprodukte, für die vor dem 1. Januar 2019 ein Zulassungsantrag eingereicht wurde und auch nur, wenn die in den Anträgen genannten Spezifikationen und Verwendungsbedingungen gehalten werden (Europäisches Parlament und Rat 15.11.2005). Aufgrund dieser Regelung ist das Einbringen folgender Spezies in der jeweils beantragten Form auf den Markt der EU aktuell gestattet: Heimchen (*Acheta domestica*), Buffalowurm (*Alphitobius diaperinus* im Larvenstadium), Drohenbrut der Honigbiene (*Apis mellifera* im Puppenstadium), Kurzflügelgrille (*Gryllodes sigillatus*), Schwarze

Soldatenfliege (*Hermetia illucens* in Larvenstadium), Europäische Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) und der Mehlwurm (*Tenebrio molitor* im Larvenstadium) (Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 2015).

2. MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle A- 1: Prüfplan zur mikrobiologischen Untersuchung von Speiseinsekten im CVUA Freiburg.

Keimgruppe	Verfahren	Medium	Temperatur [°C]	Verdünnungsstufe	Verwendete Norm
β-Glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i>	Keimzählung Guss	gepuffertes Peptonwasser (PEP), Trypton-Galle-Glucuronid-Medium (TBX)	44	-1	(DIN ISO 16649-2:2009-12)
Präsumtive <i>Bacillus cereus</i>	Keimzählung Spatel	PEP, Mannitol-Eigelb-Polymyxin-Agar (MYP)	30	-1 -2	(DIN EN ISO 7932:2005-03)
Sulfatreduzierende Anaerobier	Keimzählung Guss	PEP, Eisen-Sulfit-Agar (ESU),	37	-1 -1	(ISO 15213:2003-05)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Keimzählung Spatel	PEP, Listerien-Agar nach Ottavian und Agosti (Vlaemynck	37	-1 -1 1 ml/3P Mit Hof Ohne Hof	(DIN EN ISO 11290-2:2017-09)

		et al. 2000) (ALOA)			
Koagulase- positive <i>Staphylokokken</i>	Keimzählung Guss	PEP, Kaninchenplasma/Fibrinogen-Agar (RPF)	37	-1 -2 -3	(DIN EN ISO 6888-2:2003-12)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Keimzählung Spatel	PEP, Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBG)	30	-1 -2 -3	(Technische Regel 06.00-24:2019-12)
Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl	Keimzählung Spiral	PEP, Plate-Count-Agar (PCA) (z.B. Fertigmedium von OXIOD Art.Nr. PO 5013A)	30	-1 -3	(DIN EN ISO 4833-2:2014-05)
Hefen und Schimmel	DG 18 Spatel	PEP, Dichloran 18% (Massekonzentration) Glycerol Agar (DG 18-Agar)	25	-1 -2	(ISO 21527-2:2008-07)
Gesamtkeimzahl anaerob	Direktausstrich	PEP CBL	37	-	(Die Bundesministerin für

					Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (09.11.2021)
--	--	--	--	--	--

Die Beschreibungen der jeweiligen Verfahren lassen sich der jeweils zitierten Norm entnehmen. Bei den beschriebenen Verdünnungsstufen handelt es sich um dezimale Verdünnungen. Hierfür werden die Proben jeweils in 1:10 Verdünnungsstufen in gepufferten Peptonwasser (PEP) eingewogen (-1 entspricht einer 1:10-, -2 einer 1:100-Verdünnung).

Die Verdünnung 1 mL/ 3 P bei der Keimgruppe *Listeria monocytogenes* beschreibt das Ausspateln von 1 mL des 1:10 verdünnten Lebensmittels auf drei Platten. Kommt es bei diesem Verfahren zur Hofbildung (mit Hof) deutet das auf eine Belastung mit *Listeria monocytogenes* hin. Wenn nicht (ohne Hof) kommen andere *Listeria spp.* in Frage (z.B. *L. innocua*, *L. ivanovii*) (DIN EN ISO 6579-1:2020-08).

Tabelle A- 2: Zusammensetzung Nähragar (1,6 % Agar).

Menge	Substanz
1000,0 mL	Einfach destilliertes Wasser
5,0 g	NaCl (Fa. Roth, Art.Nr. 9265)
1,0 g	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Fa. Merck, Art.Nr. 6580)
16,0 g	Agar (Fa. Oxoid, Art.Nr. LP011)
10,0 g	Neutralpepton (Fa. Oxoid, Art.Nr. L34)
8,0 g	Lab Lemco (Fa. Oxoid, Art.Nr. LP29)

Tabelle A- 3: Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Speiseinsekten vom CVUA Freiburg.

	Bacillus cereus praesumtiv (KEZ Sp MYP 30°C 24 h aerob) [KBE/g]	Sulfitreduzierende Anaerobier (KEZ Guß ESU 37°C 48 h anaerob) [KBE/g]	Aerobe mesophile Keime (KEZ Spi PCA 30°C 72 h aerob) [KBE/g]	Schimmelpilze (KEZ Sp DG18 25°C 72 h aerob) [KBE/g]	Gefundene Mikroorganismen
Probe	Wert	Wert	Wert	Wert	
1	n.b.	2,6E2	9,3E5	n.n.	<i>Enterococcus mundtii</i> (4/12), <i>Paenibacillus polymyxa</i> (1/12), <i>Bacillus cereus</i> (4/12), <i>Clostridium bifermentans</i> (2/12), <i>Enterococcus cloacae</i> (1/12)
2	n.n.	n.n.	1,4E3	n.n.	<i>Moraxella osloensis</i> (1/6), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> (1/6), <i>Enterococcus casseliflavus</i> (1/6), <i>Bacillus cereus</i> (2/6), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/6)
3	1,0E3	n.n.	n.b.	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (7/10), <i>Clostridium sporogenes</i> (1/10), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/10), <i>Staphylococcus warneri</i> (1/10)
4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<i>Enterococcus faecalis</i> (1/2), <i>Escherchia hermannii</i> (1/2)
5	n.n.	n.n.	3,0E3	n.n.	Mikroorganismen nicht eindeutig bestimmbar

6	n.n.	1,0E3	4,8E4	n.b.	<i>Bacillus licheniformis</i> (1/9), <i>Brevibacillus parabrevis</i> (1/9), <i>Enterococcus mundtii</i> (1/9), <i>Clostridium subterminale</i> (1/9), <i>Enterococcus casseliflavus</i> (1/9), <i>Clostridium bifermentans</i> (1/9), <i>Enterococcus mundtii</i> (1/9), <i>Clostridium bifermentans</i> (1/9)
7	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.	Mikroorganismen nicht eindeutig bestimmbar
8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1/2), <i>Leclercia adecarboxylata</i> (1/2)
9	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.	<i>Micrococcus luteus</i> (1/3), <i>Enterococcus durans</i> (1/3), <i>Klebsiella oxytoca</i> (1/3)
10	8,0E2	n.n.	1,4E3	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (7/9), <i>Enterococcus casseliflavus</i> (1/9), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1/9)
11	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (2/3), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/3)

12	n.n.	7,0E1	n.b.	n.n.	<i>Clostridium sporogenes</i> (3/7), <i>Enterobacter bugandensis</i> (1/7), <i>Enterobacter cloacea</i> (1/7), <i>Clostridium bifermentans</i> (1/7), <i>Enterococcus gallinarum</i> (1/7)
13	n.b.	n.n.	1,0E3	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (4/10), <i>Bacillus flexus</i> (1/10), <i>Acinetobacter lwofii</i> (1/10), <i>Paenibacillus</i> sp. (1/10), <i>Micrococcus lutus</i> (2/10), <i>Enterobacter cloacae</i> (1/10)
14	n.n.	n.n.	5,5E4	n.n.	<i>Enterococcus gallinarum</i> (1/2), <i>Bacillus cereus</i> (1/2)
15	n.n.	n.n.	n.b.	n.b.	<i>Enterococcus faecium</i> (1/3), <i>Enterococcus gallinarum</i> (2/3)
16	n.n.	n.n.	1,8E4	n.n.	<i>Clostridium sporogenes</i> (3/10), <i>Bacillus cereus</i> (2/10), <i>Paenibacillus stellifer</i> (1/10)
17	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.	<i>Bacillus pumilus</i> (1/10), <i>Bacillus circulans</i> (1/10), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/10), <i>Clostridium perfringens</i> (1/10)
18	1,0E4	n.b.	1,0E5	n.n.	<i>Bacillus licheniformis</i> (1/5), <i>Bacillus cereus</i> (4/5)

19	n.b.	n.n.	8,0E4	n.n.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> (3/7), <i>Bacillus subtilis</i> (3/7), <i>Clostridium sporogenes</i> (1/7)
20	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (1/1)
21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (1/3), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/3), <i>Staphyococcus warneri</i> (1/3)
22	n.n.	n.n.	n.b.	n.n.	<i>Bacillus cereus</i> (1/2), <i>Bacillus licheniformis</i> (1/2)

Tabelle A- 4: Übersicht aller gewonnenen Isolate mit jeweiligen Medium, Speiseinsektenprodukt Nummer (s. Tabelle A- 5), dem Ergebnis der MALDI-ToF-MS-Speziesidentifikation und jeweils errechnetem Score des Ergebnisses. Dargestellt ist auch das Ergebnis der rpoB Sequenzierung, sofern diese durchgeführt wurde.

ID	Medium (mit Verdünnungsstufe)	Produktnr.	MALDI-ToF-MS-Ergebnis	Score	Ergebnis rpoB Sequenzierung
1	ESU I	1	<i>Clostridium sporogenes</i>	2,09	
2	ESU I				
3	ESU I		<i>Clostridium sporogenes</i>	2,25	
4	ESU II		<i>Clostridium sporogenes</i>	2,19	
5	ESU II		<i>Enterobacter bugandensis</i>	2,29	
6	PEP		<i>Enterobacter cloacae</i>	2,43	
7	PEP		<i>Clostridium bifermentans</i>	2,25	
8	PEP		<i>Enterococcus gallinarum</i>	2,28	
9	PC -1		not reliable ident.	1,57	<i>Bacillus subtilis</i>
10	PC -3		not reliable ident.	1,64	
11	PC -1	2	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,06	
12	PC -1		<i>Brevibacillus parabrevis</i>	2,1	

13	PC -3		Enterococcus mundtii	2,3	
14	PC -3		Brevibacillus centrosporus	1,85	Bacillus sp. NSP2.1 (96,2%); Brevibacillus agri strain DSM 6348 (95,4%)
15	PEP		Clostridium subterminale	2,14	
16	PEP		Enterococcus casseliflavus	2,39	
17	PEP		Clostridium bifermentans	2,27	
18	PEP		Enterococcus mundtii	2,38	
19	ESU II		Enterococcus mundtii	2,39	
20	ESU II		Clostridium bifermentans	2,24	
21	PC -1	3	Bacillus mycoides	2,02	Bacillus wiedmannii
22	MYP		Bacillus cereus	2,4	B. pacificus oder paranthracis
23	MYP		Bacillus cereus	2,31	
24	MYP		Bacillus cereus	2,31	
25	MYP		Bacillus cereus	2,37	
26	MYP		Bacillus cereus	2,39	
27	PEP		Clostridium sporogenes	2,39	
28	PEP		Enterococcus faecium	1,75	Enterococcus lactis oder faecium
29	PEP		Enterococcus faecium	1,75	
30	PC -3	4	Enterococcus mundtii	2,46	
31	PC -3		Enterococcus mundtii	2,43	
32	PC -3		Brevibacillus agri	1,83	Bacillus sp. NSP2.1 (96%); Brevibacillus agri strain DSM 6348 (95,2%)
33	PC -3		Paenibacillus polymyxa	2,1	
34	PC -3		Paenibacillus azoreducens	1,87	Paenibacillus stellifer strain DSM 14472 bzw. Sabinae T27 beide 94,6% zu Paenibacillus sp. 93,8%

35	MYP		Bacillus cereus	2,36	B. pacificus oder paranthracis
36	MYP		Bacillus cereus	2,34	
37	MYP		Bacillus cereus	2,22	
38	ESU I		Enterococcus mundtii	2,28	
39	ESU I		Clostridium bifermentans	2,27	
40	PEP		Clostridium bifermentans	2,24	
41	PEP		Enterobacter cloacae	2,29	
42	PEP		Enterococcus mundtii	2,41	
43	PC -1		Bacillus cereus	2,22	
44	PEP	5	Bacillus cereus	2,4	B. cereus
45	PEP		Bacillus circulans	1,88	Bacillus circulans
46	RPF -3		Bacillus licheniformis	2,08	
47	RPF -3		not reliable ident.	1,43	Bacillus subtilis
48	MYP -2sp		Bacillus cytotoxicus	2,18	Bacillus cytotoxicus
49	MYP -2sp				
50	MYP -2sp		Bacillus cytotoxicus	2,28	
51	MYP -2sp		Bacillus cytotoxicus	2,29	
52	MYP -2sp	6	Bacillus cytotoxicus	2,2	
53	MYP -2sp		not reliable ident.	1,48	Bacillus subtilis
54	MYP -2sp		not reliable ident.	1,42	Bacillus paralicheniformis
55	COL		Bacillus licheniformis	1,82	Bacillus paralicheniformis
56	ESU -1		Bacillus cytotoxicus		
57	ESU -1		Bacillus cytotoxicus		
58	PC -1		Bacillus pumilus	1,78	Bacillus altitudinis
59	PC -1	7	Micrococcus luteus	2,4	
60	PEP		Enterococcus durans	2,24	
61	PEP		Klebsiella oxytoca	2,43	
62	PC -1	8	not reliable ident.	1,46	Bacillus subtilis

63	PC -1		Brevibacillus agri	1,95	Bacillus sp. NSP2.1 (96,2%); Brevibacillus agri strain DSM 6348 (95,4%)
64	PC -1		Paenibacillus azoreducens	1,7	Paenibacillus stellifer strain DSM 14472 bzw. Sabinae T27 beide 94,6% zu Paenibacillus sp. 93,8%
65	PEP		Lactococcus lactis	1,73	keine Bande im E-Gel --> nicht sequenziert
66	PC	9	Bacillus sp.	1,84	Bacillus safensis
67	PEP		Enterococcus faecium	1,76	
68	PEP	10	Enterococcus casseliflavus	2,45	
69	PEP		Leclercia adecarboxylata	2,49	
70	PC -1	11	Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	1,72	Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum (Synonom für Bacillus velezensis)
71	PC -1		not reliable ident.	1,3	Bacillus subtilis
72	PC -1		Moraxella osloensis	2,07	
73	MYP -1		Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	2,05	
74	PEP		Enterococcus casseliflavus	2,27	
75	PEP		Bacillus cereus	2,38	Bacillus cereus oder thuringiensis
76	PEP	12	Enterococcus faecalis	2,26	
77	PEP		Escherichia hermannii	2,51	
78	PEP	13	Enterococcus faecium	2,27	
79	PEP		Enterococcus gallinarum	2,3	
80	PEP		Enterococcus gallinarum	2,35	
81	MYP -1sp	14	Bacillus cereus	2,19	Bacillus cereus oder toyonensis

82	MYP -1sp		Bacillus cereus	2,25	
83	MYP -1sp		Bacillus cereus	2,33	
84	PC		Bacillus flexus	2,29	
85	PC		Acinetobacter lwoffii	2,31	
86	PC		Paenibacillus sp	2,16	
87	PC		Bacillus cereus	2,11	
88	PC		Lysinibacillus xylanilyticus	1,94	Paenibacillus sp. (nur 94% Übereinstimmung)
141	PC-3		Micrococcus luteus	2,47	Ent
142	PC-3		Micrococcus luteus	2,49	
89	PEP		Enterobacter cloacae	2,54	
90	MYP -1	15	Bacillus cereus	2,12	Bacillus cereus oder toyonensis
91	MYP -1		Bacillus cereus	2,18	
92	MYP -1		Bacillus cereus	2,18	
93	MYP -1		Bacillus cereus	2,17	
94	MYP -1		Bacillus cereus	2,23	
95	MYP -2		Bacillus cereus	2,24	
96	PC -1		Bacillus cereus	2,2	
97	PEP		Enterococcus casseliflavus	2,35	
98	PEP		Klebsiella pneumoniae	2,49	
99	Pc -1	16	not reliable ident.	1,64	Enterococcus faecium
100	Pc -1		Glutamicibacter protophormiae	1,85	Arthrobacter sp. (97,5%), Glutamicibacter protophormiae (95,9%), Glutamicibacter nicotianae (95,8%)
101	Pc -1		Brevibacillus centrosporus	1,86	Bacillus sp. NSP2.1 (95,7%); Brevibacillus agri strain DSM 6348 (95,2%)
102	PEP		Enterococcus gallinarum	2,28	

103	PEP		Bacillus cereus	2,47	B. paranthracis oder pacificus
104	MYP				
105	MYP				
106	MYP		not reliable ident.	1,5	
107	MYP		Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	2,1	Bacillus velezensis (überwiegend) oder amyloliquefaciens oder methylophilus alle 100%
108	MYP		Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	2,08	
109	RPF -2		Bacillus subtilis	1,81	Bacillus subtilis
109 2					Bacillus subtilis
110	RPF -2	17	Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	1,75	Bacillus subtilis
111	RPF -2		Bacillus subtilis	2,22	Bacillus subtilis
112	RPF -2		Bacillus subtilis	2,29	
113	RPF -2		Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	2,38	
114	RPF -2		Bacillus amyloliquefaciens_ssp_planatarum	1,82	
115	RPF -2		Bacillus subtilis	2,04	
116	PAL		Bacillus pumilus	1,88	Bacillus safensis
117	PAL		Bacillus pumilus	1,97	
118	COL		Clostridium sporogenes	2,39	
119	COL	18	Clostridium sporogenes	2,23	
120	COL		Clostridium sporogenes	2,19	
121	COL		Bacillus sp	1,91	
122	COL		Clostridium sporogenes	2,18	
123	PAL F1		Bacillus cereus	2,56	B. paranthracis oder pacificus
124	PC		Bacillus cereus	2,51	

125	PC		not reliable ident.	1,45	nicht angewachsen
126	PC		not reliable ident.		Bacillus circulans
127	PC			1,59	Bacillus circulans
128	PC		Paenibacillus stellifer	2,37	
129	PAL		Bacillus pumilus	2,11	
130	PAL		Bacillus sporothermodurans	1,84	Bacillus vini (99,5%) sporothermodurans (95,3%)
131	PAL		Bacillus sporothermodurans	1,85	
132	OCCLA		Bacillus sporothermodurans	1,98	
133	OCCLA		Bacillus circulans	2,11	
134	PC -1		Bacillus licheniformis	2,17	
135	COL		Clostridium perfringens	2,52	
136	COL	20	Bacillus cereus	2,48	Bacillus cereus oder toyonensis
137	COL		Bacillus cereus	3,31	B. paranthracis oder pacificus
138	PC	21	Bacillus licheniformis	2,11	
139	RPF		Staphylococcus warneri	2,24	
140	PEP		Bacillus cereus	2,44	B. paranthracis oder pacificus
143	PC -1	22	Bacillus licheniformis	2,16	

3. LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG

Tabelle A- 5: Ergebnisse der Lebensmitteluntersuchungen der Speiseinsekten vom CVUA Freiburg.

		Maldi Ergebnis		Wasser (61 Gesamtwassergehalt A1) [g/100 g]	Fett (61 Fett (Weib II) A) [g/100 g]	Rohprotein (61 Rohprotein A) [g/100 g]	Natriumchlorid (bestimmt über Chlorid) (61 Kochsalzgehalt A) [g/100 g]
--	--	-------------------	--	--	---	---	---

Prob e	Probenbezeichn ung lt. PEB	Wert	Verarbeitung	Wert	Wert	Wert	Wert
1	Insektenmehl	Alphitobi us spp. positiv	Mehl	4,9	27,14	54,34	0,94
2	Mehlwürmer	Tenebrio molitor positiv	Gefriergetrockn et, gewürzt, ganze Insekten	2,3	25,25	53,24	2,99
3	Würmchen- Pulver		Mehl	3,6	32,09	52,30	0,84
4	Heimchenmehl	Acheta spp. positiv	Mehl	3,2	22,89	61,83	0,93
5	Insektenmehl aus Buffalowürmer	Alphitobi us diaperinu s positiv	Mehl	1,6	26,67	57,91	0,79
6	Insektenmehl aus Buffalowürmern	nicht auswertb ar	Mehl	5,7	27,17	54,26	
7	Mehlwürmer	Tenebrio molitor positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	5,2	19,46	58,12	1,15
8	gefriergetr. Mehlwürmer	Tenebrio molitor positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	4,4	27,39	52,85	0,97
9	Mehlwürmer	Tenebrio molitor positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	6,2	15,66	61,86	1,18
10	Heimchen	nicht auswertb ar	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	8,1	17,47	62,52	1,61
11	Große Heuschrecken	Locusta migratori a positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	4,6	25,30	53,48	0,64

12	gemahlene Buffalowürmer	Alphitobi us diaperinu s positiv	Mehl	6,4		55,61	
13	Grillen	Acheta domestic us positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	3,1	25,30	59,71	
14	Buffalowürmer	Alphitobi us diaperinu s positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	4,5	25,20	56,33	0,89
15	Mehlwurm	Tenebrio molitor positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	4,3	21,33	55,31	1,15
16	Palmwürmer Rhynchophorus Ferrugineus	für DB- Eintrag verwend et	Gefriergetrockn et, ganze Insekten				
17	Palmwürmer Rhynchophorus Ferrugineus	für DB- Eintrag verwend et	Gefriergetrockn et, ganze Insekten				
18	Käfer Juni Phyllophaga	für DB- Eintrag verwend et	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	9,7	7,09	63,88	1,07
19	Heimchen	Acheta domestic us positiv	Gefriergetrockn et, ganze Insekten	4,0	22,25	60,99	1,25
20	ganze geröstete Heimchen	Acheta domestic us positiv	Geröstet, ganze Insekten	3,4	25,9	59,71	6,4
21	Heimchen in weißer Schokolade	Acheta domestic us positiv	Gefriergetrockn et, in weißer Schokolade und Joghurtzubereit ung	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
22	gewürzte, getrocknete Speisegrillen	Acheta domestic us positiv	Gefriergetrockn et, gewürzt, ganze Insekten	4,7	31,21	51,63	1,62

B. SEQUENZANALYSE

Tabelle B- 1: Typ-Stamm- und Genombezeichnungen der 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen zusammengestellt vom BfR.

Name Typ-Stamm	Genombezeichnung
<i>Bacillus albus</i> N35-10-2	MAOE01000001 - MAOE01000142
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	NC_003997
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	NC_004721 - NC_004722.1
<i>Bacillus cytotoxicus</i> NVH 391 98	NC_009673.1 - NC_009674.1
<i>Bacillus luti</i> TD41	NZ_MACI01000001.1 - NZ_MACI01000099.1
<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1	NZ_MACF01000001.1 - NZ_MACF01000152.1
<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048	NZ_CM000742.1
<i>Bacillus nitratreducens</i> 4049	NZ_MAOC01000001.1 - NZ_MAOC01000101.1
<i>Bacillus pacificus</i> EB422	NZ_MACD01000001.1 - NZ_MACD01000102.1
<i>Bacillus paramycoides</i> NH24A2	NZ_MAOI01000001.1 - NZ_MAOI01000144.1
<i>Bacillus paranthracis</i> MN5	NZ_MACE01000001.1 - NZ_MACE01000091.1
<i>Bacillus proteolyticus</i> TD 42	NZ_MACH01000001.1 - NZ_MACH01000170.1
<i>Bacillus pseudomycoides</i> DSM 12442	NZ_CM000745.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar berliner ATCC 10792	NZ_CM000753.1
<i>Bacillus toyonensis</i> BCT 7112	NC_022781.1 - NC_022783.1
<i>Bacillus tropicus</i> N24	NZ_MACG01000001.1 - NZ_MACG01000078.1
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> WSBC 10204	NZ_CP009746.1
<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8 0169	NZ_LOBC01000001.1 - NZ_LOBC01000104.1

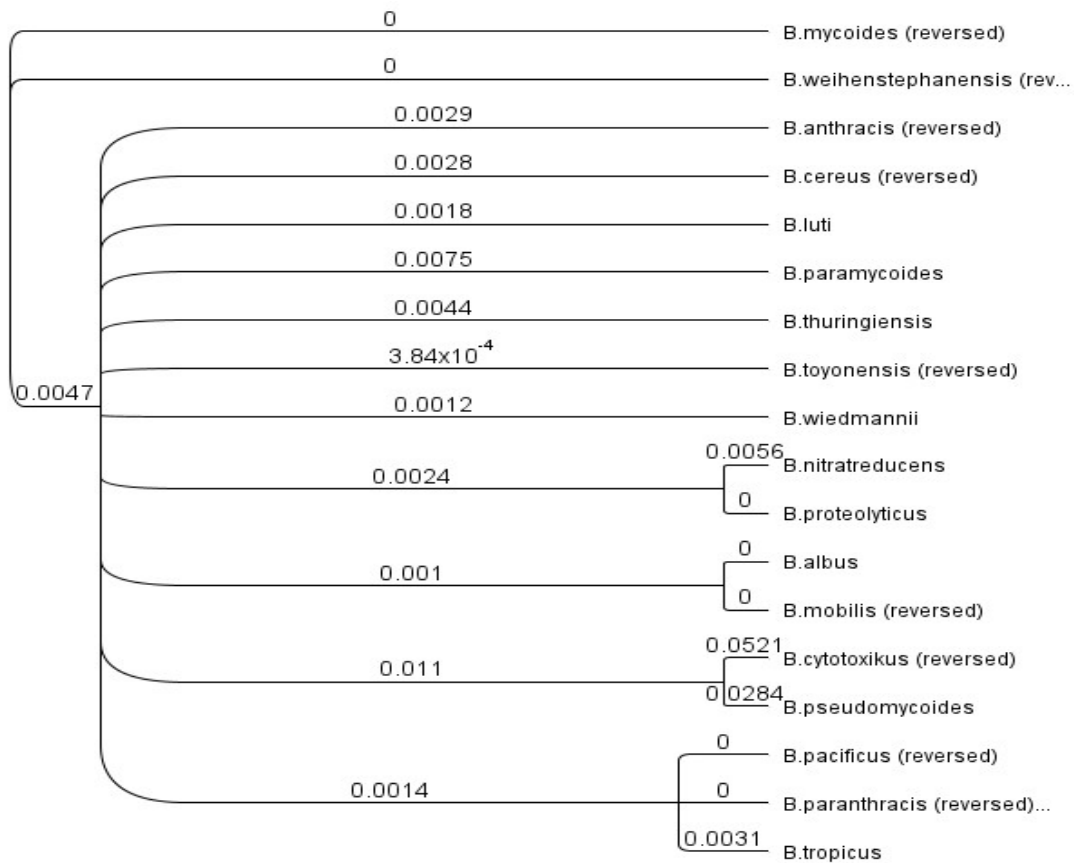


Abbildung B- 1: Phylogenetischer Baum der 18 untersuchten *rpoB* PCR-Produkte der *Bacillus cereus* Gruppe. Vollgenomsequenzen zur Verfügung gestellt vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Dargestellt sind die Substitutions per Site (Anzahl an Unterschieden geteilt durch die Länge der Sequenz).

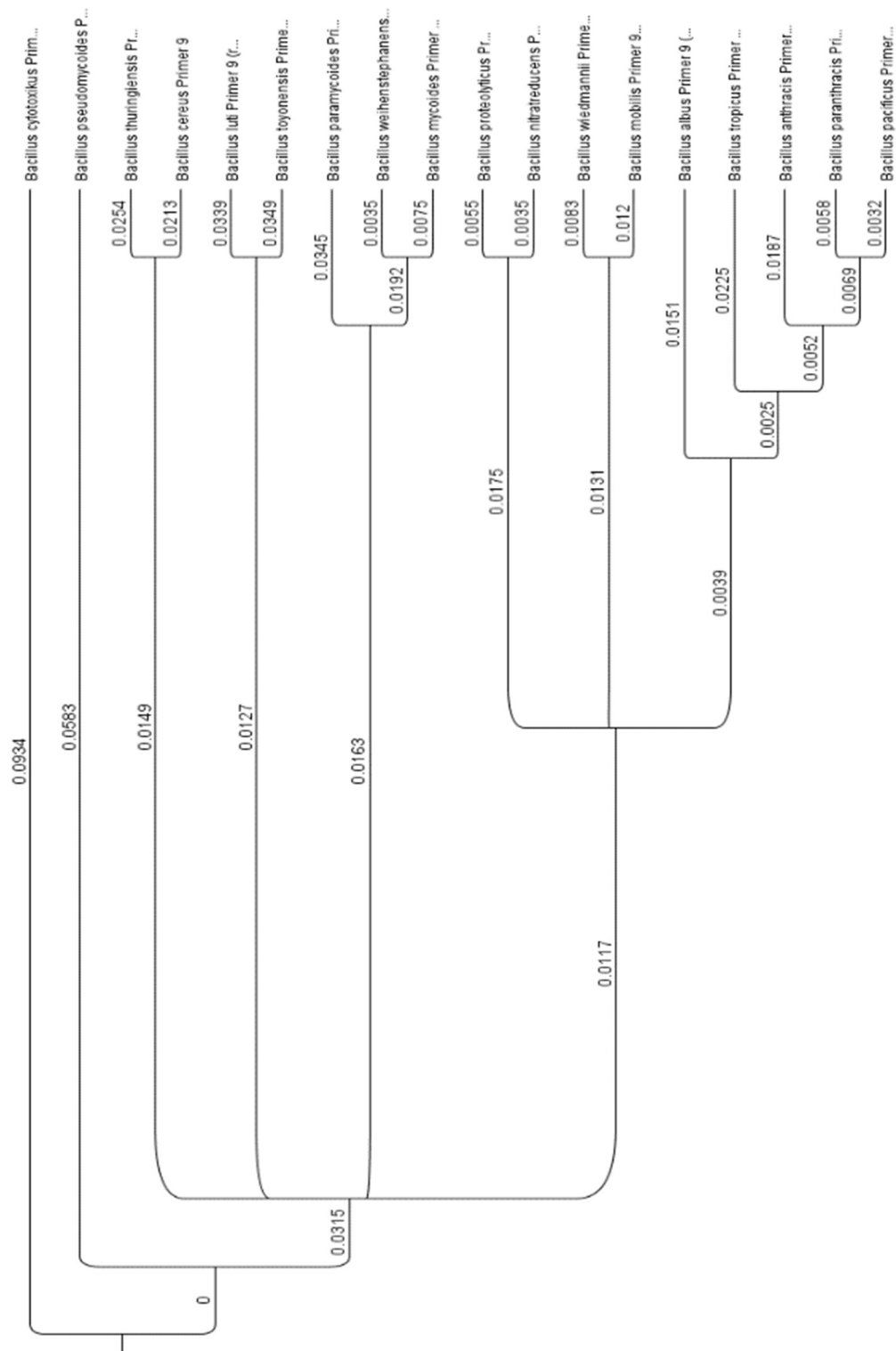


Abbildung B- 2: Phylogenetischer Baum der 18 untersuchten *pycA* PCR-Produkte der *Bacillus cereus* Gruppe. Vollgenomsequenzen zur Verfügung gestellt vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Erstellt mit neuer designten Primern. Dargestellt sind die Substitutions per Site (Anzahl an Unterschieden geteilt durch die Länge der Sequenz).

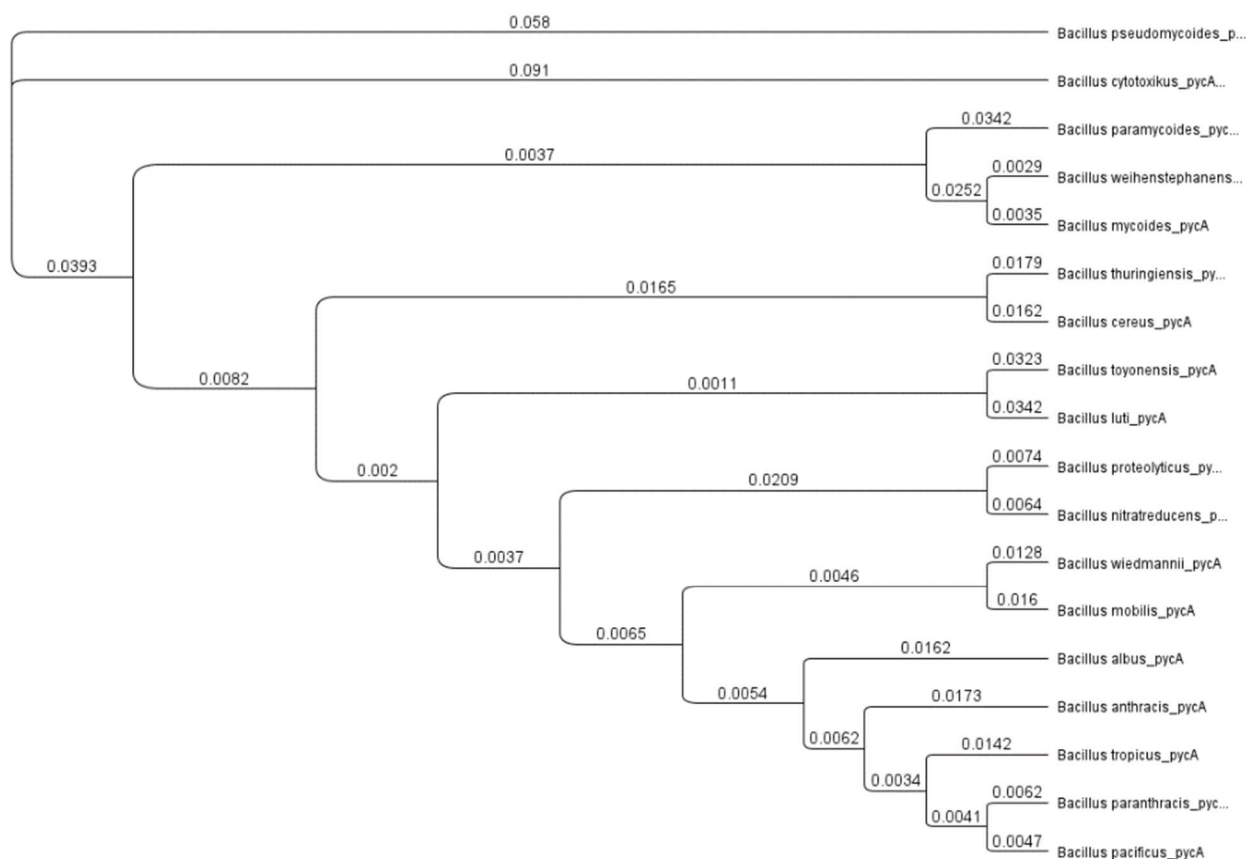


Abbildung B- 3: Phylogenetische Bäume der 18 *Bacillus cereus* Referenzsequenzen (zur Verfügung gestellt vom Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR]). Vergleich des gesamten *pycA* Gens. Dargestellt sind die Substitutions per Site (Anzahl an Unterschieden geteilt durch die Länge der Sequenz).

Tabelle B- 2: Ergebnisse der *rpoB* Sequenzierung. In Klammern hinter Speziesbezeichnung: Genombezeichnung. Dargestellt ist der von BLAST ausgegebene Bit-Score sowie der Grad der Übereinstimmung (Grade). Verglichen gegen Nucleotide collection (NCBI Ausgabe) und eigens erstellte *Bacillus cereus* Datenbank basierend auf 18 Referenzsequenzen.

ID	NCBI Ausgabe	Bit-Score (Grade)	<i>Bacillus cereus</i> Datenbank Ausgabe	Bit-Score (Grade)
21	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP035727)	579,122	<i>Bacillus wiedmannii</i>	579,122
	<i>Bacillus wiedmannii</i> (100%)			(100%)
	(CP032365)			

	<i>Bacillus wiedmannii</i> biovar <i>thuringiensis</i> (CP024684)		
		573,582	
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP041071) (99,8%)	<i>Bacillus mobilis</i> 573,582 (99,8%)	
		<i>Bacillus albus</i>	
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i> 580,968 (100%)	
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP070476)	<i>Bacillus pacificus</i>	
22	580,968 (100%)	575,428	
	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)	<i>Bacillus tropicus</i> (99,8%)	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP002508)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i> 579,122 (100%)	
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	<i>Bacillus pacificus</i>	
	579,122 (100%)	573,582	
35	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)	<i>Bacillus tropicus</i> (99,8%)	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP002508)		
	573,582		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP65743) (99,8%)		
	<i>Bacillus cereus</i> (CP065881)	<i>Bacillus paranthracis</i>	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> 580,968 (CP054568) (100%)	<i>Bacillus pacificus</i> 569,888 (99,7%)	
44	<i>Bacillus anthracis</i> (CP031643)	<i>Bacillus anthracis</i>	
	575,968	564,348	
	<i>Bacillus cereus</i> (CP000001) (99,8%)	<i>Bacillus wiedmannii</i> (99,5%)	
	<i>Bacillus cytotoxicus</i> 547,729 (CP066194) (99%)	<i>Bacillus cytotoxicus</i> (98,7%)	
48	<i>Bacillus anthracis</i> 481,249 (CP066168) (97,1%)	481,249 <i>Bacillus proteolyticus</i> (97,1%)	

75	<i>Bacillus cereus</i> (CP053997)	580,968	<i>Bacillus paranthracis</i>	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP053980)	(100%)		575,428
			<i>Bacillus pacificus</i>	(99,8%)
		575,428		
81	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	(99,8%)	<i>Bacillus anthracis</i>	
				569,888
			<i>Bacillus wiedmannii</i>	(99,7%)
90	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)		<i>Bacillus cereus</i>	573,582
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	573,582		(99,8%)
		(99,85)	<i>Bacillus toyonensis</i>	
				568,042
103	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)	579,122	<i>Bacillus toyonensis</i>	573,582
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	(100%)		(99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743)	573,582	<i>Bacillus cereus</i>	
		(99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
123	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	580,968
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	580,968		(100%)
		(100%)	<i>Bacillus pacificus</i>	
				575,968
136	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)		<i>Bacillus tropicus</i>	(99,8%)
		575, 428		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,8%)		
136	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	573,582
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	573,582		(99,8%)
		(99,8%)	<i>Bacillus pacificus</i>	
				568,042
136	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)		<i>Bacillus tropicus</i>	(99,7%)
		568,042		
136	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,7%)		
136	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)		<i>Bacillus toyonensis</i>	

	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	580,428 (100%)	<i>Bacillus cereus</i>	575,428 (99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743)	575,428 (99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	569,888 (99,7%)
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	575,428 (99,8%)		575,428 (99,8%)
137	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)		<i>Bacillus pacificus</i>	569,888
		569,888	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,7%)
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,7%)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	579,122 (100%)		579,122 (100%)
140	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)		<i>Bacillus pacificus</i>	573,582
		573,582	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,85%)
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,85%)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	580,968 (100%)		580,968 (100%)
BC 3	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)		<i>Bacillus pacificus</i>	575,428
		575,428	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,8%)		
	<i>Bacillus wiedmannii</i> (CP032365)	579,122 (100%)	<i>Bacillus wiedmannii</i>	579,122 (100%)
BC 5		573,582		573,582
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP041071)	(99,8%)	<i>Bacillus mobilis</i>	(99,8%)
		580,968		580,968
BC 6	<i>Bacillus albus</i> (CP040344)	(100%)	<i>Bacillus mobilis</i>	(100%)

		575,428		
<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)		(99,8%)	<i>Bacillus albus</i>	
				575,428
			<i>Bacillus wiedmannii</i>	(99,8%)
BC 9	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)		<i>Bacillus toyonensis</i>	
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	579,122		573,52
	(CP050183)	(100%)	<i>Bacillus cereus</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	573,582		568,042
		(99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
BC 12	<i>Bacillus mycoides</i>		<i>Bacillus</i>	
	(CP065877)	565,502	<i>weihenstephanensis</i>	562,502
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	(99,5%)	<i>Bacillus mycoides</i>	(99,5%)
		545,882		545,882
		(99%)	<i>Bacillus proteolyticus</i>	(99%)
			<i>Bacillus nitratreducens</i>	

Tabelle B- 3: Ergebnisse der pycA Sequenzierung. In Klammern hinter Speziesbezeichnung: Genombezeichnung. Dargestellt ist der von BLAST ausgegebene BIT-Score sowie der Grad der Übereinstimmung (Grade). Verglichen gegen Nucleotide collection (NCBI Ausgabe) und eigens erstellte *Bacillus cereus* Datenbank basierend auf 18 Referenzsequenzen.

ID	NCBI Ausgabe	Bit-Score (Grade)	<i>Bacillus cereus</i> Datenbank Ausgabe	Bit-Score (Grade)
21	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP035727)			
	<i>Bacillus wiedmannii</i> (CP032365)	579,122	<i>Bacillus wiedmannii</i>	579,122
	<i>Bacillus wiedmannii biovar thuringiensis</i> (CP024684)	(100%)		(100%)
		573,582		
22	<i>Bacillus tropicus</i> (CP041071)	(99,8%)	<i>Bacillus mobilis</i>	573,582
			<i>Bacillus albus</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	

			580,968
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP070476)	580,968	<i>Bacillus pacificus</i> (100%)
		(100%)	575,428
	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)		<i>Bacillus tropicus</i> (99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP002508)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i> 579,122
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	579,122	<i>Bacillus pacificus</i> (100%)
		(100%)	573,582
35	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)		<i>Bacillus tropicus</i> (99,8%)
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP002508)		
		573,582	
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP65743)	(99,8%)	
	<i>Bacillus cereus</i> (CP065881)	580,968	<i>Bacillus paranthracis</i> 569,888
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP054568)	(100%)	<i>Bacillus pacificus</i> (99,7%)
44	<i>Bacillus anthracis</i> (CP031643)		<i>Bacillus anthracis</i>
		575,968	564,348
	<i>Bacillus cereus</i> (CP0000001)	(99,8%)	<i>Bacillus wiedmannii</i> (99,5%)
		547,729	547,729
	<i>Bacillus cytotoxicus</i> (CP066194)	(99%)	<i>Bacillus cytotoxicus</i> (98,7%)
48		481,249	481,249
	<i>Bacillus anthracis</i> (CP066168)	(97,1%)	<i>Bacillus proteolyticus</i> (97,1%)
	<i>Bacillus cereus</i> (CP053997)	580,968	<i>Bacillus paranthracis</i>
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP053980)	(100%)	<i>Bacillus pacificus</i> 575,428
		575,428	(99,8%)
75	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	(99,8%)	<i>Bacillus anthracis</i>
			569,888
			<i>Bacillus wiedmannii</i> (99,7%)
	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)	573,582	<i>Bacillus cereus</i> 573,582
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	(99,85)	<i>Bacillus toyonensis</i> (99,8%)
81			568,042
			<i>Bacillus thuringiensis</i> (99,7%)
90	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)		<i>Bacillus toyonensis</i>

	579,122		573,582
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183) (100%)	<i>Bacillus cereus</i>	(99,8%)
	573,582		568,042
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743) (99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i>	580,968
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244) 580,968	<i>Bacillus pacificus</i>	(100%)
	(100%)		575,968
103	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,8%)
	575, 428		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743) (99,8%)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i>	573,582
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244) 573,582	<i>Bacillus pacificus</i>	(99,8%)
	(99,8%)		568,042
123	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,7%)
	568,042		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743) (99,7%)		
	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724) 580,428	<i>Bacillus toyonensis</i>	575,428
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183) (100%)	<i>Bacillus cereus</i>	(99,8%)
136	575,428		569,888
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743) (99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i>	575,428
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244) 575,428	<i>Bacillus pacificus</i>	(99,8%)
	(99,8%)		569,888
137	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,7%)
	569,888		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743) (99,7%)		
	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)	<i>Bacillus paranthracis</i>	579,122
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244) 579,122	<i>Bacillus pacificus</i>	(100%)
	(100%)		573,582
140	<i>Bacillus cereus</i> (CP026376)	<i>Bacillus tropicus</i>	(99,85%)
	573,582		
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743) (99,85%)		

BC 3	<i>Bacillus pacificus</i> (CP070478)		<i>Bacillus paranthracis</i>	580,968
	<i>Bacillus paranthracis</i> (CP069244)	580,968	<i>Bacillus pacificus</i>	(100%)
		(100%)		575,428
	<i>Bacillus cereus</i> (CP064072)		<i>Bacillus tropicus</i>	(99,8%)
		575,428		
BC 5	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,8%)		
		579,122		579,122
	<i>Bacillus wiedmannii</i> (CP032365)	(100%)	<i>Bacillus wiedmannii</i>	(100%)
		573,582		573,582
BC 6	<i>Bacillus tropicus</i> (CP041071)	(99,8%)	<i>Bacillus mobilis</i>	(99,8%)
		580,968		
	<i>Bacillus albus</i> (CP040344)	(100%)	<i>Bacillus mobilis</i>	580,968
		575,428		(100%)
	<i>Bacillus tropicus</i> (CP065743)	(99,8%)	<i>Bacillus albus</i>	
BC 9				575,428
			<i>Bacillus wiedmannii</i>	(99,8%)
	<i>Bacillus cereus</i> (CP068724)	579,122	<i>Bacillus toyonensis</i>	573,52
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP050183)	(100%)	<i>Bacillus cereus</i>	(99,8%)
		573,582		568,042
BC 12	<i>Bacillus thuringiensis</i> (CP071743)	(99,8%)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(99,7%)
			<i>Bacillus</i>	
	<i>Bacillus mycoides</i> (CP065877)	565,502	<i>weihenstephanensis</i>	562,502
	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	(99,5%)	<i>Bacillus mycoides</i>	(99,5%)
		545,882		
	<i>Bacillus cereus</i> (CP065881)	(99%)	<i>Bacillus proteolyticus</i>	545,882
			<i>Bacillus</i>	(99%)
			<i>nitratireducens</i>	

C. CES REAL-TIME PCR

Tabelle C- 1: Übersicht der *Bacillus* Stammsammlung des CVUA Freiburgs. Im Laufe der Arbeit ergänzt um *Bacillus cereus* Isolat zur Verfügung gestellt vom CVUA Stuttgart (BC 47-43) und einem Stamm erworben bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (BC 54). Übersicht erhält außerdem das erwartete und gemessene Ergebnis der ces Real-time PCR und die Speziesausgabe der MALDI-ToF-MS-Messung.

ID	taxon. Name	ATCC / DSM Nr.	Bezugs- quelle	erwart et ces- positiv	PCR- Ergebni s	MALDI Ergebnis
BC 1	<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001 ATCC 11778 DSM 345	OXOID	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 2	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	Feldstamm/Mu Err Pilze	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 3	<i>Bacillus spp.</i>	entfällt	Feldstamm /Teufelspefferon en	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 4	<i>Bacillus spp.</i>	entfällt	Feldstamm /Teufelspefferon en	nein	neg	<i>Bacillus subtilis</i>
BC 5	<i>Bacillus spp.</i>	entfällt	Feldstamm /Milchbrei	nein	neg	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BC 6	<i>Bacillus spp.</i>	entfällt	Feldstamm Weizen-Hirsebrei	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 7	<i>Bacillus subtilis</i> <i>subsp. spizizenii</i>	WDCM 00003 ATCC 6633 DSM 347	DSMZ	nein	neg	<i>Bacillus subtilis</i>
BC 8	<i>Bacillus mycoides</i>	DSM 2048 WDCM: -	DSMZ	nein	neg	<i>Bacillus mycoides</i>
BC 9	<i>Bacillus spp.</i>	entfällt	Feldstamm Kartoffellandsupp e	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 10	<i>Bacillus sporotheodura ns</i>	DSM 10599 WDCM: -	DSMZ Isolat aus UHT-Milch	nein	neg	<i>Bacillus sporotheodura ns</i>
BC 11	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	Isolat aus LM- /Tofu mit Chili	nein	neg	<i>Bacillus cereus</i>
BC 12	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	Isolat aus LM- Gemüse- Maultasche	nein	neg	<i>Bacillus weihenstephani s? oder Bacillus cereus</i>

BC 13	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 14	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 15	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 16	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 17	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 18	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 19	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 20	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 21	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 22	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 23	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 24	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 25	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns

BC 26	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 27	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 28	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 29	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 30	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 31	<i>Bacillus sporothermodura ns</i>	entfällt	MRI Kiel	nein	neg	Bacillus sporothermodura ns
BC 32	<i>Bacillus subtilis</i>	entfällt	Isolat aus Spiruß- Vitamin Complex	nein	neg	Bacillus subtilis
BC 33	<i>Bacillus subtilis</i>	entfällt	Isolat aus Spiruß- Vitamin Complex	nein	neg	Bacillus subtilis
BC 34	<i>Bacillus subtilis</i>	entfällt	MALDI-LVU 2015 LGL Nr. 3	nein	neg	Bacillus subtilis
BC 35	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372 DSM 675	MesaLabs Bioindikator	als nein	neg	Bacillus atrophaeus
BC 36	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 37	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 38	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 39	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 40	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 41	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus

BC 42	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 43	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 44	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 45	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 46	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	BfR/CVUA KA	JA	pos	Bacillus cereus
BC 47	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 48	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 49	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 50	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 51	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 52	<i>Bacillus cereus</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 53	<i>Bacillus mobilis</i>	entfällt	CVUA S	JA	pos	Bacillus cereus
BC 54	<i>Bacillus cereus</i>	DSM 4312	DSMZ	JA	pos	Bacillus cereus

Tabelle C- 2: Ergebnisse der ces Real-Time PCR der Bacillus cereus Isolate isoliert von den Speiseinsekteprodukten. CT: Schwellwertzyklus, undetermined: ΔRn -Wert des Isolats übersteigt Ct Grenzwert nicht. Ct Grenzwert: ΔRn -Wert über dem von Vorhandensein des Zielgens ausgegangen werden kann.

ID	Zielgen	CT	Ct Grenzwert
103	ces-Gen	Undetermined	0,005
103	pUC19	38,188	0,005
103	ces-Gen	Undetermined	0,005
103	pUC19	38,159	0,005
22	ces-Gen	24,368	0,005
22	pUC19	38,718	0,005
22	ces-Gen	24,515	0,005

22	pUC19	37,181	0,005
24	ces-Gen	22,937	0,005
24	pUC19	33,903	0,005
24	ces-Gen	22,850	0,005
24	pUC19	39,129	0,005
25	ces-Gen	23,083	0,005
25	pUC19	31,539	0,005
25	ces-Gen	22,859	0,005
25	pUC19	Undetermined	0,005
26	ces-Gen	21,831	0,005
26	pUC19	Undetermined	0,005
26	ces-Gen	21,790	0,005
26	pUC19	Undetermined	0,005
23	ces-Gen	Undetermined	0,005
23	pUC19	35,686	0,005
23	ces-Gen	Undetermined	0,005
23	pUC19	34,963	0,005
BC 44	ces-Gen	24,196	0,005
BC 44	pUC19	39,627	0,005
BC 44	ces-Gen	24,422	0,005
BC 44	pUC19	39,358	0,005
AL	ces-Gen	Undetermined	0,005
AL	pUC19	34,329	0,005
NegKo	ces-Gen	Undetermined	0,005
NegKo	pUC19	35,222	0,005
PosKo	ces-Gen	35,002	0,005
PosKo	pUC19	Undetermined	0,005

D. CEREULIDTOXIN-NACHWEIS MITTELS MALDI-TOF-MS

Tabelle D- 1: Untersuchung der Peakintensitäten vom Natrium (1176,47 m/z)- und Kaliumaddukt (1192, 53 m/z) von Cereulid in Abhängigkeit der Kultivierungstemperatur. Untersucht wurden je vier ces-positive Bacillus cereus Stämme (ID BC 37, BC 41, BC 42, BC 44) kultiviert auf CASO-Agar bei 25°C oder 37°C für 48 Stunden. DAve: durchschnittliche Peakintensität, PTTA: p-Wert des T-tests, PWKW: P-Wert des Wilcoxon-tests, PAD: P-Wert des Anderson-Darling tests,

*SD: Standardabweichung, CV: Variationskoeffizient (jeweils der Peakintensitäten).
Intensitäten unterscheiden sich dabei nicht signifikant (PTTA > 0,05).*

Masse [m/z]	DA ve	PTT A	PWK W	PAD	Intensität 25°C	Intensität 37°C	SD 25°C	SD 37°C	CV 25°C	CV 37°C
1176,46	67, 45	0,3 45	0,55 9	0,06 61	82,19	149,64	89,62	101,7 7	109,0 4	68,01
1192,53	26, 2	0,8 61	0,89 2	0,26 2	242,45	216,26	202,4 8	144,7 8	83,51	66,95

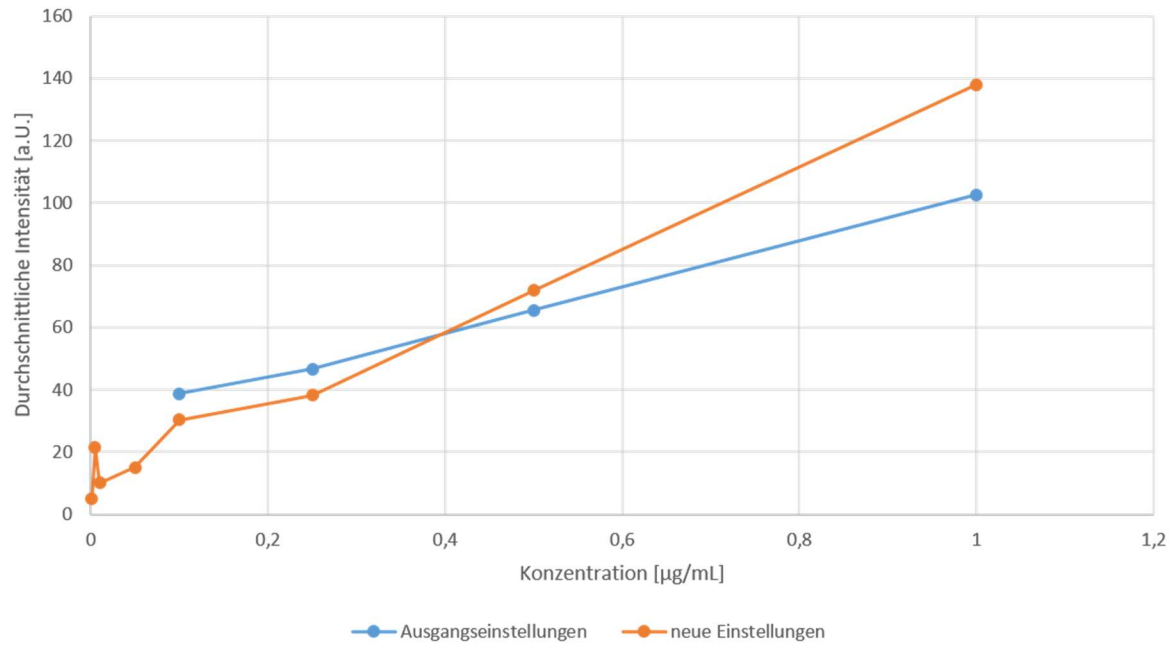


Abbildung D- 1: Intensität des Peaks bei 1191 m/z vom Cereulid Standard in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen. Gemessen mit Ausgangseinstellungen (blau) und neu erarbeiteten Einstellungen (orange) im MALDI ToF-MS.

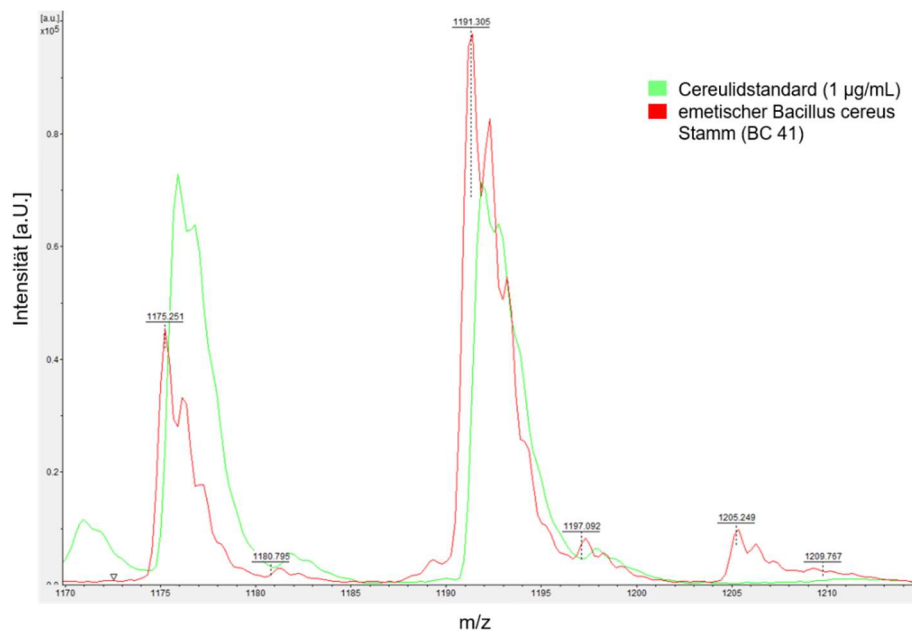


Abbildung D- 2: Zusätzlicher Peak bei 1205 Da eines emetischen *Bacillus cereus* Isolats nach Cereulidextraktion.

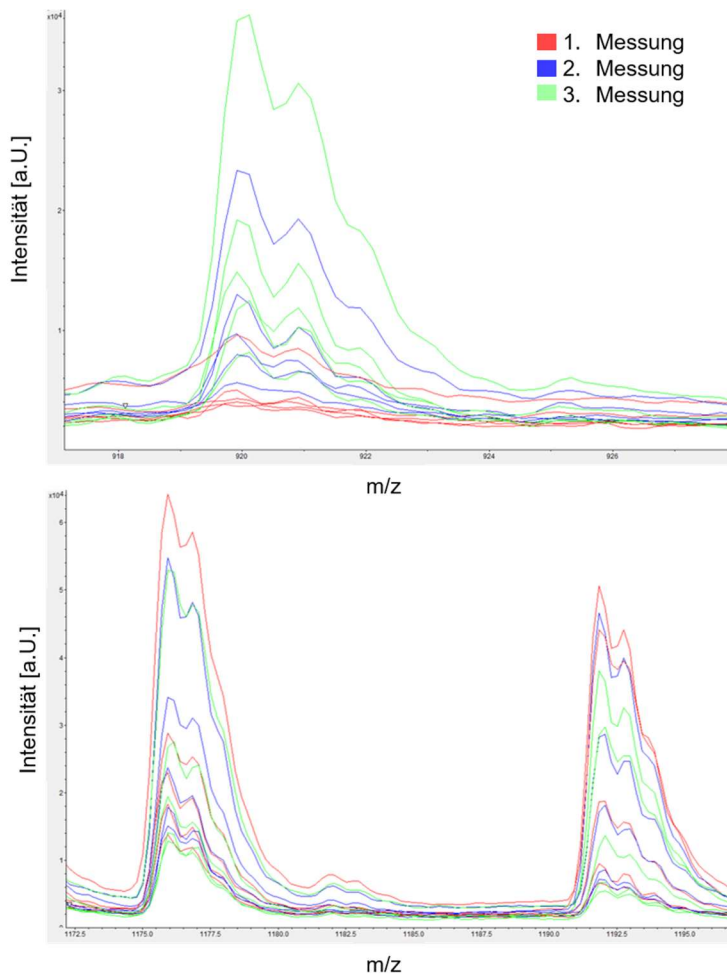


Abbildung D- 3: Mehrfachmessung des selben Spots. Aufgetragen ist Cereulid Standard (1 μ g/mL). Bild oben: Peak bei 920 m/z (Massenbereich). Bild unten: Cereulidpeaks (Massenbereiche)

E. LITERATURVERZEICHNIS

Die Bundesministerin für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (09.11.2021): Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung der Einhaltung von Hygienevorschriften für Lebensmittel und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis. AVV Lebensmittelhygiene – AVV LmH. Online verfügbar unter http://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwvbund_09112009_329225270006.htm.

Europäische Kommission (01.06.2021): DURCHFÜHRUNGSVERORDNUNG (EU) 2021/882 DER KOMMISSION vom 1. Juni 2021 zur Genehmigung des Inverkehrbringens getrockneter Larven von *Tenebrio molitor* als neuartiges Lebensmittel gemäß der Verordnung (EU) 2015/2283 des Europäischen Parlaments und des Rates sowie zur Änderung der Durchführungsverordnung (EU) 2017/2470 der Kommission. Fundstelle: Amtsblatt der Europäischen Union.

Europäisches Parlament und Rat (15.11.2005): VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. Fundstelle: Amtsblatt der Europäischen Union, Anhang I Kapitel 1.1 bis 1.3. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=de>, zuletzt geprüft am 21.07.2021.

Generaldirektion Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Hg.) (2015): Summary of applications and notifications. Summary of the applications submitted within the meaning of Article 10(1) of Regulation (EU) 2015/2283. Europäische Kommission. Online verfügbar unter https://ec.europa.eu/food/food/novel-food/authorisations/summary-applications-and-notifications_de, zuletzt geprüft am 20.07.2021.

ISO 21527-2:2008-07, 2008-07: Horizontales Verfahren zur Zählung von Hefen und Schimmelpilzen.

DIN EN ISO 11290-2:2017-09: Mikrobiologie der Lebensmittelkette.

DIN EN ISO 4833-2:2014-05, 2014-05: Mikrobiologie der Lebensmittelkette.

DIN EN ISO 6579-1:2020-08: Mikrobiologie der Lebensmittelkette.

DIN ISO 16649-2:2009-12, 2009-12: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln.

DIN EN ISO 7932:2005-03, 2005-03: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln.

ISO 15213:2003-05, 2003-05: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln.

DIN EN ISO 6888-2:2003-12, 2003-12: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln_- Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies)_ - Teil_2: Verfahren mit Kaninchenplasma-/Fibrinogen-Agar (ISO_6888-2:1999_+ AMD_1:2003); Deutsche Fassung EN_ISO_6888-2:1999_+ A1:2003.

Technische Regel 06.00-24:2019-12, 2019-12: Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung von Enterobacteriaceae in Fleisch.

Vlaemynck, G.; Lafarge, V.; Scotter, S. (2000): Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. In: *Journal of applied microbiology* 88 (3), S. 430–441. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00978.x.