



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Lebensmitteltechnologie und Bioprodukttechnologie

WS 2012/13

Herstellung und Charakterisierung von Bakterien- sporen für die Beurteilung von Sterilisations- und Konservierungsprozessen

Bachelorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

Vorgelegt von

Carolin Fritsch

Urn:nbn:de:gbv:519-thesis2012-0707-1

Erstgutachter: Prof. Dr. Karl Steffens

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christine Wittmann

Neubrandenburg, 01.02.2013

Abstract

Some grampositive Bacteria, like members of the genera *Bacillus* and *Clostridium*, are sporeformers. When they are exposed to nutrient deficiency the vegetative state convert to a resistant form, called spore. They are able to withstand a wide range of assaults that would destroy a vegetative cell. The spore has a high level of resistance against heat, radiation and chemical agents. These characteristics are explained by their multi-layered structure and their very dehydrated state. Under brighter environmental conditions the spore is able to germinate into a vegetative cell. For that reason they have become important contaminants in industrial food processing and characterized the methods of disinfections and parameters during heat treatments. To ensure a safe food the killing of spores requires very high temperatures. It is important to conduct a variety of investigations to learn more about the behavior of spores and their properties under various conditions. To characterize the spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium* they were produced in petri dishes under various times of incubation and centrifuged to receive a spore-suspension. This solution provides the basis for the following investigation of the germination number and the microscopic analysis. The results show that both sporeformers have the possibility to produce spores on agar dishes for subsequent investigations.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen	4
1 Einleitung	5
1.1 Zielstellung	5
1.2 Endosporen	6
1.2.1 Sporenbildner	6
1.2.2 Sporulation	7
1.2.2.1 Auslöser der Sporulation	7
1.2.2.2 Vorgang der Sporenbildung	7
1.2.2.3 Auskeimen der Sporen	9
1.2.3 Eigenschaften von Sporen	10
1.2.3.1 Morphologie der reifen Sporen	10
1.2.3.2 Merkmale der Spore	12
1.3 Bedeutung der Endosporen für Sterilisations- und Konservierungsprozesse	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Verwendete Materialien und Geräte	15
2.2 Angewandte Methoden	18
2.2.1 Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	18
2.2.2 Bestimmung der Gesamtkeimzahl	21
2.2.3 Sporenfärbung und Mikroskopie	22
3. Ergebnisse	24
3.1 Gesamtkeimzahl	24
3.2 Mikroskopische Auswertung	25
4 Diskussion	28
5 Zusammenfassung	31
6 Literaturverzeichnis	32
Abbildungsverzeichnis	34
Tabellenverzeichnis	35
Anlagen	36
Anlage 1: Ausgezählte koloniebildende Einheiten zur Gesamtkeimzahlbestimmung	36
Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit	38

Verzeichnis der verwendeten Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen

<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
d	kleinster ablesbarer Gewichtswert [g]
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
g	Erdbeschleunigung
Hz	Hertz
KbE	Koloniebildende Einheiten
M	Molare Masse [g/mol]
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute [U/min])
SASP	small acid soluble proteins (kleine säurelösliche Proteine)
Σ	Summe

1 Einleitung

1.1 Zielstellung

In den letzten Jahren haben Meldungen über Lebensmittelinfektionen zugenommen und sind vermehrt in die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit getreten. Eine Ursache für lebensmittelbedingte Erkrankungen ist der Befall von Lebensmitteln mit Mikroorganismen. Neben dem natürlichen Verderb, kann ebenfalls die sensorische Qualität der Nahrungsmittel negativ beeinträchtigt werden. Hinzu kommt das Risiko für die Gesundheit des Menschen durch gebildete Toxine. Um die gesundheitliche Gefahr und den Verderb von Lebensmitteln zu vermeiden, müssen die Mikroorganismen abgetötet, oder zumindest ihr Wachstum gehemmt werden. Dies geschieht unter anderem durch Kühlung, Trocknung oder Desinfektion. Jedoch ist die wichtigste Methode zur Abtötung von Mikroorganismen die Behandlung mit hohen Temperaturen. Dabei spielt insbesondere die Sterilisation eine bedeutende Rolle. Ausschlaggebend für die Anwendung sehr hoher Temperaturen ist die Fähigkeit einiger Bakterien zur Endosporenbildung. Diese zeichnen sich durch eine enorme Widerstandsfähigkeit aus und werden erst bei erneutem Auskeimen gefährlich. Als ein Beispiel kann das sporenbildende Bakterium *Clostridium botulinum* genannt werden, das nach dem Auskeimen das Botulismustoxin bilden und insbesondere Konserven kontaminieren kann. Der Milzbranderreger *Bacillus anthracis* ist ebenfalls zur Sporenbildung befähigt. Die Gefahr durch Endosporen wird hier besonders deutlich, denn wenn Tiere an Milzbrand verenden, darf man sie nicht in der Erde begraben, sondern muss sie verbrennen, um ein Auskeimen der Sporen im Bodenmilieu und somit eine Kontamination zu vermeiden (Fuchs, 2007).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung eigens hergestellter Bakteriensporen, insbesondere in Bezug auf Sterilisierungs- und Konservierungsprozesse. Im Fokus stehen dabei die Endosporen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium*. Die Charakterisierung erfolgt durch die Bestimmung der Gesamtkeimzahl vor und nach der Pasteurisation, sowie die mikroskopische Analyse nach durchgeführter Sporenfärbung. Die Bildung der Endosporen erfolgt in einer fünftägigen Inkubation auf Agarplatten und anschließender Zentrifugation. Bei *Bacillus megaterium* soll zusätzlich die Endosporenentwicklung nach 24 Stunden und 48 Stunden hinsichtlich der Gesamtkeimzahl und dem mikroskopischen Bild analysiert werden, um die Entwicklung der Sporen einschätzen zu können. Anschließend soll die Bedeutung der Kultivierung von Sporen auf Nährböden zur Beurteilung von Sterilisationsprozessen bewertet werden.

1.2 Endosporen

1.2.1 Sporenbildner

Endosporen sind Dauerformen, die von Bakterien gebildet werden und eine Art Ruhezustand darstellen, um ungünstige Lebensbedingungen zu überstehen. Sie zeichnen sich besonders durch ihre kaum vorhandene Stoffwechselaktivität und die enorme Hitzeresistenz aus. Die Vermehrung von Sporenbildnern erfolgt nur in der vegetativen Form. Neben den Endosporen gibt es weitere Dauerformen, die allerdings nicht deren Resistenzeigenschaften aufweisen. Dazu zählen die Exosporen, welche durch Knospung der Mutterzellen entstehen oder die Cysten, bei denen das stäbchenförmige Bakterium in eine kugelförmige Zelle umgewandelt wird. Als eine dritte Dauerform sind die Myxosporen zu nennen, sogenannte Fruchtkörper, die von Myxobakterien gebildet werden.

Die Bildung von Endosporen gehört zu den Differenzierungsprozessen, zu denen nur wenige stäbchenförmige Bakteriengruppen befähigt sind. Zu den bedeutendsten Gattungen zählen die grampositiven aeroben oder fakultativ aeroben *Bacilli*, sowie die anaeroben *Clostridien*. Unter diesen Bakterien befinden sich auch lebensmittelvergiftende Gattungen, die die Haltbarkeit und gesundheitliche Unbedenklichkeit eines Lebensmittels beeinflussen können (Schlegel, 1985).

In der vorliegenden Arbeit werden die nicht pathogenen Bakterien *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* untersucht. Beide *Bacilli* sind grampositiv, stäbchenförmig und aerob. *Bacillus subtilis* ist etwa zwei μm lang und 0,6 μm dick. Es ist ubiquitär verbreitet und kann aus Boden- und Luftproben isoliert werden. Weiterhin besitzt *B. subtilis* durch die peritriche Begeißelung eine gute Beweglichkeit. Seine Ernährungsweise ist chemoorganotroph, das bedeutet er nutzt organische Nährstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle. Anwendung findet er unter anderem als Testkeim für Kontrollen von Sterilisationsanlagen. *Bacillus megaterium* ist im Boden beheimatet und besitzt eine Größe von etwa fünf μm und ist damit einer der längsten Eubakterien. Da sich die Spore innerhalb der Mutterzelle bildet, ist deren Ausrichtung artspezifisch. Bei *Bacillus megaterium* befindet sie sich zentral in der Ausgangszelle (Anranikin, 2006; Schlegel, 1985).

1.2.2 Sporulation

1.2.2.1 Auslöser der Sporulation

Die Sporenbildung ist einer der kompliziertesten Prozesse bei Differenzierungsvorgängen in Bakterienzellen. Für den Lebenszyklus der sporenbildenden Bakterien ist eine Sporulation nicht erforderlich, denn solange günstige Umwelt- und Ernährungsbedingungen vorhanden sind, vermehren sie sich auf unbegrenzte Zeit durch Zellteilung. Werden allerdings die Vermehrungsbedingungen für die Bakterien schlechter, beispielsweise durch Nährstoffmangel oder eine zu hohe Konzentration an Stoffwechselprodukten, wird die Bildung von Sporen ausgelöst. Auch Stress kann eine Sporulation hervorrufen, jedoch führt eine Austrocknung nicht zur Sporenbildung.

Die Sporulation erfolgt meist am Ende des exponentiellen Wachstums, da hier das Nährstoffangebot vermindert ist und die Zelldichte zugenommen hat. Der Beginn der Sporulation geht einher mit dem Ende des logarithmischen Wachstums der sporenbildenden Bakterien. Hat die Bildung von Endosporen begonnen, so kann dieser Vorgang, auch bei wieder eintretenden günstigen Umweltbedingungen, nicht mehr gestoppt werden (Schlegel, 1985).

1.2.2.2 Vorgang der Sporenbildung

Die Bildung von Endosporen ist ein regulierter Vorgang, der in sieben Phasen untergliedert werden kann. In der Abbildung eins sind diese Schritte verdeutlicht. Die Phase Null beschreibt die sogenannte Mutterzelle. Dies ist eine vegetative Zelle aus der, am Ende der Sporulation, die reife Endospore mit mehreren Hüllschichten hervorgeht.

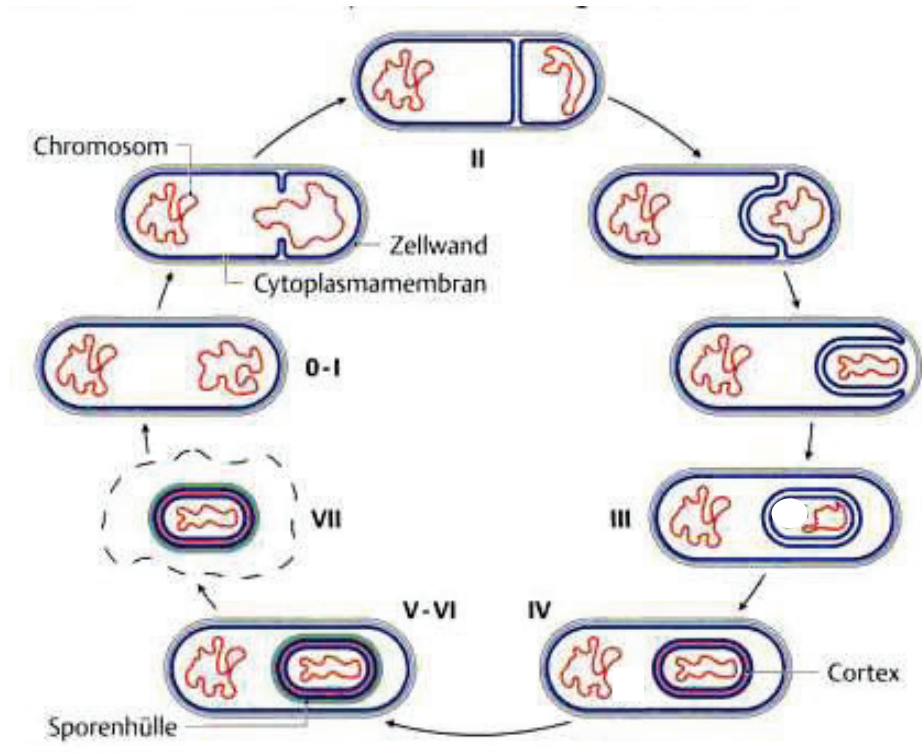


Abbildung 1: Die Phasen der Endosporenbildung (Fuchs, 2007)

In Phase Null bis eins erfolgt eine inäquale Zellteilung innerhalb der vegetativen Zelle. Dazu wird zunächst das genetische Material (Nukleotid) kopiert und die Cytoplasmamembran schnürt sich asymmetrisch von zwei Punkten aus ein. Dadurch wird ein Stück des Protoplasten von der Mutterzelle abgetrennt und die Spore erhält so einen Teil des Genoms.

In Phase zwei sind die beiden Protoplasten dargestellt, die jeweils das identische genetische Material beinhalten. Der größere Zellraum bildet die Mutterzelle, während sich die kleinere Zelle im weiteren Verlauf zu der Endospore entwickelt. Zwischen den Protoplasten wird keine Zellwand gebildet, jedoch umwächst die Cytoplasmamembran der Mutterzelle den Sporeprotoplasten.

Als Ergebnis des Abtrennens und Umschließens erhält man in Phase drei die sogenannte Vorspore, die sich innerhalb des Cytoplasmas der Mutterzelle frei bewegen kann. Sie ist durch die vorangegangenen Phasen bereits von einer inneren und äußeren Membran umgeben. Diese stammen von der Mutterzelle und ragen nun mit ihrer ursprünglichen Außenseite nach innen. Sie sind zudem an der weiteren Synthese der Sporenschichten beteiligt.

In Phase vier wird zwischen den beiden Membranen das Peptidoglykan aufgenommen und so die Sporenrinde (Cortex) gebildet. Weiterhin werden Calciumionen aufgenommen und die, für

Endosporen charakteristische, Dipicolinsäure synthetisiert. Zudem erfolgt die Bildung von kleinen säurelöslichen Proteinen (SASP).

In Phase fünf und sechs reift die Spore weiter durch Hydratation und bildet einen lockeren quervernetzten Sporenmantel aus. Bei einigen Endosporenbildnern wird zusätzlich noch eine äußerste Schicht gebildet, die Exosporium genannt wird.

In der siebten und letzten Phase erfolgt die Autolyse der Mutterzelle, wodurch die dickwandige, reife Spore freigesetzt wird. Diese hat das Potential nach dem Auskeimen, den gesamten Vorgang zu wiederholen.

Der komplette Sporulationsvorgang dauert in etwa acht Stunden (Fuchs, 2007; Parish, 1979).

1.2.2.3 Auskeimen der Sporen

Der Vorgang des Auskeimens der Endospore und der Umwandlung in die vegetative Zelle, kann in drei Phasen untergliedert werden.

In der ersten Phase erfolgt die Aktivierung. Der Vorgang des Auskeimens wird dabei häufig durch eine kurzzeitige Erhitzung für zehn Minuten bei 60°C bis 100°C ausgelöst. Dadurch wird der Sporenmantel durchlässiger und somit ist die Spore bereits geschwächt. Anschließend kann die Endospore, wie andere Bakterien, relativ einfach inaktiviert werden.

Die zweite Phase beschreibt die Keimung. In diesem Schritt nimmt die Zelle Wasser auf und quillt. Der Protoplast wird wieder stoffwechselaktiv, sodass Enzymaktivität und Atmung rasch zunehmen. Das Peptidoglykan in der Sporenrinde hydrolysiert, bis es vollständig abgebaut ist. Weiterhin wird das für Endosporen charakteristische Calciumdipicolinat freigesetzt und die kleinen säurelöslichen Proteine abgebaut.

Im dritten und letzten Schritt, dem Auswachsen, entwickelt sich aus dem Sporenprotoplasten eine neue funktionsfähige vegetative Zelle, bei der die Keimzellwand der Spore nun der Zellwand entspricht. Diese vegetative Zelle ist identisch mit der originalen Mutterzelle vor der Sporulation und besitzt wieder die Fähigkeit zum Wachstum und zur Vermehrung.

Somit bildet der Prozess der Sporulation und der Sporenkeimung einen geschlossenen Kreislauf. Der Prozess des Auskeimens geht mit dem Verlust der Sporeneigenschaften einher und ist irreversibel (Buselmaier, 2009; Parish, 1979).

1.2.3 Eigenschaften von Sporen

1.2.3.1 Morphologie der reifen Sporen

Die reife Endospore zeichnet sich insbesondere durch ihre Vielzahl an Schichten aus, die den Sporenkern umgeben. In Abbildung zwei ist der schematische Aufbau einer Endospore dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass sechs Hüllen den Sporenkern umgeben und damit etwa 50% des Gesamtvolumens der Spore ausmachen.

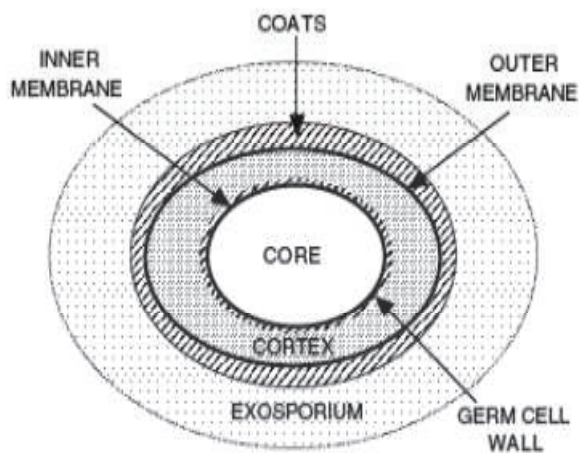


Abbildung 2: Aufbau einer Endospore (Setlow, 2005)

Der Sporenkern (Core) bildet den Innenkörper der Spore und besitzt die DNA, RNA und Ribosomen, die identisch mit denen der vegetativen Zellen sind. Im Protoplasten befindet sich zudem ein geringer Wassergehalt von maximal 25 %. Dieser Sachverhalt wird als Hauptfaktor für die enzymatische Inaktivität und Hitzeresistenz der Endospore angesehen. Ein zweiter wichtiger Bestandteil des Sporenkerns in Bezug auf die Resistenzeigenschaften sind die SASP, deren Hauptaufgabe darin liegt, die DNA vor Hitze zu schützen. Eine weitere für Endosporen charakteristische Substanz im Kern ist die Dipicolinsäure, die ca. 5 bis 15% des Trockengewichtes der Spore ausmacht. Sie kommt im Komplex mit Calciumionen nur in der Endospore vor und ist ausschlaggebend für deren Hitzestabilität. In der folgenden Abbildung drei ist der chemische Aufbau der Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-dicarbonsäure) dargestellt.

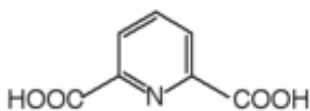


Abbildung 3: chemischer Aufbau der Dipicolinsäure (www.nugi-zentrum.de)

Um den Sporenkern befindet sich eine innere Membran (inner membrane), auch Sporenprotoplastenmembran genannt. Sie wurde in Phase eins der Sporulation gebildet, als sich die Mutterzelle eingeschnürt und die Vorspore gebildet hat.

Sie ist von einer festen Keimzellwand (germ cell wall) umschlossen, die aus Peptidoglykan besteht. Dieses besitzt eine ähnliche Struktur, wie die Zellwand der vegetativen Zelle. Im Hinblick auf die Resistenzeigenschaften der Endosporen spielt sie zwar keine Rolle, jedoch ist sie beim Vorgang des Auskeimens von enormer Bedeutung, da sie sich dann zur Zellwand der neuen vegetativen Zelle entwickelt.

Umschlossen wird die Keimzellwand von der dickschichtigen Sporenrinde (Cortex), welche aus modifiziertem Peptidoglykan zusammengesetzt ist. Ihr Aufbau ist entscheidend für die Dehydratation des Sporenkerns, wodurch die Hitzeresistenz unterstützt wird.

Um den Cortex befindet sich die äußere Membran (outer membrane). Vor der Sporulation bildete diese die Zellwand der vegetativen Zelle und sorgt bei der Sporenbildung dafür, dass die Spore vollständig in die Mutterzelle aufgenommen wird. Sie besitzt jedoch keine erwähnenswerte Rolle bei der Sporenresistenz.

Die Außenschicht der Endospore bildet der Sporenmantel (coat). Dieser besteht aus keratinhaltigem Material mit intramolekularen Disulfidbrücken. Diese Schicht macht etwa 30 % bis 60 % der Sporentrockenmasse, sowie ca. 50 % des Sporenvolumens aus und besitzt bis zu 80 % des gesamten Sporenproteins. Sie stellt den Hauptgrund für die chemische und enzymatische Resistenz dar.

Bei einigen Bakterien wird zusätzlich das Exosporium als äußerste Schutzschicht ausgebildet. Bei *Bacillus cereus* beispielsweise umgibt diese Hülle die gesamte Spore, während sie bei *Bacillus subtilis* und *megaterium* weniger deutlich sichtbar ist. Es ist eine Proteinschicht, die weder zur längeren Überdauerung, noch zu den Resistenzeigenschaften der Spore wesentlich beiträgt (Buselmaier, 2009; Setlow, 2005).

Allgemein ist zu erwähnen, dass die Spore nahezu die gesamte Trockensubstanz der Mutterzelle enthält, allerdings nur in einem Zehntel ihres Volumens.

1.2.3.2 Merkmale der Spore

In Form von Endosporen ist es Bakterien möglich Jahre bis Jahrzehnte zu überdauern und anschließend noch keimungsfähig zu sein. Die vermutlich wichtigste Eigenschaft der Endosporen ist ihre enorme Widerstandsfähigkeit. Sie zeichnen sich besonders durch ihre Resistenz gegenüber Hitze, Strahlung und chemischen Agenzien aus. Dadurch erlangt die Spore die Fähigkeit, Behandlungen zu überleben, die die vegetativen Zellen abtöten würden.

Ihre Hitzeresistenz wird dabei auf den sehr geringen Wassergehalt in der Spore zurückgeführt. Beispielsweise enthalten Sporen der Gattung *Bacillus megaterium* etwa 15 % Wasser. Dies ist vergleichbar mit dem Wasseranteil von Wolle. Durch diesen geringen Wassergehalt wird die Denaturierung von Proteinen durch Hitze erschwert. Weiterhin ist die Hitzeresistenz proportional zum Dipicolinsäuregehalt. Je höher der Anteil an Dipicolinsäure, desto resistenter ist die Spore. In Verbindung mit Calciumionen bildet die Dipicolinsäure das Calciumdipicolinat, ein Salz, das durch die Quervernetzungen der Sporenproteine ebenfalls die Denaturierung erschwert. Die Hitzeresistenz der Endosporen hängt zusätzlich vom pH-Wert, der Wasseraktivität und dem umgebenden Medium ab.

Die Resistenz gegen Einwirkung von Strahlung ist in etwa proportional zum Disulfidbrückengehalt in der Sporenrinde. Diese ist undurchlässig für radiochemische Produkte und bildet durch die schwefelhaltigen Bestandteile freie Radikale. Auch der niedrige Wassergehalt trägt vermutlich zur Strahlungsresistenz bei.

Die Resistenz gegenüber chemischen Agenzien ist mit der Undurchlässigkeit des Sporenmantels für chemische Mittel zu erklären. Zu solchen Chemikalien zählen insbesondere Säuren, Basen, oxidierende und organische Lösungen (Setlow, 2005; Schlegel, 1985).

Die folgende Tabelle soll einen Überblick darüber geben, inwieweit sich die Eigenschaften von der vegetativen Zelle und der Endospore unterscheiden.

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von vegetativer Zelle und Endosporen

		Vegetative Zelle	Endospore
Hülle		Typische grampositive Mureinzellwand	5 bis 6 Lagen: Exosporium, Sporenmantel, äußere Membran, Sporenrinde, innere Membran, Keimzellwand
Wassergehalt		80 – 90%	10 – 25%
Stoffwechselaktivität		hoch	niedrig bis keine
Enzymatische Aktivität		hoch	niedrig bis keine
pH im Cytoplasma		Ca. 7	5,5 – 6,0 (im Kern)
Calciumionen		niedrig	hoch
Dipicolinsäure		nicht vorhanden	enthalten
SASP		fehlen	vorhanden
Resistenz gegen	Hitze	niedrig (sterben bei 100°C)	hoch (über 100°C, Abtötung bei 120°C im Druckautoklav)
	UV-Strahlung	niedrig	hoch
	Chemische Mittel	niedrig	hoch
Färbung mit		Safranin	Malachitgrün
Mikroskopische Erscheinung		nicht lichtbrechend	stark lichtbrechend

(Schlegel, 1985)

1.3 Bedeutung der Endosporen für Sterilisations- und Konservierungsprozesse

Durch das ubiquitäre Vorkommen und ihre enorme Resistenz, insbesondere gegen Hitze, gehören die endosporenbildenden Bakterien zu den Hauptvertretern in Bezug auf Lebensmittelverderb und lebensmittelbedingte Erkrankungen. *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* können als Bodenbewohner die Lebensmittel in nahezu jedem Bearbeitungsschritt kontaminieren, von der Produktion oder Verarbeitung bis hin zum Vertrieb, und können dadurch zu erheblichen Sicherheits- und Qualitätsproblemen führen (Heyndrickx, 2011).

Die vegetativen Zellen von Bakterien werden in der Regel bereits durch das Pasteurisieren, einer Wärmebehandlung von 80°C für etwa 10 Minuten, abgetötet. Jedoch überleben die Endosporen solche Konservierungsmethoden. Durch ihre enorme Hitzeresistenz ist man gezwungen höhere Temperaturen anzuwenden, um die Unbedenklichkeit von Lebensmitteln zu gewährleisten. Denn nur wenn die optimalen Sterilisationsbedingungen erreicht wurden, kann das Auskeimen der Sporen verhindert werden. Die Sterilisation dient der Abtötung und Entfernung sämtlicher Mikroorganismen, einschließlich ihrer Dauerformen und ist somit auf das Inaktivieren von Endosporen ausgerichtet. Um ein Auskeimen der Sporen zu vermeiden ist es von großer Bedeutung sicherzustellen, dass die Sporen tatsächlich abgetötet wurden und nicht nur extrem inaktiv sind. Aus diesem Grund werden die Parameter beim Autoklavieren an die Überlebensbedingungen der stabilsten bekannten Endosporen angepasst, der als sogenannter Leitkeim für erfolgreiche Sterilisationen gilt. Dies sind nach dem heutigen Wissensstand die Sporen von *Geobacillus stearothermophilus*. Daher werden beim Autoklavieren folgende Parameter benötigt: eine Temperatur von 121°C und einem bar Wasserdampfdruck bei einer Dauer von 15 Minuten (Steinbüchel, 2003; Setlow, 2005).

Endosporen führen, neben der Sterilisation, ebenfalls bei der Desinfektion von Oberflächen zu Problemen, aufgrund ihrer Resistenzfähigkeit gegenüber chemischen Agenzien. Bei der Desinfektion werden zumeist Alkohole eingesetzt, die jedoch nicht durch den Sporenmantel dringen und die Spore nicht inaktivieren können. Nach Holzapfel (2004) sind die Endosporen von *Bacillus subtilis* in der Lage 95 % Ethanol für über drei Sekunden, sowie 30 Minuten auf Seife zu überleben.

Auch eine Abtötung durch Bestrahlung gestaltet sich schwierig, da hohe Strahlendosis eingesetzt werden müsste, die wiederum die ernährungsphysiologischen und sensorischen Eigenschaften des Lebensmittels negativ beeinträchtigen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Die Tabelle zwei enthält die Bezeichnung und Herkunft der beiden *Bacilli* für die weitere Untersuchung der Sporenbildung. Beide *Bacilli* gehören zu der Risikogruppe eins.

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme

Bacillus	Bezeichnung	Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM 32	Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

In Tabelle drei sind die verwendeten Nährmedien für die Kultivierung der Bakteriensporen kurz dargelegt, sowie die notwendigen Färbemittel für die Sporenfärbung. Es werden Hersteller und Mischverhältnis angegeben, sowie ausgewählte Zusatzinformationen.

Tabelle 3: verwendete Medien und Lösungen

Verwendung für	Bezeichnung	Hersteller	Zusatz	Mischverhältnis in g/l entionisiertes Wasser
Nährbouillon (Caso-Bouillon)	Tryptone Soya Broth	AppliChem Bio Chemica	pH vor Autoklav = 7,3	30g/l
Nährboden (Caso-Agar)	Caso-Agar Ph. Eur.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		40g/l
	Agar-Agar Kobe I pulv.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe		4 g/l
Sporenfärbung	Malachitgrün-Oxalat	C.I. 42000 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	$C_{54}H_{54}N_4O_{12}$ grünes Pulver	0,5g/l
	Safranin für die Gramfärbung	Art. Nr. CN01.1 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Flüssig, rot	0,1g/l

In Tabelle vier werden die verwendeten Chemikalien dargelegt, inklusive Hersteller und angewandtem Mischverhältnis, sowie Zusatzinformationen.

Tabelle 4: verwendete Chemikalien

Verwendung	Chemikalie	Hersteller	Zusatz	Mischverhältnis in g/l entionisiertes Wasser
Abschwemmen und Lösung für Verdünnungsreihe	Natriumchlorid (0,9% ige NaCl)	OmniChem GmbH, Bremen		9g/l
Sörensenphosphatpuffer für die Zentrifugation	Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	M = 136,09 g/mol	9,078g/l
	Dinatriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	M = 141,96 g/mol	9,474g/l

Bei der Herstellung des Sörensenphosphatpuffers sollten zwei Bedingungen erfüllt werden. Zum Einen sollte der Puffer eine molare Masse von 0,14 mol besitzen und zum Anderen einen pH-Wert von sieben aufweisen. Anhand der Molmassen der Einzelbestandteile wurde das, in Tabelle vier, angegebene Mischverhältnis berechnet. Vermengt man nun 38,8 ml der Kaliumdihydrogenphosphatlösung mit 61,2 ml der Dinatriumhydrogenphosphatlösung, so erhält man 100 ml Sörensenphosphatpuffer, der den oben genannten Anforderungen entspricht.

Die folgende Tabelle fünf soll einen Überblick über die eingesetzten Hilfsmittel und Geräte im Rahmen der Untersuchung geben. Es werden Hersteller und Zusatzinformationen aufgelistet.

Tabelle 5: verwendete Hilfsmittel und Geräte

Einsatz	Geräte- und Hilfsmittelbezeichnung	Hersteller	angewandte Parameter	Zusatzinformationen
Nährmedien und Lösungen	Waage Sartorius BL 1500S	Sartorius AG, Göttingen		Max. 1500g, d=0,01g
	Waage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern		Max. 220g, min 0,01g, d = 0,0001g

	Certoclav Hochdrucksterilisator Steam Sterilizer Typ CV-EL 18L	Certoclav Sterilizer GmbH, Traum/Austria	125°C, 1,4 bar, 15 min	1600 W, 220V, 50/60Hz, max. 3 bar, max. 140°C
Inkubieren	Schüttler Edmund Bühler TH15 KS-15 control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen	130 U/min bei 30°C	
	Brutschrank Heraeus instruments	Heraeus instru- ments, Thermo scientific, Hanau	30°C	
Zentrifugieren	Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf	10.000 g, 20 min	
	Eppendorf-Gefäße	Eppendorf	Fassungsver- mögen: 1ml; 1,5 ml	
Verdünnungs- reihe und Ausstrich	Reagenzglasrüttler Heidolph Reax control	Heidolph Instru- ments GmbH&Co. KG , Schwabach	Geschwindig- keit: 1500 rpm	max. 2500 rpm
	Drehelement Schütt petritum-M	Schütt Labortechn- ik, Göttingen		
	Wasserbad (Inkubations-oder Inaktivierungsbad 1002)	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel	80°C, 20 min (50°C zum Erhalt des flüs- sigen Agars)	T = 5 – 99,9°C Fassungsver- mögen: 7l
Mikroskopie	Mikroskop mit Kamera Nikon eclipse E400	Nikon instruments, Inc., New York	100-fache Vergrößerung	Vergrößerung 20- bis 100- fach
	Programm NIS Elements	Nikon instruments, Inc., New York		

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium*

Die Kultivierung ist ein Vorgang mit dem Ziel, das sich Mikroorganismen außerhalb ihres natürlichen Standortes vermehren. Bei der Kultivierung von Bakterien müssen gute Wachstumsbedingungen geschaffen und aufrechterhalten werden, die den Umweltverhältnissen ihres natürlichen Vorkommens ähnlich sein sollten. Dazu werden verschiedene Nährmedien eingesetzt, die je nach Verwendungszweck, flüssig oder fest sein können. Bei flüssigen Nährmedien spricht man von einer Nährbouillon, die hauptsächlich für physiologische Untersuchungen und zur Zellmassegewinnung genutzt wird, da eine homogene Verteilung von Nährstoffen und Zellen möglich ist. Möchte man hingegen Einzelkolonien, sogenannte Reinkulturen, gewinnen oder Form und Aussehen von Kulturen prüfen, so nutzt man feste Nährböden (Steinbüchel, 2003).

Da Bakterien Energie aus dem Abbau von organischen Nährstoffen gewinnen, müssen die Nährmedien entsprechende Energiequellen beinhalten, um ein optimales Wachstum zu ermöglichen. Insbesondere Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sind dabei von großer Bedeutung, sowie Mineralien und Spurenelemente. Je nach Bakterienart sind ebenfalls der Sauerstoffgehalt, pH-Wert und osmotischer Druck entscheidend. In der folgenden Tabelle sechs sind die Bestandteile der verwendeten Caso-Bouillon nach Herstellerangaben dargelegt.

Tabelle 6: Bestandteile der verwendeten Caso-Bouillon (www.carlroth.de)

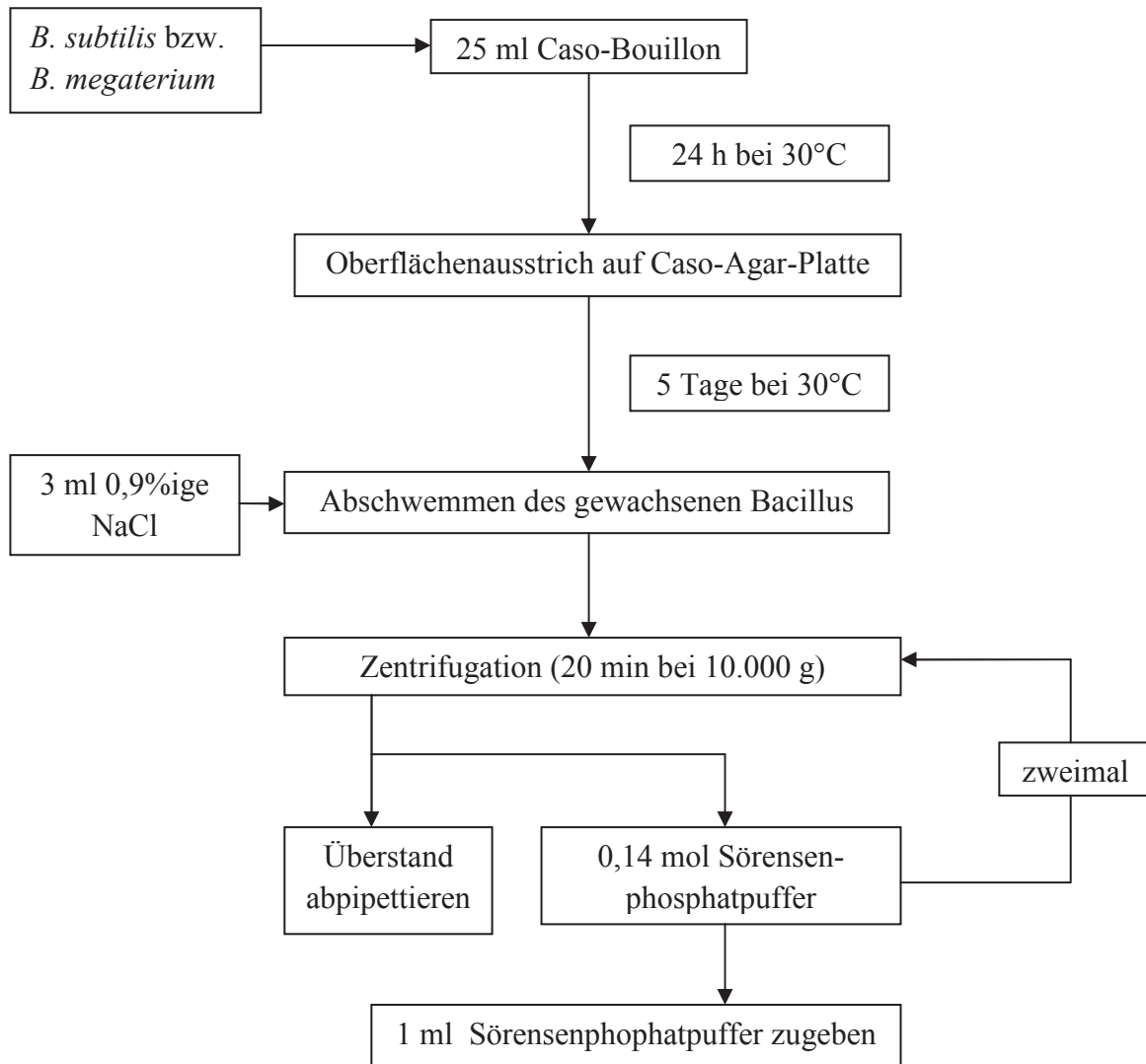
Bestandteile	Anteil
Puffer (di-Kaliumhydrogenphosphat)	2,5 g/l
Glukose (-Monohydrat)	2,5 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
Pepton aus Soja (Papainhydrolysat)	3 g/l
Pepton aus Casein (Pankreashydrolysat)	17 g/l
Entionisiertes Wasser (zum Anmischen nötig, da pulverförmiger Zustand)	1 l
pH	7,3 +/- 0,2

Im Folgenden soll auf die einzelnen Bestandteile der Nährbouillon näher eingegangen und diese hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Mikroorganismenwachstum charakterisiert werden.

Puffer dienen im Allgemeinen zur Stabilisierung des pH-Wert. Glukose dient als häufigste organische Kohlenstoff- und Energiequelle, da sie von den chemoorganotrophen Mikroorganismen gut verwertet werden kann. Natrium hingegen ist für das Mikroorganismenwachstum nicht zwingend erforderlich, jedoch kann es, bei Zugabe geringer Mengen Natriumchlorids, die Entwicklung der Bakterien fördern (Bast, 2001). Peptone dienen in Form komplexer Verbindungen als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Sie werden durch enzymatische Hydrolyse von eiweißhaltigem Material gewonnen und bestehen aus Polypeptiden, Dipeptiden und Aminosäuren. Da sie wasserlöslich, aber nicht hitzeempfindlich sind, eignen sie sich besonders als Bestandteil in Nährmedien (Baumgart, 2012). Pepton aus Sojamehl weist einen hohen Gehalt an Kohlenhydraten und Vitaminen auf. Pepton aus Casein hingegen bietet einen hohen Gehalt an freien Aminosäuren. Wasser dient als Lösungsmittel, für die im Medium vorhandenen Nährstoffbestandteile, die dann von den Mikroorganismen in gelöster Form aufgenommen werden können (Bast, 2001).

Der verwendete Caso-Agar ist ähnlich aufgebaut, wie die Bouillon. Seine Festigkeit erhält der Nährboden durch den Zusatz von Agar Agar. Dieses Verfestigungsmittel ist ein stark vernetztes Polysaccharidgemisch aus Meeresalgen, das aus Agarose und Agaropektin besteht. Agar ist ein gelbliches Pulver, welches in destilliertem Wasser gelöst wird und ab 80°C eine klare Flüssigkeit bildet. Nach dem Autoklavieren bleibt das Gemisch bis ca. 40°C flüssig. So kann es dann in sterile Petrischalen gegossen werden, wo es relativ schnell zu einem stabilen Gel erstarrt. Dieses Gel besteht aus einer weitmaschigen Matrix, wodurch Wasser, Nährstoffe und Proteine frei diffundieren können (Steinbüchel, 2003).

Das folgende Fließschema soll die Schritte der Gewinnung der Zellen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium* schematisch verdeutlichen.



Im ersten Schritt wird eine sterile Caso-Bouillon hergestellt, die mit dem entsprechenden Bacillus beimpft wird. Dazu wird mit einer sterilen Impföse eine geringe Menge des Bacillus von einer Agarplatte in die Bouillon gegeben. Anschließend wird die beimpfte Bouillon bei 30°C und 130 U/min für 24 Stunden im Schüttler inkubiert. Durch die kreisende Bewegung wird die Oberfläche für den Gasaustausch erhöht. Nach den 24 Stunden im Schüttler werden je 100 µl der gewachsenen Kultur auf sterile Caso-Agar-Platten mittels Oberflächenausstrichverfahren gegeben. Diese Platten werden fünf Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgt das Abschwemmen des gewachsenen Bakteriensporensrasens. Dazu werden auf jede bewachsene Platte drei Milliliter 0,9%-ige Natriumchloridlösung gegeben und die Kultur mit einem Drigalskispatel vorsichtig abgenommen. Die Sporenernte wird anschließend in Eppendorfgläsern gesammelt und sedi-

mentiert, um die reinen Bakteriensporen zu erhalten. Dazu werden die gefüllten Eppendorfgefäße für 20 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Dabei setzen sich am Boden der Eppendorfgefäße die Endosporen der *Bacilli* ab und der entstandene flüssige Überstand wird abpipettiert. Der Vorgang des Zentrifugierens soll insgesamt dreimal erfolgen, um die Reste von Natriumchlorid und Caso-Bouillon zu entfernen. Daher werden die sedimentierten Sporen im Eppendorfgefäß mit einem Milliliter sterilem Sörensenphosphatpuffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung erhält man die reinen Bakteriensporen, die für weitere Verwendungen erneut mit einem Milliliter Sörensenphosphatpuffer aufgefüllt werden und als Ausgangssuspension für anschließende Untersuchungen genutzt werden.

2.2.2 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Da die Zelldichte der Kulturen in der Regel zu hoch für die notwendigen Analysen ist, wird ausgehend von der hergestellten Bacillussuspension eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden 500 µl der Suspension in 4,5 ml steriler Natriumchloridlösung gegeben. Dies stellt die 10¹-Verdünnung dar. Von dieser werden wiederum 500 µl abpipettiert und in 4,5 ml steriles Natriumchlorid gegeben. So erhält man die 10²-Verdünnung. Dies wird, je nach Notwendigkeit, bis zu einer Verdünnungsstufe von 10¹² fortgesetzt. Zur Bestimmung der Keimzahl wird die Verdünnungsreihe mit Hilfe des Oberflächenausstrichverfahrens auf Caso-Agarplatten gebracht. Dazu werden 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe auf eine Agar-Platte gegeben und anschließend mit einem Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die beimpften Platten werden für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Im nächsten Schritt wird die hergestellte Verdünnungsreihe für 20 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Durch diesen Vorgang der Pasteurisation soll sichergestellt werden, dass die vegetativen Zellen abgetötet und die thermoresistenten Endosporen, während der späteren mikroskopischen Untersuchung, deutlich erkennbar sind. Auch diese Verdünnungsreihe wird mit dem Oberflächenausstrich auf Nähragar gegeben und unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

Nach Ablauf der 24 Stunden werden die bewachsenen Platten ausgezählt und die Gesamtkeimzahl berechnet. Dazu wird folgende Formel verwendet.

$$\frac{\sum x * 10^x}{n * 10} = KbE/ml$$

- x – Anzahl der ausgezählten Kolonien
- 10^x – Verdünnungsstufe von x
- n – Anzahl der ausgezählten Platten (Multiplikation mit zehn ist nötig, wenn das Ergebnis in KbE/ml angegeben wird, da 100 μ l Suspension auf die Platte gegeben wurden)

Als Ergebnis erhält man die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in einem Milliliter der Ausgangssuspension [KbE/ml]. Durch die berechneten Mittelwerte kann die Sporenkonzentration der Suspension näherungsweise bestimmt werden.

Für alle Untersuchungen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurden mindestens achtfache Verdünnungen hergestellt und acht Platten zum Auszählen ausgestrichen. Bei *Bacillus subtilis* wurden die Verdünnungsreihen von 10^1 bis 10^8 auf Platten ausgestrichen. Diese konnten jedoch aufgrund des guten Wachstums der Bacilli nicht ausgezählt werden, insbesondere da *B. subtilis* beim Wachsen sehr stark ausschwärmt. Um dieses Verhalten etwas zu minimieren, wurde der Caso-Agar mit Agar-Agar versetzt und zudem die Verdünnungsreihe bis 10^{13} hergestellt. Anschließend wurden die Verdünnungsstufen 10^5 bis 10^{13} per Oberflächenausstrich auf Platten gebracht. Bei der Untersuchung der Kolonien von *Bacillus megaterium* nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, wurde eine Verdünnungsreihe bis 10^8 hergestellt, da nach 24 Stunden eine geringere Gesamtkeimzahl erwartet wurde, als bei fünftägiger Inkubation. In Bezug auf das Wachstum der Kolonien von *Bacillus megaterium* nach 48 stündiger Inkubation bei 30°C, ist eine Zunahme der Gesamtkeimzahl zu erwarten. Daher wurde die Verdünnungsstufe erneut auf 10^{12} erhöht.

2.2.3 Sporenfärbung und Mikroskopie

Endosporen sind stark lichtbrechend und können mittels Phasenkontrastmikroskop als runde bis ovale Strukturen erkannt werden. Die hell erscheinende Spore hebt sich dabei deutlich von der dunklen vegetativen Zelle ab. Um die Endosporen jedoch sicher von anderen lichtbrechenden Zelleinschlüssen zu unterscheiden, wird eine Sporenfärbung vorgenommen. Da die reife Spore von einer undurchlässigen äußeren Hülle umgeben wird, ist sie nur schwer anfärbbar. In dieser Untersuchung wurde die Sporenfärbung nach Wirtz genutzt. Dazu wird ein Ausstrichpräparat der 10^1 -Verdünnung angefertigt und somit ein Teil der Kultur auf einen Objektträger gebracht. Nach

kurzem Lufttrocknen wird die Sporensuspension hitzefixiert, indem sie mehrmals durch den Bunsenbrenner gezogen wird. Anschließend wird eine ausreichende Menge des Farbstoffes Malachitgrün mit einer Pasteurpipette aufgegeben und durch die Brennerflamme fixiert, bis sich eine metallisch glänzende Schicht gebildet hat. Die überschüssige Malachitgrünlösung wird mit destilliertem Wasser abgespült und der Objektträger in ein Objektträgerbad gestellt. Dieses ist mit einer Lösung des roten Farbstoffes Safranin gefüllt. Darin muss der Objektträger für zehn Minuten gegengefärbt werden, um nicht versportete Zellen sichtbar zu machen. Anschließend wird erneut mit destilliertem Wasser abgespült und nach kurzem Lufttrocknen die mikroskopische Analyse vorgenommen. Die beiden genutzten Lösungen von Malachitgrün und Safranin zählen zu den basischen Farbstoffen. Diese werden von der Zelle selbst aufgenommen, während saure Farbstoffe die Zellumgebung färben. Das Malachitgrün dient dazu die Sporen grün anzufärben, während die vegetativen Zellen unter dem Mikroskop braunrot erscheinen (Alexander, 2006).

Beim Mikroskopieren wurde eine 100fache Vergrößerung angewandt.

3. Ergebnisse

3.1 Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgt durch das Auszählen gewachsener Kolonien auf der Agarplatte. Die folgende Tabelle sieben zeigt die Anzahl koloniebildender Einheiten in einem Milliliter Sporensuspension vor und nach der Erwärmung bei 80°C für 20 Minuten. Zudem wird die Inkubationsdauer, der mit Bacilli beimpften Agarplatten, berücksichtigt. Eine detaillierte Auflistung der ausgezählten Keime jeder Verdünnungsstufe der *Bacilli*, ist in der Anlage eins dargelegt.

Tabelle 7: Gesamtkeimzahl pro Milliliter Sporensuspension vor und nach der Pasteurisation

Bacilli	Inkubationsdauer	Gesamte KbE/ml	Gesamte KbE/ml nach 20 min bei 80°C
<i>Bacillus subtilis</i>	5 Tage	$4,2 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^8$
<i>Bacillus megaterium</i>	24 Stunden	$5,3 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$
	48 Stunden	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^9$
	5 Tage	$3,2 \cdot 10^{10}$	$4,3 \cdot 10^9$

Tabelle sieben zeigt die berechneten koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Suspension. Die Zeile von *Bacillus subtilis* zeigt die Gesamtkeimzahl nach der festgelegten fünftägigen Inkubation an. Bei *Bacillus megaterium* wurden drei unterschiedliche Inkubationsstadien untersucht. Es wird deutlich, dass nach einer 24-stündigen Inkubation bereits eine hohe Gesamtkeimzahl in der Ausgangssuspension enthalten ist. Zudem erkennt man die stetige Zunahme der Gesamtkeimzahl von 24 Stunden bis hin zu der eigentlichen Inkubationszeit von fünf Tagen.

Bei beiden Bacilli wird, unabhängig von Inkubationsdauer, deutlich, dass nach dem Pasteurisieren der Verdünnungsreihen die Koloniebildenden Einheiten um eine Zehnerpotenz minimiert wurden. Dies zeigt, dass durch die Hitzeeinwirkung restliche, vegetative Zellen abgetötet wurden, jedoch die Sporen dies überleben und unter geeigneten Bedingungen erneut auskeimen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass ca. 10 % der Ausgangssuspension und somit etwa jede zehnte Zelle versport ist.

3.2 Mikroskopische Auswertung

Im Folgenden werden die mikroskopischen Bilder der hergestellten Endosporen dargestellt. Dabei erfolgte die Betrachtung der untersuchten Bakteriensporen bei 100-facher Vergrößerung.

Die Abbildung vier zeigt die Endosporen von *B. subtilis* nach der Färbung mit Malachitgrün.

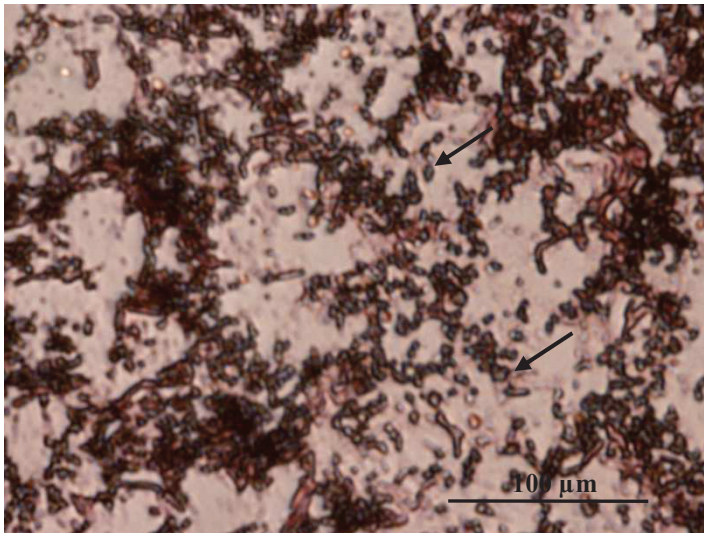


Abbildung 4: *B. subtilis* Sporen (mit Malachitgrün angefärbt)

In Abbildung vier wird deutlich, dass die Sporenbildung bei *B. subtilis* erfolgreich war. Man kann grüne dickwandige Zellen erkennen, bei denen zum Teil ein klarer Sporenkern sichtbar ist. Jedoch sind ebenfalls vereinzelt rötliche vegetative Zellen erkennbar.

Die Abbildung fünf zeigt die Endosporen von *B. megaterium* nach einem Tag Inkubation.

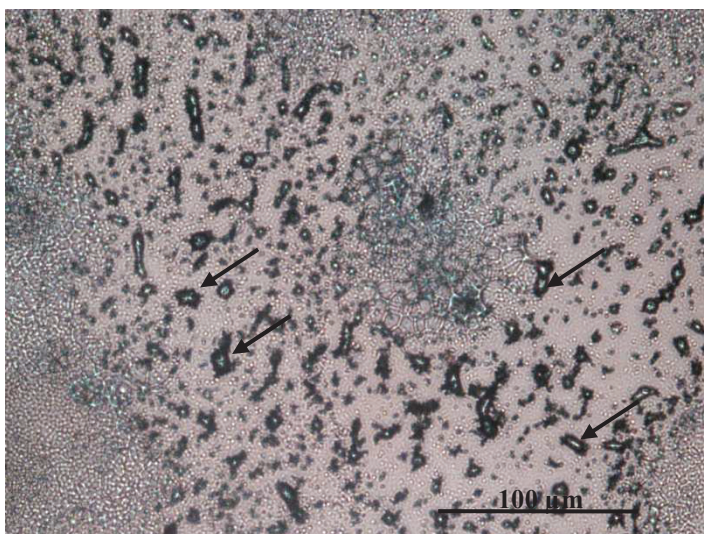


Abbildung 5: *B. megaterium* Sporen nach 24 h (mit Malachitgrün angefärbt)

Man erkennt, dass sich bereits dickwandige Sporen gebildet haben, die aufgrund der Grünfärbung der Hüllschichten gut identifiziert werden können. Jedoch erscheinen am Rand des Präparates noch gehäuft weitere Zellbestandteile.

Die Abbildung sechs zeigt die Endosporen nach 48-stündiger Inkubation der *B. megaterium*-Kultur. Um die lichtbrechenden Eigenschaften der Sporen unter dem Mikroskop zu verdeutlichen, wurde dieses Präparat zunächst ungefärbt mikroskopiert.

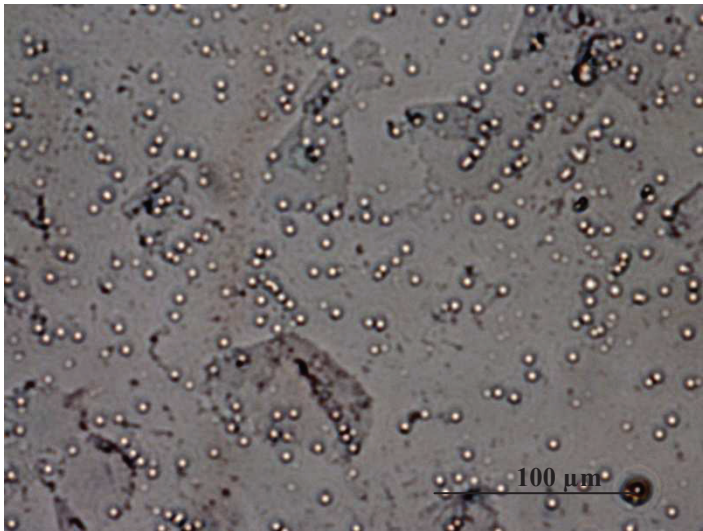


Abbildung 6: *B. megaterium* nach 48 h (ohne Sporenfärbung)

In Abbildung sechs kann man deutlich die hellen, runden Sporen erkennen, während die vegetativen Zellen als dunkle Objekte im Phasenkontrast erscheinen.

Anschließend wurde das Präparat mit Malachitgrün und Safranin gefärbt und erneut mikroskopiert. Das Resultat ist in der Abbildung sieben dargestellt.

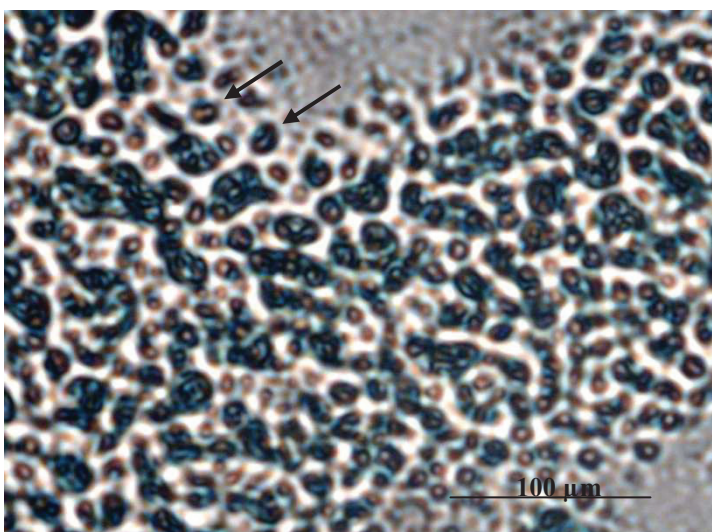


Abbildung 7: *B. megaterium* nach 48 h (mit Malachitgrün angefärbt)

In der Abbildung sieben sind deutlich die Sporen mit ihrem klaren Cytoplasmakern erkennbar, der von den mehrschichtigen, grüngefärbten Sporenhüllen umgeben ist.

In Abbildung acht werden die Endosporen nach fünf Tagen Inkubation bei 30°C und anschließender Färbung mit Malachitgrün dargestellt.

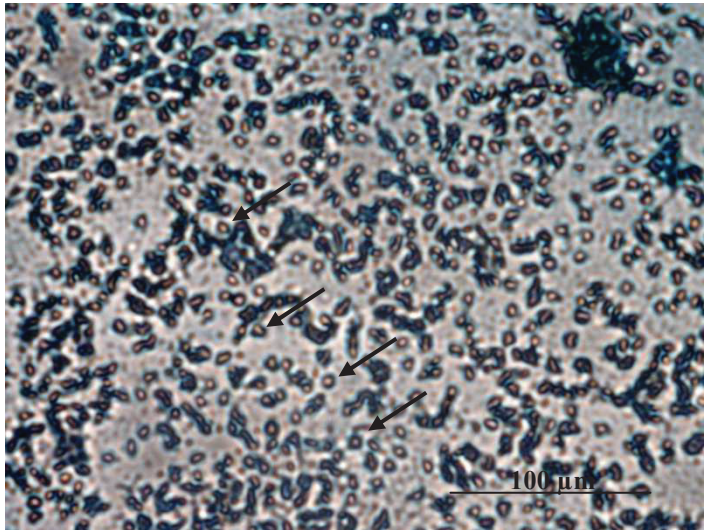


Abbildung 8: *B. megaterium* nach fünf Tagen (mit Malachitgrün angefärbt)

Man erkennt die grüngefärbten Sporen und vereinzelt restliche braunrote vegetative Zellbestandteile. In der Spore kann der Cytoplasmakern durch seine stärkere Lichtbrechung gut identifiziert werden.

Zusammenfassend kann man behaupten, dass die Sporenbildung auf Agarplatten erfolgreich war, denn in jedem der betrachteten mikroskopischen Bilder, sind Endosporen erkennbar. Diese zeichnen sich durch ihre grüngefärbten Hüllen und dem lichtbrechenden Sporenkern aus. Zudem sind vereinzelt vegetative Zellen durch ihre rotbraune Färbung sichtbar.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von selbst hergestellten Endosporen der Bakteriengattungen *Bacillus subtilis* und *Bacillus megaterium*. Dazu wurden die Endosporen zunächst im Labor kultiviert, um sie dann hinsichtlich der Gesamtkeimzahl und Mikroskopie zu beurteilen. Zur näheren Betrachtung der Gesamtkeimzahl, wurde die Verdünnungsreihe vor und nach der Pasteurisation auf Agarplatten ausgezählt. Weiterhin wurde die Entwicklung der Sporenbildung während der fünftägigen Inkubation beobachtet, in dem nach 24 Stunden und 48 Stunden Proben genommen und die Sporen extrahiert wurden.

Nach der Inkubation der beimpften Bouillon, kann eine Trübung durch die gewachsenen Bacilli erkannt werden. Nachdem *Bacillus subtilis* auf elf Platten ausgestrichen wurde, erhält man nach dem Abschwemmen etwa zwölf gefüllte Eppendorfgefäße, die anschließend zentrifugiert werden. Bei *Bacillus megaterium* werden ebenfalls elf Platten ausgestrichen und man erntet die gebildeten Endosporen in insgesamt elf Eppendorfgefäßen für die Zentrifugation. Nach den Zentrifugationsvorgängen kann man erkennen, dass die Sporen etwa ein Drittel des Eppendorfgefäßvolumens ausmachen. Die geernteten Sporen von *Bacillus megaterium* nach 24 und 48 Stunden füllen ungefähr ein Fünftel des Volumens aus. Somit kann bereits anhand der Sporenernte der zu erwartende Anstieg der Zellmassegewinnung mit zunehmender Inkubationsdauer erkannt werden.

Anhand der zentrifugierten Sporen erfolgt die Anfertigung der Verdünnungsreihen, die aufgrund des guten Wachstums der Bacilli bis 10^{12} erfolgen sollte, um das Auszählen zu ermöglichen. *Bacillus subtilis* besitzt vor der Pasteurisation eine Gesamtkeimzahl von $4,2 \cdot 10^9$ Koloniebildende Einheiten pro Milliliter der Ausgangssuspension. Bei der Untersuchung zur Permeabilität von *Bacillus subtilis* für Malachitgrün von Kozuka und Tochikobu (1990) wurde in gleicher Weise die Keimzahl bestimmt. Dabei wurde ein Ergebnis um $2 \cdot 10^9$ KbE/ml erzielt. Somit sind die ausgezählten Keimzahlen der eigens hergestellten Sporensuspension als realistisch anzusehen. Nach der Wärmehandlung ist die Gesamtkeimzahl auf $4,8 \cdot 10^8$ KbE/ml minimiert worden. Ähnliches ist bei *Bacillus megaterium* zu erkennen, bei dem sich die Gesamtkeimzahl von $3,2 \cdot 10^{10}$ nach der Erwärmung auf $4,3 \cdot 10^9$ reduziert. Im Normalfall besteht die Suspension vor der Pasteurisation bereits zum großen Teil aus den gebildeten Sporen. Durch die Abnahme der Gesamtkeimzahl nach der Wärmebehandlung kann man davon ausgehen, dass letzte vegetative Zellen abgetötet wurden. Durch das Ausstreichen auf Nähragar wird den Sporen wieder ein geeignetes Milieu geboten, um auszukeimen und die gebildeten Kolonien können nach 24 Stunden ausgezählt

werden. Anhand der Auswertung der Gesamtkeimzahlen der *Bacilli* kann man erkennen, dass die Ausgangssuspension zu etwa 10 % aus Sporen besteht, bzw. dass sich im Verlauf der Inkubation etwa jede zehnte Zelle zu einer Spore entwickelt hat.

Bei der Inkubation von *Bacillus megaterium* erfolgt zusätzlich nach 24 und 48 Stunden eine Auswertung der gebildeten Sporen. Die Auswertung nach 24-stündiger Inkubation zeigt ebenfalls eine Abnahme der Koloniebildenden Einheiten nach erfolgter Erwärmung von $5,3 \cdot 10^7$ auf $3,5 \cdot 10^6$ KbE/ml. Nach 24 Stunden im Inkubator liegt die Gesamtkeimzahl im Bereich zwischen 10^6 und 10^7 , während nach fünf Tagen bereits Keimzahlen bis 10^{10} gebildet wurden. Somit sind nach 24 Stunden etwas mehr als ein Prozent der Endsporenanzahl gebildet worden. Bei der Auswertung nach 48 Stunden erhält man eine Gesamtkeimzahl von $1,1 \cdot 10^{10}$ KbE/ml vor der Pasteurisation und $1,8 \cdot 10^8$ KbE/ml nach der Erhitzung. Somit sind nach 48-stündiger Inkubation bereits über ein Drittel der am Ende entstandenen Sporenzahl gebildet worden. Somit könnte für die Sporenbildung eine Inkubationsdauer von weniger als fünf Tagen ebenfalls zu den gewünschten Sporensuspensionen für Untersuchungen ausreichen. Dies müsste allerdings mit weiterführenden Experimenten hinsichtlich der Gesamtkeimzahl der gebildeten Sporen nach 72 und 96 Stunden untersucht werden. Nach der Hitzebehandlung bei 80°C für 20 Minuten wurden die vegetativen Zellen abgetötet. Laut Holzapfel (2004) reichen bereits zehn Minuten aus, um bei einer Temperatur von 80°C die nicht versporteten Zellen abzutöten. Durch die erhöhte Erhitzungsdauer sollte eine bessere visuelle Betrachtung gewährleistet werden. In weiteren Untersuchungen könnte geprüft werden, inwieweit diese Erhitzungsparameter, die mikroskopische Auswertung der Endosporen beeinflusst.

Da es sich bei dem Auszählen der Kolonien auf den Agarplatten um eine manuelle Bestimmung handelt, sind fehlerhafte Auswertungen möglich. Hauptursache ist das enorme Ausschwärmen der *Bacilli*, sodass sich eine exakte Abgrenzung der Kolonien schwierig gestaltet. So kann es durchaus möglich sein, dass beim Auszählen mehr oder weniger Keime gezählt wurden, als tatsächlich vorhanden sind. Die Kolonien der untersuchten *Bacilli* erscheinen auf den Platten unregelmäßig und mit wellenartiger Abgrenzung, was die Identifizierung zusätzlich erschwert. Eine weitere Schwierigkeit bei der Auswertung ist die unterschiedliche Zelldichte in den hergestellten Sporensuspensionen. Die jeweils ausgezählten Keimzahlen, sind die Ergebnisse eines untersuchten Präparates und lassen sich daher nur schwer mit den berechneten Gesamtkeimzahlen der anderen untersuchten Bakteriensporen vergleichen. Weitere Fehlerquellen bei der Untersuchung zur Gesamtkeimzahl sind Pipettierfehler, unzureichende Durchmischung der Verdünnungsreihen, Inkubationsfehler, sowie Berechnungsfehler.

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte bei 100facher Vergrößerung. Dabei konnten die Sporen besonders gut aufgrund ihrer starken Lichtbrechung und grünen Färbung der Sporenhüllen identifiziert werden. Die Präparate, die nach der Sporenfärbung betrachtet wurden, lassen hauptsächlich grüne runde Sporen mit hellem Kern erkennen, während vereinzelt noch rötliche vegetative Zellen sichtbar sind. Insbesondere das mikroskopische Bild von *Bacillus megaterium* nach 24 Stunden zeigt am Rand eine Vielzahl von Zellbestandteilen. Diese sind jedoch nach 48 Stunden reduziert worden. Zusätzlich wurde zur besseren Darstellung der starken Lichtbrechungseigenschaften ein Präparat von *Bacillus megaterium* (nach 48 Stunden Inkubation) ohne Sporenfärbung mikroskopiert. Dabei konnten deutlich die hellen runden Bereiche erkannt werden. Nach der anschließenden Sporenfärbung wurden dann die wirklichen Sporen gefärbt, während eventuelle andere lichtbrechende Zelleinschlüsse das Malachitgrün nicht aufnehmen. Nach der Färbung erscheinen die Sporen unter dem Mikroskop größer. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die starke Lichtbrechung von dem Cytoplasma des Sporenkerns ausgeht und die Hüllen erst durch die Sporenfärbung in ihrem vollständigen Umfang erkennbar sind. Problematisch ist auch hier die Untersuchung von unterschiedlichen Präparaten mit verschiedenen Zelldichten, wodurch eine vergleichbare Auswertung schwierig ist.

Die mikroskopische Analyse der Endosporen erfolgte mit dem Mikroskop und einem entsprechenden Programm am Computer. Das Programm ermöglicht das Einfügen eines Maßstabes in das mikroskopische Bild zur genaueren Darstellung der Größenverhältnisse. Dieser Maßstab wurde beim Abspeichern der Bilder nicht übernommen, sodass die angezeigten Maßstäbe in der mikroskopischen Auswertung nachträglich manuell eingefügt wurden. Dadurch ist es möglich, dass die angezeigten 100 µm nicht exakt der Abmessungen entsprechen.

Eine vergleichende Auswertung der erhaltenen Ergebnisse ist schwierig, da die Sporulation entweder erfolgreich verläuft, sodass Sporen gebildet werden und diese durch die Berechnung der Gesamtkeimzahl und unter dem Mikroskop ausgewertet werden können, oder keine Sporen gebildet wurden und daher keine auswertbaren Resultate erzielt werden konnten.

Im Bereich der Lebensmittelindustrie ist es ein elementares Ziel die Lebensmittel möglichst lange in ihrer Qualität zu erhalten und eine ausreichende Haltbarkeit zu gewährleisten. Dafür sind Untersuchungen bezüglich Bakteriensporen unabdingbar. Zusammenfassend ist erkennbar, dass die Sporenbildung auf Nährböden erfolgreich durchgeführt wurde und anhand der gebildeten Endosporen Experimente und Untersuchungen hinsichtlich der Eigenschaften und Merkmale vorgenommen werden können.

5 Zusammenfassung

Die Sporulation ist ein komplizierter Prozess, der hauptsächlich durch Nährstoffentzug während des Wachstums ausgelöst wird. Bei der Sporulation wird in der vegetativen Mutterzelle durch inäquale Teilung und Synthese der umgebenden Hüllen die Spore gebildet. Die Endospore stellt eine Dauerform dar, die ungünstige Lebensbedingungen überstehen und unter geeigneten Umständen wieder Auskeimen kann. Dabei nimmt sie Wasser auf, quillt und verliert so ihre Hüllen, sodass sich wieder eine vegetative Zelle bildet. Als Sporenform besitzt die Zelle einen reduzierten Stoffwechsel und hält extremer Hitze, Strahlung, Austrocknung und chemischen Agenzien stand. Dies begründet auch ihre enorme Bedeutung für die Abtötung von Mikroorganismen bei der Lebensmittelproduktion. Erst wenn auch die Sporen eliminiert wurden, kann von einem sicheren Lebensmittel ausgegangen werden. Dazu muss eine Hitzebehandlung bei hohen Temperaturen erfolgen, die Sterilisation. Die Hauptursache für ihre enormen Resistenzeigenschaften sind die mehrschichtigen Umhüllungen aus Peptidoglykan und Proteinen, der geringe Wassergehalt im Sporenkern, sowie die Anteile an Dipicolinsäure und kleiner säurelöslicher Proteine.

Im Labor werden durch das Beimpfen der Bouillon und anschließendem Ausstrich auf Agarplatten die Sporen nach fünftägiger Inkubation gebildet. Die Untersuchung und Charakterisierung der Endosporen erfolgt durch die Bestimmung der Gesamtkeimzahlen vor und nach der Pasteurisation. Dabei werden bei der Hitzebehandlung die übrigen vegetativen Zellen abgetötet, sodass die Sporen bei der mikroskopischen Analyse sichtbar werden. Dies verdeutlicht, dass durch die enorme Hitzeresistenz der Sporen, eine Wärmebehandlung bei 80°C nicht ausreicht, um die Endosporen zu eliminieren. Diese könnten anschließend durch geeignete Umweltbedingungen wieder Auskeimen und zu gesundheitsgefährdenden Lebensmitteln führen. Daher ist eine Behandlung mit hohen Temperaturen unabdingbar. Als Leitkeim für die notwendigen Parameter bei der Sterilisation gilt der *Geobacillus stearothermophilus*, deren Sporen nach einer Hitzebehandlung von 121°C für 15 Minuten abgetötet werden und somit ein Auskeimen verhindert wird.

6 Literaturverzeichnis

Alexander, S.; Strete, D.: Mikrobiologisches Grundpraktikum: Ein Farbatlas. 1. Auflage. München: Addison-Wesley Verlag, 2006.

Antraninkin, G.: Angewandte Mikrobiologie. 1. Auflage. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2006.

Bast, E.: Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2. Auflage. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001.

Baumgart, J. (Hrsg.); Becker, B.(Hrsg.); Stephan, R. (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 57. Aktualisierung. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 02/2012 (Grundwerk 1994).

Buselmaier, W.: Biologie für Mediziner. 11. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2009.

Carl Roth GmbH & Co. KG: Produktdatenblatt Caso-Bouillon. Karlsruhe, 11/2012.
http://www.carlroth.de/media/_de-de/usage/X938.pdf 15.01.2013

Fuchs G. (hrsg.); Schlegel, H. (Begr.): Allgemeine Mikrobiologie. 8. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2007.

Höffeler, F.: Bildatlas Cytologie. 1. 1Auflage. Frankfurt am Main: Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch GmbH, 2003.

Holzappel, W. (Hrsg.); Baumgart, J.; Heeschen, W.: Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und –Hygiene. 3. Auflage. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 2004.

Netzwerk Universität Gymnasien Industrie: Autoklavieren: Zusatzinformationen. Ulm, 11/2009
<http://www.nugi-zentrum.de/experimente/grundlagen/autoklavieren/allgemeines/zusatzinfo.html-print=1> 21.01.2013

Kozuka, S.; Tochikobu, K.: Permeability of dormant spores of *Bacillus subtilis* to malachite green and crystal violet. *Journal of General Microbiology*, 1990.

Parish, J.H.: *Studies in microbiology Volume I, Developmental Biology of Prokaryotes*. Berkeley and Los Angeles: Blackwell Scientific Publications, 1979.

Schlegel, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie. 6. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1985

Schröder, H.: Mikrobiologisches Praktikum. 5. Auflage. Berlin: Volk und Wissen Verlag GmbH, 1991.

Setlow, P.: Spores of *Bacillus subtilis* and their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. University of Connecticut Department of molecular, microbial and structural biology USA: Journal of applied microbiology ISSN 1364-5072, 2005.

Steinbüchel, A. ; Oppermann-Sanio, F.: Mikrobiologisches Praktikum. 1. Auflage. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 2003.

VDMA-Arbeitskreis „Schnittstellenproblematik bei Aseptikanlagen“: Merkblatt Prüfung von Aseptikanlagen mit Packmittelentkeimungseinrichtungen auf deren Wirkungsgrad. Nummer 6. Frankfurt am Main: VDMA-Fachverbandszeitschriften Nahrungsmittelmaschinen und Verpackungsmaschinen, 2002.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Phasen der Endosporenbildung (Fuchs, 2007).....	8
Abbildung 2: Aufbau einer Endospore (Setlow, 2005).....	10
Abbildung 3: chemischer Aufbau der Dipicolinsäure (www.nugi-zentrum.de)	10
Abbildung 4: <i>B. subtilis</i> Sporen (mit Malachitgrün angefärbt).....	25
Abbildung 5: <i>B. megaterium</i> Sporen nach 24 h (mit Malachitgrün angefärbt).....	25
Abbildung 6: <i>B. megaterium</i> nach 48 h (ohne Sporenfärbung)	26
Abbildung 7: <i>B. megaterium</i> nach 48 h (mit Malachitgrün angefärbt).....	26
Abbildung 8: <i>B. megaterium</i> nach fünf Tagen (mit Malachitgrün angefärbt)	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften von vegetativer Zelle und Endosporen	13
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme	15
Tabelle 3: verwendete Medien und Lösungen	15
Tabelle 4: verwendete Chemikalien	16
Tabelle 5: verwendete Hilfsmittel und Geräte	16
Tabelle 6: Bestandteile der verwendeten Caso-Bouillon (www.carlroth.de).....	18
Tabelle 7: Gesamtkeimzahl pro Milliliter Sporensuspension vor und nach der Pasteurisation....	24
Tabelle 8: KbE von <i>B. subtilis</i> nach fünf Tagen Inkubation.....	36
Tabelle 9: KbE von <i>B. megaterium</i> 24 Stunden nach Inkubation.....	36
Tabelle 10: KbE von <i>B. megaterium</i> 48 Stunden nach Inkubation.....	37
Tabelle 11: KbE von <i>B. megaterium</i> 5 Tage nach Inkubation.....	37

Anlagen

Anlage 1: Ausgezählte koloniebildende Einheiten zur Gesamtkeimzahlbestimmung

Tabelle 8: KbE von *B. subtilis* nach fünf Tagen Inkubation

Verdünnungsstufe	KbE	KbE nach 20 min bei 80°C
10^5	n.a.	n.a
10^6	304	267
10^7	105	91
10^8	44	6
10^9	13	2
10^{10}	3	2
10^{11}	2	0
10^{12}	0	0
10^{13}	0	0
Gesamt-KbE/ml	$4,2 \cdot 10^9$	$4,8 \cdot 10^8$

Tabelle 9: KbE von *B. megaterium* 24 Stunden nach Inkubation

Verdünnungsstufe	KbE	KbE nach 20 min bei 80°C
10^1	n.a.	227
10^2	n.a.	94
10^3	n.a.	23
10^4	n.a.	15
10^5	89	13
10^6	56	11
10^7	36	7
10^8	17	2
Gesamt-KbE/ml	$5,3 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^6$

Tabelle 10: KbE von *B. megaterium* 48 Stunden nach Inkubation

Verdünnungsstufe	KbE	KbE nach 20 min bei 80°C
10 ⁵	n.a.	n.a.
10 ⁶	n.a.	140
10 ⁷	134	108
10 ⁸	92	68
10 ⁹	29	13
10 ¹⁰	21	7
10 ¹¹	3	0
10 ¹²	0	0
Gesamt-KbE/ml	1,1*10 ¹⁰	1,8*10 ⁹

Tabelle 11: KbE von *B. megaterium* 5 Tage nach Inkubation

Verdünnungsstufe	KbE	KbE nach 20 min bei 80°C
10 ⁵	n.a.	n.a.
10 ⁶	n.a.	n.a.
10 ⁷	n.a.	93
10 ⁸	183	6
10 ⁹	8	3
10 ¹⁰	8	1
10 ¹¹	5	2
10 ¹²	1	0
Gesamt-KbE/ml	3,2*10 ¹⁰	4,3*10 ⁹

Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Unterschrift