

3. Eigene Untersuchungen

Das häufige Vorkommen von Enterokokken in Lebensmitteln nicht nur in geringem Maß sowie der Einsatz einiger Enterokokkenstämme in der Lebensmittelproduktion als Starterkeime ist unbestritten. Das gleiche gilt für das Aminbildungsvermögen dieser Keimgruppe. Desweiteren ist die Wirkung bestimmter Amine, u.a. auch des Phenylethylamins, auf den lebenden Organismus in der internationalen Literatur seit längerem bekannt.

Beim Studium der mir zugänglichen Literatur fanden sich wenige genauere Angaben zur Fähigkeit der Enterokokken Phenylethylamin zu bilden.

In den eigenen Untersuchungen wurde daher eine repräsentative Auswahl verschiedener Enterokokkenspezies, die zuvor aus unterschiedlichen Lebensmittelproben isoliert worden waren, auf ihr Aminbildungsvermögen, speziell Phenylethylamin und Tyramin, geprüft. Die Enterokokken stammten entweder direkt vom Lebensmittel oder aus Lebensmitteln, die zuvor enzymatischen Prozessen, aber keiner Hitzebehandlung als Fertigerzeugnis, unterlegen haben.

Als Ergebnis der Literaturrecherchen sowie als Grundlage für die eigenen Untersuchungen blieben folgende Fragen offen:

1. In welchem Umfang sind phenylethylaminbildende Enterokokkenstämme in Lebensmitteln zu finden?
2. In welchem Umfang wird unter optimalen Bedingungen in vitro von den verschiedenen Enterokokkenspezies Phenylethylamin gebildet?
3. In welchem Verhältnis stehen Keimzahlentwicklung und Aminbildung?

3.1. Material und Methodik

Die eigenen Untersuchungen wurden in 5 Untersuchungsreihen gegliedert.

Die erste Untersuchungsreihe diente der Probennahme und Isolierung der Enterokokken.

Es wurden tierische Rohstoffe und Lebensmittel ausgewählt, in denen ein Vorkommen dieser Bakterien wegen der Verwendung unerhitzter Materialien zu erwarten ist. Daraus ergab sich die Wahl folgender Proben: Schweine-, Rinderschlachtkörper, Käse und Hackfleisch. Es wurden Käsesorten ausgewählt, zu deren Herstellung erfahrungsgemäß Rohmilch verwendet wird: Emmentaler, Edamer, Tilsiter, Butterkäse, Camembert, Limburger, Edelpilzkäse, Juressic, Romadur, Münster sowie Französischer Bergkäse.

Zusätzlich wurden 15 Enterokkokenstämme untersucht, welche aus der Darmflora von Hühnern isoliert worden waren. In Tab. 9 sind Art und Aufteilung der Lebensmittelproben dargestellt.

Tab. 9: Art und Aufteilung der Lebensmittelproben

Probe	Probenzahl	Herkunft
Abstriche von Schweineschlachtkörpern	63	Fleischzentrum Lausitz GmbH, Kasel-Golzig
Abstriche von Rinderschlachtkörpern	20	Fleischzentrum Lausitz GmbH, Kasel-Golzig
Käse, frisch und abgepackt	17	Berliner Verbrauchermärkte
Hackfleisch vom Schwein, frisch und frisch abgepackt	10	Fleischtheken Berliner Verbrauchermärkte

Die Probenentnahme an Schweine- und Rinderschlachtkörpern erfolgte mittels Naß-Tupfertechnik, wobei mit einem sterilen Tupfer, befeuchtet mit steriler physiologischer Kochsalzlösung, bestimmte Oberflächenbereiche des Schlachtkörpers abgewischt wurden. Abgestrichen wurde etwa eine Fläche von 100 cm² der Bauchinnenseite, der Bauchaußenseite, der Brustaußenseite

sowie der Außenseite der Schulter, wobei der Tupfer jeweils um 90° gedreht wurde, so dass eine Tupfersammelprobe entstand. Die Proben wurden am Ende der Schlachtkette entnommen, bevor man die Schlachtkörper der Kühlung zuführte. Die so mit Oberflächenkeimen behafteten Tupfer wurden zur weiteren Bearbeitung in sterile Röhrchen verbracht und in einer geschlossenen Box in das Labor des Instituts für Fleischhygiene- und technologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin transportiert.

Die Tupfer wurden noch am Tag der Probenentnahme zur selektiven Anreicherung von Enterokokken in 5 ml Azid-Glucose-Bouillon (Biotest) (Rezept 1) gegeben und bei 37 °C 24 h bebrütet. Dabei ist Natriumazid in einer Konzentration vorhanden, welche bei maximaler Schonung der Enterokokken die gramnegative Begleitflora weitgehend hemmt (Merck-Nährbodenhandbuch, 1997).

Danach wurde 0,1 ml der bebrüteten, gut durchmischten Azid-Glucose-Bouillon in 5 ml 6,5 % NaCl-Bouillon (ISO-Bouillon + 6,5 % NaCl) überführt und für zwei Tage in einem 37 °C Brutschrank belassen. Anschließend erfolgte zur weiteren Selektierung die Beimpfung von KF-Agar (Merck) (Rezept 2) mit einer Öse aus jeder bebrüteten, aufgeschüttelten Bouillon. Die unerwünschten Keimarten werden hierbei weitgehend durch Natriumazid unterdrückt. Die Enterokokken verwerten die zugesetzten Zucker (Maltose, Laktose) unter Säurebildung und begünstigen somit ihr Wachstum (Merck-Nährbodenhandbuch, 1997).

Die Platten wurden halbiert, wobei jeweils eine Hälfte mit Azid-Glucose-Bouillon und die andere Hälfte mit der 6,5%igen NaCl-Bouillon beimpft wurde. Die KF-Agar Platten wurden 24-48 h bei 37 °C bebrütet.

Zur Untersuchung der Käse- und Hackfleischproben wurden jeweils 25 g steril entnommen und in 225 ml Peptonwasser (Biotest) (Rezept 3) mit dem Ultraturrax der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG bei 20 000 U/min 3 min homogenisiert. Zwischen zwei Zerkleinerungen wurde das Dispergierwerkzeug mit siedendem, sterilem Aqua dest. gespült.

Anschließend wurde das Homogenat zweieinhalb Stunden stehen gelassen, so dass sich die festen Bestandteile absetzten. Von dem klaren Überstand wurde

1 ml in Azid-Glucose-Bouillon überpipettiert und bei 37 °C 24 Stunden bebrütet. Danach erfolgte die Beimpfung von KF-Agar mit einer Öse der Bouillon.

Alle Übertragungen erfolgten unter sterilen Kautelen und wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zusätzlich zu diesen Lebensmitteln wurden Proben von transporttoten Masthähnchen untersucht. Die isolierten Enterokokkenstämme stammten hier aus dem Hühnerdarm. Da infolge des Geflügelschlachtprozesses insbesondere beim Brühen, Rupfen und Ausschachten die Geflügelhaut vornehmlich mit Kotschmutz kontaminiert wird (SCHIEFER, 1986; FEHLHABER u. JANETSCHKE, 1992), können auch diese nicht direkt von Verzehrteilen des Huhnes entnommenen Proben in die Untersuchungen einbezogen werden.

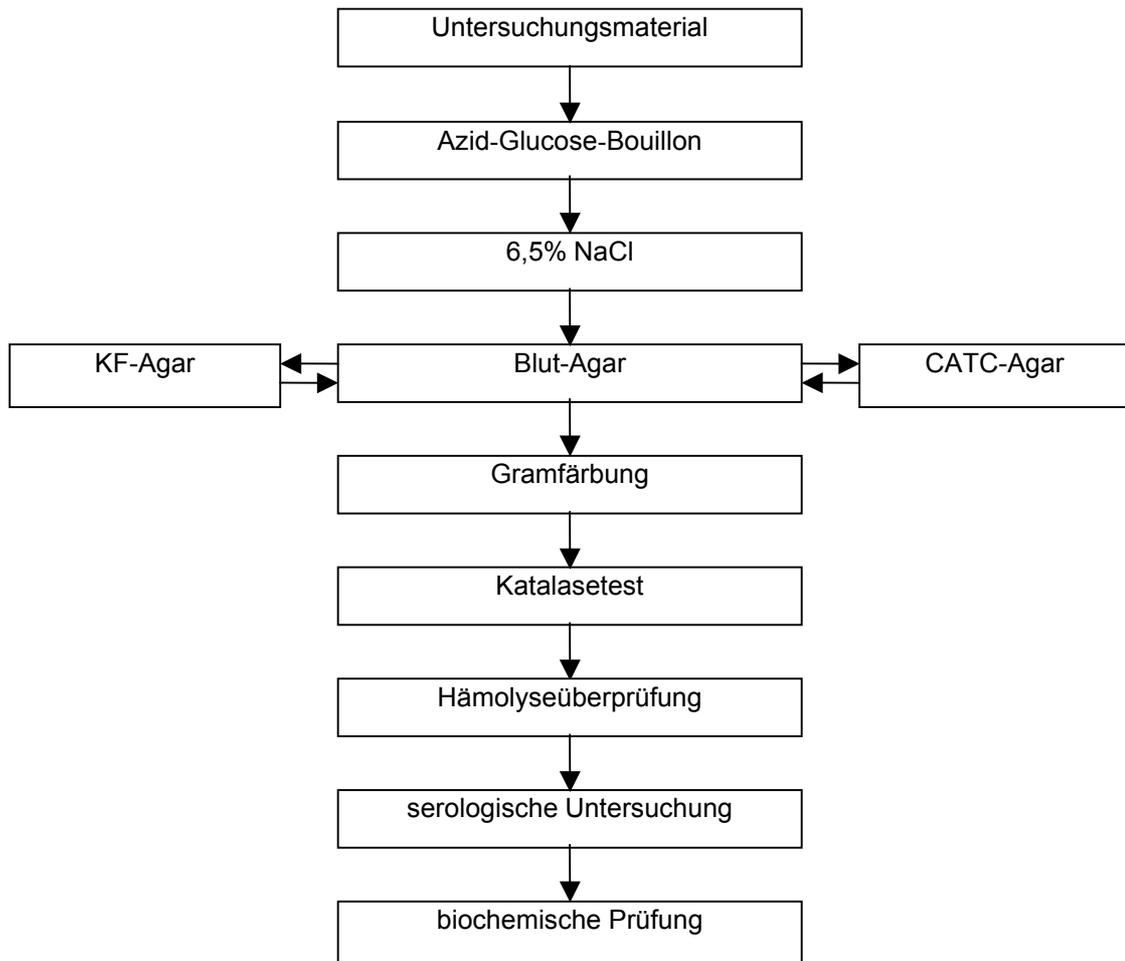
Die Tierkörper wurden unter sterilen Bedingungen eröffnet, mit einer sterilen Öse erfolgte dann ein Abstrich der Darmschleimhaut. Die Öse wurde direkt auf CATC (Citrat-Azid-Tween-Carbonat) -Agar (Merck) (Rezept 4) ausgestrichen. Die hohen Konzentrationen an Citrat und Azid hemmen die Begleitflora fast vollständig (Merck-Nährbodenhandbuch, 1997).

Die durch die jeweiligen Aufbereitungsarten gewonnenen Kolonien wurden durch Vereinzeln und abwechselnde Verdünnungsaustriche auf KF-, CATC- und Blut-Agar gereinigt. Anschließend wurden die Stämme differenziert (siehe Tab. 3, S. 18).

Die zweite Untersuchungsreihe diente der Differenzierung der Enterokokkenspezies.

Die Einstufung der isolierten Bakterien zu der Gruppe der Enterokokken erfolgte nach den allgemeinen Differenzierungskriterien (in Anlehnung an 9. Auflage Bergey's Manual, HOLT et al., 1994; siehe Kap. 2.1.3., S. 11).

Abb. 3: Untersuchungsgang zur Identifizierung von Enterokokken



Enterokokken sind in der Lage, das farblose 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu einem roten Formazan zu reduzieren. Der Nachweis gelingt mittels CATC (Citrat-Azid-Tween-Carbonat) Agar (REUTER, 1968).

Enterokokken besitzen weiterhin die Fähigkeit das Glycosid Äsculin in Glucose und Äsculetin zu hydrolisieren. Äsculetin bildet mit Eisen(III)-Ionen einen olivgrünen bis schwarzen Komplex. Der Nachweis gelingt mittels Kanamycin-Äsculin-Azid-Agar (Biotest) (Rezept 5). Kanamycin und Azid hemmen die Begleitflora. Da Enterokokken eine sehr geringe Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen aufweisen, wachsen sie auf diesem Nährmedium fast ungehindert (Merck-Nährbodenhandbuch, 1997).

Alle untersuchten Stämme wurden auf die oben genannten Eigenschaften geprüft.

Die für die Untersuchungen verwendeten Referenzstämme sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Referenzstämme

Spezies	Stamm	Herkunft
<i>Ec. faecalis</i>	DSM 2570	Braunschweig, 1991
<i>Ec. faecium</i>	NICB 10415	Firma Schevita, Pfaffenhofen, 1988
<i>Ec. hirae</i>	DSM 20160	Braunschweig, 1989
<i>Ec. durans</i>	SSHK 76	Reodema, Serumwerke Dessau, 1991
<i>Ec. gallinarum</i>	DSM 20628 ^T	Braunschweig, 1989
<i>Ec. casseliflavus</i>	DSM 20680	Braunschweig, 1984
<i>Staph. aureus</i>	DSM 799	Braunschweig, 1996

Zum Nachweis des gruppenspezifischen Antigens wurde ein kommerzieller Latex-Agglutinationstest durchgeführt. Es handelte sich hierbei um *Slidex Strepto-Kit* der Firma bioMerieux. Nach Anzucht der Stämme auf Blutagar (Rezept 6) wird das Antigen enzymatisch aus der Zellwand extrahiert. Die mit einem Anti-Streptokokken-Gruppenantigen-Antikörper beschichteten Latexpartikel agglutinieren mit dem Extrakt bei Vorliegen des entsprechenden Antigens.

Die Ausdifferenzierung der Isolate erfolgte mit thermischen Wachstumsversuchen bei 50 °C und fünf biochemischen Reaktionen: Wachstum in 0,04 % Kalium-Tellurit-Bouillon, Hämolyse von Schafbluterythrozyten, Reduktion von M- α -D-G (Methyl- α -D-Glucopyranosid) sowie Sorbit- und Arabinosefermentation. Es wurde das Differenzierungsschema nach HAHN et al., 1970, modifiziert nach NUSSER, 1991, verwendet (siehe Kap. 2.1.3., S. 17).

Die Beurteilung der einzelnen Parameter geschah nach 24stündiger Bebrütung der beimpften Nährmedien bei 37 °C. Das Wachstum der Enterokokken bei einer Temperatur von 50 °C wurde nach 72 h bestimmt.

Die Hämolysebestimmung erfolgte auf Nähragar 1 (Sifin) mit 5 % Hammelblut an Einzelkolonien ohne optische Hilfsmittel (HAHN et al., 1970).

Die Stämme der Spezies *Ec. faecalis* sind in der Lage, Telluritsalze zu metallischem Tellur zu reduzieren. Iso-Bouillon (Rezept 7) mit einem Zusatz von 0,04 % Kaliumtellurit dient dem Nachweis dieser Reaktion. In positivem Fall bildet sich ein schwarzer, metallischer Niederschlag (BURKHARDT, 1992).

Der Zucker Methyl- α -D-Glucopyranosid wird durch die beiden Stämme *Ec. casseliflavus* und *Ec. gallinarum* vergoren. Als einprozentige Lösung in Phenolrotfleischbouillon ergibt sich bei positiver Reaktion ein gelber Farbumschlag (DEVRIESE et al., 1996).

Arabinose und Sorbit sind zwei weitere Zucker, deren Spaltung nur einigen Enterokokkenspezies gelingt. Als 1%iger Zusatz zu einem Basalmedium (Rezept 8) ergibt sich bei positiver Reaktion ein grüner Farbumschlag. Als Indikatoren dienen Bromkresolgrün und Bromkresolpurpur (BURKHARDT, 1992).

Neben der Ausdifferenzierung nach oben stehenden Kriterien wurde gleichzeitig eine biochemische Identifizierung mittels *rapid ID 32 strep* (bioMerieux) durchgeführt, in welcher sich derselbe Stamm mit mindestens 85%iger Sicherheit identifizieren lassen mußte.

Alle Stämme, die in einem der Merkmale unsicher reagierten oder bei denen der *rapid ID 32 strep* eine Stammidentifizierung unter 85 % anzeigte, wurden den *Ec. ssp.* zugeordnet.

Die Rezepte aller verwendeten Nährmedien sind im Anhang aufgelistet.

Die dritte Untersuchungsreihe diente der Referenzstammfindung.

Zur Ermittlung eines stark phenylethylaminbildenden *Enterococcus faecalis* Stammes als Referenzstamm wurde die Methode der Dünnschichtchromatographie (DC) zum Aminnachweis gewählt (BEUTLING, 1996b). Insgesamt erfolgte ein semiquantitativer Nachweis der Phenylethylaminbildung an 18 (25 %) der isolierten *E. faecalis* Stämmen. Die Anzahl der ausgesuchten Stämme betrug vom Schwein 8, vom Rind 4 sowie von Käse, Hackfleisch und vom Huhn jeweils 2 Stämme. Als negative Kontrolle diente ein *Staphylococcus aureus* Stamm (ATCC 6538).

Frische Kolonien der ausgewählten Stämme wurden in 5 ml ISO-Bouillon überimpft. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37 °C erfolgte daraus die Überführung von 0,1 ml in 5 ml Tyrosinbouillon (Rezept 9). Diese wurde 72 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die bebrütete Tyrosinbouillon wurde in einer Ultrazentrifuge K24D (VEB MLW Medizintechnik Leipzig) 20 min mit 9000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Als Proben fanden dann der reine dekantierte Überstand sowie dessen Verdünnungen im Verhältnis 1:2, 1:2,5, 1:3 und 1:4 Verwendung. DC-Platten der Marke „Silufol“, (Firma Cavalier, ČSSR) wurden mit 2,5 µl jeder Probe beschickt. Zusätzlich erfolgte das Auftragen von 0,1%iger Phenylethylaminlösung in Aqua dest. als Positivkontrolle sowie einer Probe des *Staph. aureus* Stammes und unbeimpfte Tyrosinbouillon als Negativkontrollen auf jede Platte. Nach Luftrocknung wurden die DC-Platten senkrecht in Laufgefäße gestellt. Das Laufmittel setzte sich aus iso-Propanol, 25%iger Ammoniaklösung und Aqua dest. im Verhältnis 8:1:1 zusammen.

Nachdem eine Laufmittelfronthöhe von 10 cm (ca. 90 min) erreicht war, wurden die Platten dem Laufgefäß entnommen und luftgetrocknet. Zum Nachweis der Aminflecken in den Chromatogrammen wurden die DC-Platten in eine Lösung aus 0,35 g Ninhydrin in 100 ml n-Butanol und 4 ml Eisessig getaucht und erneut luftgetrocknet. Zur Farbentwicklung wurden die Platten anschließend auf eine Heizplatte (Thermoplate S, DESAGA, Sarstedt Gruppe) mit 100 °C gelegt.

Die Untersuchungen wurden als Doppelversuche durchgeführt.

Die vierte Untersuchungsreihe diente der Abschätzung des Ausgangskeimgehaltes der Tyrosinbouillon für die Aminbestimmungsversuche. Dieser sollte zwischen 10^4 - 10^6 KbE/ml betragen. Dazu wurde die Keimzahlentwicklung des Referenzstammes Fs 202 untersucht. Ausgehend davon sollte die Bebrütungszeit der Vorkultur sowie deren Überimpfungsvolumen in die Tyrosinbouillon für die nachfolgenden Aminbildungsversuche ermittelt werden.

Um frische Kolonien zu erhalten wurde der Stamm auf Lebensmittel-Keimzahlagar (Merck) (Rezept 10) 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach erfolgte die Überimpfung von 3-5 Kolonien in 3 ml Nährbouillon I mit 1% Dextrose. Diese Nährbouillon wurde bei 37 °C bebrütet. Keimzahlbestimmungen erfolgten zu Versuchsbeginn (Stunde 0) sowie nach 3, 6 und 24 Stunden der Bebrütung. Die Keimzählungen wurden nach dem Tropfplattenverfahren durchgeführt (BAUMGART, 1998).

Die Durchführung erfolgte, indem 1 ml der keimhaltigen Probenflüssigkeit in das erste einer Reihe von Reagenzröhrchen pipettiert wurde, die mit 9 ml Drop (Rezept 11) gefüllt waren. Nach der Durchmischung des Inhalts des Röhrchens wurde hieraus wieder 1 ml in das zweite Reagenzröhrchen pipettiert. Dieser Vorgang wiederholte sich bis zur erforderlichen, d.h. später wahrscheinlich auswertbaren, Verdünnungsstufe.

Aus den Verdünnungsstufen wurde auf jeweils 2 Lebensmittel-Keimzahlagarplatten je 0,1 ml bakterienhaltige Dropflüssigkeit (Verdünnungslösung für weitere Dezimalverdünnungen nach L 06.00-19, Amtl. Sammlung § 35 LMBG) aufgetragen und verteilt. Bebrütet wurden die Platten unter aeroben Bedingungen, zwei Tage bei 30 °C. Die Untersuchungen wurden als Doppelversuch und unter sterilen Kautelen durchgeführt.

Zur Ermittlung der jeweiligen Keimzahl wurden stets 2 gut auswertbare Verdünnungsstufen herangezogen, wobei mindestens eine Verdünnungsstufe Platten enthielt, auf denen zwischen 1 und 100 Kolonien vorlagen. Das Auszählen der Kolonien erfolgte mit bloßem Auge oder unter Zuhilfenahme einer Lupe.

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde der gewogene Mittelwert \bar{c} ermittelt. (Amtl. Sammlung § 35 LMBG)

Die Keimzahl errechnet sich nach der Formel:

$$\text{Keimzahl} = \bar{c} \times r$$

\bar{c} = gewogener Mittelwert der Koloniezahlen der ausgewerteten Verdünnungsstufen

r = reziproke Zehnerpotenz der entsprechenden Verdünnungsstufe

Die Keimzahl wird mit einem Zahlenwert von 1,0 bis 9,9 multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz angegeben.

Die fünfte Untersuchungsreihe diente der Ermittlung der Phenylethylaminbildung durch Enterokokken.

Mit dieser Versuchsreihe sollte die Entwicklung der Phenylethylaminbildung der einzelnen Enterokokkenstämme über einen Zeitraum von 3 Tagen untersucht werden. Gleichzeitig sollten die Keimzahlentwicklung und die pH-Wertentwicklung der Bouillon in Bezug zur Aminbildung ermittelt werden.

Diese Versuchsreihe wurde in zwei Untersuchungspunkte gegliedert:

A: Kultivierung der Enterokokken

B: Quantitative Bestimmung von Phenylethylamin

A: Kultivierung der Enterokokken

Zum Herstellen der Vorkultur wurden 3 ml Nährbouillon I (Sifin) + 1% Dextrose mit 3-5 frischen Kolonien des jeweiligen Enterokokkenstammes beimpft. Die Kolonien stammten von ISO-Agarplatten. Die Bebrütung der Vorbouillon erfolgte drei Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden 0,1 ml der bebrüteten Nährbouillon in sterile Reagenzröhrchen mit 5 ml Tyrosinbouillon pipettiert. Die Bebrütung der Tyrosinbouillon erfolgte bei 30 °C in einem Wasserbad W26 der Firma Haake. In jeder Versuchsreihe wurden der Referenzstamm Fs 202 als Positivkontrolle sowie ein *Staph. aureus* Stamm (ATCC 6538) als Negativkontrolle mitgeführt.

Jeweils zu Versuchsbeginn (Stunde 0), nach 24, 48 und 72 Stunden wurde eine Keimzählung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem Tropfplattenverfahren, wie bereits unter der dritten Versuchsreihe beschrieben. Nach erfolgter Keimzählung wurde die bebrütete Nährbouillon mittels eines Spritzenfilters 25 mm, 0,2 M PS (Roth) filtriert. Ein Teil der so entstandenen bakterienfreien Probenflüssigkeit wurde in Mikrotubes bei -18 °C zur quantitativen Analyse eingefroren. Mit dem anderen Teil erfolgte jeweils die pH-Wertmessung mit einer SE 100, pH / Pt 1000 Elektrode (Knick, pH-Meter 761 Calimatic). Als Standardlösungen wurden Eichpuffer mit einem pH-Wert von 4,01 und 7,00 der Firma Mettler-Toledo verwendet.

Die gesamten Untersuchungen wurden als Doppelversuch durchgeführt.

B: Quantitative Analyse von Phenylethylamin und Tyramin

Zur quantitativen Analyse von Tyramin und Phenylethylamin mittels HPLC wurden von jeder Spezies Stämme ausgewählt, die gut gewachsen sind, d.h. deren Keimzahl nach 24 Stunden Bebrütung im 10^8 -Bereich lag sowie Stämme, welche sich nach 24 Stunden weniger gut vermehrt haben (Keimzahl im 10^7 -Bereich). Bei den Spezies *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* wurden die wenigen vorhandenen Stämme überprüft.

Die ausgewählten Stämme sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Auswahl der Stämme zur quantitativen Analyse

Spezies	Stamm	Wachstum	Herkunft
Ec. faecalis	Fs 202	+++	Käse
	Fs 015	+++	Schwein
	Fs 020	+++	Schwein
	Fs 106	+++	Rind
	Fs 205	+	Käse
	Fs 209	+	Käse
Ec. faecium	Fc 302	+++	Hackfleisch
	Fc 304	+	Hackfleisch
	Fc 403	+	Huhn
Ec. durans	D 102	+++	Rind
	D 303	+++	Hackfleisch
	D 203	+++	Käse
	D 201	+	Käse
	D 202	+	Käse
Ec. hirae	H 002	+++	Schwein
	H 004	+++	Schwein
	H 005	+++	Schwein
	H 001	+	Schwein
	H 402	+	Huhn
Ec. gallinarum	G 201	+++	Käse
	G 202	+	Käse
Ec. casseliflavus	C 201	+++	Käse

+++ Wachstum mit Keimzahl deutlich im 10^8 -Bereich nach 24 h bei 30 °C

+ Wachstum mit Keimzahl im 10^7 -Bereich und darunter nach 24 h bei 30 °C

Von diesen ausgewählten Stämmen wurden die filtrierten Probenflüssigkeiten der 0. Stunde und nach 72 Stunden Bebrütung auf ihren Gehalt an Tyramin und Phenylethylamin untersucht.

Beim Referenzstamm Fs 202 erfolgte die Bestimmung der biogenen Amine in der 0. Stunde, nach 24, 48 sowie nach 72 Stunden Bebrütung.

Vor der Untersuchung der bebrüteten Bakteriensuspensionen der ausgewählten Stämme auf ihren Gehalt an Tyramin und Phenylethylamin wurden die Nachweisgrenzen dieser biogenen Amine mit dem zur Verfügung stehendem HPLC-Gerät ermittelt sowie eine Eichkurve erstellt. Für die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden je 5 Proben mit den Konzentrationen von 0,0; 0,009; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08 und 0,09 µg/ml Phenylethylamin bzw. Tyramin untersucht.

Die Nachweisgrenze lag für beide Amine bei 0,03 µg/ml, die Bestimmungsgrenze bei 0,06 µg/ml.

Zur Erstellung der Eichkurve erfolgte die Analyse von je 5 Proben mit den Konzentrationen von 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 und 1,0 µg/ml der zu untersuchenden Amine. Zusätzlich wurden zur aktuellen Eichung jeder Probensequenz mehrere Proben als externer Standard beigefügt. Außerdem wurde Tryptamin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml bei jeder Analyse als interner Standard verwendet.

Die eingefrorene, bakterienfreie Flüssigkeit der jeweils zu untersuchenden Probe wurde kurz vor der Analyse aufgetaut. Zur Untersuchung im HPLC-Gerät mußten die Proben verdünnt werden. Je 25 µl Probe wurden mit Aqua bidest auf 100 ml aufgefüllt und gut durchmischt. Eine derartig hohe Verdünnung des Ausgangssubstrates war nötig, da es sonst durch zu hohe Konzentrationen der zu untersuchenden Amine sowie vorhandener Verunreinigungen zur Überladung der Säule kommen würde. Von der so verdünnten Probe wurden 80 µl zur Analyse in den Autosampler des HPLC-Gerätes verbracht.

Bei der Analyse der biogenen Amine kam die Vorsäulenderivatisierung zum Einsatz. Als Derivatisierungsreagenz wurde o-Phthaldialdehyd*¹ (OPA) verwendet. Die Probenaufbereitung erfolgte direkt im Autosampler.

80 µl Probe wurden mit 20 µl internem Standard sowie 80 µl Reagenz vermischt und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Injektionsvolumen der so aufbereiteten Probe betrug 20 µl.

Nach zwei Standardproben wurden je vier unbekannte Proben analysiert. Danach führte das HPLC-Gerät ein Waschprogramm durch. Diese Reihenfolge wurde bei allen Untersuchungen eingehalten. Jede Probe wurde doppelt analysiert, so dass zur Auswertung eines Stammes vier Konzentrationsangaben von Tyramin und Phenylethylamin zur Verfügung standen.

Die Analyse erfolgte mit einem HPLC-System der Firma Kontron: Pumpe 422S, Autosampler 465, Fluoreszenzdetektor SFM 25. Die Säulentemperatur wurde mittels Säulenofen - Peltier-Kolonnenhermostat Jetstream 2 (WO Industrial Electronics) - kontinuierlich bei 30 °C gehalten. Die Analyse wurde unter online Heliumgasung bei folgenden Chromatographiebedingungen durchgeführt:

Vorsäule:	30 x 4 mm LiChrosorb® RP-18, 5 µm (Knauer)
Trennsäule:	250 x 4 mm LiChrosorb® RP-18, 5 µm (Knauer)
Fließmittel:	(A) Elutionspuffer* ² (B) Acetonitril (Roth)
Gradient:	0 min - 30 % B 15 min - 70 % B 18 min - 70 % B 20 min - 30 % B
Flußrate:	0,8 ml/min
Detektion:	Anregungswellenlänge 344 nm bei Emissionswellenlänge von 450 nm

*¹ OPA-Reagenz: 50 mg o-Phthaldialdehyd (Roth)
1,5 ml Methanol (Roth)
50 µl Mercaptoethanol
11 ml Boratpuffer:
2,44 g Borsäure (Roth) in Aqua bidest lösen,
mit 4 M NaOH (Merck) auf pH 9,5 einstellen
und mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen.

*² Elutionspuffer: 100 ml Acetonitril (Roth)
10 ml Tetrahydrofuran (Roth)
Na₂HPO₄-Puffer:
5g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck) in ca. 800 ml
Aqua bidest lösen, mit o-Phosphorsäure (Roth) auf pH 7
einstellen und mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen.

Alle Elutionsmittel wurden mit Membranfilter RC 58, 0,2 µm (Schleicher und Schuell) filtriert und entgast.

Das HPLC-Analysenschema einschließlich des verwendeten Gradienten stellt eine Modifikation des im BgVV verwendeten Programms zur Analyse von biogenen Aminen in Wein dar. Das System wurde von JUHLS et al. (1999) sowie von JUHLS (Diss. in Anfertigung) für Untersuchungen zur Analyse von Phenylethylamin, gebildet von Enterokokken aus menschlichen Faezes, entwickelt und getestet.

3.2. Statistische Kenngrößen zur Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit folgenden statistischen Kenngrößen (RASCH, 1987; Lorenz, 1988):

1. **Arithmetischer Mittelwert** - \bar{x}

Der arithmetische Mittelwert ist die Summe x_i aller Einzelwerte dividiert durch ihre Anzahl n .

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

2. **Gewogener Mittelwert** - \bar{c}

Der gewogene Mittelwert wird aus mehreren arithmetischen Mittelwerten \bar{x} von Beobachtungsreihen unterschiedlichen Umfangs berechnet.

$$\bar{c} = \frac{n_1 \bar{x}_1 + n_2 \bar{x}_2 + \dots + n_i \bar{x}_i}{n}$$

3. **Standardabweichung** - s

Die Standardabweichung ist die mittlere Abweichung aller Einzelwerte vom arithmetischen Mittel der Beobachtungswerte. Sie wird als Streuungsmaß verwendet.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

4. Median

- \tilde{x}

Der Median, auch Zentralwert oder mittelster Wert genannt, halbiert die der Größe nach geordnete Reihe der Beobachtungswerte. Er charakterisiert das Zentrum der Verteilung.

$$\tilde{x} = Me = x\left(\frac{n+1}{2}\right) \quad , \text{ falls } n \text{ ungerade}$$

$$\tilde{x} = Me = \frac{1}{2}\left(x\left(\frac{n}{2}\right) + x\left(\frac{n}{2} + 1\right)\right) \quad , \text{ falls } n \text{ gerade}$$

5. Varianz

- s^2

Die Varianz wird als mittlere quadratische Abweichung aller Einzelwerte vom arithmetischen Mittelwert berechnet. Sie ist der Quotient aus der Summe der quadratischen Abweichungen (SQ) und der Anzahl der Freiheitsgrade (n-1). Die Größe der Varianz wird vor allem von weit vom Mittelwert entfernt liegenden Einzelwerten beeinflusst.

$$s^2 = \frac{SQ}{n-1} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

3.3. Untersuchungsergebnisse

3.3.1. Isolierung und Differenzierung der Enterokokkenstämme

In der **ersten und zweiten Untersuchungsreihe** wurden aus einer Gesamtzahl von 110 Lebensmittelproben insgesamt 157 Stämme der Gattung der *Enterococcus* isoliert. Aufgrund von nicht typischen biochemischen Eigenschaften und dem Vorkommen von nicht lebensmitteltypischen Enterokokkenarten konnten 39 Stämme nicht näher identifiziert werden. Die Kombination der biochemischen Eigenschaften dieser Stämme ließ eine Diagnose nur bis auf Genusebene zu.

Insgesamt wurden 118 Stämme auf Speziesebene differenziert. In Tab. 12 sind die Enterokokkenstämme nach Herkunft und Spezies aufgeführt. Die prozentuale Aufteilung der gefundenen Stämme in Beziehung zur Probenart ist in Tab.13 dargestellt.

Bei fast allen Probenarten nahm die Spezies *Ec. faecalis* den weitaus größten Anteil der isolierten Enterokokken ein. Bei den Proben der Schweineschlachtkörper waren über die Hälfte *Ec. faecalis* Stämme differenziert worden.

Den zweit größten Anteil der ausdifferenzierten Stämme bildete *Ec. faecium*. Besonders im Hackfleisch ist diese Spezies zum großen Teil diagnostiziert worden, hier traten *Ec. faecalis* und *Ec. faecium* zu gleichen Teilen auf. Während diese beiden Spezies in allen Probenarten isoliert wurden, fanden sich *Ec. durans*, *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* nur vereinzelt.

Tab. 12: Aufteilung der isolierten Enterokokkenstämme (Anzahl der Proben in Klammern)

Enterococcus	Schwein (63)	Rind (20)	Käse (17)	Hack (10)	Huhn (10)	Summe (110)
faecalis	37	13	11	6	6	73
faecium	6	4	5	6	4	25
hirae	5	1	-	-	3	9
durans	-	2	3	3	-	8
gallinarum	-	-	2	-	-	2
casseliflavus	-	-	1	-	-	1
ssp.*	21	7	5	4	2	39
Gesamtzahl isol. Enterokokkenst.	69	27	27	19	15	157

* Enterococcus species (Stämme mit nicht typischen biochemischen Eigenschaften / nicht ausdifferenzierte Stämme)

Tab. 13: Prozentuale Aufteilung der gefundenen Enterokokkenspezies in Bezug zur Probenart

Enterococcus	Anteil an Stämmen gesamt in %	Schlacht- körper Schwein	Schlacht- körper Rind	Käse	Schweine- hack- fleisch	Huhn
faecalis	46,5	53,6	48,2	40,7	31,5	40,0
faecium	15,9	8,7	14,8	18,5	31,5	26,7
hirae	5,7	7,3	3,7	0,0	0,0	20,0
durans	5,2	0,0	7,4	11,1	15,9	0,0
gallinarum	1,3	0,0	0,0	7,5	0,0	0,0
casseliflavus	0,6	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0
ssp.*	24,8	30,4	25,9	18,5	21,1	13,3

* Enterococcus species (Stämme mit nicht typischen biochemischen Eigenschaften / nicht ausdifferenzierte Stämme)

Ec. hirae konnte mit einem relativ hohen Anteil von 20 Prozent aus den Hühnerproben isoliert werden, wenige Stämme dieser Spezies wurden noch in den Proben der Schweine- und Rinderschlachtkörper gefunden. Ec. durans

fand sich bei Rind, Käse und Hackfleisch. *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* ließen sich nur aus den Käseproben isolieren. Sie machten den geringsten relativen Anteil der Enterokokkenstämme aus.

3.3.2. Vorversuch zur Referenzstammfindung

Die **dritte Untersuchungsreihe** diente der Ermittlung eines stark phenylethylaminbildenden *Enterococcus faecalis* Stammes als Referenzstamm mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

Ausgewertet wurde die Intensität der entstandenen Farbreaktion an der Stelle, an der das Amin Phenylethylamin im Vergleich mit der Positivkontrolle auf der Dünnschichtplatte erschien. Je nach Farbstärke wurden Kreuzsymbole verteilt, die eine Unterscheidung in: kein Ergebnis, schwach positiv, positiv sowie stark positiv zuließen. Weiterhin wurden die Rf-Werte bestimmt.

Tab. 14: Farbintensitäten der präferierten Stämme in der DC
(Laufmittel: iso-Propanol, 25%ige Ammoniaklösung, Aqua dest; 8:1:1)

Verdünnung.	1:2		1:2,5		1:3		1:4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Versuch	1	2	1	2	1	2	1	2
Fs 102	xx	xx	xx	xx	xx	x	x	(x)
Fs 104	xx	xx	xx	xx	xx	xx	x	x(x)
Fs 202	xx	xx	xx	xx	xx	xx	x(x)	xx

- (x) schwach positiv
- x positiv
- xx stark positiv

Der Stamm Fs 202, ein *Ec. faecalis* Stamm, der aus Käse isoliert wurde, konnte als starker Phenylethylaminbildner bestimmt werden. Das Ergebnis der Aminbildung dieses Stammes war selbst bei einer Verdünnung von 1:4 noch stark positiv. Damit erschien der Stamm Fs 202 als Referenzstamm für weitere Untersuchungen zur Aminbildung geeignet. Die Stämme Fs 104 und Fs 102, beide vom Rind isoliert, wurden aufgrund der Intensität der Farbflecken für

Phenylethylamin in den Verdünnungen 1:3 und 1:4 als Reservereferenzstämme festgelegt.

Die Ermittlung eines mittleren Rf-Wertes erfolgte mit Hilfe der Rf-Werte des Referenzstammes sowie der Positivkontrollen (0,1%ige PEA-Lösung.) in allen Verdünnungsstufen. Der Rf-Wert für Phenylethylamin beträgt im arithmetischen Mittel 0,57.

Tab. 15: Rf-Werte von Phenylethylamin

Verdünnung	1:2		1:2,5		1:3		1:4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0,1% PEA	0,61	0,56	0,57	0,58	0,49	0,49	0,59	0,46
	0,63	0,54	0,62	0,57	0,58	0,45	0,57	0,69
	0,58	0,50	0,62	0,58	0,60	0,54	0,63	0,57
Fs 202	0,64	0,51	0,59	0,59	0,58	0,47	0,59	0,65
Mittel	0,62	0,53	0,60	0,58	0,56	0,49	0,60	0,59

3.3.3. Keimzahlentwicklung des Referenzstammes Fs 202

Die **vierte Untersuchungsreihe** sollte klären, wie lange die Vorkultur bebrütet werden muß und welches Überimpfungsvolumen erforderlich ist, um einen entsprechenden Ausgangskeimgehalt von 10^4 - 10^6 KbE/ml in der Tyrosinbouillon für die Aminbildungsversuche zu erhalten.

Tab. 16 zeigt die Keimzahlentwicklung des Enterokkokenstammes Fs 202 über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Tab. 16: Keimzahlen von Fs 202 in KbE pro ml bei 37 °C

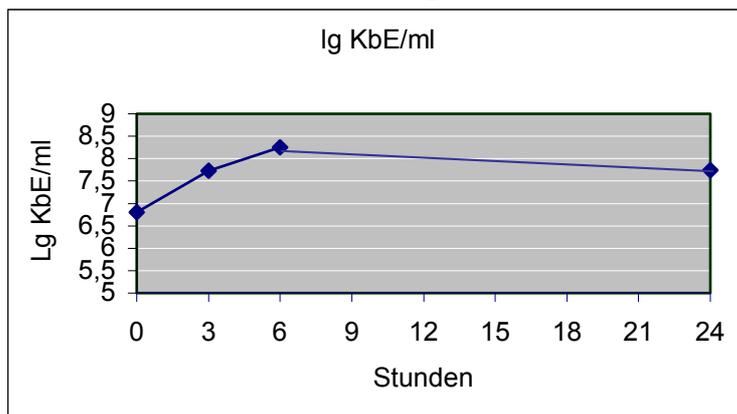
Stunde	0		3		6		24	
Versuch	1	2	1	2	1	2	1	2
Fs 202	$7,6 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$9,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$
\bar{x} (n=2)	$6,5 \times 10^6$		$5,4 \times 10^7$		$1,8 \times 10^8$		$5,5 \times 10^7$	

\bar{x} = arithmetischer Mittelwert

Ein Anstieg der Keime von $6,4 \times 10^6$ Keimen/ml ($6,806 \lg \text{KbE/ml}$) auf $1,8 \times 10^8$ Keime/ml ($8,255 \lg \text{KbE/ml}$) ist bis zu 6 Stunden Bebrütung ersichtlich. Danach fällt die Keimzahl unwesentlich um ca. eine halbe Zehnerpotenz, um bei der 24-Stundenkultur einen Wert von $5,5 \times 10^7$ Keime/ml ($7,74 \lg \text{KbE/ml}$) zu erreichen (Abb. 4).

Nach drei Stunden Bebrütung sind bereits ausreichend Keime gewachsen. Bei einem Überimpfungsvolumen von 0,1 ml in 5 ml Tyrosinbouillon ergibt sich ein Ausgangskeimgehalt in der Größenordnung von 10^6 KbE/ml. Dies entspricht den Zielvorstellungen und kann als allgemeiner Modus für die Durchführung der Bebrütungsversuche zur Phenylethylaminbildung übernommen werden.

Abb. 4: Keimzahlentwicklung des Referenzstammes Fs 202 bei 37 °C



3.3.4. Quantitative Analyse der Aminbildung der geprüften Enterokokkenspezies

Die **fünfte Untersuchungsreihe** beinhaltete die quantitative Aminanalyse der ausgewählten Enterokokkenstämme. Sie wurde in 2 Abschnitte untergliedert. Als Erstes erfolgte die Bebrütung der Bakterien bei 30 °C und Keimzählung jeweils zu Versuchsbeginn (Stunde 0), nach 24, 48 und 72 Stunden. Gleichzeitig wurde der pH-Wert der Bouillon gemessen. Die Ausgangskeimgehalte der Stämme betragen durchschnittlich 10^6 KbE/ml. Danach wurde die quantitative Aminanalyse mittels HPLC durchgeführt.

3.3.4.1. Charakterisierung des Referenzstammes Fs 202

Da der Referenzstamm Fs 202 in jedem Ansatz als Positivkontrolle mitgeführt wurde, ergaben sich mehr Angaben zu Keimzahlen und pH-Wert als bei den anderen ausgewählten Stämmen. Die Angaben hierzu sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Keimzahlen und pH-Werte des Referenzstammes Fs 202 nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

Versuch		0 h		24 h		48 h		72 h	
		pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	Ig /KbE/ml
1	a	7,18	6,85	4,52	8,49	4,49	8,23	4,52	7,95
	b	7,04	6,70	4,52	8,04	4,49	7,97	4,54	8,11
2	a	7,09	6,67	4,49	8,15	4,47	7,92	4,50	8,08
	b	7,02	6,71	4,49	7,86	4,50	8,00	4,53	7,18
3	a	7,19	6,74	4,54	7,97	4,52	7,98	4,53	7,18
	b	7,18	6,30	4,48	8,61	4,47	7,89	4,52	8,00
4	a	7,03	6,48	4,49	7,98	4,45	8,41	4,50	8,00
	b	7,05	6,77	4,54	7,61	4,47	7,99	4,47	7,54
5	a	7,03	6,82	4,52	8,72	4,43	8,00	4,52	7,76
	b	7,05	6,46	4,48	7,76	4,45	7,65	4,52	7,63
x		7,09	6,65	4,51	8,12	4,47	8,00	4,52	7,84
s		0,07	0,18	0,02	0,37	0,03	0,20	0,02	0,31

\bar{x} arithmetischer Mittelwert
s Standardabweichung

Die Keimzahl des ausgewählten Referenzstammes stieg unter den genannten Bedingungen bis 24 Stunden deutlich an (ca. 1,5 Zehnerpotenzen) und wies bei 24 bis 72 Stunden etwa gleiche Keimzahlen auf. Bei einigen Stämmen war ein

leichter Abfall der Keimzahl nach 24 Stunden Bebrütung zu verzeichnen. Dies ist ein normaler Wachstumsverlauf bei Mikroben und von anderen Wachstumsversuchen bekannt. Solange genügend Substrat im Nährmedium vorhanden ist, können sich die Mikroben vermehren, danach sterben sie langsam ab und es kommt zum Fallen der Keimzahlen.

Die Keimzahl der eingebrachten Keime war relativ konstant, dies wird gekennzeichnet durch eine für die Methode der Keimzählung (Tropfplattenverfahren) geringe Standardabweichung der „Stunde Null“ von 0,18 lg KbE/ml. Danach kam es durch individuelles Wachstum der Keime zu geringgradig größeren Streuungen der Keimzahl nach 24, 48 und 72 Stunden Kultivierung des Nährmediums, gekennzeichnet durch Standardabweichungen von 0,20 lg KbE/ml bis 0,37 lg KbE/ml. Auch diese Streuung der Keimzahlen bedeutet in Bezug zur verwendeten Keimzählmethode, dem Tropfplattenverfahren, eine relativ große Genauigkeit der Methode in Abhängigkeit von der individuellen Keimvermehrung. Durch das Wachstum der Keime fiel der pH-Wert deutlich in den sauren Bereich. In der Bebrütungszeit von 24 bis 72 Stunden gab es keine wesentlichen Veränderungen des Milieus. Da es während der Bebrütungszeit von 24 bis 72 Stunden bezüglich der Keimzahl und des pH-Wertes keine wesentlichen Veränderungen gab, wurde für diese Versuchsanordnung entschieden, die Gehalte an Phenylethylamin und Tyramin zum Zeitpunkt der Stunde Null sowie nach 72 Stunden Bebrütung der Enterokokken bei 30 °C zu bestimmen. Erst zu diesem Zeitpunkt war die maximale PEA-Menge zu erwarten.

Für den Referenzstamm Fs 202 wurden zusätzlich die Amingehalte nach 24 und nach 48 Stunden Bebrütung bestimmt. Insgesamt erfolgten je vier Messungen mit jeweiligen Doppelbestimmungen. Da bei einer Messreihe die Retentionszeiten bei Standards und Probelösungen etwa 1 Minute von den sonst Üblichen abwichen, wurden diese Werte nicht zur Auswertung herangezogen. Es sei nur erwähnt, dass diese bestimmten Werte sich in ihrer Größenordnung in die Reihe der anderen ermittelten Aminkonzentrationen einreichten. Die Phenylethylamin- und Tyraminkonzentrationen für den Stamm Fs 202 sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Phenylethylamin- und Tyraminkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) des Referenzstammes Fs 202 nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

		Versuch 1		Versuch 2		Versuch 3		\bar{x}	s
		a	b	a	b	a	b		
0 h	PEA	n.a.	n.a.	n.	n.	n.	n.	∅	∅
	TYR	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	∅	∅
24 h	PEA	456,0	485,6	481,2	470,8	507,6	496,4	482,9	18,29
	TYR	778,4	823,6	894,8	864,0	940,0	907,6	868,1	59,14
48 h	PEA	899,6	905,2	842,0	741,6	887,6	781,6	842,9	67,99
	TYR	917,6	925,2	961,6	837,6	1010,4	880,0	922,1	60,50
72 h	PEA	1137,2	1048,8	1060,8	926,4	1118,4	976,8	1044,7	81,08
	TYR	858,4	816,0	873,6	783,2	918,0	822,8	845,3	47,91

\bar{x} arithmetisches Mittel

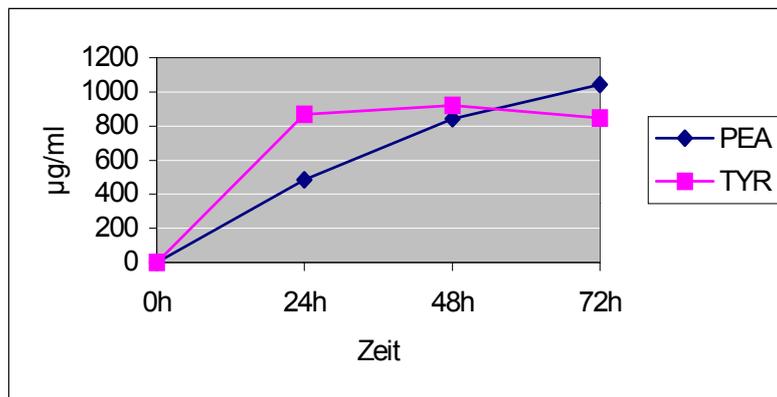
s Standardabweichung

∅ keine Angabe

n. Zacke im Chromatogramm unterhalb der Bestimmungsgrenze

n.a. keine Aminbildung nachgewiesen

Abb. 5: Darstellung der Aminbildung des Stammes Fs 202



Die graphische Darstellung der Aminbildung in Abbildung 5 erfolgte anhand der arithmetischen Mittelwerte des jeweiligen Amins. Es ist zu erkennen, dass es bei Phenylethylamin zu einem stetigen, fast linearen Anstieg der Konzentration während der Bebrütung der Bakteriensuspension über 72 Stunden kam. Die Tyraminkonzentration hingegen blieb nach einem starken Anstieg bis 24 Stunden Bebrütung etwa auf dem selben Niveau bzw. schien nach 48 Stunden wieder ein wenig abzufallen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Phenylalanin im Überschuss vorlag, Tyrosin aber in solcher Menge bemessen war, dass es innerhalb von 24 Stunden zu Tyramin umgesetzt werden konnte.

Bezieht man den Amingehalt auf eine bestimmte Anzahl von lebenden Keimen, so ergibt sich eine ständige Zunahme von PEA und TYR über den Zeitraum von 0 bis 72 Stunden. Wobei auch hier der Gehalt an Tyramin in der Zeit von 48 bis 72 Stunden weniger ansteigt als bei Phenylethylamin.

In Tabelle 19 ist der Amingehalt bezogen auf 1 Million Keime dargestellt. Für die Darstellung wurden die arithmetischen Mittelwerte herangezogen.

Tab. 19: Phenylethylamin- und Tyramingehalte bezogen auf 1×10^6 KbE des Referenzstammes Fs 202 nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

$\mu\text{g} / 1 \times 10^6$ KbE	Phenylethylamin	Tyramin
24 h	2,61	4,69
48 h	8,43	9,22
72 h	12,45	10,08

3.3.4.2. Analyse der *Ec. faecalis* Stämme

Die Keimzahlen der 5 *Ec. faecalis* Stämme stiegen nach 24 Stunden bis zu zwei Zehnerpotenzen an, um dann die weiteren 48 Stunden etwa auf ihrem Niveau zu bleiben. Der pH-Wert sank dagegen weiter in den sauren Bereich bis zu 48 Stunden Bebrütung, die darauffolgenden 24 Stunden war etwa gleiches Milieu vorhanden. In Tabelle 20 sind die arithmetischen Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen der pH-Werte sowie der Keimzahlen der untersuchten *Ec. faecalis* Stämme dargestellt.

Tab. 20: Keimzahlen und pH-Werte der *Ec. faecalis* Stämme nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH-Wert	Ig KbE/ml						
Fs 015	7,10	7,01	4,32	8,60	4,26	8,10	4,25	8,74
Fs 020	7,06	6,78	4,36	8,82	4,26	8,27	4,25	8,55
Fs 106	7,12	6,85	4,34	8,77	4,26	8,07	4,25	8,50
Fs 205	7,14	6,85	4,36	8,04	4,23	8,00	4,20	7,92
Fs 209	7,15	6,14	4,30	7,81	4,10	7,74	4,03	7,75

Die pH-Werte der einzelnen Faecalisstämme unterschieden sich im Bebrütungszeitraum von 72 Stunden kaum.

Die Stämme Fs 205 und Fs 209 vermehrten sich schwächer, als die Stämme Fs 015, Fs 020 und Fs 106. Wie schon im vorigen Kapitel (3. Eigene

Untersuchungen) beschrieben, wurden für die Untersuchungsreihe wachstumsstarke und wachstumsschwache Stämme ausgewählt. Während die wachstumsschwachen Stämme (Fs 205 und Fs 209) nach einem Keimzahlanstieg nach 24 Stunden Bebrütung etwa bei der gleichen Keimzahl pro Milliliter Nährmedium blieben, gab es bei den wachstumsstärkeren Stämmen (Fs 015, Fs 020, Fs 106) nach 48 Stunden Bebrütung eine leichte Verringerung der Keimzahl, welche nach 72 Stunden wieder leicht anstieg. In Tabelle 21 ist die Aminkonzentration der *Ec. faecalis* Stämme nach 72 Stunden Bebrütung des Nährmediums dargestellt.

Tab. 21: Phenylethylamin- und Tyraminkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) der *Ec. faecalis* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

		Versuch 1		Versuch 2		\bar{x}	s
		a	b	a	b		
Fs 015	PEA	931,8	952,8	966,4	886,8	934,5	34,81
	TYR	823,2	843,2	851,6	779,2	824,3	32,34
Fs 020	PEA	884,8	889,2	930,4	1014,0	929,6	59,89
	TYR	846,8	858,8	856,8	1000,0	890,6	73,12
Fs 106	PEA	1118,8	1038,0	1027,2	1184,0	1092,0	73,71
	TYR	950,0	895,6	905,2	1048,0	949,7	69,69
Fs 205	PEA	842,4	818,0	797,2	808,0	816,4	19,30
	TYR	969,2	886,0	906,0	949,2	927,6	38,27
Fs 209	PEA	265,6	261,6	273,2	253,6	263,5	8,17
	TYR	876,0	881,2	924,4	785,6	866,8	58,32

\bar{x} arithmetischer Mittelwert
s Standardabweichung

Alle Stämme waren in der Lage, die beiden zu analysierenden biogenen Amine Phenylethylamin und Tyramin zu bilden.

Die Phenylethylaminkonzentration nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C reichte von ca. 260 $\mu\text{g/ml}$ (Stamm Fs 209) bis ca. 1100 $\mu\text{g/ml}$ (Stamm Fs 106). Die Schwankungsbreite der Phenylethylaminkonzentrationen innerhalb der ausgesuchten *Faecalis*stämme war somit relativ hoch. Sie betrug ca. 840 $\mu\text{g/ml}$. Der wachstumsstarke Stamm Fs 106 bildete etwa die vierfache Menge Phenylethylamin wie der wachstumsschwächere Stamm Fs 209.

Die Stämme Fs 015 und Fs 020 folgen dem Stamm Fs 106 unmittelbar mit Phenylethylaminkonzentrationen von 934,5 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 929,6 $\mu\text{g/ml}$. Danach

kam der Stamm Fs 205 mit einer Phenylethylaminkonzentration von 816,4 µg/ml.

Bei den wachstumstarken Stämmen (Fs 015, Fs 020, Fs 106) lag die Tyraminkonzentration jeweils um einen geringen Betrag unter der Phenylethylaminkonzentration. Bei den wachstumsschwächeren Stämmen konnte eine höhere Tyraminkonzentration gegenüber der Phenylethylaminkonzentration festgestellt werden. Insgesamt lagen die Tyraminkonzentrationen der ausgesuchten *Ec. faecalis* Stämme etwa in der gleichen Größenordnung. Die Tyraminkonzentration des Stammes Fs 106 war mit 949,7 µg/ml am höchsten, gefolgt von Stamm Fs 205 mit 927,6 µg/ml, Stamm Fs 020 mit 890,0 µg/ml sowie Stamm Fs 209 mit 866,8 µg/ml. Bei Stamm Fs 015 war die Tyraminkonzentration mit 824,3 µg/ml am geringsten. Die Schwankungsbreite der Tyraminkonzentrationen war somit relativ gering und betrug etwa 125 µg/ml.

(Konzentrationsangaben sind Mittelwertangaben)

Bezogen auf 1 Million lebende Keime war dagegen bei den wachstumsschwachen Stämmen (Fs 205, Fs 209) die Phenylethylaminmenge etwa 1,4- bis 6,0-mal höher und die Tyraminmenge etwa 4- bis 10-mal höher als bei den wachstumsstärkeren *Faecalis*stämmen (Fs 015, Fs 020, Fs 106), (Tab. 22). Für die Darstellung in Tab. 22 wurden die arithmetischen Mittelwerte herangezogen. Bei den wachstumstarken Stämmen wurde mehr Phenylethylamin als Tyramin gebildet, bei den wachstumsschwachen Stämmen war dieses Verhältnis umgekehrt. Bei den wachstumstarken Stämmen wurden von 1 Million lebender Keime bis zu 1,2-mal mehr Tyramin als Phenylethylamin gebildet. Der wachstumsstarke Stamm Fs 205 bildete 1,35-mal mehr Tyramin als Phenylethylamin. Auffällig ist der Stamm Fs 209. Hier bildeten 1 Million lebende Keime dieses Stammes 3,3-mal mehr Tyramin als Phenylethylamin. Die Tyraminkonzentration lag ebenfalls etwa 3,3-mal höher als die Phenylethylaminkonzentration des kultivierten Nährmediums. Bei allen anderen Stämmen war das Verhältnis von gebildetem Tyramin und Phenylethylamin in etwa gleich.

Tab. 22: Phenylethylamin- und Tyraminbildung bezogen auf 1×10^6 KbE der *Ec. faecalis* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

$\mu\text{g}/1 \times 10^6$ KbE	Fs 015	Fs 020	Fs 106	Fs 205	Fs 209
Phenylethylamin	1,60	2,41	3,08	9,72	4,32
Tyramin	1,41	2,31	2,68	11,04	14,21

3.3.4.3. Analyse der *Ec. faecium* Stämme

Wie in Tabelle 23 zu ersehen, stiegen die Keimzahlen auch hier nach 24 Stunden Bebrütung stark an (bis 1,5 Zehnerpotenzen) und blieben dann die weiteren 48 Stunden etwa konstant. Bei der pH-Wertentwicklung (Tab. 23) fiel auf, dass der Stamm Fc 304 zwar ebenso wie die anderen Stämme nach 24 Stunden den größten Abfall hatte aber nicht so stark in den sauren Bereich fiel. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen stieg hier der pH-Wert sogar nach 72 Stunden wieder leicht an. Die Werte in Tabelle 23 sind arithmetische Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen.

Tab. 23: Keimzahlen und pH-Werte der *Ec. faecium* Stämme nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH-Wert	Ig KbE/ml						
Fc 302	7,03	6,96	4,38	8,48	4,31	8,10	4,31	7,96
Fc 304	7,07	6,58	4,59	7,86	4,53	7,39	4,61	8,01
Fc 403	7,07	6,41	4,39	7,92	4,26	7,98	4,23	8,10

In Tabelle 24 ist die Aminkonzentration der *Ec. faecium* Stämme nach 72 Stunden Bebrütung des Nährmediums dargestellt. Alle Stämme waren in der Lage Tyramin zu bilden. Phenylethylamin hingegen konnte nur bei den Stämmen Fc 302 und Fc 403 bestimmt werden. Die Bildung von Phenylethylamin lag beim Stamm Fc 304 unterhalb der Bestimmungsgrenze, die anderen beiden Stämme bildeten dieses Amin in unterschiedlichem Maße, jedoch lag die Konzentration jeweils unter der des Tyramins. Die Tyraminkonzentration des Stammes Fc 302 war 1,7-mal und die des Stammes Fc 403 3,3-mal höher als die Phenylethylaminkonzentration.

Die Phenylethylaminkonzentration des wachstumsstarken Stammes Fc 302 lag mit 505,1 µg/ml etwa doppelt so hoch wie beim wachstumsschwächeren Stamm Fc 403 mit 258,7 µg/ml.

Tab. 24: Phenylethylamin- und Tyraminkonzentration (µg/ml) der *Ec. faecium* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

		Versuch 1		Versuch 2		\bar{x}	s
		a	b	a	b		
Fc 302	PEA	536,8	561,6	458,8	463,2	505,1	51,95
	TYR	898,4	890,4	812,8	832,8	858,6	42,26
Fc 304	PEA	n.	n.	n.	n.	∅	∅
	TYR	620,8	695,2	837,2	864,4	754,4	115,92
Fc 403	PEA	252,8	254,8	256,8	270,4	258,7	7,97
	TYR	810,0	844,0	876,0	888,0	854,5	35,00

\bar{x} arithmetischer Mittelwert

s Standardabweichung

n. Bildung unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode

∅ keine Angabe

Die Tyraminkonzentration war bei allen *Faecium*stämmen nach 72 Stunden Kultivierung etwa gleich. Der Stamm Fc 302 (wachstumsstark) bildete hier die größte Menge Tyramin mit 858,6 µg/ml, dicht gefolgt vom Stamm Fc 403 (wachstumsstark) mit 854,6 µg/ml. Der Stamm Fc 304 bildete mit 754,4 µg/ml die geringste Menge Tyramin der ausgesuchten *Faecalis*stämmen. Damit war die Schwankungsbreite der Tyraminkonzentration mit 104,2 µg/ml relativ gering.

Wie aus Tab. 25 ersichtlich ergab sich bei der Aminbildung bezogen auf 1 Million lebender Keime kein wesentlicher Unterschied zur Aminkonzentration je Milliliter. Phenylethylamin wurde in geringerem Maße gebildet als Tyramin.

Trotz etwa gleicher Tyramingehalte stellte sich der Stamm Fc 302 als Bildungsstärkster heraus. Der Stamm Fc 302 wies zugleich die höchste Phenylethylaminkonzentration (505,1 µg/ml) und Bildungsrate (5,55 µg/1x10⁶ KbE) dieses Amins auf. Ähnlich der Phenylethylamin- und Tyraminkonzentrationen bildeten 1 Million lebender Keime des Stammes Fc 302 1,8-mal und des Stammes Fc 403 3,3-mal mehr Tyramin als Phenylethylamin.

(Konzentrationsangaben und Angaben pro 1 Million Keime sind Mittelwertangaben)

Tab. 25: Phenylethylamin- und Tyramingehalte bezogen auf 1×10^6 KbE/ml der *Ec. faecium* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

$\mu\text{g}/1 \times 10^6$ KbE	Fc 302	Fc 304	Fc 403
Phenylethylamin	5,55	n.	2,07
Tyramin	9,44	6,83	6,84

n. Bildung unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode

3.3.4.4. Analyse der *Ec. durans* Stämme

Die Keimzahlen stiegen nach 24 Stunden vor allem bei den Stämmen D 102, D 203 und D 303 stark an (z.T. mehr als zwei Zehnerpotenzen). Nach 48 Stunden gab es außer bei den Stämmen D 102 und D 201 einen geringen Abfall der Keimzahlen, nach 72 Stunden Bebrütung waren die Keimzahlen bei allen zu untersuchenden *Ec. durans* Stämmen etwa auf dem selben Niveau (Tab. 26). Die Angaben in Tabelle 26 beruhen auf den arithmetischen Mittelwerten der Doppelbestimmungen.

Tab. 26: Keimzahlen und pH-Werte der *Ec. durans* Stämme nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	Ig KbE/ml	pH-Wert	KbE/ml
D 102	7,04	6,53	4,30	8,37	4,24	8,49	4,22	8,24
D 203	7,10	6,06	6,09	8,20	5,88	7,31	5,57	7,74
D 303	7,06	6,53	4,20	8,45	4,06	8,04	4,11	7,96
D 201	7,04	6,24	4,29	7,55	4,18	7,97	4,12	7,88
D 202	7,05	6,05	4,27	7,78	4,09	7,31	4,10	7,88

Wie in Tab. 26 ersichtlich, fallen die pH-Werte im Bebrütungszeitraum bei allen Stämmen mit Ausnahme des Stammes D 203 auf etwa das selbe Niveau. Stamm D 203 macht eine geringere Säuerung durch. Die Keimzahl dieses Stammes fällt nach 48 Stunden weiter ab, erreicht aber nach 72 Stunden etwa den gleichen Endwert wie bei den anderen Stämmen.

In Tabelle 27 ist die Aminkonzentration der *Ec. durans* Stämme nach 72 Stunden Bebrütung des Nährmediums dargestellt.

In dieser Stammgruppe waren nur zwei von fünf Stämmen in der Lage die untersuchten Amine zu bilden. Nur die nach 24 Stunden zu den wachstumsstarken Stämmen gehörenden *Ec. durans* Stämme D 102 und D 203 konnten beide Amine im nachweisbaren Bereich bilden. Beim Stamm D 303 konnten noch Spuren der beiden Amine gefunden werden. Die nach 24 Stunden wachstumsschwächeren Stämme D 201 und D 202 konnten trotz guter Säuerung weder Phenylethylamin noch Tyramin bilden.

Tab. 27: Phenylethylamin- und Tyraminkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) der *Ec. durans* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

		Versuch 1		Versuch 2		\bar{x}	s
		a	b	a	b		
D 102	PEA	1108,8	1044,8	1029,2	1031,6	1053,6	37,43
	TYR	904,8	832,4	848,4	884,8	867,6	33,10
D 203	PEA	1395,6	1343,6	1396,8	1323,2	1364,8	37,21
	TYR	837,6	820,8	866,4	793,6	829,6	30,51
D 303	PEA	n.	n.	n.	n.	∅	∅
	TYR	n.	n.	n.	n.	∅	∅
D 201	PEA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	∅	∅
	TYR	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	∅	∅
D 202	PEA	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	∅	∅
	TYR	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	∅	∅

\bar{x} arithmetischer Mittelwert

s Standardabweichung

n. Bildung unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode

n.a. keine Aminbildung nachgewiesen

∅ keine Angabe

Die beiden Stämme, die Phenylethylamin und Tyramin im nachweisbaren Bereich bildeten (D 102, D 203), konnten jedoch beträchtliche Mengen der beiden Amine erzeugen.

Es ist auffallend, dass der Stamm mit der geringsten Säuerung (D 203) mit 1364,8 $\mu\text{g/ml}$ die höchste Phenylethylaminkonzentration zeigte. Die Phenylethylaminkonzentration lag damit etwa 1,3-mal über der des Stammes D 102 (1053,6 $\mu\text{g/ml}$). Die Schwankungsbreite der Phenylethylaminkonzentration betrug damit ca. 310 $\mu\text{g/ml}$ zwischen den beiden aminbildenden *Ec. durans* Stämmen.

Tyramin wurde von beiden Stämmen in etwa der selben Größenordnung gebildet, jedoch jeweils in geringerer Menge als Phenylethylamin. Die Tyraminkonzentration lag beim Stamm D 102 mit 867,6 µg/ml 1,2-mal und beim Stamm D 203 mit 829,6 µg/ml 1,7-mal über der jeweiligen Phenylethylaminkonzentration. Die Konzentrationsdifferenz der beiden Stämme ist mit 38,0 µg/ml relativ gering.

(Konzentrationsangaben sind Mittelwertangaben)

Bezogen auf 1×10^6 KbE konnte der Stamm D 203 auch die größte Menge Phenylethylamin und Tyramin bilden (Tab. 28). Für die Darstellung in Tab. 28 wurden die arithmetischen Mittelwerte herangezogen.

Eine Million lebende Keime dieses Stammes bildeten 3,1-mal mehr Phenylethylamin und 2,3-mal mehr Tyramin als beim Stamm D 102. Die Bildungsrate für Phenylethylamin war 1,2- bis 1,7-mal höher als für Tyramin.

Tab. 28: Phenylethylamin- und Tyraminbildung bezogen auf 1×10^6 KbE der *Ec. durans* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

µg/ 1×10^6 KbE	D 102	D 203	D 303	D 201	D 202
Phenylethylamin	7,80	24,16	n.	n.a.	n.a.
Tyramin	6,43	14,68	n.	n.a.	n.a.

- n. Bildung unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode
- n.a. keine Aminbildung nachgewiesen

3.3.4.5. Analyse der *Ec. hirae* Stämme

In Tabelle 29 sind die arithmetischen Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen der pH-Werte und Keimzahlen der 5 untersuchten *Ec. hirae* Stämme dargestellt.

Tab. 29: Keimzahlen und pH-Werte der *Ec. hirae* Stämme nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH-Wert	Ig KbE/ml						
H 002	7,05	6,80	4,51	8,04	4,47	8,06	4,45	8,40
H 004	7,06	6,44	4,51	8,08	4,48	8,10	4,46	8,11
H 005	7,06	6,23	4,50	8,20	4,43	7,97	4,42	7,53
H 001	7,04	6,73	4,49	7,71	4,47	8,05	4,43	8,01
H 402	7,05	6,46	4,30	7,98	4,14	7,96	4,17	7,98

Die Keimzahlen aller Stämme stiegen nach 24 Stunden Bebrütung bis zu zwei Zehnerpotenzen an, wobei die Stämme H 002, H 004 und H 005 in den ersten 24 Stunden stärkeres Wachstum zeigten. Nach 48 Stunden Bebrütung hatten alle Stämme etwa die gleiche Keimzahl und hielten diese mit Ausnahme der Stämme H 002 und H 005 bis 72 Stunden Bebrütung. Die Keimzahl des Stammes H 002 stieg weiter leicht an, wohingegen die des Stammes H 005 nach 72 Stunden Bebrütung abfiel.

Der pH-Wert der einzelnen Stämme sank mit Ausnahme des Stammes H 402 nach 24 Stunden Bebrütung auf etwa den gleichen Wert und veränderte sich in den darauffolgenden 48 Stunden bei allen Stämmen kaum. Der Stamm H 402 säuerte von den hier genannten 5 *Ec. hirae* Stämmen am stärksten.

Alle untersuchten *Ec. hirae* Stämme bildeten die zu untersuchenden Amine Phenylethylamin und Tyramin in relativ großen Mengen. In Tabelle 30 ist die Aminkonzentration der Stämme nach 72 Stunden Bebrütung des Nährmediums dargestellt.

Tab. 30: Phenylethylamin- und Tyraminkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) der *Ec. hirae* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

		Versuch 1		Versuch 2		\bar{x}	s
		a	b	a	b		
H 002	PEA	1547,6	1581,2	1483,6	1482,4	1532,7	48,96
	TYR	883,2	903,6	854,0	873,6	878,6	20,63
H 004	PEA	1489,2	1492,8	1527,2	1576,4	1521,4	40,47
	TYR	849,6	861,2	863,2	889,6	865,9	16,90
H 005	PEA	1661,2	1779,6	1719,6	1756,8	1729,3	51,70
	TYR	942,4	1031,6	926,8	996,0	974,2	48,40
H 001	PEA	1550,4	1680,8	1755,2	1762,8	1687,3	98,48
	TYR	922,0	976,0	1071,6	1118,4	1022,0	89,12
H 402	PEA	917,6	1026,0	918,8	882,4	936,2	62,20
	TYR	880,4	860,8	763,2	732,8	809,3	72,31

\bar{x} arithmetischer Mittelwert
s Standardabweichung

Mit Ausnahme des Stammes H 402 wurde bei den untersuchten *Ec. hirae* Stämmen wesentlich mehr Phenylethylamin als Tyramin gebildet.

Bei den Stämmen H 005 und H 001 erreichte Phenylethylamin seine höchste Konzentration mit ca. 1700 $\mu\text{g/ml}$, wobei Stamm H 005 zu den nach 24 Stunden Bebrütung stärker gewachsenen Stämmen gehört ($\text{KbE/ml} > 10^8$) und H 001 zu den nach 24 Stunden wachstumsschwächeren Stämmen zählt ($\text{KbE/ml} < 10^8$). Nach 24 Stunden Bebrütung jedoch kehrte sich das Keimzahlverhältnis der beiden Stämme um, die Keimzahl des Stammes H 005 fiel unter 10^8 KbE/ml und die des Stammes H 001 stieg weiter an bis über 10^8 KbE/ml . Gefolgt wurden die Stämme H 005 und H 001 in ihrer Phenylethylaminkonzentration von den Stämmen H 002 und H 004 mit etwa 1500 $\mu\text{g/ml}$. Die geringste Konzentration an Phenylethylamin wies nach 72 Stunden Bebrütung bei stärkster Säuerung der Stamm H 402 (wachstumsschwach) mit ca. 940 $\mu\text{g/ml}$ auf. Damit konnten die Stämme H 005 und H 001 etwa 1,8-mal mehr Phenylethylamin bilden als der Stamm H 402. Die Schwankungsbreite war mit etwa 760 $\mu\text{g/ml}$ in der Phenylethylaminkonzentration der *Ec. hirae* Stämme im Vergleich zu den anderen untersuchten Stammgruppen relativ groß.

Die Tyraminkonzentration lag etwa in der gleichen Größenordnung. Der Stamm H 001 wies mit 1022,0 $\mu\text{g/ml}$ die höchste Tyraminkonzentration der untersuchten *Ec. hirae* Stämme auf. Danach folgten die Stämme H 005 mit

974,2 µg/ml, H 002 mit 878,6 µg/ml und H 004 mit 865,9 µg/ml. Die geringste Konzentration an Tyramin zeigte auch hier der Stamm H 402 mit 809,3 µg/ml. Die Schwankungsbreite war mit ca. 210 µg/ml deutlich geringer als in der Phenylethylaminkonzentration. Der Stamm H 001 konnte nur etwa 1,3-mal mehr Tyramin bilden als der Stamm H 402.

(absolute Konzentrationsangaben sind Mittelwertangaben)

Wie in Tabelle 31 (Angaben sind arithmetische Mittel der Doppelbestimmungen) zu ersehen, fiel der Stamm H 005 bezogen auf seine Aminbildungspotenz deutlich aus der Reihe der anderen *Ec. hirae* Stämme heraus . 1 Million lebende Keime konnten wesentlich mehr Amin bilden als bei den anderen Stämmen. Mit über 50 µg Phenylethylamin und ca. 30 µg Tyramin je 1×10^6 KbE war die Aminbildungspotenz etwa 3- bis 12-mal höher als bei den anderen *Ec. hirae* Stämmen. Mit Ausnahme des Stammes H 402 konnten 1 Mill. Keime der untersuchten *Ec. hirae* Stämme ca. 1,7-mal mehr Phenylethylamin bilden als Tyramin. 1×10^6 KbE des Stammes H 402 bildeten nur ca. 1,2-mal mehr Phenylethylamin als Tyramin.

Tab. 31: Phenylethylamin- und Tyraminbildung bezogen auf 1×10^6 KbE der *Ec. hirae* Stämme nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

µg/ 1×10^6 KbE	H 002	H 004	H 005	H 001	H 402
PEA	4,23	10,83	51,62	15,34	9,70
TYR	2,44	6,16	29,08	9,29	8,39

3.3.4.6. Analyse der *Ec. gallinarum* Stämme und des *Ec. casseliflavus* Stammes

Die Keimzahlen dieser Stämme stiegen nach 24 Stunden Bebrütung stark an (bis zu zwei Zehnerpotenzen) und fielen dann wieder leicht ab. Der stärkste Keimzahlabfall war bei dem *Ec. casseliflavus* Stamm zu verzeichnen.

Keimzahlen und pH-Werte sind anhand der arithmetischen Mittel der Doppelbestimmungen in Tabelle 32 dargestellt.

Tab. 32: Keimzahlen und pH-Werte der *Ec. gallinarum* Stämme und des *Ec. casseliflavus* Stammes nach Kultivierung bei 30 °C in Abhängigkeit der Kultivierungszeit

	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH-Wert	Ig KbE/ml						
G 201	7,08	6,20	4,33	8,14	4,17	8,18	4,09	7,87
G 202	7,08	6,13	4,31	7,98	4,19	7,89	4,14	7,81
C 201	7,23	6,16	4,34	8,26	4,16	7,88	4,10	7,53

Der pH-Wert der einzelnen Stämme fiel nach 24 bis 48 Stunden in den sauren Bereich und blieb bei allen Stämmen etwa auf dem selben Niveau.

Keimzahlentwicklung und Säuerung erfolgten ähnlich wie bei den anderen untersuchten Enterokokkenstämmen.

Weder die hier untersuchten *Ec. gallinarum* Stämme, noch der *Ec. casseliflavus* Stamm waren in der Lage mit der hier verwendeten Methode nachweisbare Mengen an Phenylethylamin und Tyramin zu bilden.

3.3.5. Vergleich der Phenylethylaminbildung zwischen den untersuchten Enterokokkenspezies

Die Phenylethylaminbildung der einzelnen Stämme der verschiedenen Enterokokkenspezies war unterschiedlich. Während die untersuchten Stämme der Spezies *Ec. gallinarum* und *Ec. casseliflavus* keine Phenylethylaminbildung zeigten, bildeten dagegen Stämme der anderen Enterokokkenspezies teilweise enorme Mengen dieses Amins. Alle analysierten *Ec. faecalis* und *Ec. hirae* Stämme konnten Phenylethylamin bilden, während jeweils nur zwei der untersuchten Stämme der Spezies *Ec. faecium* und *Ec. durans* diese Fähigkeit besaßen. Im Vergleich der einzelnen Spezies fiel auf, dass die *Ec. hirae* Stämme die größten Mengen an Phenylethylamin erzeugten (bis über 1700 µg/ml), gefolgt von den untersuchten *Ec. faecalis* (bis über 1000 µg/ml) Stämmen. Die beiden phenylethylaminbildenden Stämme der Spezies *Ec. durans* lagen mit der Bildung dieses Amins mengenmäßig zwischen den *Ec. hirae* und *Ec. faecalis* Stämmen. Diese beiden *Ec. durans* Stämme gehörten zu den nach 24 Stunden stärker wachsenden Enterokokkenstämmen. Der ebenfalls dazugehörige *Ec. durans* Stamm D 303 sowie die nach 24 Stunden

wachstumsschwächeren *Ec. durans* Stämme D 201 und D 202 bildeten dagegen kein Phenylethylamin. Während zwei der untersuchten *Ec. faecium* Stämme (Fc 302, Fc 403) im Stammvergleich der phenylethylaminbildenden Enterokokkenspezies die geringste Menge dieses Amins bildeten (bis ca. 500 µg/ml), konnte bei einem Stamm (Fc 304) dieser Speziesgruppe kein Phenylethylamin nachgewiesen werden. Während Fc 302 zu den wachstumsstärkeren Stämmen gehörte, zählten Fc 304 und Fc 403 zu den wachstumsschwächeren Stämmen.

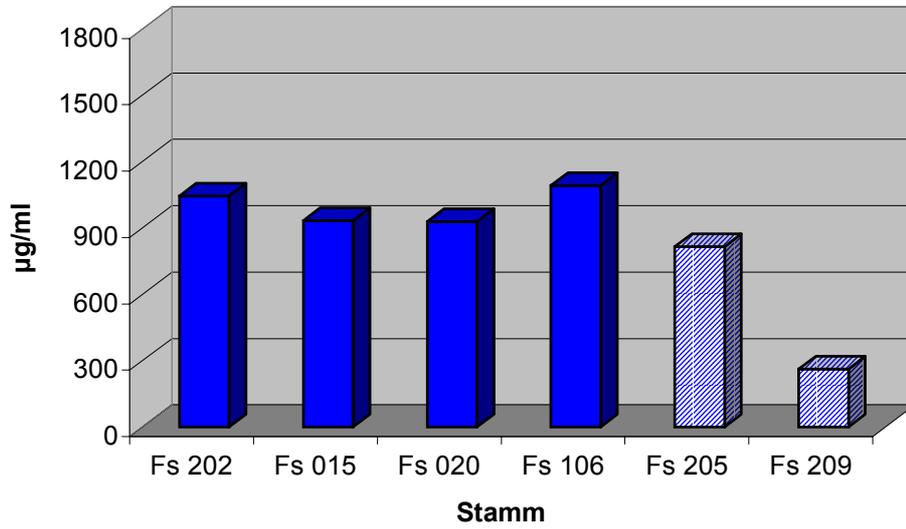
Bezogen auf 1 Million lebende Keime war die Phenylethylaminbildung der einzelnen Stämme sehr unterschiedlich. Der *Ec. hirae* Stamm H 005 fiel mit seiner Bildung pro 1 Million KbE im Vergleich zu allen untersuchten Enterokokkenstämmen deutlich heraus. Eine Million der Keime dieses Stammes konnten unter den genannten Untersuchungsbedingungen über 50 µg Phenylethylamin bilden. Danach folgte der *Ec. durans* Stamm D 203 mit knapp der Hälfte (ca. 25 µg) Phenylethylamin pro 1 Million lebender Keime. Bei allen anderen untersuchten Enterokokkenstämmen war eine Phenylethylaminbildung bezogen auf 1 Million KbE unter 20 µg zu verzeichnen. Dabei lag die Schwankungsbreite von 1,60 µg/1x10⁶ KbE beim *Ec. faecalis* Stamm Fs 015 bis 15,34 µg/1x10⁶ KbE beim *Ec. hirae* Stamm H 001.

Es konnte kein unmittelbarer Zusammenhang der hier untersuchten Stämme zwischen der Wachstumsstärke nach 24 Stunden und der Phenylethylaminkonzentration bzw. -bildung pro 1 Million lebender Keime festgestellt werden.

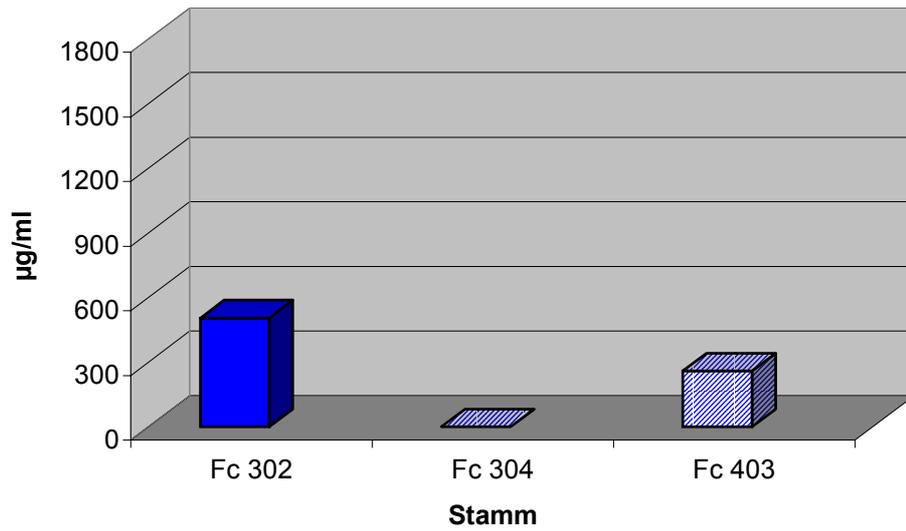
In Abbildung 6 sind die Phenylethylaminbildung (µg/ml) und in Abbildung 7 die Phenylethylaminbildung bezogen auf 1 Million KbE der untersuchten Enterokokkenspezies nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C vergleichend dargestellt. Die Balkendiagramme beziehen sich auf die Mittelwerte der jeweiligen Doppelbestimmungen.

Abb. 6: Phenylethylaminkonzentration der Enterokokkenspezies nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

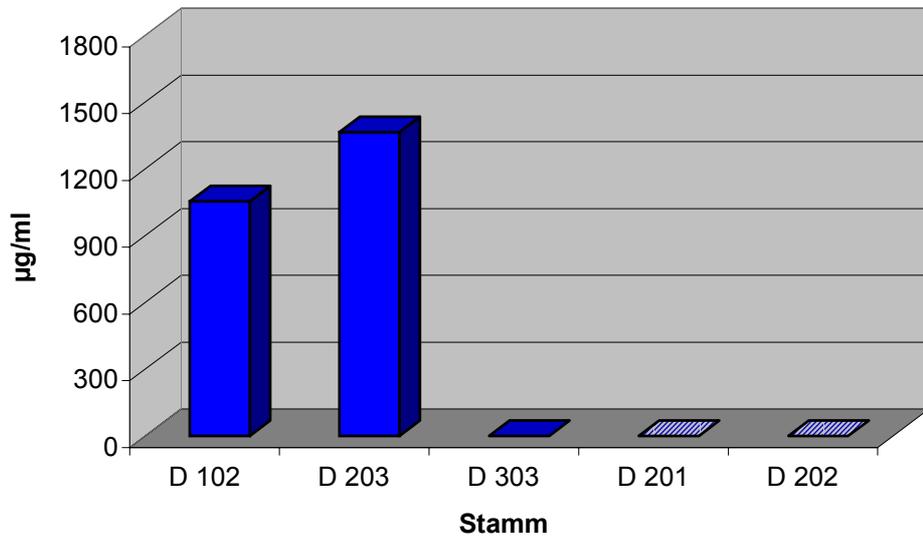
Ec. faecalis



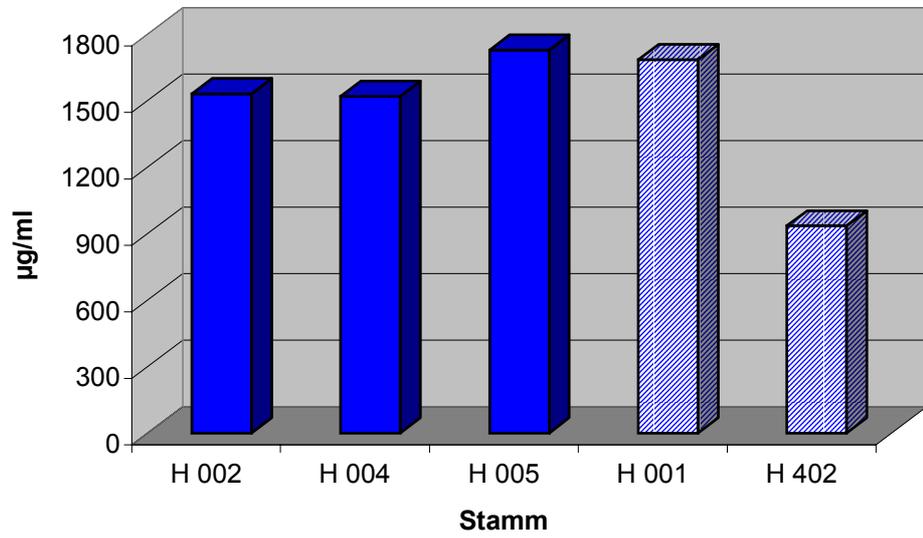
Ec. faecium



Ec. durans



Ec. hirae

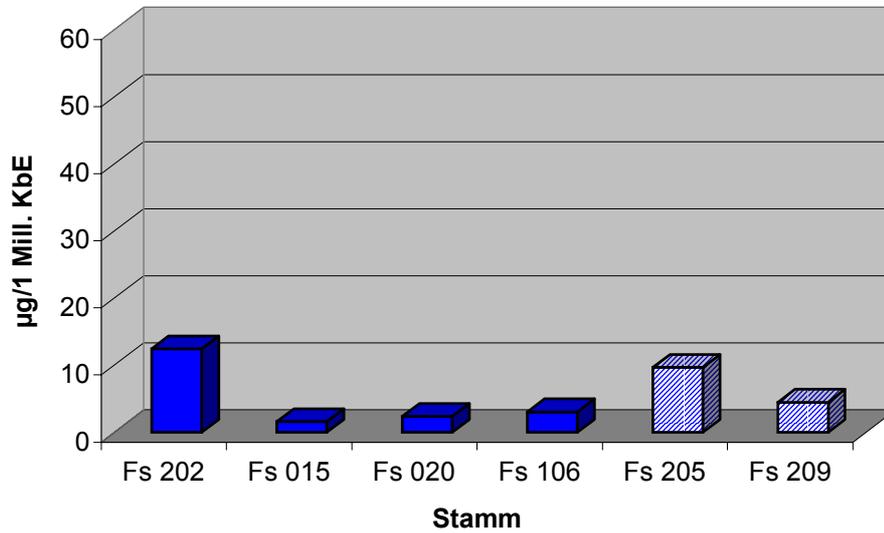


Balken mit voller Fläche: nach 24 Stunden wachstumsstarke Stämme

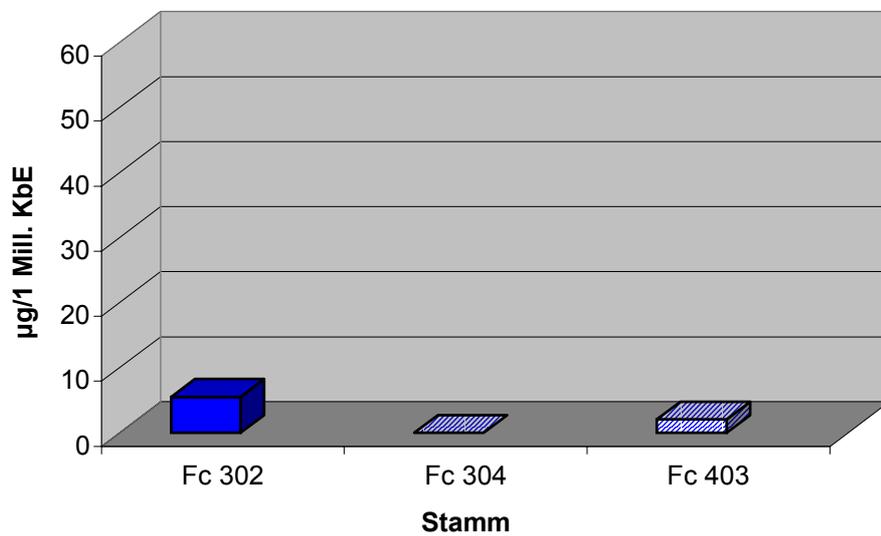
Balken mit schraffierter Fläche: nach 24 Stunden wachstumsschwache Stämme

Abb. 7: Phenylethylaminbildung der Enterokokkenspezies bezogen auf 1×10^6 KbE nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

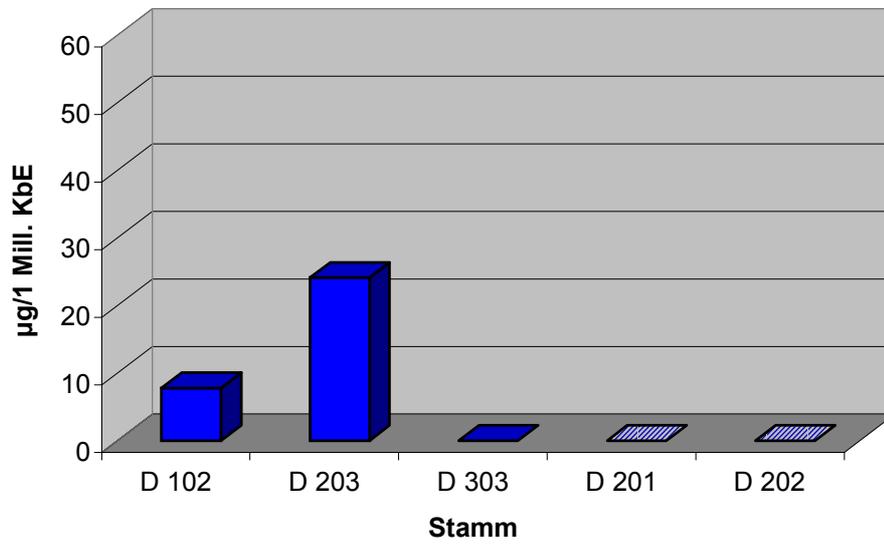
Ec. faecalis



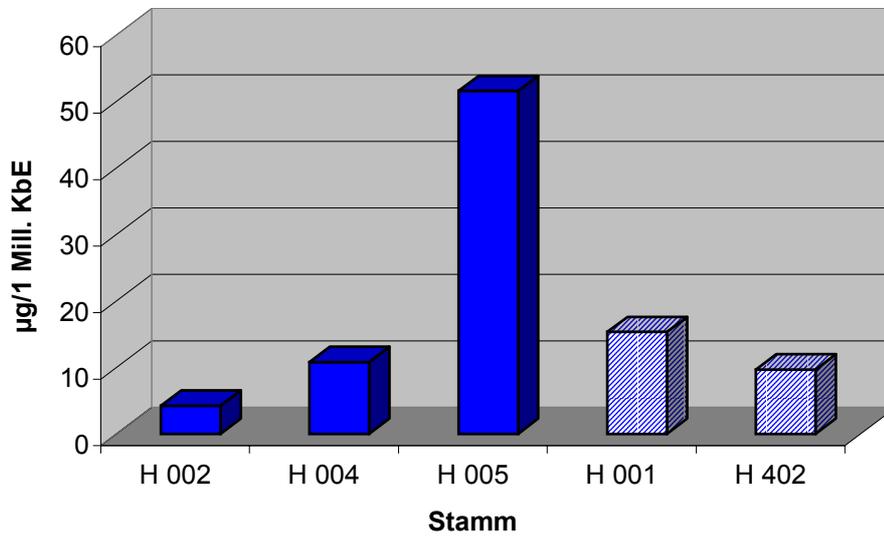
Ec. faecium



Ec. durans



Ec. hirae



Balken mit voller Fläche: nach 24 Stunden wachstumsstarke Stämme
Balken mit schraffierter Fläche: nach 24 Stunden wachstumsschwache Stämme

Vergleichend kann festgestellt werden, dass Phenylethylaminbildung stets neben Tyraminbildung bei allen Teststämmen gefunden wurde. Fehlende Phenylethylaminbildung war meist mit negativem Nachweis der Tyraminbildung verbunden. Der Stamm Fc 304 zeigte als einziger Tyramin- aber keine Phenylethylaminbildung.

Nimmt man den Referenzstamm Fs 202, ein *Ec. faecalis* Stamm, als Vergleichsstamm für die Phenylethylaminbildung der anderen Enterokokkenstämme, so ergibt sich ein sehr unterschiedliches Bild. Bis auf den Stamm H 402 konnten alle anderen *Ec. hirae* Stämme etwa 1,5-mal soviel Phenylethylamin bilden. Die beiden phenylethylaminbildenden *Ec. durans* Stämme folgten mit etwa der gleichen Bildungsmenge (D 102) bzw. 1,3-mal soviel Phenylethylamin (D 203). Die etwa gleiche Menge dieses Amins konnte noch durch den *Ec. faecalis* Stamm Fs 106 gebildet werden, alle anderen Stämme unterboten die Phenylethylaminkonzentration des Referenzstammes Fs 202 nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C.

Bezogen auf 1 Million lebender Keime konnten nur drei Enterokokkenstämme die Bildungspotenz des Referenzstammes überbieten. Der *Ec. hirae* Stamm H 005 war sowohl der Stamm mit der höchsten Phenylethylaminkonzentration, als auch der Stamm mit der größten Bildungsrate pro 1 Million Keime. Mit über 400 % (bezogen auf den Referenzstamm Fs 202) überragte er alle anderen untersuchten Enterokokkenstämme deutlich, dabei konnte nur eine ca. 1,5-mal höhere Phenylethylaminkonzentration gegenüber Fs 202 nachgewiesen werden. Desweiteren konnten von 1 Million KbE des *Ec. hirae* Stammes H 001 und des *Ec. durans* Stammes D 203 mehr Phenylethylamin gegenüber Fs 202 gebildet werden. Alle anderen untersuchten Enterokokkenstämme lagen mit ihrer Phenylethylaminbildung pro 1 Million lebender Keime deutlich unter der des Referenzstammes. Dabei war eine große Schwankungsbreite von etwa 13 % (Fs 015) bis 87 % (H 004) zu verzeichnen. In Tabelle 33 ist die relative Phenylethylaminbildung der untersuchten Enterokokkenstämme bezogen auf den Referenzstamm Fs 202 dargestellt. Die angegebenen Werte beziehen sich jeweils auf die Mittelwerte der Doppelbestimmungen. Die Stämme links der gestrichelten Linie stellen die nach 24 Stunden wachstumsstärkeren Stämme

dar, die rechts neben der gestrichelten Linie sind die nach 24 Stunden wachstumsschwächeren Stämme. Die Enterokokkenspezies *Ec. gallinarum* sowie *Ec. casseliflavus* wurden nicht mit einbezogen, da diese Stämme kein Phenylethylamin im nachweisbaren Bereich bildeten.

Tab. 33: Relative Phenylethylaminbildung der untersuchten Stämme der verschiedenen Enterokokkenspezies in Prozent bezogen auf den Referenzstamm Fs 202 (1044,7 µg/ml und 12,45 µg/1x10⁶ KbE entsprechen 100 %) nach 72 Stunden Kultivierung bei 30 °C

Ec. faecalis	Fs 015	Fs 020	Fs 106	Fs 205	Fs 209
µg/ml	89,5	88,9	104,5	78,2	25,2
µg/1x10 ⁶ KbE	12,9	19,4	24,7	78,1	34,7
Ec. faecium	Fc 302			Fc 304	Fc 403
µg/ml	48,4			∅	24,8
µg/1x10 ⁶ KbE	44,6			∅	16,6
Ec durans	D 102	D 203	D 303	D 201	D 202
µg/ml	100,9	130,6	∅	∅	∅
µg/1x10 ⁶ KbE	62,7	194,0	∅	∅	∅
Ec. hirae	H 002	H 004	H 005	H 001	H 402
µg/ml	146,7	145,6	165,5	161,5	89,6
µg/1x10 ⁶ KbE	34,0	87,0	414,6	123,2	77,9

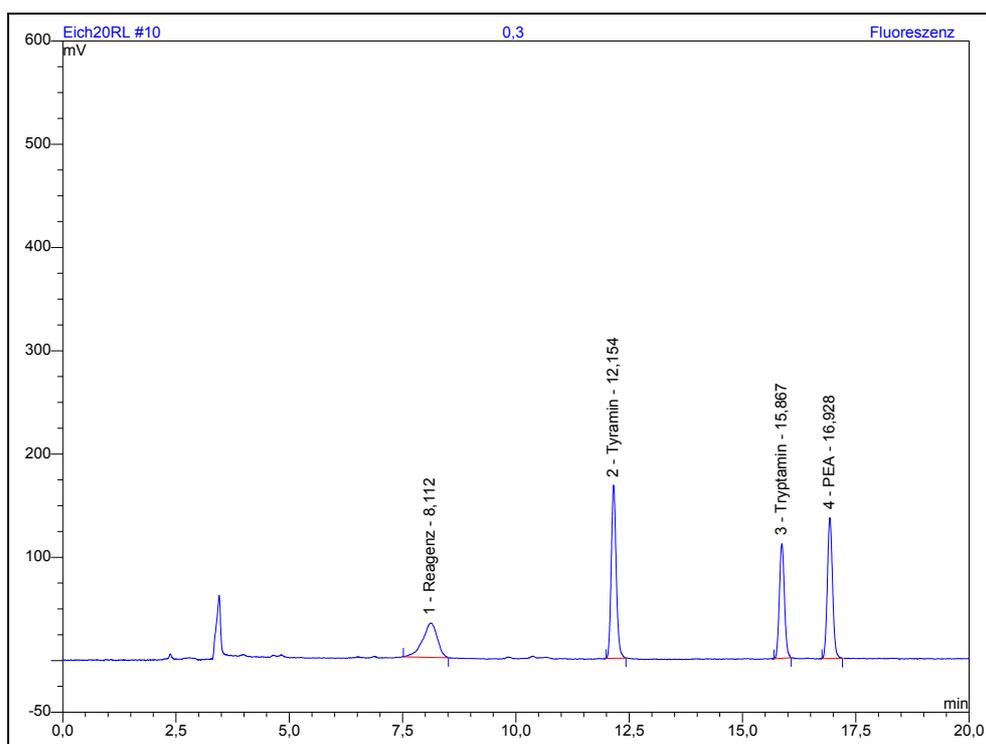
∅ keine Angabe

3.3.6. Auswertung der Methode zur Aminanalyse

Bei der durchgeführten Methode wurden die zu untersuchenden biogenen Amine mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert und anschließend über Reversed-Phase-Chromatographie und Fluoreszenzdetektion analysiert. Die Nachweisgrenze für die verwendete Methode lag bei 0,03 mg/l, die Bestimmungsgrenze bei 0,06 mg/l. Damit waren Nachweis- und Bestimmungsgrenze im unteren Bereich bzw. unter denen in der Literatur angegebenen Werten (JUHLIS et al. (1999); JUHLIS, Diss. in Arbeit: Nachweisgrenze: 0,04 mg/l) und sonstigen Angaben für Derivatisierung mit anschließender Fluoreszenzdetektion (Nachweisgrenze zwischen 0,5 mg/kg und 1,5 mg/kg; BÜTIKOFER et al., 1990; STRAUB et al., 1993; HERNANDEZ-JOVER et al., 1996; VALE u. GLORIA, 1997; siehe auch Kap. 2.3.2.2.).

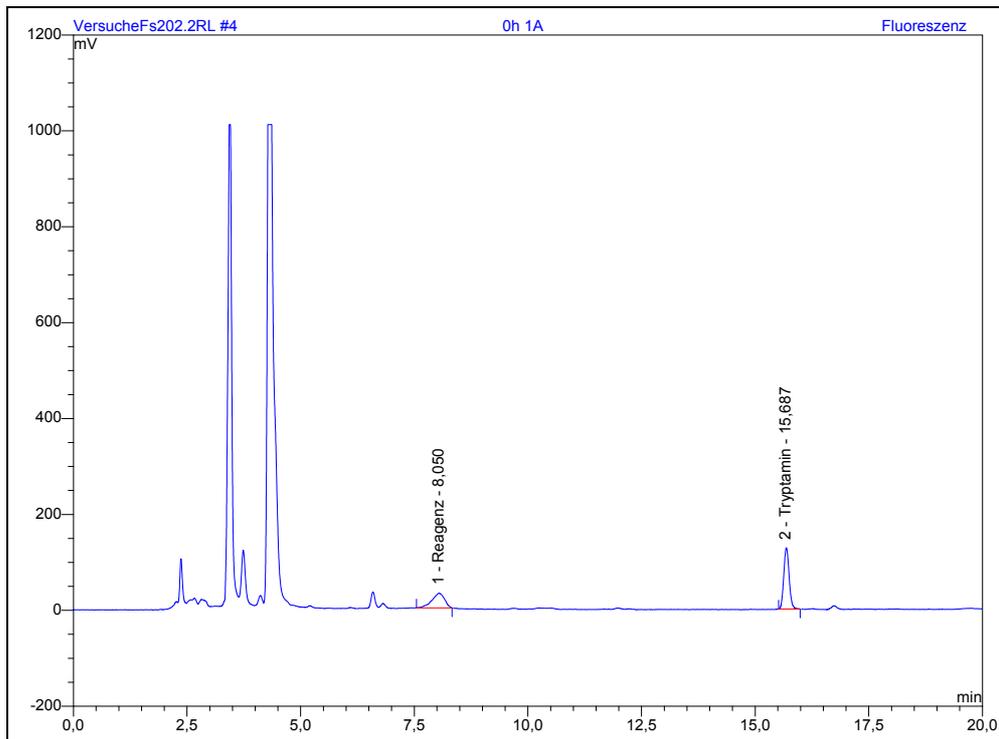
Bei der in den Untersuchungen verwendeten Analysemethode der HPLC werden die zu untersuchenden Amine anhand Ihrer Retentionszeit (Rf-Wert) identifiziert. Die Retentionszeit ist die Zeit, die eine Substanz braucht, um von der Dosiervorrichtung bis zum Säulenende zu gelangen. Unter konstanten Bedingungen erscheint eine reine Substanz immer mit der selben Retentionszeit, d.h. der Peak im Chromatogramm erscheint für diese bestimmte Substanz immer an der selben Stelle. Die Fläche unter dem Peak im Chromatogramm spiegelt die Menge der gemessenen Substanz wider. Somit wird die Probe qualitativ und quantitativ analysiert (siehe Kap. 2.3.2.). In den folgenden Abbildungen sind einige Beispielchromatogramme dargestellt.

Abb. 8: Chromatogramm zur Probe 0,3 mg/l in der Eichreihe



In Abb. 8 ist ein Chromatogramm aus der Sequenz einer Eichreihe dargestellt. Sowohl Phenylethylamin als auch Tyramin sind hier in einer Konzentration von 0,3 mg/l vorhanden. Die Zahlen hinter den Substanzbezeichnungen im Chromatogramm stellen die Retentionszeiten in Minuten dar. Tryptamin wurde als interner Standard verwendet.

Abb. 9: Chromatogramm Fs 202 / 0 Stunden



In Abb. 9 ist ein Chromatogramm aus der Sequenz des Stammes Fs 202 vor der Bebrütung dargestellt. Nur der interne Standard Tryptamin wird als Peak gezeigt. Für Phenylethylamin und Tyramin gibt es keine Peaks, d.h. diese Substanzen konnten in den Probelösungen nicht eruiert werden.

Zu beachten ist die unterschiedliche Millivolt-Einteilung der Größenachse in Abb. 8 und 9. Je nach Ausprägung der Peaks der zu untersuchenden Substanzen wird diese verändert. Ziel war dabei die möglichst gute Darstellung der Peaks der Amine im Chromatogramm. Die Abbildungen 9 bis 12 haben zum besseren Vergleich die selbe Millivolt-Einteilung der Größenachse.

Abb. 10: Chromatogramm Fs 202 / 24 Stunden

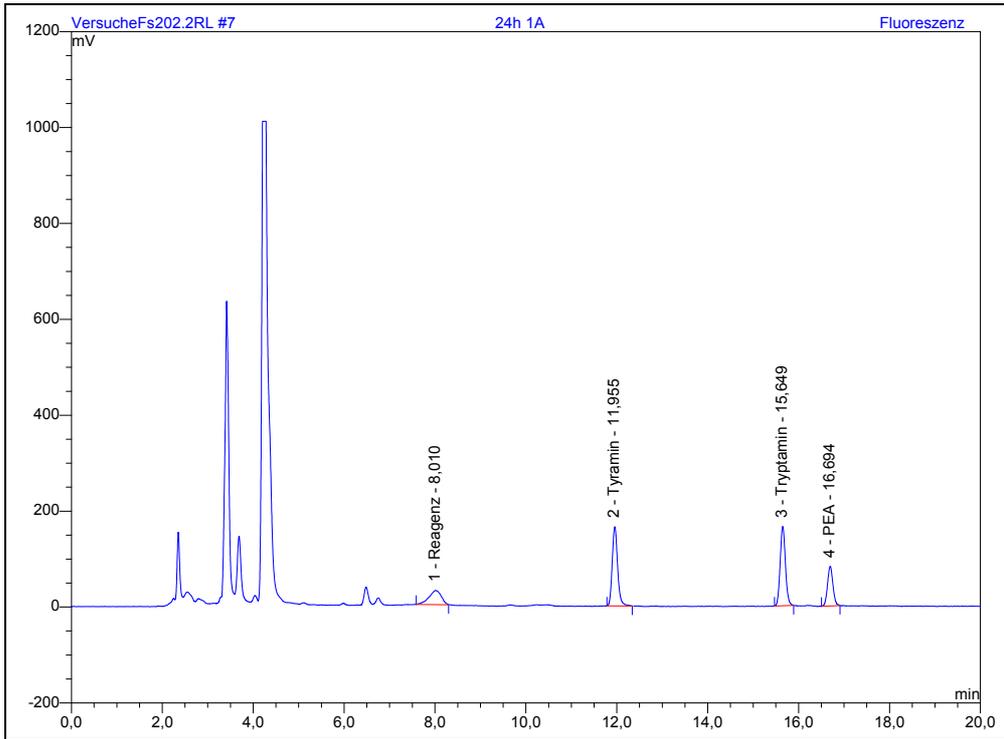
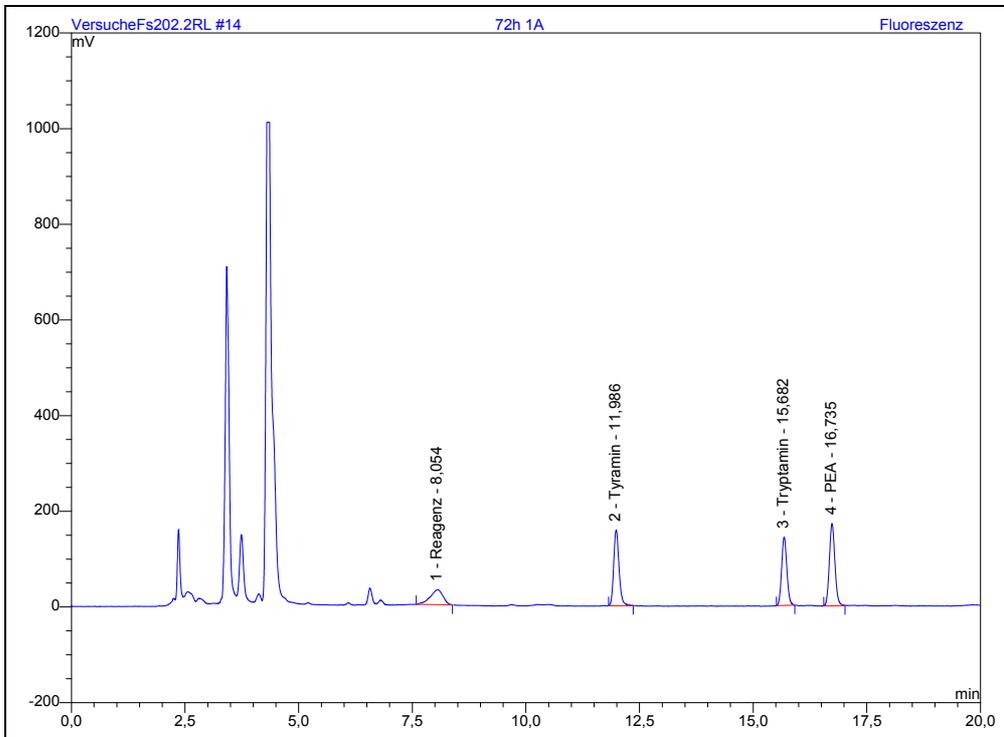


Abb. 11: Chromatogramm Fs 202 / 72 Stunden



In Abb. 10 ist ein Chromatogramm aus der Sequenz des Referenzstammes Fs 202 nach 24 Stunden Bebrütung dargestellt. Phenylethylamin und Tyramin zeigen deutliche Peaks im Chromatogramm. Abbildung 11 zeigt ein Chromatogramm aus der Sequenz des Stammes Fs 202 nach 72 Stunden. Es fällt auf, dass die Tyraminpeaks in beiden Chromatogrammen fast gleich groß sind, der Phenylethylaminpeak hingegen nach 72 Stunden Bebrütung höher erscheint als nach 24 Stunden Bebrütung. Dies spiegelt sich entsprechend in den gemessenen Konzentrationen der Amine wider (siehe Tab.18 und Abb. 5 in Kap. 3.3.4.1.).

Abb. 12: Chromatogramm D 201 / 72 Stunden

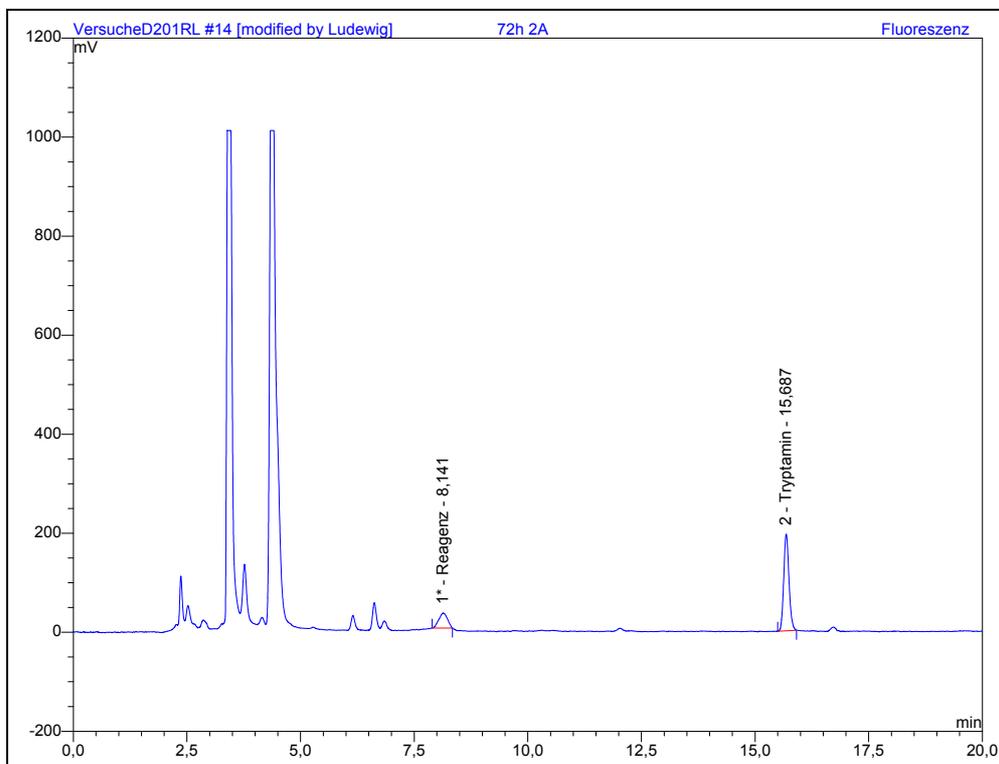


Abbildung 12 zeigt ein Chromatogramm aus der Sequenz des Stammes D 201 nach 72 Stunden Bebrütung. Auch hier ist außer für Tryptamin kein Peak für weitere Amine erkennbar. Die angedeuteten Zacken der Basislinie an den typischen Stellen der Amine Phenylethylamin und Tyramin sind unterhalb der Nachweisgrenze und somit nur als Verunreinigung einzustufen.

Die Retentionszeiten in Minuten lagen im Mittelwert für Phenylethylamin bei 16,7 und für Tyramin bei 11,9. Insgesamt wurden jeweils 96 Retentionszeiten für Phenylethylamin und Tyramin bei Analyse der Standards ermittelt und je 86 bzw. 82 Werte für Retentionszeiten von Phenylethylamin und Tyramin bei Analyse der Probelösungen.

Die Genauigkeit der Methode ergab sich aus den angegebenen Standardabweichungen und der Tatsache, dass Mittelwert sowie Median der Retentionszeiten für Standards und Probelösungen faktisch nicht voneinander abwichen (Tab. 34). Lediglich die Standardabweichungen lagen für die Proben geringfügig höher als bei den Standards.

Tab. 34: Retentionszeiten in Minuten und dazugehörige statistische Angaben

	Rf-Werte PEA		Rf-Werte TYR	
	Standard	Probe	Standard	Probe
Mittelwert	16,70	16,70	11,98	11,99
s	0,092	0,111	0,078	0,105
Median	16,70	16,70	11,99	11,99
Minimum	16,52	16,17	11,83	11,43
Maximum	16,88	16,99	12,14	12,40
n	96	82	96	86
Varianz	0,009	0,012	0,006	0,011

s Standardabweichung
n Anzahl der Werte

Aus den Angaben in Tab. 34 ist ersichtlich, dass die hier zu untersuchenden biogenen Amine Phenylethylamin und Tyramin mit der hier durchgeführten Untersuchungsmethode der HPLC mit großer Genauigkeit analysiert worden sind.