

**Aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung
und
dem Institut für Lebensmittelhygiene des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin**

**Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von
Vibrio parahaemolyticus in Miesmuscheln (*Mytilus edulis*)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Helen Remy
Tierärztin aus Sinsheim**

Berlin 2009

Journal-Nr.:3335

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt
Zweiter Gutachter: PD Dr. Lüppo Ellerbroek
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Jörg Oehlenschläger

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Vibrio parahaemolyticus, mussels, culture media, bacterial counting

Tag der Promotion: 07.12.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-803-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild © Teamarbeit - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2010

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern
und meinem Lebensgefährten Christian

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abs.	Absatz
ADH	Arginindihydrolase
AG	Arabinose-Glucuronat (Medium)
ALTS	Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen Sachverständigen
AMY	Amygdalin
APW	Alkalisches Peptonwasser
ARA	Arabinose
ASM	American Society for Microbiology
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning (Amnetische/zentralnervöse Muschelvergiftung)
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Wasseraktivität (Maß für frei verfügbares Wasser)
bp	base pairs (=Basenpaare)
BTBT	Bromthymolblau-Teepol-Agar
$C_6H_8O_7 \cdot x nFe \cdot x nH_3N$	Ammoniumeisen(III)citrat
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFSAN	Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science
CIT	Citrat
cm	Zentimeter
CSP	Cold-Shock-Proteine
CVA	Chrom-Vibrio-Agar
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
DSP	Diarrethic Shellfish Poisoning (Durchfallerzeugende Muschelvergiftung)
E	Escherichia
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid (Ethylendiaminotetraessigsäure)
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alii

EU	Europäische Union
FAO	Food and Agricultural Organization
FDA	Food and Drug Administration
GEL	Gelatinase
GKZ	Gesamtkeimzahl
GLU	Glucose
GSTB	Glukose-Salz-Teepol-Boullion
h	Stunde
H ₂ CO ₃	Dihydrogencarbonat (Kohlensäure)
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O	Ammoniumeisen(III)-sulfat Dodecahydrat
HCl	Hydrogeniumchlorid (Salzsäure)
HGMF	Hydrophobic-Grid-Membrane-Filter
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
IND	Indol
INO	Inosit
ISO	International Organization for Standardization
K	Kelvin
KbE	Kolonie bildende Einheit(en)
kg	Kilogramm (10 ³ Gramm)
kGy	Kilogray
KP	Kanagawa-Phänomen
KZ	Keimzahl
l	Liter
LDC	Lysindecaboxylase
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
M	Molar
mA	Milliampere (10 ⁻³ Ampere)
MAN	Mannit
McF	Mc Farland
MEL	Melbiose
mg	Milligramm (10 ⁻³ Gramm)

mg Pt/ l	Milligramm Platin pro Liter (= Hazen-Farbzahl)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mM	Millimolar (10^{-3} Molar)
MPa	Megapascal (10^6 Pascal)
MPN	Most Probable Number (höchstwahrscheinliche Zahl)
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulphat
NaCl	Natriumchlorid
NCTC	National Collection of Type Cultures (UK)
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer (10^{-10} Meter)
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NRL	Nationales Referenzlabor
O129	2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-Phosphat
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-βD-Galaktopyranosidase
OSV	Oberflächenspatelverfahren
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	pondus hydrogenii
PHLS	Public Health Leadership Society (Grossbritannien)
pmol	Pikomol (10^{-12} Mol)
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning (Paralysierende Muschelvergiftung)
r	Korrelationskoeffizient
RHA	Rhamnose
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S‰	Promille Salinität
SAC	Saccharose
SCB	Salz-Colistin-Boullion
sec	Sekunde

SOR	Sorbit
SPB	Salz-Polymyxin-Bouillon
spp.	Spezies
STB	Salz-Teepol-Puffer (= engl.buffer)
T	Temperatur
T-APW	Tris gepuffertes Alkalisches Peptonwasser
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bilesalts-Sucrose (Agar)
TDA	Tryptophandesaminase
TDH	Thermolstable Direct Hemolysin
TE	Tris-EDTA
TRH	TDH-Related Hemolysin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trypton-Soja-Agar
TSAT	Trypton-Soja-Tetrazoliumchlorid-Agar
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
TTSS	Type Three Secretion System
UpM	Umdrehungen pro Minute
URE	Urease
V	Volt
V.	Vibrio
VBNC	viable-but-non culturable
VE	voll entsalzt(es Wasser)
VO	Verordnung
VP	Voges-Proskauer
VPSA	<i>V. parahaemolyticus</i> -Sucrose-Agar
WHO	World Health Organization
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum.....	3
2.1	Miesmuscheln: <i>Mytilus</i> spp.....	3
2.1.1	Namensgebung.....	3
2.1.2	Systematik.....	3
2.1.3	Aufbau.....	3
2.1.4	Ernährungsweise.....	4
2.1.5	Herzkreislaufsystem und Immunabwehr.....	5
2.1.6	Fortpflanzung und Entwicklung.....	5
2.2	Miesmuscheln als Lebensmittel.....	6
2.3	Miesmuschelerzeugung.....	7
2.3.1	Internationaler Miesmuschelmarkt.....	7
2.3.2	Miesmuschel-Aquakultur.....	7
2.3.3	Formen der Miesmuschelaquakultur.....	7
2.3.3.1	Hängekulturen.....	7
2.3.3.2	Pfahlkulturmethode.....	8
2.3.3.3	Bodenkulturen.....	8
2.3.4	Rechtliche Bestimmungen.....	9
2.3.4.1	Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer.....	10
2.3.4.2	Hygienevorschriften vor der Muschelernte.....	11
2.3.4.3	Hygienevorschriften nach der Ernte.....	13
2.3.4.4	Kritik an den Hygienevorschriften.....	14
2.4	Vibrionen.....	14
2.4.1	Historischer Abriss.....	14
2.4.2	Taxonomie.....	15
2.4.3	Morphologie und allgemeine Eigenschaften.....	15
2.5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
2.5.1	Synonyme Bezeichnungen.....	16
2.5.2	Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i>	16
2.5.2.1	Allgemeine kulturelle Eigenschaften.....	16
2.5.2.2	Kulturelle Methoden zum Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i>	17
2.5.2.2.1	Qualitativer Nachweis.....	17
2.5.3	Molekulare Nachweismethoden für <i>V. parahaemolyticus</i>	24
2.5.3.1	Qualitativer Nachweis.....	24
2.5.3.2	Quantitativer Nachweis.....	25
2.5.4	Typisierungsmethoden.....	26
2.5.4.1	Serotypisierung.....	26
2.5.4.2	Kanagawa-Phänomen.....	26
2.5.4.3	Phagentypisierung.....	27
2.5.4.4	Genotypisierungsverfahren.....	27
2.5.4.4.1	Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	28
2.5.4.4.2	Ribotyping.....	28
2.5.4.4.3	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR).....	28

2.5.4.4.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) / Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR).....	29
2.5.4.4.5 Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE).....	29
2.5.4.4.6 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	29
2.5.4.4.7 Multi Locus Sequence Typing (MLST).....	29
2.5.4.5 Virulenzfaktoren.....	30
2.5.4.5.1 Hämolytine.....	30
2.5.4.5.2 Siderophore.....	32
2.5.4.5.3 Adhäsion.....	32
2.5.4.5.4 Enzyme.....	33
2.5.4.5.5 Typ III Sekretions System.....	33
2.5.5 Tenazität.....	34
2.5.5.1 Erforderliche Umweltbedingungen.....	34
2.5.5.2 Hitzebeständigkeit	35
2.5.5.3 Kältebeständigkeit.....	35
2.5.5.4 Säuren- und Basenbeständigkeit.....	36
2.5.5.5 Beständigkeit gegen Druck.....	37
2.5.5.6 Beständigkeit gegenüber ionisierender Strahlung.....	37
2.5.5.7 Beständigkeit im Magen-Darm-Trakt.....	37
2.5.6 Vorkommen.....	38
2.5.6.1 Vorkommen in mariner Umgebung.....	38
2.5.6.2 Vorkommen in Lebensmitteln.....	39
2.5.7 Epidemiologie.....	41
2.5.7.1 Vektoren.....	41
2.5.7.2 Sediment.....	41
2.5.7.3 Biofilmbildung.....	41
2.5.7.4 Viable-but-non culturable-Stadium (VBNC).....	42
2.5.7.5 Regenerationsvermögen.....	43
2.5.7.6 Humane Krankheitsfälle und Ausbrüche.....	44
2.5.8 Bedeutung für die menschliche Gesundheit.....	47
2.5.8.1 Wege der Übertragung.....	47
2.5.8.2 Begünstigende Faktoren.....	47
2.5.8.2.1 Alimentäre Faktoren.....	47
2.5.8.2.2 Medizinische Faktoren.....	47
2.5.8.2.3 Lagerung und klimatische Faktoren.....	47
2.5.8.2.4 Mindestinfektionsdosis.....	48
2.5.8.2.5 Symptome der Infektion.....	48
2.5.8.2.6 Morbidität.....	50
2.5.8.2.7 Mortalität.....	50
2.5.8.2.8 Therapie.....	50
3 Eigene Untersuchungen.....	52
3.1 Versuchsaufbau.....	52
3.2 Material.....	54
3.2.1 Arbeitsgeräte allgemein.....	54
3.2.2 Arbeitsgeräte zur Herstellung von Proben mit Muschelhomogenat.....	54
3.2.3 Arbeitsgeräte zur Sterilisation der Proben mit Muschelhomogenat.....	54

3.2.4 Arbeitsgeräte zum Dotieren und zur Untersuchung der Proben mit Muschelhomogenat.....	54
3.2.5 Arbeitsgeräte für die molekularbiologische Untersuchung.....	54
3.2.6 Muschelmaterial.....	55
3.2.6.1 Muscheln für die Wachstumsversuche.....	55
3.2.6.2 Kontaminierte Muscheln.....	55
3.2.7 Flüssignährmedien.....	55
3.2.7.1 Alkalisches Peptonwasser (APW)	55
3.2.7.2 Modifiziertes APW.....	55
3.2.7.2.1 Trispuffer-Stammlösung (1 M).....	55
3.2.7.2.2 Tris-gepuffertes APW (T-APW) (0,1 M); pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5.....	56
3.2.7.2.3 Tris-gepuffertes APW (0,05 M); pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5	56
3.2.7.2.4 Tris-gepuffertes APW (0,01 M); pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5	56
3.2.7.3 Weitere Modifikationen (Grundlage: T-APW (0,01 M; pH 8,5)).....	56
3.2.7.3.1 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5) 3% NaCl.....	56
3.2.7.3.2 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5) 5% NaCl.....	56
3.2.7.3.3 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 3% Pepton.....	56
3.2.7.3.4 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 5% Pepton.....	56
3.2.7.3.5 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 2% Arabinose.....	56
3.2.8 Festnährmedien.....	57
3.2.8.1 Cholera Medium TCBS (Oxoid, CM 0333).....	57
3.2.8.2 CHROMagar™Vibrio (Mast Diagnostica, VB 910/ VB 912)	57
3.2.8.3 Columbiablutagar (COLB A; Basis: Merck 1100455).....	58
3.2.8.4 Schafblut-Agar (SBA; Basis: Standard-I-Nähragar, Merck 1.07881).....	58
3.2.9 Medien zur biochemischen Identifikation/Verdünnung.....	58
3.2.9.1 Sulphide Indole Motility -Agar (SIM Agar, Oxoid CM 435).....	58
3.2.9.2 Eisen-Dreizucker-Agar (TripleSugar-Iron-Agar, TSI; Merck 1.03915).....	59
3.2.9.3 Peptonwasser.....	59
3.2.9.4 Peptonwasser zur Salztoleranzmessung.....	59
3.2.10 Reagenzien/Chemikalien für kulturelle und biochemische Tests.....	60
3.2.11 Reagenzien/Chemikalien für die Multiplex PCR.....	60
3.2.11.1 1 xTE-Puffer.....	61
3.2.11.2 Chelex® 100 Resin-Lösung (5%).....	61
3.2.11.3 50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer.....	61
3.2.11.4 Ladepuffer	61
3.2.11.5 Ethidiumbromid-Färbelösung.....	61
3.2.11.6 Agarosegel 2%.....	61
3.3 Methoden.....	62
3.3.1 Leistungsprüfung des Chrom-Vibrio-Agar (CVA).....	62
3.3.2 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Reinkulturen.....	62
3.3.3 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Mischkulturen.....	64
3.3.4 Messung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen Modifikationen von APW.....	65
3.3.4.1 Varianten der APW-Zusammensetzung.....	65
3.3.4.2 Auswahl der Test-Stämme.....	66
3.3.4.3 Herstellung der Bakteriensuspensionen	66

3.3.4.4	Durchführung der photometrischen Messung.....	66
3.3.4.5	Anfertigung der Eichkurven.....	67
3.3.4.6	Ermittlung des Wachstumsverlaufs.....	68
3.3.4.7	Herstellung der Proben mit Muschelhomogenat.....	68
3.3.4.8	Sterilfiltration der Proben mit Muschelhomogenat.....	69
3.3.5	Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in Proben mit Begleitflora.....	69
3.3.5.1	Auswahl der Stämme.....	69
3.3.5.2	Einstellen der Keimkonzentration.....	70
3.3.5.3	Dotieren der Proben mit Muschelhomogenat.....	70
3.3.5.4	Untersuchung der Proben.....	72
3.3.6	Vergleich der Keimzählmethoden.....	72
3.3.6.1	Herstellung des Untersuchungsmaterials.....	72
3.3.6.2	MPN-Verfahren.....	72
3.3.6.3	Oberflächenspatelverfahren.....	74
3.3.7	Muschelkontamination.....	74
3.3.7.1	Herkunft, Transport und Haltung der Versuchstiere.....	74
3.3.7.2	Kontamination der Versuchstiere.....	75
3.3.7.3	Untersuchung der kontaminierten Miesmuscheln.....	77
3.3.7.4	Identifizierung nachgewiesener Bakterien.....	77
3.3.7.4.1	Biochemische/kulturelle Identifizierung.....	78
3.3.7.4.2	Biochemische Identifikation.....	78
3.3.7.4.3	Molekularbiologische Identifizierung.....	82
3.4	Statistische Auswertung.....	85
4	Ergebnisse.....	86
4.1	Leistungsprüfung des Chrom-Vibrio-Agar (CVA).....	86
4.1.1	Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Reinkulturen.....	86
4.1.2	Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Mischkulturen.....	88
4.1.3	Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Sensitivität und Spezifität.....	90
4.2	Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW.....	91
4.2.1	Statistische Auswertung der Eichkurven.....	91
4.2.1.1	Korrelation.....	91
4.2.1.2	Regressionsanalyse.....	92
4.2.2	Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. vulnificus</i> in verschiedenartig modifiziertem alkalischen Peptonwasser.....	102
4.2.2.1	Alkalisches Peptonwasser: Modifikation des pH-Werts, gepuffert mit verschiedenen Tris-Konzentrationen.....	102
4.2.2.1.1	Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in Proben mit Reinkulturen.....	102
4.2.2.1.2	Wachstum in Proben mit <i>V. parahaemolyticus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat.....	107
4.2.2.1.3	Wachstum in Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen.....	109
4.2.2.1.4	Wachstum in Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat.....	110
4.2.2.2	Gesamtkeimzahlen nach 48 Stunden.....	110
4.2.2.2.1	Proben mit <i>V. parahaemolyticus</i> -Reinkulturen.....	110

4.2.2.2.2 Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen.....	111
4.2.2.2.3 Proben mit <i>V. parahaemolyticus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat.....	111
4.2.2.2.4 Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat.....	113
4.2.2.3 T-APW (0,01 M; pH 8,5): Modifikation des Salzgehaltes.....	113
4.2.2.3.1 <i>V. parahaemolyticus</i> in aufgesalztem Medium.....	113
4.2.2.3.2 <i>V. vulnificus</i> in aufgesalztem Medium.....	115
4.2.2.4 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl): Modifikation des Peptongehaltes.....	115
4.2.2.4.1 Proben mit <i>V. parahaemolyticus</i> -Reinkulturen.....	115
4.2.2.4.2 Proben mit <i>V. parahaemolyticus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat.....	117
4.2.2.4.3 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen	118
4.2.3 Prüfung der Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	118
4.2.4 Statistische Auswertung der 48-Stunden-Gesamtkeimzahlmessung.....	122
4.3 Vergleich des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von Begleitflora.....	123
4.3.1 Statistische Auswertung	125
4.4 Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) mit dem Zusatz von Arabinose.....	125
4.4.1 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose): Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i>	126
4.4.2 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose): Gegenüberstellung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. alginolyticus</i>	127
4.4.3 Statistische Auswertung.....	128
4.5 Vergleich quantitativer, kultureller Nachweismethoden: Oberflächen-Spatelverfahren (OSV) und Most-Probable-Number (MPN)- Methode.....	129
4.5.1 Statistische Auswertung.....	130
4.6 Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> in kontaminierten Miesmuscheln.....	131
4.6.1 Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i>	131
4.6.2 Einfluss von <i>V. alginolyticus</i> auf den Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i>	134
4.6.2.1 Statistische Auswertung.....	134
4.6.3 Einfluss der Muschelfleisch-/Schalenflüssigkeitseinwaage auf die nachgewiesene Keimdichte.....	135
4.6.4 Biochemisch-kulturelle mikrobiologische Analyse der Proben.....	136
4.6.5 Molekularbiologische Untersuchung des DNA-Materials.....	136
5 Diskussion.....	137
5.1 Bewertung der eigenen Untersuchungsergebnisse.....	137
5.1.1 Leistungsprüfung von CVA.....	137
5.1.2 Optimierung der Zusammensetzung von APW.....	138
5.1.2.1 Darstellung und Begründung der Untersuchungsabschnitte/-abfolge.....	138
5.1.2.1.1 Keimzahlbestimmung mittels Photometrie.....	138
5.1.2.1.2 Kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden.....	140
5.1.3 APW-Modifikationen im Einzelnen.....	142
5.1.3.1 pH-Wert.....	142

5.1.3.2 Pufferung.....	143
5.1.3.3 Wahl des Puffers und dessen Konzentration.....	143
5.1.3.4 Wahl des Kochsalzgehaltes.....	143
5.1.3.5 Wahl des Peptongehalts.....	144
5.1.3.6 Erweiterung der APW-Zutaten durch Arabinose.....	144
5.1.4 Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in Anwesenheit von <i>V. alginolyticus</i>	145
5.1.5 Vergleich Oberflächenspatelverfahren und MPN-Technik.....	146
5.1.6 T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Kombination mit CVA...147	147
5.1.7 Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> in kontaminierten Miesmuscheln.....	147
5.1.8 Auftretende natürliche Begleitflora in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose).....	148
5.1.9 Biochemische Identifikation von <i>Vibrio</i> spp.....	148
5.1.10 Identifikation von <i>V. parahaemolyticus</i> mittels molekularbiologischer Methoden.....	149
5.2 Schlussfolgerung und Ausblick.....	150
6 Zusammenfassung.....	151
7 Summary.....	153
8 Literaturverzeichnis.....	155
9 Anhang.....	198
9.1 Tabellenverzeichnis.....	198
9.2 Bildverzeichnis.....	200

1 Einleitung

Vibrio parahaemolyticus gehört weltweit zu den wichtigsten Verursachern bakteriell bedingter Gastroenteritiden beim Menschen. Zur Zeit treten Erkrankungen schwerpunktmäßig in den USA und Japan auf, aber auch in Europa (Frankreich und Spanien) gibt es derartige Fälle zu verzeichnen. Überall wird ein Anstieg von *V. parahaemolyticus* bedingten Lebensmittelvergiftungen beobachtet.

Aufgrund der fehlenden Anzeigepflicht muss auch in Deutschland mit einer recht hohen Dunkelziffer von *V. parahaemolyticus* bedingten Human-Erkrankungen gerechnet werden. Die im Folgenden aufgeführten Faktoren unterstützen die Annahme:

V. parahaemolyticus ist natürlicherweise in Meeres- und Brackwasser zu finden, weshalb dieses Bakterium auch regelmäßig in Nord- und Ostsee, aber auch im Unterlauf der Elbe nachgewiesen wird. So isolierten die Lebensmitteluntersuchungsämter der muschelproduzierenden Länder, Schleswig-Holstein und Niedersachsen, im Rahmen ihrer Routineuntersuchungen nicht nur immer wieder dieses Bakterium, sondern verzeichneten in den letzten Jahren sogar eine Zunahme der Nachweise.

Mit einem pro-Kopf-Verbrauch von 16,4 kg im Jahr 2007 war auch in Deutschland der Konsum an Fischereierzeugnissen hoch und übertraf damit den entsprechenden Wert an Rindfleisch. Der Anteil an Krebs- und Weichtieren bewegte sich dabei in letzter Zeit zwischen 11 und 15%. Diese Daten belegen die wachsende Bedeutung von Fischereierzeugnissen als Lebensmittel in Deutschland und damit auch ein höheres Risiko einer möglichen Erkrankung durch *V. parahaemolyticus*.

Bedingt durch den globalen Klimawandel bzw. einzelner Klimaphänomene wie El Niño ist zukünftig mit einem Anstieg der Meerestemperaturen und damit mit einer weiteren Zunahme von *V. parahaemolyticus* im Meerwasser und in/auf Meerestieren zu rechnen. So wurden nach dem Hurrikan "Katrina" im Jahr 2005 in den betroffenen US-Staaten verstärkt humane Erkrankungen durch *Vibrio* spp. verzeichnet. Daneben trägt der internationale Schiffsverkehr durch die Praxis der Ballastwasserentsorgung während der Beladung zu einer globalen Distribution dieses Bakteriums bei.

Des Weiteren werden marine Fischereierzeugnisse in Europa immer häufiger in Aquakulturen produziert. In diesem Zusammenhang machte die Europäische Union die Gewährleistung gesunder und hochwertiger Erzeugnisse zu ihrem erklärten Ziel. Dazu ist die zuverlässige Überwachung der marinen Bakterienflora unabdingbar.

Eine Risikobewertung der Europäischen Kommission aus dem Jahr 2001 stellte fest, dass ausreichende quantitative Daten zum Vorkommen von *V. parahaemolyticus* für die verschiedenen marinen Fischereierzeugnisse in Europa immer noch fehlen. Zusätzlich bemängelte dieser Bericht die unterschiedliche Sensitivität der Untersuchungsmethoden, was zu Schwierigkeiten beim Vergleich der Zahlen einzelner Studien führte. In der Verordnung EG Nr. 2073/2005 betont die Europäische Union die Erfordernis der Entwicklung zuverlässiger Untersuchungsmethoden speziell auch für *V. parahaemolyticus*. Derzeit gibt es jedoch

Einleitung

kein einheitliches Verfahren zur qualitativen bzw. quantitativen Bestimmung von *V. parahaemolyticus* in marinen Fischereierzeugnissen. Die ISO-Methode 8914 aus dem Jahre 1990, als das einzige genormte qualitative Nachweisverfahren, galt als überarbeitungsbedürftig und wurde 2007 durch die ISO-Methode TS 21872-1:2007 abgelöst. Da diese allerdings keine Änderung der bisher gebräuchlichen Selektivnährmedien vorsieht, ist mit einer endgültigen Lösung der bestehenden Probleme beim Nachweis dieses Bakteriums nicht zu rechnen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die *V. parahaemolyticus*-Diagnostik in Fischereierzeugnissen durch Optimierung der gebräuchlichen Nährmedien zu verbessern. Da der Konsum von Muscheln als einer der wichtigsten Übertragungswege gilt, wurde ein besonderes Augenmerk auf den Nachweis des Bakteriums in dieser Matrix gelegt.

Zu diesem Zweck wurde das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen Zusammensetzungen des herkömmlichen Anreicherungsmediums und auch auf einem neuartigen Festnährmedium getestet. Weiterhin wurde die Leistungsfähigkeit zweier Techniken zur Quantifizierung von *V. parahaemolyticus* miteinander verglichen. Abschließend sollte das so optimierte Anreicherungsmedium sowie das o.g. neue Festnährmedium bei der quantitativen Untersuchung von kontaminierten Miesmuschelchargen in der Praxis erprobt werden. Insgesamt sollte mit Hilfe dieser Erhebungen ein einfaches wie auch routinemäßig anwendbares Nachweisverfahren für *V. parahaemolyticus* in zweischaligen Weichtieren entwickelt werden.

2 Schrifttum

2.1 Miesmuscheln: *Mytilus* spp.

2.1.1 Namensgebung

Der Namensbestandteil „mies“ in dem Wort „Miesmuschel“ leitet sich vom mittelhochdeutschen bzw. plattdeutschen „mois“ ab und bedeutet soviel wie „Moos“. An Moos erinnern die sogenannten Byssusfäden, mit denen sich das Tier an verschiedene Oberflächen anheften kann (SCHUTZSTATION WATTENMEER, 2007). Eine weitere geläufige Bezeichnung ist „Pfahlmuschel“ (GUBERNATOR, 2007). Im englischen Sprachgebrauch existiert auch der Ausdruck „blaue Muschel“ (blue mussel).

2.1.2 Systematik

Die Miesmuschel gehört dem Stamm der *Mollusca* (Weichtiere) an. Aufgrund ihrer zwei Schalen ist sie der Klasse der *Bivalvia* (Muscheln) zuzuordnen. Da diese Muschelart wie viele andere Spezies über Byssusfäden bzw. sezernierten Zement an Substraten des Meeresboden anhaftet und über keinen verwachsenen Mantelrand verfügt, zählt sie zu der Unterklasse der *Pteriomorpha* (Meeresmuscheln). Unter die Ordnung *Mytiloidea* ist sie zu fassen, da sie sich über Byssusfäden anheftet sowie einen reduzierten vorderen Adduktormuskel aufweist. Die Familie der *Mytilidae* (Miesmuscheln) ist die einzige dieser Ordnung. Das Genus *Mytilus* wird durch eine - bis auf wenige strahlenartig verlaufende Rippen - glatte Schale und kleinen Zähnchen nahe des Schnabels gekennzeichnet (RUPPERT und BARNES, 1994). Arten wie *Mytilus edulis* und *Mytilus trossulus* finden sich z.B. in Nord- und Ostsee, wogegen *Mytilus galloprovincialis* vorwiegend im Mittelmeer beheimatet ist.

2.1.3 Aufbau

Mytilus edulis (lat. *edulis* = essbar) lebt überwiegend im Sublitoral und kann dort eine Länge von 10-13 cm erreichen. Unter weniger idealen Bedingungen wird sie auch nach 15 bis 20 Jahren oft nicht größer als 2-3 cm (SEED, 1976).

Das Farbspektrum der Schalenaußenseite reicht bei dieser Muschelart von blauschwarz bis braun mit dunkelbrauner bis lila strahlenartiger Zeichnung (SIDDALL, 1980).

Die beiden gleich großen, fast dreieckigen Schalenklappen, die das Tier umschließen, sind im vorderen Bereich über ein elastisches Band, mit dessen Hilfe die Muschelhälften gespreizt werden können, scharnierartig verbunden (GOSSLING, 2003a; STORCH und WELSCH, 2004). Bis auf eine breite, lilafarbene oder dunkle Grenzschrift sind Miesmuschelschalen auf der Innenseite weiß. Entlang der bereits erwähnten Grenzschrift ist der Mantel (Pallium) aufgehängt, weshalb sie auch als Palliallinie bezeichnet wird. Der Mantel wiederum produziert die Schale aus Calciumcarbonat. Im Inneren jeder Klappe befinden sich jeweils die beiden Ansatzpunkte des großen hinteren und des weniger ausgeprägten vorderen Adduktormuskels. Mit Hilfe dieser beiden Muskeln kann sich die Muschel vollständig verschließen.

Schrifttum

Hinterer und vorderer Retraktormuskel sind ebenfalls in der Schale verankert und kontrollieren die Bewegungen des Fußes. Der Fuß dient der Fortbewegung einerseits und sezerniert andererseits den Byssus, ein Bündel robuster Fäden eines bräunlichen Proteins, mit denen sich die Muschel an einem Substrat anzuheften vermag (GOSSLING, 2003a).

2.1.4 Ernährungsweise

Miesmuscheln ernähren sich von Schwebstoffen und Plankton (STORCH und WELSCH, 2004).

Die Ein- und Ausströmöffnung (Siphons oder Atemöffnung sowie Kloake) werden durch den teilweise verwachsenen Mantel gebildet (STORCH und WELSCH, 2004). Wie die meisten Bivalvier nehmen sie ihre Nahrung über die Kiemen auf, die aufgrund ihrer Doppelrolle - als Organ des Gasaustauschs und der Ernährung - sehr stark entwickelt sind. Man bezeichnet diese Art der Nahrungsgewinnung als Filtration. Zilien der Kiemen und inneren Mantelfläche erzeugen einen zum Mund gerichteten Wasserstrom. Zusätzlich produziert das Kiemenepithel Schleim, in dem die von den Kiemen heraus gefilterten Nahrungspartikel eingebettet werden (BENINGER et al., 1997). Den Verdauungsapparat bilden der aus vier dreieckigen Lappen zusammengesetzte Mund, ein kurzer Ösophagus, Magen, Hepatopankreas und Darm. Über Anus und Ausströmöffnung werden Fäkalpellets aus der Muschel entfernt (GOSSLING, 2003 b).

Eine einzige Muschel kann an einem Tag bis zu 15 Liter Wasser filtrieren (BUSCHBAUM und NEHLS, 2003). Andere Autoren sprechen sogar von einer Filtrationsleistung von 20 Litern pro Tag und Muschel, womit die gesamte Muschelpopulation rein rechnerisch in der Lage wäre, das gesamte Wattenmeer innerhalb von 10 Tagen vollständig zu filtrieren (GUBERNATOR, 2007). Die tatsächliche Filtrationsrate hängt dabei unter anderem von der Größe des Individuums und von der Teilchenkonzentration des Wassers (keine Teilchen, keine Filtration) ab (GOSSLING, 2003 b). Abbildung 1 veranschaulicht das Filtrationsleistungsvermögen. Dazu wurde Wasser des Juister Hafens in zwei Gläser abgefüllt, und nur einem Miesmuscheln zugegeben (rechtes Glas). Nach einer Stunde war das Wasser durch die Filtrieraktivität der Muscheln im Vergleich zum unbehandelten Wasser (links) deutlich klarer.



Abbildung 1: Filtrationsleistungsvermögen von Miesmuscheln (ALDEBARAN, 1997)

2.1.5 Herzkreislaufsystem und Immunabwehr

Muscheln besitzen ein offenes Kreislaufsystem, was bedeutet, dass die Körperflüssigkeit der Muschel, die so genannte Hämolymphe, nicht über Gefäße verteilt wird, sondern über Sinus (Mz.) das Muschelgewebe trinkt (GOSSLING, 2003 e).

Die aus vielen langen Fäden geformten Kiemen befinden sich beiderseits des Körpers in der Mantelhöhle (STORCH und WELSCH, 2004). Die Hämolymphe wird über die Kiemen mit Sauerstoff versehen, mittels des offenen Herzens über die Muschel verteilt, in der Niere gereinigt und wieder den Kiemen zugeführt.

Die Hämolymphe enthält Hämozyten. Diese Zellen sind zuständig für die zelluläre Abwehr der Muschel. Sie umfassen zwei Zellarten, die Granulozyten und die Agranulozyten, wobei erstere die Mehrheit bilden. Hämozyten sind in der Lage fremde Zellen, wie zum Beispiel Bakterien, zu erkennen und mit Phagozytose oder Einkapselung der Eindringlinge zu reagieren (GOSSLING, 2003 e). Aufgrund diverser Enzyme haben Hämozyten aber auch eine zytotoxische Wirkung. Der flüssige Anteil der Hämolymphe, das Hämoserum, repräsentiert über Lektine, wasserlösliche Enzyme und antimikrobielle Peptide die humorale Immunabwehr (CANESI et al., 2002).

Theoretisch könnte jede Bakterienspezies von Muscheln aufgenommen und im Gewebe angereichert werden. Tatsächlich sind es aber insbesondere *Vibrio* spp., die einer spezifischen Bakterienabwehr widerstehen, in Muschelgewebe und Hämolymphe verbleiben und sich damit Reinigungsprozessen entziehen (CROCI et al., 2002; HARRIS-YOUNG et al., 1995; PRIEUR et al., 1990). CANESI et al.(2005) fanden heraus, dass dieses Phänomen im unterschiedlichen Vermögen der verschiedenen Bakterienspezies, in die Signalkaskade des muscheleigenen Abwehrsystems einzugreifen, begründet liegt.

Ähnlich dem Immunsystem der Säugetiere ist aber auch das der Bivalvier durch Umweltfaktoren beeinflussbar. Man weiß heute beispielsweise um den Effekt von Wassertemperatur oder Kupfer auf das Abwehrvermögen von Muscheln. So liegt das Phagocytosemaximum der Muscheln bei circa 15°C (PARRY und PIPE, 2004).

2.1.6 Fortpflanzung und Entwicklung

Miesmuscheln sind getrennt geschlechtlich. Mit einem Alter von 12 Monaten erlangen sie die Fortpflanzungsfähigkeit (GUBERNATOR, 2007). Der Genitaltrakt dieser Tiere ist recht einfach aufgebaut. Die paarig angeordneten Gonaden bestehen aus aufgezweigten Tubuli, aus deren Epithel sich die Gameten abschnüren. Über einen kurzen Ei- bzw. Samenleiter werden Geschlechtszellen in die Mantelhöhle geleitet und über die Ausströmöffnung in das umgebende Wasser entlassen (GOSSLING, 2003 c). Je nach Ernährungszustand produziert ein weibliches Individuum 5-12 Millionen Eier (GUBERNATOR, 2007).

Die Befruchtung findet außerhalb der Muscheln statt (GOSSLING, 2003 c).

Aus dem befruchteten, ca. 68 µm großen Ei entwickelt sich innerhalb weniger Stunden ein dank Zilien schwimmfähiger Zellklumpen (Trochophore). Nach ca. 24 Stunden beginnt eine Schalendrüse die erste Larvenschale abzusondern. Aus der Trochophore entsteht somit die D-förmige, 120-250 µm große, schwimmende Veliger-Larve, die bereits zur Aufnahme kleinster Nahrungspartikel fähig ist. Seinen Namen erhielt dieses Stadium vom sogenannten

Schrifttum

Velum, einem zilien-umsäumten Gewebelappen, der sowohl der Fortbewegung als auch der Nahrungsaufnahme dient (BAYNE, 1976).

Das Veliger-Stadium wird durch ein schnelles Wachstum und die Ausbildung der zweiten Larvenschale gekennzeichnet. Während der Metamorphose bilden sich ein pigmentiertes Auge sowie ein ausfahrbarer Fuß mit Zilien. Die Larve wird nun Pediveliger genannt und nimmt ca. 4 Wochen nach der Befruchtung eine Größe von 210-350 μm an. War die Larve während des Veliger-Stadiums positiv phototroph und druckempfindlich, ist sie als Pediveliger nun positiv geotroph und druckunempfindlich, was ihr hilft abzusinken. Jetzt kann sie sich kriechend fortbewegen, sezerniert Byssusfäden und heftet sich schließlich an Hartboden, Algen oder Muschelschalen an (LUTZ, 1985; GOSSLING, 2003 c).

Die Vermehrung der Miesmuschel ist stark temperaturabhängig. Mit Zunahme der Wassertemperatur im Frühjahr beginnt auch die Reproduktion. Im Wattenmeer wird im Mai ein Maximum erreicht, bis Oktober können aber noch 1-2 Laichereignisse eintreten. (GUBERNATOR, 2007; GOSSLING, 2003 c).

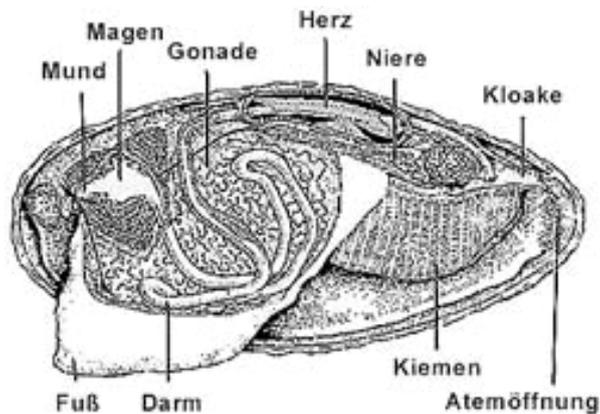


Abbildung 2: Aufbau einer Miesmuschel (TU-DARMSTADT, 2004)

2.2 Miesmuscheln als Lebensmittel

Fischereierzeugnisse gelten als wichtiger Bestandteil des modernen menschlichen Speiseplans. Muscheln beispielsweise sind weitgehend naturbelassen und weisen einen hohen gesundheitlichen Wert auf. Sie sind fettarm, aber reich an ungesättigten Omega-3-Fettsäuren, essentiellen Aminosäuren sowie Vitaminen und enthalten wertvolle Mineralien sowie Spurenelemente, darunter Jod und Selen (SCHUBRING und REHBEIN, 2007). Der hohe Nährwert spiegelt sich wider im pro-Kopf-Verbrauch an Fisch und Fischereierzeugnissen, der laut FISCHINFORMATIONSZENTRUM in Hamburg (2008) von 14,0 kg im Jahre 2002 auf 16,4 kg im Jahr 2007 gestiegen ist. Der Anteil an Krebs- und Weichtieren bewegte sich dabei zwischen 12 und 15%. Damit ist der Konsum von marinen Fischereierzeugnissen sogar höher als der von Rindfleisch, dessen pro-Kopf-Verbrauch laut BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ (BMELV, 2007) in den letzten Jahren bei 12,8 kg stagniert.

2.3 Miesmuschelerzeugung

2.3.1 Internationaler Miesmuschelmarkt

Während die Muschelproduzenten Spanien, Frankreich und Italien überwiegend den einheimischen Markt beliefern, werden die Miesmuscheln der Nordseeanrainer - mit Ausnahme von Dänemark - hauptsächlich im Frischversand abgesetzt. Die Erträge dänischer Wildmuschelfischer, die jährlich 150.000 Tonnen aus dem Limfjord und der Ostsee anlanden, werden überwiegend in Muschelkochereien verarbeitet. Die neuseeländische und chilenische Ware wird ebenfalls ausschließlich der Weiterverarbeitung zugeführt. Diese beiden Länder haben in den letzten Jahren große Bedeutung am internationalen Muschelmarkt erlangt (GUBERNATOR, 2007).

2.3.2 Miesmuschel-Aquakultur

Unter einer Aquakultur versteht man die kontrollierte Aufzucht von aquatischen, also im Wasser lebenden Organismen. Nach Angaben der FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) für das Jahr 2005 führte Spanien mit 158.059 Tonnen Muschellebendgewicht die Miesmuschelproduktion in Aquakultur weltweit an. Frankreich folgte mit 66.250 Tonnen. Die Niederlande produzieren 59.500 Tonnen. Es folgen Irland und Großbritannien. In Deutschland erntete man 9.470 Tonnen Lebendgewicht im Jahr 2005 (FAO, 2007).

2.3.3 Formen der Miesmuschelaquakultur

Bei der Erzeugung von Miesmuscheln unterscheidet man zwischen on-bottom und off-bottom Kultivation, also Haltung auf dem (Meeres-)Boden im Gegensatz zu bodenfernen Methoden. Für die bodenfernen Techniken spricht, dass die gesamte Wassertiefe besser genutzt werden kann und die Muscheln weniger anfällig für bodenbewohnende Fraßfeinde sind (GOSSLING, 2003 d). Andere Autoren teilen die Kultivationsformen auch in Hänge-, Pfahl- und Bodenkulturen ein (LUTZ, 1985).

2.3.3.1 Hängekulturen

Zu den Hängekulturen zählen die Floß- und die Langleinenkulturmethode. Erstere wird in den Rias der spanischen Atlantikküste seit Anfang des 20. Jahrhunderts angewendet. Ein Rahmen aus Eukalyptusholz, der eine Fläche von 100 - 500 m² umfasst, wird von vier bis sechs Schwimmern aus Stahl oder Fiberglas getragen und mit Seilen und schweren Ankern an Ort und Stelle gehalten. Von diesem Rahmen hängen 200-700 Seile von je 9 m Länge, an denen die Muscheln haften (GOSSLING, 2003 d). Die Kultivierungsprozedur untergliedert sich in 5 Phasen: Saatmuschelgewinnung, Anheften der Saat an die Seile, Ausdünnen des Seilbesatzes, Wachstum und Ernte. Die Saatmuscheln (Schalenlänge von 6-8 mm) werden zu 70% von ihren natürlichen Ansiedlungen, d.h. exponierten felsigen Meeresufern, in der Zeit von November bis März gewonnen. Die restlichen 30% werden von Seilen, die von einem Floß ins Wasser hängen, während der Monate März und April geerntet. Saatmuscheln werden dann per Hand oder maschinell in einem wasserlöslichen Netz, das sich nach wenigen Tagen aufgelöst hat, um die Seile gewickelt. Haben die Muscheln ein bestimmtes Gewicht erreicht, so

Schrifttum

werden sie von den Seilen abgesammelt und auf neue zusätzliche Seile verteilt (GOSSLING, 2003 d; KORRINGA, 1976). Dieses Verfahren der Ausdünnung verhindert einerseits ein Abfallen von Muschelklumpen und verbessert andererseits die Bedingungen für das Grössenwachstum. Marktreife können die Muscheln mit einer Größe 8-9 cm in 13 bis 16 Monaten erreichen (GOSSLING, 2003 d). Vorteile dieser Kulturmethode sind der geringe Raubfraß, Verfügbarkeit planktonischer Nahrung auf allen Wasserebenen und eine minimale Verschlickung (AYPA, 1990).

Die Langleinenkulturmethode wird in Gebieten eingesetzt, die unzureichend gegen Wellentätigkeit geschützt sind. Dabei verwendet man eine lange Leine, die durch einige kleine Schwimmer nahe der Wasseroberfläche gehalten wird und an beiden Enden fest im Boden verankert ist. Auf diesem Seil wird die Muschelsaat, wie oben beschrieben, angebracht. Eine solche Konstruktion ist damit recht flexibel (AYPA, 1990). Das Verfahren wird beispielsweise in Irland, Großbritannien und Neuseeland eingesetzt (GOSSLING, 2003 d).

2.3.3.2 Pfahlkulturmethode

In Frankreich verwendet man die so genannte „Bouchot“- bzw. Pfahlkulturmethode. Als Pfähle dienen 4-6 m hohe, dicke Eichenäste oder -stämme, die in Reihen mit einem Abstand von 0,7 m in den weichen, schlammigen Untergrund der intertidalen Zone gerammt werden.

Die Muschelsaat wird über Kokosfaserseile, die horizontal zwischen küstenfernen Pfählen gespannt sind und an denen sich die Muschellarven anheften können, rekrutiert. Nach ein paar Monaten werden die Saatmuscheln von den Seilen entfernt und in Maschenschläuche verbracht, die dann zum Wachsen spiralig um die küstennahen Pfähle gewunden und zur Sicherung angenagelt werden (AYPA, 1990; GOSSLING, 2003 d).

2.3.3.3 Bodenkulturen

In den Niederlanden und Deutschland wird die Bodenkulturmethode zur Miesmuschelproduktion bevorzugt. Wie der Name schon besagt, werden Miesmuscheln hier direkt auf dem Untergrund aufgezogen. Bei dieser Art der Kultivierung benötigt man einen festen Boden mit adäquatem Tidefluss, um Schlammablagerungen zu vermeiden, Exkremete zu entfernen und die Tiere ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Die Produktion der Saatmuscheln wird komplett der Natur überlassen (AYPA, 1990). Saatmuscheln sind also Wildmuscheln, die sich nach dem sogenannten Brutfall auf Naturbänken niederlassen. Demnach handelt es sich bei dieser Art der Muschelkultivierung um eine Kombination aus Wildmuschelfischerei und extensiver Kultivierung. In Deutschland werden die Naturbänke der Besatzmuscheln (Saatmuscheln) mit dem Schiff angefahren. Auf jeder Schiffsseite werden 2 Muschelfanggeschirre, die Dredgen, zu Wasser gelassen. Diese Netze werden für 5-10 Minuten über den Grund gezogen und dann wieder an Bord gehievt. Es lassen sich bis zu 500 kg Besatzmuscheln pro Netz ernten, wobei maximal 60% der Muscheln erfasst werden. Die verbleibenden Muscheln bilden das Reservoir für einen erneuten Brutfall. Zur Aussaat der Besatzmuscheln auf die Kulturbänke wird der Laderaum des Kutters geflutet und die Muscheln über Öffnungen im Rumpf auf den Boden entlassen, um sich dort anzuheften. Pro Hektar Kulturfläche werden so 100 Tonnen Saatmuscheln ausgebracht. Diese Menge berücksichtigt gleichermaßen den Fraß durch Eiderenten sowie das Größenwachstum der Muscheln. Nach ein bis zwei Jahren können

Schrifttum

die ersten Konsummuscheln (>5 cm) abgefischt werden (GUBERNATOR, 2007). Natürliche Umstände bedingen die Qualität und Quantität der Nahrung im Wasser, welche über die Kulturflächen geschwemmt wird.

Einen Vorteil dieser Methode bildet der geringe finanzielle Aufwand. Nachteilig wirken sich die Verschlammung, ein geringes Wachstum und relativ geringe Erträge pro Quadratmeter aus (AYPA, 1990). Da in den letzten Jahren die natürliche Ansiedlung neuer Miesmuscheln bedingt durch Fraßräuber (Seesterne, Strandkrabben, Garnelen), Konkurrenten (pazifische Auster) und Klimawandel immer stärker abnimmt, wird in Deutschland die Anwendung von Langleinen zur Gewinnung von Saatmuscheln erprobt. Erste Ergebnisse sind vielversprechend (WALTER und DE LEEUW, 2007).

Heute wird nahezu die gesamte niedersächsische Ernte an Miesmuscheln aus Bodenkulturen zur Muschelauktion in Yerseke in den Niederlanden gebracht. Lediglich Muscheln mit geringem Fleischgehalt, die sich am Markt nicht als Frischware absetzen lassen, werden durch Muschelkochereien in Schleswig-Holstein oder den Niederlanden weiterverarbeitet (GUBERNATOR, 2007).

2.3.4 Rechtliche Bestimmungen

Rechtlich sind folgende Bestimmungen für Muscheln als Lebensmittel von Bedeutung

Europa:

- Richtlinie 2006/113/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 über die Qualitätsanforderungen an Muschelgewässern (ANONYM, 2006)
- Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (ANONYM, 2004 a)
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ANONYM, 2004 b)
- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene vom 29. April 2004 (ANONYM, 2004 c)
- Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (ANONYM, 2005 a)

Bundesrepublik Deutschland:

- Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007 (ANONYM, 2007 b)
- Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung und der Einhaltung von Hygienevorschriften und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis (AVV LmH) vom 12. September 2007 (ANONYM, 2007 c)

Schrifttum

Schleswig Holstein:

- Fisch- und Muschelgewässerverordnung (FMGVO) vom 4. Juli 1997 (ANONYM, 1997 a)

Niedersachsen:

- Fisch- und Muschelgewässerverordnung (FMGVO) vom 15. Mai 2007 (ANONYM, 2007 a)

Mecklenburg-Vorpommern:

- Muschelgewässerverordnung (MuGVO) vom 23. Oktober 1997 (ANONYM, 1997 b)

2.3.4.1 Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer

In der Richtlinie 2006/113/EG des europäischen Parlaments und des Rates finden sich die Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer auf europäischer Ebene aufgeführt.

In Deutschland sind die Anforderungen an die Muschelgewässerqualität jeweils in den Landesverordnungen von Niedersachsen, Schleswig-Holstein und Mecklenburg-Vorpommern als muschelproduzierende Länder geregelt. Mit diesen föderalen Verordnungen ist die europäische Richtlinie zur Qualität von Muschelgewässern weitestgehend umgesetzt. Am Beispiel der niedersächsischen Verordnung über die Qualitätsanforderungen an Fischgewässer und Muschelgewässer (FMGVO) vom 15.5.2007 sollen die rechtlichen Bestimmungen exemplarisch verdeutlicht werden:

Nach §2 der niedersächsischen FMGVO definieren sich Muschelgewässer wie folgt: Gewässer, die Muscheln (Bivalvia) und Schnecken (Gastropoda) Lebens- und Wachstumsmöglichkeiten bieten.

In der Anlage 4 der niedersächsischen FMGVO sind die einzelnen zu überprüfenden Parameter zur Feststellung der Muschelwassergüte aufgeführt. Danach müssen der Sauerstoffgehalt (mindestens 80% vom Sättigungsgehalt) und der Salzgehalt (12-38 ‰) monatlich überprüft werden. Einer vierteljährlichen Kontrolle unterliegen der pH-Wert (7-9), die Temperatur (die Temperatur infolge Wassereinleitung darf maximal 2 K von der umgebenden Temperatur abweichen), die Wasserfarbe (infolge einer Einleitung darf die Wasserfarbe nicht mehr als 10 mg Pt/l abweichen), Schwebstoffe (infolge einer Einleitung max. 30% mehr als in unberührtem Wasser) sowie Kohlenwasserstoffe aus Erdöl (dürfen keinen sichtbaren Film verursachen und keine schädlichen Auswirkungen auf Schalentiere zeigen).

Vierteljährlich muss der Gehalt an Fäkalkoliformen pro 100 ml Muschel ermittelt werden. Er darf maximal 300 KBE in Muschelfleisch und Muschelflüssigkeit betragen. Als Analyseverfahren ist die Verdünnungsmethode mit Fermentation in flüssigen Substraten in mindestens 3 Ansätzen vorgeschrieben. Bei positivem Ausfall müssen die Proben in ein Nachweismilieu überführt werden und der Gehalt an Fäkalkoliformen mittels Most-Probable-Number-Methode ermittelt werden. Eine Bebrütungstemperatur von $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ wird vorgegeben.

Halbjährlich ist die Überprüfung auf organohalogene Stoffe und Metalle (Silber, Arsen, Kadmium, Chrom, Kupfer, Quecksilber, Nickel, Blei, Zink) vorgeschrieben.

Schrifttum

Bei Verdacht ist der Geschmack der Schalentiere zu überprüfen. Dieser darf nicht von der Norm abweichen. Des Weiteren ist eine Untersuchung auf Saxitoxine ohne eingehendere Erläuterung vorgegeben (ANONYM, 2007 a).

§ 3 Absatz 3 Nr.1 der niedersächsischen FMGVO verbietet die Nutzung der Gewässer zur Zucht von Muscheln, falls die in Anlage 4 genannten Parameter durch die Benutzung überschritten werden.

§ 4 Absatz 2 FMGVO erlaubt eine Überschreitung der vorgegebenen Grenzwerte, sofern sie auf natürlicher Anreicherung beruht. Weiterhin gestattet Absatz 3 das Nichteinhalten bzw. das Nichtanstreben der Werte bei außergewöhnlichen meteorologischen oder besonderen geographischen Verhältnissen.

2.3.4.2 Hygienevorschriften vor der Muschelernte

Gemäß der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) definiert der Gesetzgeber Muscheln als Lamellibranchia, die ihre Nahrung über das Ausfiltern von Kleinstlebewesen aus dem Wasser beziehen.

Unter einem Erzeugungsgebiet versteht man laut Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) ein Meeres-, Mündungs- oder Lagunengebiet mit natürlichen Muschelbänken oder zur Muschelzucht verwendete Plätze, an denen Muscheln geerntet werden.

Ein Umsetzgebiet ist nach VO (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) definiert als ein durch feste Vorrichtungen abgegrenztes Meeres-, Mündungs- oder Lagunengebiet, das ausschließlich der natürlichen Reinigung lebender Muscheln dient.

Erzeugungsgebiete und Umsetzgebiete von Muscheln werden nach VO (EG) Nr. 854/2004 (ANONYM, 2004 a) abhängig vom Ausmaß der Verunreinigung mit Fäkalbakterien von den zuständigen Behörden in die Kategorien A, B und C eingeteilt.

Muscheln aus einem Erzeugungsgebiet der Klasse A können für den unmittelbaren Verzehr geerntet werden, wenn sie zusätzlich entsprechenden Hygienevorschriften der VO (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) hinsichtlich Frischemerkmalen und Grenzwerten für marine Biotoxine genügen.

In einem Erzeugungsgebiet der Klasse B dürfen in 100 g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit maximal 4600 *E. coli* per 5-tube-3-dilution-MPN-Test nachweisbar sein. Bevor sie zum menschlichen Verzehr gelangen, müssen Muscheln dieses Gebietes entweder umgesetzt oder in einem Reinigungszentrum aufbereitet werden, bis sie den Anforderungen der Kategorie A entsprechen.

Ein Reinigungszentrum definiert sich laut VO über das Vorhandensein von Becken, die mit natürlich sauberem oder gereinigtem Meerwasser gespeist werden, sodass in ihnen gehaltene lebende Muscheln Mikroorganismen ausscheiden können, um Verzehrseignung zu erlangen.

Die zuständige Behörde kann ein Erntegebiet in Kategorie C einstufen. Aus solch einem Gebiet dürfen Muscheln zwar geerntet werden, dürfen jedoch erst nach einer längeren Umsetzzeit, in der sie die Anforderungen der Kategorie A erreichen müssen, in Verkehr gebracht werden. In einem Gebiet der Kategorie C dürfen in den Muscheln über das oben genannte MPN-Verfahren maximal 46000 *E.coli* / 100g Muschelfleisch- und Schalenflüssig-

Schrifttum

keit nachweisbar sein.

Umgesetzten Muscheln müssen optimale Bedingungen geboten werden. Die Dauer des Verbleibs im Umsetzgebiet ist temperaturabhängig und beträgt mindestens zwei Monate. Je nach Einzelfall kann die Behörde auch eine geringere Verweildauer gestatten.

Erfolgt bei Muscheln aus Gebieten der Kategorie B oder C keine Umsetzung oder Reinigung, so gestattet die Verordnung eine Weiterverarbeitung, sofern geeignete Maßnahmen zur Beseitigung pathogener Keime erfolgen. Als angemessene Verfahren gelten die Sterilisation in hermetisch geschlossenen Behältnissen oder andere Erhitzungsprozesse (mit und ohne Druck), bei denen eine Kerntemperatur von mindestens 90°C erreicht wird.

Die VO (EG) Nr. 854/2004 (ANONYM, 2004 a) schreibt weiterhin ein regelmäßiges Monitoring der als Umsetz- und Erzeugungsgebiete eingestuften Areale vor. So sind diese Gebiete daraufhin zu prüfen, ob keine rechtswidrigen Praktiken in Bezug auf Ursprung, Herkunft und Bestimmung der lebenden Muscheln geschehen. Des Weiteren ist eine Untersuchung der lebenden Muscheln auf ihre einwandfreie Beschaffenheit hinsichtlich des mikrobiellen Status gemäß der Einstufung des Gebietes vorgeschrieben. Außerdem verlangt die Verordnung die regelmäßige Prüfung auf marine Biotoxine, toxinbildendes Plankton und chemische Schadstoffe. Die zugehörigen Stichprobenpläne müssen repräsentative Analyseergebnisse gewährleisten.

Während der zulässigen Erntezeit müssen die Muscheln mindestens einmal pro Woche auf marine Biotoxine untersucht werden.

Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) versteht unter marinen Biotoxinen giftige Stoffe, die von Muscheln gespeichert werden. Dazu zählen PSP (Paralytic Shellfish Poison), ASP (Amnesic Shellfish Poison), Okadegasäure, Dinophysistoxine, Pectenotoxine, Yessotoxine und Azaspiracide.

Ergibt das Monitoring der Muschelgewässer eine Überschreitung der Grenzwerte oder ein anderweitiges Risiko für die menschliche Gesundheit, so verlangt die Verordnung von den Behörden eine Schließung des entsprechenden Erzeugungsgebiets mit dem Verbot, dort lebende Muscheln zu ernten. Eine Umstufung in eine B/C Kategorie ist ebenfalls statthaft, sofern die oben genannten Voraussetzungen gegeben sind, und keine anderweitige Gefährdung der menschlichen Gesundheit zu befürchten ist.

Wenn die hygienischen Verhältnisse wieder den EU-rechtlichen Vorschriften entsprechen, so darf das betroffene Erzeugungsgebiet zur Ernte freigegeben werden. Falls Toxine der Grund der Schließung waren, müssen die Ergebnisse zweier aufeinander folgender Probennahmen mit einem Mindestabstand von 48 Stunden unterhalb der gesetzlichen Grenzwerte liegen, bevor das Gebiet wieder genutzt werden darf.

Zusätzlich zum Monitoring der Erzeugungs- und Umsetzgebiete schreibt die Verordnung die Überprüfung von Enderzeugniskriterien auf allen Erzeugungsstufen der Muscheln mittels Laboruntersuchungen vor.

2.3.4.3 Hygienevorschriften nach der Ernte

Was die Hygienevorschriften nach der Ernte betrifft, so unterscheidet man zwischen Prozesshygienekriterien und Lebensmittelsicherheitskriterien. Diese Kriterien sind in VO (EG) Nr. 2073/2005 (ANONYM, 2005 a) definiert. Nach dieser Norm charakterisieren Prozesshygienekriterien die akzeptable Funktionsweise eines Herstellungsprozesses. Bei Nichterfüllung sind Korrekturmaßnahmen seitens des Herstellers vorzunehmen. Lebensmittelsicherheitskriterien dagegen legen die Akzeptabilität eines Lebensmittels auf Handelsebene fest und beziehen sich auf pathogene Mikroorganismen bzw. deren Toxine.

Die VO (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) enthält weitere Prozesshygienekriterien. Gemäß den Hygienevorschriften für lebende Muscheln in dieser Verordnung müssen lebende Muscheln Merkmale des Frischezustandes und der Lebensfähigkeit aufweisen. Diese Kriterien beinhalten im Besonderen eine schmutzfreie Schale, positive Klopffreaktion und eine normale Menge an Schalenflüssigkeit.

Ebenfalls müssen Grenzwerte bezüglich mariner Biotoxine eingehalten werden. In Abschnitt VII, Kapitel V der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (ANONYM, 2004 b) wird pro Kilogramm maximal 800 µg Lähmungen hervorrufender Algtoxine (PSP- Paralytic Shellfish Poison), 20 mg Amnesie auslösende Domoinsäuren (ASP-Amnesic Shellfish Poison), 160 µg gesamt an Okadasäure, Dinophysistoxine und Pectenotoxine, 1 mg Yessotoxine und 160 µg Azaspiraciden gestattet.

Mikrobiologische Prozesshygienekriterien für Weichtiere sind in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (ANONYM, 2005 a) zu finden. So dürfen bei Erzeugnissen aus geschälten Krebs- und Weichtieren am Ende des Herstellungsprozesses maximal 2 von 5 Proben eine Keimzahl von 10 KbE/g *E.coli* aufweisen. An koagulase-positiven Staphylokokken sind maximal 2 von 5 Proben mit einer Keimzahl zwischen 10 und 100 KbE/g zugelassen.

Auch Lebensmittelsicherheitskriterien für Weichtiere sind in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 (ANONYM, 2005 a) angegeben. Für Krebs- und Weichtiere schreibt sie bezüglich Salmonellen vor: Von 5 Proben gekochter Krebs- und Weichtiere sowie lebender Muscheln darf keine Probe Salmonellen in 25 g enthalten. Des Weiteren dürfen bei einer Probe nicht mehr als 230 MPN/100 g an *E. coli* nachzuweisen sein.

Spezielle Anforderungen an die Abgabe von Muscheln gibt die Verordnung zur Durchführung der Verordnung des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerecht vom 8. August 2007 (ANONYM, 2007 b) vor. Demnach dürfen Muscheln keinen erheblichen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden und müssen so aufbewahrt werden, dass ihre Lebensfähigkeit erhalten bleibt. Der Transport und die Abgabe von lebenden Muscheln dürfen ausschließlich in ausreichend festen, verschlossenen Verpackungen erfolgen, die vor einer negativen Beeinflussung Schutz bieten.

Konkrete Anweisungen über die Durchführung der amtlichen Überwachung zur Einhaltung der Hygienevorschriften sind in der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift AVV LmH (ANONYM, 2007 c) verankert.

2.3.4.4 Kritik an den Hygienevorschriften

Bezüglich der Vermeidung einer *V. parahaemolyticus*-Belastung von Muscheln bieten die derzeitigen mikrobiologischen Überwachungsvorschriften bei der Ernte von Muscheln keinen nennenswerten Schutz. Gegenwärtig werden Fäkalkoliforme als Indikatoren für die fäkale Kontamination von Muscheln herangezogen, um z.B. Reinigungszeiten der Tiere festlegen zu können. Im Hinblick auf das Vorkommen von *V. parahaemolyticus* haben HACKNEY et al. (1980) und andere Autoren eine Korrelation mit koliformen Keimen oder anderen Indikatororganismen jedoch verneint (HACKNEY et al., 1980; MARTINEZ-MANZARES et al., 1992; OLIVER und KAPER, 2001). Auch zeigen die gebräuchlichen Reinigungsprozeduren mehreren Berichten zufolge keinen signifikanten Reduktionseffekt auf *Vibrio* spp. in natürlich infizierten Austern oder Venusmuscheln (EYLES und DAVEY, 1984; GREENBERG und DUBOIS, 1981; OLIVER und KAPER, 2001). In sich reinigenden Schalentieren, sowie in Wasser aus Becken und Rohrleitungssystemen können sich diese Mikroorganismen sogar vermehren (EYLES und DAVEY, 1984; GREENBERG und DUBOISE, 1981).

2.4 Vibrionen

2.4.1 Historischer Abriss

Der Name *Vibrio* leitet sich vom lateinischen "vibrare" ab und bedeutet "vibrieren" (DUDEN, 2003).

Die bedeutende Rolle der Vibrionen im Seuchengeschehen ist schon lange bekannt. In einer Zeit, in der die Theorie von Mikroorganismen als Ursache für Krankheiten aufkam, wurde *Vibrio cholerae*, der Verursacher der Cholera, 1854 von dem italienischen Medizinstudenten Pacini zum ersten Mal als gekrümmtes, kommaförmiges sowie hoch bewegliches Bakterium beschrieben (SCHÜTTE, 2007; THOMPSON und SWINGS, 2006). 30 Jahre später konnte dann Robert Koch diesen Keim anzüchten und unter der Bezeichnung *Vibrio comma* noch detailliertere Informationen bereitstellen (THOMPSON und SWINGS, 2006).

V. parahaemolyticus dagegen wurde erst in der Mitte des 20. Jahrhunderts als Ursache für lebensmittelbedingte Gastroenteritiden entdeckt. Der japanische Mediziner Fujino aus Osaka beschrieb diese Spezies 1951 als Erster. Zusammen mit seinen Mitarbeitern isolierte er dieses Bakterium nach einem großen Ausbruch einer Lebensmittelinfektion mit insgesamt 272 betroffenen Patienten, von denen 20 starben. Allen Krankengeschichten vorausgegangen war der Verzehr von Shirasu, einem halbtrockenen Fischprodukt (FUJINO et al., 1953). In den USA ist dieses Bakterium fast 2 Jahrzehnte später von BAROSS und LISTON (1968) in den Küstengewässern des Puget Sound des Nordwestlichen Pazifiks nachgewiesen worden.

Bis heute zählen *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* sowie *Vibrio vulnificus* zu den bedeutendsten humanpathogenen Vertretern des Genus *Vibrio* (BAUMGART, 2007).

2.4.2 Taxonomie

Bakterien gruppiert man in das Organismenreich der Monera ein (ROLLE und MAYR, 2002). Vibrionen zählen zum Stamm (Phylum) der Proteobacteria und dabei zur Klasse der Gammaproteobacteria. Sie sind der Ordnung Vibrionales zugehörig und darin zu der Familie Vibrionaceae, der einzigen dieser Ordnung (RAWLINGS et al., 2007; THOMPSON und SWINGS, 2006). Die Art (Spezies) *V. parahaemolyticus* ist der Gattung (Genus) *Vibrio* zugeordnet (RAWLINGS, 2007).

Nach Bergey's Manual umfasst die Familie der Vibrionaceae die Genera *Vibrio*, *Allomonas*, *Catenococcus*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Listonella*, *Photobacterium* und *Salinivibrio* (THOMPSON und SWINGS, 2006), während andere Autoren lediglich *Aeromonas*, *Plesiomonas* und *Photobacterium* zu dieser Familie zählen (ATLAS, 1997). *Campylobacter* gehörte ebenfalls dieser Familie an, wurde aber aufgrund seiner Mikroaerophilie schon vor einiger Zeit taxonomisch abgetrennt. Neueren Erkenntnissen folgend wird vorgeschlagen, *Vibrio* als einziges Genus dieser Familie zu klassifizieren (ROLLE und MAYR, 2002; THOMPSON et al., 2005 a). Über die Anzahl der Spezies des Genus *Vibrio* existieren verschiedene Angaben. Heute sind in Bergey's Manual 65 Arten aufgelistet (THOMPSON und SWINGS, 2006). 12 von ihnen gelten als für den Menschen pathogen. Dazu gehören *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* und *V. carchariae* (= *V. harveyi*) (BAUMGART, 2007; MC LAUGHLIN, 1995).

2.4.3 Morphologie und allgemeine Eigenschaften

Vibrio spp. sind gramnegative Stäbchen von gerader, gebogener oder auch kokkoider Form. In der Regel sind sie zwischen 1,4 bis 2,6 µm lang und zwischen 0,5 und 0,8 µm breit. Sie tragen polare Geißeln und sind deshalb beweglich. So bewegt sich beispielsweise *V. alginolyticus* mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 116 µm/s fort, kann aber bis zu 147 µm/s erreichen. Zur Sporenbildung ist dieses Bakteriengenus nicht in der Lage (BAUMGART, 2007; MAGARIYAMA et al., 1995). Aufgrund ihrer Halophilie benötigen *Vibrio* spp. bis auf *V. cholerae* und *V. mimicus* höhere Salzgehalte zum Wachstum. Die meisten Spezies produzieren Katalase und bis auf *V. metschnikovii* auch Oxidase. Außer *V. furnissii* fermentieren sie Glucose ohne Gasbildung (BAUMGART, 2007; MC LAUGHLIN, 1995).

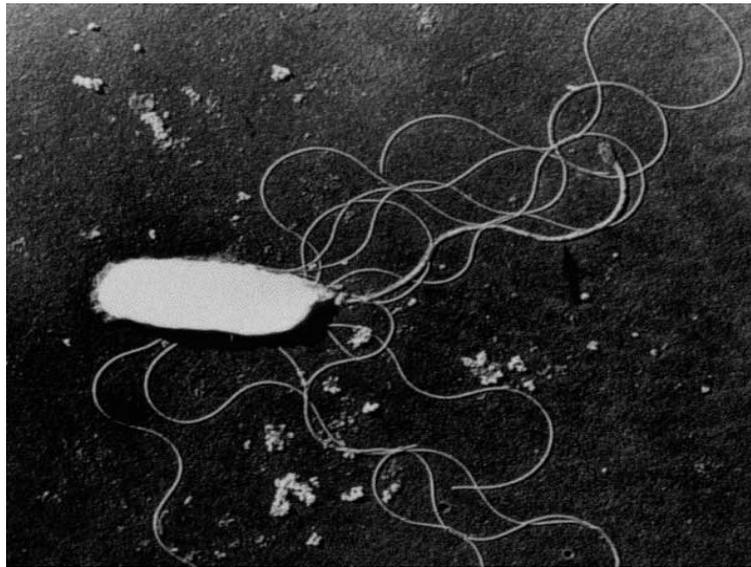


Abbildung 3: *V. parahaemolyticus*:
Elektronenmikroskopische Aufnahme (verkleinertes Bild)
(MAKINO et al., 2003)

2.5 *Vibrio parahaemolyticus*

2.5.1 Synonyme Bezeichnungen

In der (älteren) Literatur ist *Vibrio (V.) parahaemolyticus* auch unter einigen anderen Namen zu finden. So kennt man diese Spezies auch unter den Bezeichnungen *Benecka parahaemolytica*, *Oceanomonas parahaemolytica* und auch *Pasteurella parahaemolytica* (NCBI, 2007).

2.5.2 Nachweis von *V. parahaemolyticus*

2.5.2.1 Allgemeine kulturelle Eigenschaften

Die optimale Wachstumstemperatur von *V. parahaemolyticus* liegt bei 37°C. Temperaturen von mindestens 10°C und höchstens 43°C gelten dabei als äußerste Grenzen. Dieser Keim bevorzugt eine aerobe Atmosphäre, akzeptiert aber auch eine anaerobe Umgebung. Ein pH-Wert im alkalischen Bereich zwischen 7,5 und 8,5 ist für die Vermehrung ideal. Es wird aber auch ein saures Milieu bis zu einem pH-Wert von 4,5 toleriert. Auf der basischen Seite ist jenseits eines pH-Wertes von 10 kein Wachstum mehr zu beobachten. Bezüglich des frei verfügbaren Wassers wird ein a_w -Wert von 0,981 bevorzugt, aber auch bei einem a_w -Wert zwischen 0,940 und 0,994 ist eine Vermehrung noch möglich (BAUMGART, 2007). Als halophiles Bakterium bevorzugt der Keim einen Salzgehalt von 3- 6% NaCl, wobei ein minimaler Salzanteil von 0,5% zwingend notwendig ist. In Ausnahmefällen werden auch 10-12% NaCl toleriert (KAYSNER und DE PAOLA, 2004; OLIVER und KAPER, 2001; BAUMGART, 2007). Zur Fortbewegung verfügt *V. parahaemolyticus* über eine ummantelte polare Geißel. Angezüchtet auf festen Medien neigt *V. parahaemolyticus* zur zusätzlichen Ausbil-

dung von bis zu 100 peritrich angeordneten (=lateralen), nicht ummantelten Geißeln. Damit wird dem Bakterium die Fortbewegung über Oberflächen und in einer viskosen Umgebung ermöglicht. Der Keim ist also in der Lage zu schwärmen (MC CARTER, 2006).

2.5.2.2 Kulturelle Methoden zum Nachweis von *V. parahaemolyticus*

Das einzige international genormte qualitative Nachweisverfahren für *Vibrio (V.) parahaemolyticus* stellte die ISO-Methode 8914 von 1990 dar, welche als überarbeitungsbedürftig galt. Daneben veröffentlichten die FDA (KAYSNER und DE PAOLA, 2004) und das NORDIC COMMITTEE OF FOOD ANALYSIS (1997) Standardarbeitsanweisungen. Unter der Bezeichnung ISO TS 21872-1:2007 hat die INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDIZATION seit dem Jahr 2007 nun eine leicht modifizierte Version der ISO 8914 zum qualitativen Nachweis von *V. parahaemolyticus* herausgegeben (ISO, 2007).

2.5.2.2.1 Qualitativer Nachweis

Die konventionellen kulturellen Methoden zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* umfassen in der Regel eine selektive, teilweise auch zweistufige Voranreicherung, gefolgt von Ausstreichen auf selektiven Festnährmedien und einer anschließenden morphologischen und biochemischen Charakterisierung. Bis auf wenige Ausnahmen werden die Nährmedien und Bouillons bei 37°C für 18 bis 24 Stunden bebrütet. Im Falle zweier Voranreicherungen wird die erste in der Regel zwischen 6 bis 8 Stunden inkubiert (ISO-Methode 8914, 1990; NKML, 1997; KAYSNER und DE PAOLA, 2004; BAUMGART, 2007).

Überwiegend sind *Vibrio* spp. - unabhängig davon ob es sich um klinisches oder Umwelt-Probenmaterial handelt - recht einfach zu isolieren, wenn das Salzbedürfnis dieses Genus dabei berücksichtigt wird (ALSINA und BLANCH, 1994; GOMEZ-GIL et al., 2004). Ein Salzgehalt, der den Ansprüchen der meisten *Vibrio* spp. gerecht wird, liegt bei 2 bis 2,5% NaCl (DONOVAN und VAN NETTEN, 1995). Gehalte von 3% NaCl und mehr zur speziellen Selektion auf besonders halophile Spezies dieses Genus sind gleichfalls üblich. *Vibrio* spp. sind auch vielfach in der Lage, in alkalischem Milieu bei einem pH-Wert von 8,0 und mehr zu wachsen, weshalb der pH-Wert vieler Selektivmedien für *Vibrio* spp. im alkalischen Bereich liegt. Andererseits ist der Nutzen eines hohen pH-Wertes zur Selektion jedoch auch angezweifelt worden (GILMOUR et al., 1976). Selektierend für *Vibrio* spp. wirkt auch die Zugabe anderer Substanzen zum Medium. Hierzu zählen unter anderem Gallesalze, Teepol, Tellurit sowie Polymyxin B und E (PICHARDT, 1998; GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006). Eine Vielzahl an Kulturmedien zum Nachweis von *Vibrio* spp. sind bis heute entwickelt worden. Im Folgenden sollen einige davon exemplarisch vorgestellt werden.

Anreicherungsmedien zum Nachweis von *V. parahaemolyticus*

- Alkalisches Peptonwasser (APW)

Schon seit 1887 wird alkalisches Peptonwasser zum Nachweis von *Vibrio* spp. verwendet (DONOVAN und VAN NETTEN, 1995). Auch heute noch stellt es das am häufigsten eingesetzte Anreicherungsmedium beim Nachweis von *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* dar und wird auch von der FDA empfohlen (FARMER et al., 2003; KAYSNER und DE PAOLA, 2004; OLIVER, 2003). APW weist einen hohen pH-Wert von fast 9 auf und besitzt einen Gehalt von 1% - 2% NaCl. Die Peptonkonzentration liegt meist zwischen 1 und 2%, wobei letztere für marine Spezies als geeigneter gilt (CEFAS, 2006; GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; KAYSNER und DE PAOLA, 2004). Bei der Kombination dieses Mediums mit Thiosulfate-Citrate-Bilesalts-Sucrose (TCBS) - Agar stellten MIWA et al. (2003) ein Verdrängen von *V. parahaemolyticus* durch *V. alginolyticus* fest.

- Glukose-Salz-Teepol-Boullion (GSTB)

GSTB wurde für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* entwickelt (SAKAZAKI, 1965). Das enthaltene Teepol ist ein anionisches Detergenz aus Natrium- und Kaliumsalzen sowie Alkylsulfaten. Es stellt einen Ersatz für Gallosalze dar und verhindert das Wachstum der gram-positiven Begleitflora. Dieser Zusatz soll auch zur Entwicklung größerer Kolonien beitragen (JAMESON und EMBERLEY, 1958). Allerdings konnten bisher mit GSTB keine besseren Nachweisraten als mit APW erreicht werden. Das Anzüchten anderer pathogener *Vibrio* spp. gelingt mit diesem Medium schlechter (SPIRA, 1984).

- Salz-Teepol-Puffer (STB)

STB enthält 3% NaCl und 0,2% Teepol (siehe GSTB) und ist zusätzlich mit 1/15 M Phosphat gepuffert. Bei einem Vergleich dieser Rezeptur mit GSTB und Salz-Peptonwasser (SP) beobachteten CHUN et al. (1974) bessere Anreicherungsresultate von *V. parahaemolyticus* in STB. Nähere Informationen zum Wachstum weiterer pathogener *Vibrio* spp. und sonstiger mariner Spezies geben die Autoren nicht.

- Salz-Colistin-Boullion (SCB)

Von NAKANISHI und MURASE (1973) wurde die Salz-Colistin-Boullion entwickelt. Das enthaltene Antibiotikum Colistin entspricht dem Antibiotikum Polymyxin E. Es unterdrückt das Wachstum einiger gram-negativer Keime, wobei es in Struktur und Funktion deren äußeren und cytoplasmatischen Membran eingreift (DONOVAN und VAN NETTEN, 1995; HOLT und KRIEG, 1994). Nach den Erfahrungen der Entwickler zeigt es beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* bessere Resultate als GSTB oder Tryptic Soy Agar (TSA). Leider eignet es sich nicht zur Detektion anderer pathogener *Vibrio* spp. (SPIRA, 1984).

Schrifttum

- **Salz-Polymyxin-Bouillon (SPB)**

HARA-KUDO et al. (2001) beschrieben die Salz-Polymyxin-Bouillon. Zur Selektion enthält das Medium außer 2% Salz auch Polymyxin B (SIFIN, 2006), ein Antibiotikum, das in der gleichen Weise wirkt wie Polymyxin E (siehe SCB) und sich von diesem lediglich in einer Aminosäure unterscheidet (SOGAARD, 1982). Beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* in rohem Fisch oder aus Umweltproben soll dieses Selektivmedium zusammen mit SCB bessere Nachweisraten als GSTB und TSA erzielen (NAKANISHI und MURASE, 1973). Aussagen über das Wachstum anderer pathogener Vibrionen machten HARA-KUDO et al. (2001) jedoch nicht.

Feste Medien zum Nachweis von *Vibrio* spp.

- **Marine-Agar**

ZOBELL (1941) entwickelte einen nicht selektiven Agar und nannte ihn Marine-Agar E2216. Er stellt das am meisten angewendete unspezifische Festmedium zum Nachweis von Vibrionen aus der Umwelt dar. So wie fast alle Vibrionen auf diesem Nährboden wachsen, entwickeln sich darauf jedoch auch viele andere Umweltbakterien. Bis auf wenige Ausnahmen, die eine Woche benötigen, wachsen auf diesem Agar nach ca. 1 bis 2 Tagen bei 30°C kräftige, cremefarbene Kolonien. Die hohe Konzentration an Ionen in diesem Medium kann die Bakterien allerdings so verändern, dass entnommenes Koloniematerial für eine weitere Verarbeitung wie Reinigung, Identifikation oder Antibiotikatests nicht geeignet ist (CEFAS, 2006; GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006).

- **Trypton-Soja-Medium (TSA/TSB)**

Trypton-Soja-haltiges Medium gibt es als feste Variante (TSA) und als Bouillon (TSB). Mit einem Zusatz von 1,5 bis 2,5% NaCl eignet es sich gut für die Analyse der Kolonien mariner Bakterien im Anschluss an die Isolierung. Nach 24 stündiger Bebrütung zwischen 15 und 30°C erscheinen Vibrionenkolonien auf diesem Medium groß und cremig (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006).

- **Thiosulfate-Citrate-Bilesalts-Sucrose-Agar (TCBS)**

Zum Nachweis pathogener *Vibrio* spp. wie *V. cholerae*, *V. vulnificus* und *V. parahaemolyticus* sowohl aus klinischen, Umwelt- oder auch Lebensmittelproben etablierte sich der selektive TCBS-Agar (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; OLIVER, 2003). Er enthält Gallelsalze (engl. bilesalts) wie Ochsen-galle, Natriumcholat oder Taurocholat zur Unterdrückung der Vermehrung gram-positiver und einiger gram-negativer Bakterien (MONSUR, 1963). Auf diesem Agar wachsen die meisten *Vibrio* spp. zu großen, kräftigen Kolonien heran. Ist das Bakterium in der Lage, Saccharose (engl. Sucrose) zu verstoffwechseln, so bildet es gelbe Kolonien (z.B. *V. cholerae*, *V. alginolyticus*) auf dem grünen Medium. Vermag der Keim - wie *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* - diesen Zucker nicht abzubauen, entstehen grüne Kolonien. Das Wachstum von Koliformen und gram-positiven Bakterien wird dagegen stark unterdrückt (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006). Eine deutliche Abgrenzung verdächtiger Kolonien kann bei älteren, gekühlten oder stark bewachsenen Platten schwer fallen, da sich die gelbe Farbe unter Umständen verän-

Schrifttum

dert. So nimmt ein Bakterium, das Saccharose nicht verstoffwechselt (grün), inmitten von sehr vielen Saccharose abbauenden Bakterien manchmal eine gelbe Farbe an. Andererseits kann bei zu vielen um diesen Stoff konkurrierenden Bakterien der Saccharose-Metabolismus behindert sein und die entsprechenden Kolonien erscheinen irreführenderweise grün (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; HARA-KUDO et al., 2001; SIEFFERT, 2003). Die jeweils eingesetzten Gallelsalze bilden einen Grund für die schwankende Beschaffenheit dieses Agars (CHATTERJEE et al., 1977; DONOVAN und VAN NETTEN, 1995; NICHOLLS et al., 1976; SPIRA, 1984; WEST et al., 1982). In Abhängigkeit des Herstellers gibt es ebenfalls Qualitätsunterschiede, was zu Unterschieden in der Selektivität führt und die Größe und Zahl der Kolonien stark beeinflusst (BAUMGART, 2007; NICHOLLS et al., 1976).

Feste Nährmedien zum Nachweis von *V. parahaemolyticus*

– Wagatsuma-Agar

MIYAMOTO et al. (1969) entwickelten den Wagatsuma-Agar. Wichtigste Zutat bildet defibriniertes und gewaschenes humanes oder Kaninchen-Blut in einer Mindestkonzentration von 5%. Es dient dem Nachweis des Kanagawa-Phänomens. Darunter versteht man die Entwicklung einer β -Hämolyse von *V. parahaemolyticus*-Stämmen, die über das hitzestabile Hämolysin (TDH) verfügen und zugleich relativ kochsalzresistent sind (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; OLIVER und KAPER, 2001). Die Verwendung dieses Agars verliert aber an Bedeutung, da sich der Nachweis der Hämolysine heute auch über PCR-Methoden und Gensondentechniken erbringen lässt (BEJ et al., 1999).

– Bromthymolblau-Teepol-Agar (BTBT)

BTBT-Agar wurde von SAKAZAKI (1972) kreiert und stellt eine Abwandlung des TCBS-Agars dar. Er dient zum Nachweis von *V. parahaemolyticus*, wobei statt Gallelsalzen Teepol zur Unterdrückung der unerwünschten Begleitflora verwendet wird. Allerdings erlaubt dieser Agar keine eindeutige Beurteilung des Kanagawa-Phänomens (HONDA et al., 1982).

– Tryptone-Soya-Tetrazoliumchlorid-Agar (TSAT)

KOURANY (1983) schuf den TSAT-Agar für den Nachweis von *V. parahaemolyticus*. Zur Unterdrückung unerwünschter Bakterienflora enthält das Medium Gallelsalze und 3% NaCl. Durch die Reduktion von Tetrazoliumchlorid bildet *V. parahaemolyticus* dunkelrote Kolonien (CEFAS, 2006). Dieser Agar wird allerdings selten verwendet (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006).

– *V. parahaemolyticus*-Sucrose-Agar (VPSA)

Bei der Keimzahlbestimmung von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Lebensmitteln mit der Membranfiltrationsmethode empfiehlt die FDA den VPS-Agar. Aufgrund des Saccharoseanteils erscheinen *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus*-Kolonien grün bis blau (ENTIS und BOLESZCZUK, 1983; KAYSNER und DE PAOLA, 2004)

– **Chrom-Vibrio-Agar (CVA)**

HARA-KUDO et al. (2001) entwickelten einen chromogenen Agar, der unter dem Namen CHROMagar™Vibrio im Handel erhältlich ist. Er enthält eine Mischung farbgebender Substanzen, deren Zusammensetzung nicht veröffentlicht wurde und die als Substrat für die β -Galactosidase von *V. parahaemolyticus* dient. Dadurch kann *V. parahaemolyticus* (violett) farblich deutlich von *V. cholerae* und *V. vulnificus* (beide blass-blau) abgegrenzt werden. Andere Vibriospezies erscheinen cremefarben (z.B. *V. alginolyticus*) bis farblos (DUAN und SU, 2005; HARA-KUDO et al., 2001; REMY et al., 2007; SU et al., 2005).

Biochemische Identifikation von *V. parahaemolyticus*

Von präsumptiven *V. parahaemolyticus*-Kolonien werden zur biochemischen Identifikation Reinkulturen auf nicht selektiven Medien angefertigt. Die verschiedenen Protokolle konnten sich noch auf keinen Nährboden einigen. Stets sollte aber bei der Wahl der Medien ein Salzgehalt von mindestens 0,5% NaCl vorliegen (BAUMGART, 2007). Beispiele gebräuchlicher Nährböden für Reinkulturen sind Marine-Agar (CEFAS, 2006), TSA (KAYSNER und DE PAOLA, 2004), Columbia-Agar mit und ohne Blut oder Schafblutagar (BOCKEMÜHL, 1992)

– **Identifikation auf Genusebene**

Für den Nachweis des Genus wird zunächst auf die Oxidaseaktivität, das Gram-Verhalten, die Beweglichkeit, das Wachstum in einer Salzkonzentration von 3%, die Art der Verstoffwechslung von Glucose in Triple-Sugar-Iron (TSI)-Röhrchen und die Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum O 129 getestet (BAUMGART, 2007; CEFAS, 2006; KAYSNER und DE PAOLA, 2004).

Beurteilung: Die Zugehörigkeit zum Genus *Vibrio* kann unterstellt werden, wenn das Bakterium gram-negativ, Oxidase-positiv, halotolerant und in der Lage ist, Glukose fermentativ abzubauen. Über das Wachstum bei mindestens 3% NaCl lässt sich *Vibrio* spp. zunächst von halointoleranten Bakterien wie z.B. *Proteus* spp. abgrenzen. Der Test auf die Anwesenheit von Oxidase bildet ein Unterscheidungsmerkmal gegenüber Oxidase negativen, halophilen Bakterien wozu *Staphylococcus* und *Enterococcus* zählen. Mikroorganismen, die zwar halophil und Oxidase positiv sind, aber Glucose nur oxidativ abbauen (z.B. Pseudomonaden), können so ebenfalls von *Vibrio* spp. unterschieden werden (CEFAS, 2006; KAYSNER und DE PAOLA, 2004). Manche Protokolle ziehen zusätzlich die Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum O 129 (2,4-Diamino-6,7-diisopropylpteridin-Phosphat) heran, um *Vibrio* spp. von anderen Mikroorganismen abzugrenzen. *Aeromonas* und *Plesiomonas* beispielsweise verhalten sich gegen 150 μ g des Vibriostatikums resistent (BOCKEMÜHL, 1992; FARMER et al., 2003; OTTAVIANI et al., 2003).

– **Speziesidentifikation**

Zur Speziesidentifikation von *V. parahaemolyticus* werden noch weitere biochemische Tests durchgeführt. Die wichtigsten Reaktionen sind hierbei der Nachweis der Arginindihydrolase (ADH), der Lysindecaboxylase (LDC) und der Ornithindecaboxylase

Schrifttum

(ODC). Zur Identifikation von medizinisch relevanten *Vibrio* spp., wie *V. parahaemolyticus*, ist weiterhin ein Test auf Anwesenheit der Ortho-Nitrophenyl- β -Galaktosidase (ONPG), das Indolbildungsvermögen, das Acetoinbildungsvermögen (Voges-Proskauer-Reaktion) und ein kombinierter Verwertungstest verschiedener Zucker (Glucose, Laktose, Mannose, Saccharose, L-Arabinose, Cellobiose, D-Mannit und Salicin) üblich. Ferner wird das Wachstumsvermögen in verschiedenen Salzkonzentrationen (Konzentrationsstufen zwischen 0%, und 10% NaCl) überprüft (ALSINA und BLANCH, 1994; ELLIOT et al., 1995; FARMER et al., 2003; OLIVER und KAPER, 2001). Zusätzlich kann noch das Schwärmvermögen auf Marine-Agar abgeklärt werden (CEFAS, 2006).

Beurteilung: *V. parahaemolyticus* zeigt sich ADH-negativ, LDC-positiv und ODC-positiv. ONPG ist nicht vorhanden. Diese Spezies produziert Indol, jedoch kein Acetoin. Laktose, Saccharose, Cellobiose und Salicin können nicht verstoffwechselt werden, Glucose, D-Mannit und Mannose werden dagegen verstoffwechselt (ALSINA und BLANCH, 1994; ELLIOT et al., 1995; FARMER et al., 2003; OLIVER und KAPER, 2001). Das Verwertungsvermögen von Arabinose wird in der Literatur unterschiedlich eingestuft. Nach dem aktuellen FDA Protokoll und PODA (1997) besitzen mindestens 95 von 100 Stämmen *V. parahaemolyticus* diese Fähigkeit. Untersuchungen von ALCAIDE et al. (1999) bestätigten den Befund. Die Schlüssel von ALSINA und BLANCH (1994), ELLIOT et al. (1995) sowie FARMER et al. (2003) erwarten die Fähigkeit zum Arabinoseabbau bei 75-89% der Stämme. OLIVER und KAPER (2001) bestreiten andererseits das Verstoffwechselungsvermögen von Arabinose bei *V. parahaemolyticus*. Ohne Salz kann *V. parahaemolyticus* nicht wachsen. Salzkonzentrationen von 1 bis 6% NaCl werden in jedem Fall toleriert. (ALSINA und BLANCH, 1994; ELLIOT et al., 1995; FARMER et al., 2003; OLIVER und KAPER, 2001). Das Wachstumsvermögen in 8% NaCl sehen manche Autoren als gegeben an (ALSINA und BLANCH, 1994; ELLIOT et al., 1995; FARMER et al., 2003), OLIVER und KAPER (2001) beziffern die Wahrscheinlichkeit mit 80%. In seltenen Fällen (2 bzw. 1% der Stämme) toleriert dieser Keim auch Konzentrationen von 10 oder sogar 12% NaCl (OLIVER und KAPER, 2001). Das CEFAS-Protokoll (2006) sieht auch die Überprüfung des Schwärmverhaltens zur Abgrenzung gegenüber anderen Keimen vor, wobei *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 als Negativkontrolle eingesetzt wird. OLIVER und KAPER (2001) gehen jedoch davon aus, dass mindestens 95% aller Stämme schwärmfähig sind. Für diese Tests werden diverse kommerzielle Kits angeboten und in der Routinediagnostik verwendet. Wichtige Voraussetzung bildet jeweils eine Mindestkonzentration von 0,85% NaCl oder höher (bis 2%) in den Testmedien (BAUMGART, 2007). Häufig wird das Testkit API 20 E (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankreich) in der Routinediagnostik eingesetzt. Als Alternative zu den Tests in einzelnen Röhrchen wird das System auch vom FDA-Protokoll vorgeschlagen (OVERMAN et al., 1985). Weniger häufig eingesetzte Testkits sind beispielsweise die Vitek Karten (BioMérieux) und das API 20 NE (BioMérieux).

Quantitativer Nachweis

Zur Quantifizierung von Bakterien in Lebensmitteln mit kulturellen Methoden existieren vielfältige Techniken. Das Protokoll der FDA (Stand 2007) schlägt für die Zählung von *V. parahaemolyticus* das Most-Probable-Number-(MPN)-Verfahren und die Membranfiltrationsmethode nach ENTIS und BOLESZCZUK (1983) vor (KAYSNER und DE PAOLA, 2004). In den Routinelaboren verwendet man neben des Most-Probable-Number-Verfahrens häufig die Spateltechnik.

– MPN-Verfahren

Most-Probable-Number bedeutet auf deutsch: „Höchstwahrscheinliche Keimzahl“. Das MPN-Verfahren ist eine Schätzung der tatsächlichen Keimzahl mit Hilfe mathematisch-statistischer Prinzipien. Die Methode baut auf dem Titerverfahren auf, bei dem eine einfache Verdünnungsreihe mit mehreren Röhrchen pro Stufe angefertigt wird (HILDEBRANDT und ARNDT, 1982; PHELPS, 1908; THRESH et al., 1933). Das MPN-Verfahren ist somit ein multipler Röhrchentest, bei dem im ersten Schritt aus dem Probenhomogenat eine Verdünnungsreihe angelegt wird. In einem zweiten Schritt entnimmt man jeder Verdünnungsstufe die gleiche Anzahl an 1 ml Aliquots und verbringt sie in Reagenzgläser mit selektiver Nährbouillon. In der Regel sind es drei, fünf oder zehn Ansätze pro Verdünnungsstufe. Nach der Inkubation der Reagenzgläser wird anhand des Keimwachstums in den Röhrchen ein Code abgelesen. Es wird dabei die Anzahl der bewachsenen Röhrchen der drei letzten Verdünnungsstufen, in denen noch Wachstum erkennbar ist, angegeben. Ein Ablesen ist manchmal sofort anhand von Trübung, Bodensatz, Gasbildung oder Farbumschlag eines Indikators möglich. Falls jedoch nur die Keimzahl einer Spezies unter mehreren bestimmt werden soll, so muss zur Differenzialdiagnose Material von jedem Röhrchen auf ein solides Medium (pro Röhrchen eine Platte) übertragen und dieses erneut inkubiert werden. Der Code richtet sich nun nach der Wiederfindung verdächtiger Kolonien auf den Platten. Anhand einer entsprechenden Tabelle, beispielsweise nach DE MAN (1975), kann dem Code nun die wahrscheinlichste Keimzahl zugeordnet werden. Die verdächtigen Kolonien sollten anschließend noch biochemisch oder molekularbiologisch bestätigt werden (KAYSNER und DE PAOLA, 2004). Trotz des hohen Arbeitsaufwandes bietet das MPN -Verfahren Vorteile, zu denen eine hohe Nachweisempfindlichkeit, eine unverzerrte Keimzahlbestimmung und die Berücksichtigung schlecht wachsender Bakterien gehören (HILDEBRANDT und ARNDT, 1982).

– Membranfiltrationsmethode

Bei der Membranfiltrationsmethode werden Mikroorganismen, die größer als der Porendurchmesser der Membran sind, auf dieser zurückgehalten. Bakterien aus beliebigen Mengen an Flüssigkeit oder filtrierbaren Lebensmittelproben können auf diese Weise mechanisch angereichert und gezählt werden. In der konkreten Durchführung werden etwa 1 ml Homogenat (1:10 Verdünnung) über eine Membran aus beispielsweise Cellulosenitrat oder Celluloseacetat filtriert. Falls sehr große Keimmengen zu erwarten sind, kann das Homogenat auch weiter verdünnt werden. Die Membran wird anschließend steril auf eine Agarplatte verbracht und für wenige Stunden inkubiert. Danach wird sie auf eine Selektivplatte transferiert und wiederum inkubiert. Durch das Bebrüten des Filters auf dem Nährmedium werden die darauf befindlichen Bakterien als Kolonien sichtbar und zählbar (BAUMGART, 2006; PICHARDT, 1998). ENTIS und BOLESZCZUK (1983)

Schrifttum

filtrierten über eine hydrophobe Netzmembran (HGMF: Hydrophobic grid membrane filtration). Diese Membran ist über ein Gittermuster in 1600 Felder unterteilt und kann mit einem Zählgerät automatisch ausgewertet werden.

– **Oberflächenspatelverfahren (OSV)**

Das Oberflächenspatelverfahren stellt eine Variante der kulturellen Oberflächentechniken dar. Hierbei wird zunächst eine dekadische Verdünnungsreihe der Probe angefertigt. Anschließend werden in der Regel von jeder Verdünnungsstufe 2 mal 100 µl-Portionen entnommen, auf ein Selektivfestnährmedium aufgebracht und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Die Platten werden entsprechend der Bedürfnisse des Keimes inkubiert. Dann werden die entstandenen Kolonien pro Platte gezählt. Von der Gesamtkoloniezahl wird das arithmetische Mittel gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert um eine Keimzahlangabe pro ml vornehmen zu können (GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; HOLT und KRIEG, 1994). Auch hier sollten die verdächtigen Kolonien biochemisch oder molekularbiologisch bestätigt werden (MICELI et al., 1993).

– **Photometrische Bestimmung der Keimdichte**

Die Keimdichte einer Lösung lässt sich mittels Photometrie indirekt bestimmen, wobei hier die optische Dichte (OD) gemessen wird. Es handelt sich um eine Streulichtmessung bei langwelligem Licht, die kleine Partikel erfasst. Bakterien kann man als Partikel betrachten, deren Dichte sich von der von Wasser unterscheidet. In einer Küvette in den Strahlengang eines Photometers eingebracht, lenken Mikroben das langwellige Licht ab, es wird sozusagen vom Detektor „weggestreut“. Das restliche Licht wird vom Detektor erfasst und die Differenz zur ursprünglichen Lichtintensität als Extinktionswert angezeigt (STUPPERICH et al., 2007). Während der exponentiellen Wachstumsphase laufen die Massenzunahme und Partikelzahl parallel, sodass der dabei ermittelte Extinktionswert einer Keimzahl entspricht (KAYSER et al., 1998).

2.5.3 Molekulare Nachweismethoden für *V. parahaemolyticus*

2.5.3.1 Qualitativer Nachweis

– **Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction)**

Zur Detektion von *V. parahaemolyticus* wurden bisher schon einige PCR-Protokolle mit verschiedenen Zielsequenzen entwickelt. Für die zuverlässige Identifikation von Bakterien spielt die Wahl der Zielsequenz eine wichtige Rolle. Ideal ist dabei eine hoch konservierte Nukleotidsequenz (KIM et al., 1999). Bevorzugt werden rRNA-Sequenzen gewählt, allerdings stimmen die 16S rRNA von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* zu >99% überein, weshalb sie sich im Falle von *V. parahaemolyticus* weniger eignen (KITA-TSUKAMOTO, 1993; RUIMY, 1994). Eher zu empfehlen ist das Gen *gyrB*, das für die B-Untereinheit der DNA-Gyrase codiert, welche für die DNA-Replikation dieser Spezies unabdingbar ist. Sie weist lediglich 86,8% Homologie zum *gyr B* Gen von *V. alginolyticus* auf (VENKATESWARAN, 1998).

Zur Speziesidentifikation ist weiterhin das Gen *toxR* als Zielsequenz üblich. Es stellt ein Regulationsgen dar, welches bei *V. parahaemolyticus* die Expression des *tdh2* und in

Schrifttum

geringerem Maße des *tdh1* Gens fördert. *Tox R* kommt bei einigen *Vibrio* spp. (z.B. *V. cholerae* und *V. fisheri*) vor und ist gut konserviert. Der Grad an Homologie zwischen den *toxR* Genen der verschiedenen *Vibrio* spp. erwies sich als deutlich geringer, als dies zum Beispiel bei den *rRNA* Genen der Fall ist (KITA-TSUKAMOTO, 1993; LIN et al., 1993; REICH und SCHOOLNIK, 1994). Auch das *tlh* Gen ist sehr spezifisch für *V. parahaemolyticus* und deshalb für seine Identifikation gut geeignet (TANIGUCHI et al., 1986; TANIGUCHI et al., 1990).

Ein weiteres Gen, das als Zielsequenz für die Entwicklung einer *V. parahaemolyticus* PCR verwendet wurde, ist *sod A*. Dieses Gen codiert für die Mangansuperoxiddismutase (KIM et al., 1999; SHYU und LIN, 1999).

TADA et al. (1992) sowie LEE und PAN (1993) entwickelten eine PCR mit *tdh* und *trh* als Zielgenen. Sie codieren für direkte Hämolyse von *V. parahaemolyticus*, die als Virulenzmarker dieser Spezies gelten. Es existieren auch Multiplex-PCR-Methoden für *V. parahaemolyticus*. Das Protokoll von BEJ et al. (1999) beispielsweise zielt auf *tlh* zur Speziesidentifikation und auf *trh* und *tdh* für Aussagen zur Pathogenität.

2.5.3.2 Quantitativer Nachweis

– Koloniehybridisierung

Zielsequenzen beim Erfassen von *V. parahaemolyticus* bilden bei der Koloniehybridisierung beispielsweise das *tlh*-Gen oder auch die Gene der Hämolyse zum Nachweis der Pathogenität. Sonden zur Identifizierung von *V. parahaemolyticus* sind oft mit alkalischer Phosphatase oder Digoxigenin gelabelt (DE PAOLA et al., 2003 a). Das FDA-Protokoll schlägt die Methode nach MC CARHTY (1999) mit *tlh* als Zielsequenz und MC CARTHY et al. (2000) mit *tdh* als Zielsequenz vor.

– Realtime-PCR (RT-PCR)

Das Realtime PCR-Verfahren gestattet die Identifikation des Amplikons bereits während des Vervielfältigungsvorgangs. Gleichzeitig wird ein Fluoreszenzsignal gemessen, das proportional zum wachsenden Amplifikationsprodukt ansteigt. Damit kann auf die ursprünglich vorhandene Menge des in der Probe vorhandenen Zielbakteriums rückgeschlossen werden.

Auch für die Quantifizierung von *V. parahaemolyticus* wurden RT-PCR Protokolle geschaffen. BLACKSTONE et al. (2003) beispielsweise entwickelten eine RT-PCR mit *tdh* als Zielsequenz. Es existieren auch bei der RT-PCR Protokolle, welche die Vervielfältigung mehrerer Gensequenzen gleichzeitig verfolgen. DAVIS et al. (2004) konnten mit ihrem RT-PCR-Ansatz die Amplikate von Sequenzen der Gene *tlh*, *trh* und *tdh* gleichzeitig quantifizieren. WARD und BEJ (2006) fügten diesem Protokoll noch eine Sequenz des Open Reading Frame (ORF) 8 hinzu.

2.5.4 Typisierungsmethoden

2.5.4.1 Serotypisierung

V. parahaemolyticus kann eine Vielzahl von Serotypen ausbilden. Die Serotypenzugehörigkeit dieses Bakteriums basiert auf der Struktur seines Oberflächen (O-)-Antigens sowie der seines Kapsel (K-)-Antigens. Das Geißel (H-)-Antigen ist allen Stämmen gemein. Heute unterscheidet man 12 verschiedene O-Antigentypen und über 70 K-Antigentypen. Einige Kapselantigene bleiben allerdings untypisierbar (KUT= K-antigen untypable). Unter Berücksichtigung, dass sechs dieser K-Antigene nicht nur einem O-Antigen zuzuordnen sind, ergeben sich damit insgesamt 76 identifizierte *V. parahaemolyticus* Serovare (KAYSNER und DE PAOLA, 2004).

Das *V. parahaemolyticus*-Serovar O3:K6 scheint eine besondere Rolle in der Epidemiologie zu spielen. Erstmals im Jahr 1996 wurde dieses spezielle Serovar in Kalkutta, Indien, nachgewiesen (OKUDA et al., 1997 a). Später wurden 134 Stämme von Krankenhauspatienten, isoliert zwischen 1994 und 1996, ebenfalls als Serovar O3:K6 klassifiziert. Andere O3:K6 Stämme, die in der Zeit zwischen 1982 und 1993 aus asiatischen Reisenden isoliert wurden, unterschieden sich von diesem sogenannten "Kalkutta"-Stamm. Dagegen waren O3:K6 Stämme, die zwischen 1995 und 1996 in Südostasien angezüchtet wurden, identisch mit dem „Kalkutta“-Stamm. 1998 tauchte dieses Serovar dann bei Ausbrüchen in den USA auf (DE PAOLA et al., 2000). MATSUMOTO et al. (2000) stellten mit molekularbiologischen Methoden fest, dass die nordamerikanischen Isolate identisch mit dem "Kalkutta"-Stamm waren. QUILICI et al. (2005) entdeckten den gleichen Stamm dann auch in Frankreich und MARTINEZ-URTAZA et al. (2005) identifizierten ihn in Spanien, was auf eine innereuropäische Ausbreitung hindeutete. In der Zeit, in der dieser pandemische "Kalkutta"-Stamm das erste Mal auftrat, wurden auch andere Serovare wie O4:K68 und O1: UT mit gehäuftem *V. parahaemolyticus*-Infektionen weltweit in Verbindung gebracht. OKURA et al. (2003) stellten mit genotypisierenden, molekularbiologischen Methoden eine sehr große Ähnlichkeit dieser Isolate fest. In einem Review von 2007 äußerten NAIR et al. den Verdacht, dass andere Serotypen mit identischen Genotypen und molekularen Profilen tatsächlich - per Änderung ihres O- bzw. K-Antigens - Modifikationen eines einzigen O3:K6 Stammes wäre.

2.5.4.2 Kanagawa-Phänomen

Einige *V. parahaemolyticus* Stämme zeigen nach Anzucht auf Wagatsuma-Agar, einem Festmedium mit einer Beimengung von gewaschenen menschlichen Blutzellen, eine vollständige Auflösung der Erythrozyten im Umfeld der Kolonien. Man nennt diese β -Hämolyse das Kanagawa-Phänomen und die entsprechenden Stämme werden als Kanagawa-positiv (KP⁺) bezeichnet (OLIVER und KAPER, 2001). Über 90% aller klinischen Isolate verhalten sich Kanagawa-positiv (BAUMGART, 2007). SAKAZAKI et al. (1968) beobachteten bei 96,5% von insgesamt 2720 Patientenstämmen das Kanagawa-Phänomen. Bei etwa 1% der klinischen Isolate trat diese Hämolyse nach den Angaben von OLIVER und KAPER (2001) nicht auf. Heute weiß man, dass dieses Phänomen durch das hitzestabile direkte Hämolysin hervorgerufen wird (NISHIBUCHI und KAPER, 1995). Von den Umweltisolaten verhalten sich lediglich 1 bis 2% Kanagawa-positiv (BAUMGART, 2007). Andere Autoren sprechen sogar von weniger als 1% KP⁺-Stämmen in aquatischer Umgebung bzw. in marinen Fischereierzeug-

nissen (OLIVER und KAPER, 2001).

2.5.4.3 Phagentypisierung

Die Phagentypisierung, welche auch Lysotypie genannt wird, macht sich die Eigenschaft von Bakterienviren (= Bakteriophagen) zunutze, bestimmte Stämme einer Bakterienspezies zu lysieren/infizieren. Eine Charakterisierung von Isolaten gelingt über die Analyse des Phagenrezeptor- bzw. des Lysismusters. Dabei müssen allerdings eine Vielzahl verschiedener Phagen zum Einsatz kommen (LENZ, 1991; MULLIGAN et al., 1988).

Für die Typisierung von *V. parahaemolyticus* über Phagen existiert derzeit noch kein Schema. Es beschäftigten sich jedoch einige Studien mit der Erforschung von Zusammenhängen zwischen *V. parahaemolyticus* Stämmen und den dazugehörigen Bakteriophagen. MOEBUS und NATTKEMPER (1983) isolierten 366 Phagen aus dem Atlantik von denen 362 in der Lage waren, Angehörige der Familie der Vibrionaceae zu infizieren. 280 dieser Phagen waren infektiös für *Vibrio* spp. Auch in anderen Untersuchungen wurden zahlreiche Bakteriophagen isoliert, die spezifisch für *V. parahaemolyticus* waren. Diese wurden in den Küstengewässern von Laos, Hawaii, den nordamerikanischen Küsten des Pazifiks und des Atlantiks gefunden (BAROSS et al., 1978; COMEAU et al., 2005; HARDIES et al., 2003; KELLOG et al., 1995; NAKASONE et al., 1999; SKARLOW et al., 1973). KOGA et al. (1982) isolierten 18 für *V. parahaemolyticus* infektiöse Phagen, wobei sie 4 morphologische Gruppen feststellten. Einen Zusammenhang zwischen dem Serotyp von *V. parahaemolyticus* und Wirtsspezifität der Phagen konnten sie allerdings nicht feststellen.

Im Rahmen einer russischen Studie wurde dann ein Phage entdeckt, der spezifisch für das *V. parahaemolyticus* Serovar O5:K15 war (LIBINZON et al., 1995). IIDA et al. (2001) stellten fest, dass viele klinische O3:K6 Stämme, die seit 1996 isoliert worden waren, den filamentösen Phagen f237 enthielten. Dieser wies seinerseits den spezifischen open reading frame ORF 8 auf. Darüber hinaus entdeckten diese Wissenschaftler den Phagen f237 auch in Stämmen der Serotypen O4:K68 und O1:KUT. Die enge Verwandtschaft der Serovare O3:K6, O4:K68 und O1:KUT wurde bewiesen. Die Ergebnisse molekularbiologischer Studien ließen vermuten, dass O4:K68 und O1:KUT-Stämme aus O3:K6-Stämmen durch genetische Abänderung der O- und K-Antigene hervorgegangen sind. Zusammen bezeichnete man diese Serotypen nun als pandemische Gruppe (OKURA et al., 2003). Möglicherweise spielt der ORF 8 dieses Phagen bei der gesteigerten Virulenz der pandemischen Gruppe eine Rolle und mag damit als genetischer Marker für virulente *V. parahaemolyticus* dienen (MYERS et al., 2003; NASU et al., 2000). LAOHAPRERTTHISAN et al. (2003) wiesen die ORF 8-Sequenz auch in *V. parahaemolyticus*-Serovaren O1:K25, O1:K41 und O4:K12 nach.

2.5.4.4 Genotypisierungsverfahren

Mittels Genotypisierungsverfahren kann der Verwandtschaftsgrad von Stämmen bestimmt werden was der Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge dient. Über Methoden zur Erstellung eines solchen genetischen Fingerabdrucks von *Vibrio* spp. gibt es zahlreiche Veröffentlichungen. Bei der Differenzierung von *V. parahaemolyticus* auf genetischer Ebene wurden beispielsweise durch NISHIBUCHI (2006) vorgeschlagen:

- Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Schrifttum

- Ribotyping
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) = Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)
- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence (ERIC-PCR)
- Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE)
- Multilocus-Sequence-Typing (MLST)

2.5.4.4.1 Restricted Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Das RFLP-Verfahren kann an verschiedenen Abschnitten der DNA (Genloci) angewendet werden. Ein Beispiel dafür bildet das Flagellintyping (MARSHALL et al., 1999). Dabei wird eine Sequenz am Genort, der für das polare Flagellum (*fla*) codiert, amplifiziert und anschließend über Restriktionsenzyme geschnitten. MC CARTER (1995) amplifizierte ein 6,6 kb Fragment. Es umfasst die Gene *flaB*, *flaA*, *flaG*, *flaH*, *flaI*, *flaJ* und *flaK*. Zum Schneiden der Amplifikate testeten MARSHALL et al. (1999) die Restriktionsenzyme *DdeI*, *RsaI*, *TaqI*, *Sau3AI* und eine Doppelrestriktion mit *PstI* und *SspI*. Die besten Ergebnisse lieferte *RsaI*. Die gleichen Autoren stellten bei dieser Methode das geringste Diskriminationspotential verglichen mit dem Ribotyping, der ERIC-PCR und der PFGE fest, empfanden sie aber ausreichend zur Bestätigung der Ergebnisse, die mit den anderen Methoden erzielt wurden. Mit dieser Technik wurden auch weniger Banden erzeugt, was darauf hinweist, dass die *fla* Gene recht konserviert sind. Andere genetische Loci könnten sich zur RFLP-Analyse deshalb besser eignen (MARSHALL et al., 1999). Über eine PCR lassen sich diese DNA-Abschnitte vervielfältigen, womit die erforderliche DNA-Menge für eine RFLP-Analyse mit relativ geringem Zeitaufwand bereitgestellt werden kann (HILL, 2004).

2.5.4.4.2 Ribotyping

MARSHALL et al. (1999) verwendeten bei der Analyse von *V. parahaemolyticus*-Stämmen *BglII* als Restriktionsenzym und das *rrnB* rRNA Operon als Sonde. Andere Autoren charakterisierten *V. parahaemolyticus*-Isolate vollautomatisch mit einem RiboPrinter (Qualicon, Wilmington, Del. USA), wobei sie das Restriktionsenzym *EcoI* zur Verdauung der DNA verwendeten (DE PAOLA et al. 2003 b; YEUNG et al., 2002). Die Reproduzierbarkeit und das Diskriminierungspotential werden bei dieser Methode als gut bewertet. Der relativ einfachen Interpretation steht jedoch eine aufwendige Durchführung gegenüber (ARBEIT, 1995; OLIVE und BEAN, 1999; TENOVER et al., 1997; WEBER et al., 1997). Im Gegensatz zur PFGE Methode oder der ERIC-PCR, bei denen genetische Veränderungen eines *V. parahaemolyticus*-Stammes sogleich sichtbar werden, können bis zu 6 Jahre vergehen, ehe sich diese im Ribotyping (gilt auch für *fla*-typing) widerspiegeln (KARAOLIS et al., 1994). Deshalb eignet sich dieses Verfahren besser zur Analyse von Stämmen, deren Auftreten geographisch und/oder zeitlich auseinander liegt (MARSHALL, 1999).

2.5.4.4.3 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR)

Bei der Verwendung von nur einer Typisierungsmethode ist die ERIC-PCR das Verfahren der Wahl (MARSHALL et al., 1999; TANTILLO et al., 2004). Mit dieser Methode sind sowohl Homologien als auch Differenzen zwischen einzelnen Isolaten darstellbar (CIMOLAI und TROMBLEY, 1997). Die ERIC-PCR stellt eine schnelle Methode mit hohem diskriminatorischen Potential und guter Reproduzierbarkeit dar (WONG und LIN, 2001). MARSHALL et

al. (1999) verwendeten für die ERIC-PCR bei *V. parahaemolyticus* den Primer R1 (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3').

2.5.4.4.4 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) / Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)

Die RAPD (= AP-PCR) zeichnet sich durch eine schnelle Durchführbarkeit aus, allerdings gilt die Interpretation der Bandenmuster als schwierig. Der Methode wird eine nur mäßige Reproduzierbarkeit zugeschrieben, das Diskriminierungspotential wird dagegen als gut bis exzellent eingestuft (ARBEIT, 1995; OLIVE und BEAN, 1999; TENOVER et al., 1997; TYLER et al., 1997; WEBER et al., 1997). NAJIAH et al. (2003) benutzten das 10-mer Primer Gen 1-50-01 (5'-GTG CAA TGA-3') und das Gen 1-50-02 (5'-CAA TGC GTC T-3') zur Analyse von *V. parahaemolyticus*-Stämmen.

2.5.4.4.5 Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE)

WONG et al. (1996) testeten eine Vielzahl an Restriktionsenzymen (*AccI*, *AseI*, *AvaI*, *BamAI*, *BstXI*, *ClaI*, *EcoI*, *HindIII*, *NdeI*, *KpnI*, *PstI*, *SmaI*, *SfiI*, *XbaI*, *XhoI*, *XhoII*) für *V. parahaemolyticus* DNA hinsichtlich ihrer Eignung zur PFGE und stellten fest, dass *SfiI* als einziges 17 klare und erkennbare Banden in einer Größenordnung von 48 bis 727 kb erzeugt. Die PFGE besitzt ein hohes diskriminatorisches Potential und weist eine gute Reproduzierbarkeit auf. Dank der bestehenden Interpretationsrichtlinien der PFGE-Restriktionsprofile und der relativ geringen Bandenzahl lassen sich die entstandenen RFLPs (s.o.) recht einfach analysieren (CLAUS et al., 1996; TENOVER et al., 1995). Bei *V. parahaemolyticus* gilt es als gute Methode zur Differenzierung von Stämmen aus Umwelt, Ausbrüchen und vereinzelt Erkrankungen (MARSHALL et al., 1999). Dem gegenüber stehen allerdings ein hoher technischer und zeitlicher Arbeitsaufwand sowie erhebliche Anschaffungskosten für die erforderlichen Geräte (ARBEIT, 1995; OLIVE und BEAN, 1999; TENOVER et al., 1997; WEBER et al., 1997). Hinzu kommt bei dieser Methode eine Quote von 23% an nicht typisierbaren Stämmen bei *V. parahaemolyticus* aufgrund von DNA-Degradierungen im Rahmen der Probenaufbereitung (MARSHALL et al., 1999, WONG und LIN, 2001).

2.5.4.4.6 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

PARISI et al. (2005) verwendeten zur Analyse von *V. parahaemolyticus*-Stämmen die Endonucleasen *EcoRI* und *MseI* im ersten Schritt des Verfahrens und im zweiten die Primerkombinationen *EcoRI*+AA JOE sowie *MseI* +CT. Die AFLP gilt als Methode mit hoher Reproduzierbarkeit und gutem Diskriminierungspotential. Auch die Interpretation gestaltet sich relativ einfach. Dem gegenüber steht ein relativ hoher Aufwand bei der Durchführung (WICHELHAUS et al., 2000).

2.5.4.4.7 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Im Falle von *V. parahaemolyticus* werden beim MLST beispielsweise die housekeeping-Gene (Haushaltsgene) *gyrB* (DNA-Gyrase), *recA* (Rekombinationsprotein), *dnaE* (DNA-Polymerase) und *gnd* (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase) zunächst amplifiziert und dann sequenziert (CHOWDHURY et al., 2004; GARG et al., 2003), um Mutationen in ihnen festzustellen und die Rolle von Rekombinationen während der Evolution aufzuklären (FEIL et al., 2000; JOLLEY et al., 2001; MAIDEN et al., 1998). Der Datenbank PubMLST zufolge

Schrifttum

können außer den Genen *recA*, *dnaE* und *gyrB*, welche auf dem Chromosom I von *V. parahaemolyticus* zu finden sind, auch die Gene *dtbS* (Threonin Dehydrogenase), *pntA* (Transhydrogenase, α -Untereinheit), *pyrC* (Dihydroorotase) und *tnaA* (Tryptophanase) des Chromosoms II sowie das variable Gen *ompK* (Outer membrane Protein) sequenziert werden (JOLLEY et al., 2004). Die MLST zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und gute Diskriminierungsfähigkeit aus, jedoch handelt es sich auch um eine recht aufwendige Arbeitsmethode (GRUNDMANN, 2002). Mit diesem Verfahren konnten CHOWDHURRY et al. (2004) zeigen, dass die Profile der *V. parahaemolyticus* Stämme, die vor dem pandemischen "Kalkutta"-Stamm (O3:K6) auftraten, sehr vielfältig waren, während die pandemischen O3:K6 Stämme zwei gemeinsame Allele aufwiesen.

2.5.4.5 Virulenzfaktoren

Man vermutet, dass mehrere Virulenzfaktoren bei der Pathogenese *V. parahaemolyticus*-bedingter Krankheitsfälle eine Rolle spielen. Diese Faktoren stehen mit Beta-Hämolyse, Adhäsionsvermögen, diversen Enzymen und den Produkten der Gene *tdh*, *trh* und *ure* in Zusammenhang.

2.5.4.5.1 Hämolyse

– Hitzelabiles Hämolysin (TLH)

Das hitzelabile Hämolysin (thermolabile hemolysin = TLH) haben TANIGUCHI et al. (1986) beschrieben. Es wird ausschließlich in *V. parahaemolyticus* gefunden. Über das Gen *tlh*, das dieses Protein codiert, ist eine Speziesbestimmung auf molekularbiologischem Wege möglich; das Hämolysin selbst gilt aber gemeinhin nicht als Pathogenitätskennzeichen (DRAKE et al., 2007).

– Hitzestabiles direktes Hämolysin (TDH)

Zu den nachgewiesenen Virulenzfaktoren für die Durchfallerkrankung zählt das hitzestabile direkte Hämolysin (thermostable direct hemolysin = TDH), das auf dem *tdh* Gen codiert wird (BAUMGART, 2007). Der Name dieses Proteins leitet sich einerseits von seiner Hitzebeständigkeit (keine Zerstörung bei 100°C für 10 min, nach 30 min nur partiell denaturiert) ab. Andererseits ist es bei der Hämolyse nicht auf Lecithin angewiesen, es wirkt also direkt auf die Erythrozyten (NISHIBUCHI und KAPER, 1995; SAKURAI et al., 1973). TDH vermag bei verschiedenen Tierarten, rote Blutkörperchen zu zerstören, jedoch nicht die von Pferden. Außer seiner Hämolyseaktivität wirkt das TDH-Protein in Zellkulturen auch zytotoxisch auf andere Zellen (HONDA et al., 1992; OLIVER und KAPER, 2001; TANG et al., 1993).

Einigen Studien zufolge beruht die geschilderte Zytotoxizität auf dem Porenbildungsvermögen des TDH-Proteins, einer Eigenschaft, welche die Membranpermeabilität der betroffenen Zelle erhöht und zu einer osmotischen Lyse derselben führt. Damit zerstört TDH den Zellkontakt und ermöglicht *V. parahaemolyticus* das weitere Vordringen (FABBRI et al., 1999; RAIMONDI et al., 2000). In vitro-Untersuchungen an Phospholipid-Doppelmembranen zeigten weiterhin, dass TDH zur Bildung dieser Poren keines speziellen Rezeptors bedarf, und ebenso, dass die gebildeten Poren für An- und Kationen durchlässig sind. Zudem zeigte sich die Porenbildung unabhängig von der Membranzu-

Schrifttum

sammensetzung (HARDY et al., 2004). Im Gegensatz zur Pathogenese der Enterotoxizität ist die Porenbildung Ca^{2+} -unabhängig (RAIMONDI et al., 2000). Gereinigtes TDH verursacht Flüssigkeitsansammlungen im Kaninchen-Hüftdarmschlingen-Modell. Dieser Befund weist auf eine Enterotoxizität des TDH hin (MIYAMOTO et al., 1980; HONDA und IIDA, 1993). Später entdeckten RAIMONDI et al. (1995), dass gereinigtes TDH eine intestinale Chloridionen-Sekretion bewirkt, und dass Trisialogangliosid GT1b den dazugehörigen zellulären Rezeptor bildet. Dabei verwendet TDH nicht cAMP oder cGMP als Second Messenger sondern Ca^{2+} . In vivo-Untersuchungen am Hüftdarm von Ratten bestätigten diese Annahme (BAFFONE et al., 2005).

TDH kann zudem als Ionophore in den Plasmamembranen von Erythrozyten, Enterozyten und Fibroblasten fungieren (HONDA und IIDA., 1993). Nachdem es KAPER et al. (1984) als ersten gelang, das *tdh*-Gen des Stammes WP1 zu klonen, konnten diese Wissenschaftler dazugehörige Gensonden schaffen, mit deren Hilfe sich dann die *tdh*-Gene anderer *V. parahaemolyticus* Stämme identifizieren ließen.

Weiterhin entdeckten IIDA und YAMAMOTO (1990), dass es außer dem oben genannten *tdh* (1)-Gen noch ein weiteres gibt, das man *tdh2* nannte. Die beiden Gene sind nicht identisch. Die zugehörigen Produkte unterscheiden sich in der Position von sieben Aminosäuren, obwohl sie immunologisch nicht auseinanderzuhalten sind (NISHIBUCHI und KAPER, 1995). Da TDH verantwortlich für das Kanagawa-Phänomen ist, untersuchten NISHIBUCHI und KAPER (1990) KP-positive Stämme und stellten fest, dass alle diese Stämme über beide *tdh* (1 und 2)-Gene verfügten. Allerdings sind über 90% des TDH-Proteins auf eine ausgeprägte Expression des *tdh2*-Gens zurückzuführen. Stämme, die nur eine geringe Hämolyse auslösen konnten, enthielten lediglich ein *tdh*-Gen in ihrem Genom. Bei KP-negativen Stämmen, überwiegend Umweltisolate, konnte bei 16% ein *tdh*-Gen festgestellt werden, bei den restlichen lag keines vor.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass auch bei Isolaten anderer *Vibrio* spp. - wie *V. hollisae*, *V. cholerae* non-O1 und *V. mimicus* - gelegentlich das *tdh*-Gen festgestellt wird. Das *tdh* dieser *Vibrio* spp. ist dem von *V. parahaemolyticus* molekular und immunologisch sehr ähnlich. Es unterscheidet sich lediglich in einer Base. Phänotypisch gibt es jedoch deutlichere Unterschiede. So ist das TDH von *V. cholerae* non-O1 bei Schafblut weniger hämolytisch, das von *V. hollisae* unterscheidet sich im Molekulargewicht, zeigt andere Lyseigenschaften und weist nicht die gleiche Hitzestabilität auf (KAPER und NISHIBUCHI, 1995; NISHIBUCHI et al., 1985; NISHIBUCHI et al., 1990; YOH et al., 1986 a,b).

- TDH-verwandtes Hämolysin (TRH)

Einen weiteren nachgewiesenen Virulenzfaktor von *V. parahaemolyticus* stellt das TDH verwandte Hämolysin (TDH related hemolysin = TRH) dar (BAUMGART, 2007). Dieses Toxin fanden HONDA et al. (1988) in einem klinischen, KP-negativen *V. parahaemolyticus*-Stamm, isoliert von einem Malediven-Reisenden. Die Aminosäuresequenz von TRH ist der von TDH zu fast 69% homolog, was auf einen gemeinsamen Vorgänger hinweist (HONDA et al., 1988; NISHIBUCHI et al., 1989). Nicht unerwartet zeigt das TRH-Protein die gleichen biologischen Wirkungen (HONDA und IIDA, 1993).

Auch das *trh*-Gen wurde geklont und sein Vorkommen analysiert. *Trh*-positive Isolate sind meistens pathogene Stämme, welche gelegentlich auch in der Umwelt, wie Meer-

Schrifttum

wasser oder Seafood, nachgewiesen werden. Die meisten Isolate aus der Region Nordwest-Pazifik der USA scheinen beide Gene *tdh* und *trh* in sich zu tragen (NISHIBUCHI et al., 1989, KAUFMAN et al., 2002; DE PAOLA et al., 2003a).

Ein Hämolysin, das mit dem TRH zu 98% übereinstimmt, konnten GONZALES-ESCALONA et al. (2006) bei *V. alginolyticus* nachweisen. Weiterhin hat man herausgefunden, dass es vielfältige Formen des *trh*-Gens innerhalb des Genus *Vibrio* gibt. Obgleich sich diese zwar in der Nukleotidabfolge und auch in der Hämolyseaktivität des davon abgeleiteten Proteins unterscheiden, scheinen sie dennoch von einem gemeinsamen Vorgänger abzustammen. Die überwiegende Mehrheit der Umweltisolate enthalten jedoch weder das *tdh* noch das *trh* Gen (XU et al., 1994).

Eine Reihe von Untersuchungen wurden durchgeführt, bei denen Deletions-Mutationen vorgenommen wurden, die das *trh*-Gen teilweise oder sogar ganz löschen. Dabei ließ sich beobachten, dass die Hämolyseaktivität zwar verschwand, die Mutanten aber trotzdem ihre Zytotoxizität behielten und Flüssigkeitsansammlungen im Kaninchen-Hüft darm-Modell auslösten (MING et al., 1994). Das CENTRE FOR DISEASE CONTROL (CDC) der Vereinigten Staaten verzeichnete schwerwiegende Krankheitsfälle, bei denen die zugrunde liegenden *V. parahaemolyticus*- Stämme weder über ein *tdh* noch über *trh* Gen verfügten. In einigen dieser Fällen war sogar ein Klinikaufenthalt notwendig (YU et al., 2006).

2.5.4.5.2 Siderophore

Es gibt noch weitere Hinweise, die auf andere Virulenzfaktoren außer TDH und TRH bei *V. parahaemolyticus* hindeuten. Da aber TDH und TRH bisher als die wichtigsten Virulenzfaktoren galten, hatten die meisten Untersuchungen bezüglich der Pathogenität von *V. parahaemolyticus* eben diese Hämolysine im Fokus (IIDA et al., 2006).

Beispielsweise wurden neue Siderophore (gr. Eisenträger) für *V. parahaemolyticus* beschrieben. Man nennt sie Vibrioferrin, da sie Eisen an sich binden, das sie aus 30% gesättigtem, menschlichen Transferrin beziehen. Die Bedeutung dieser Siderophore für die Pathogenese von *V. parahaemolyticus* ist noch nicht geklärt. Möglicherweise wird ein Überleben und die Vermehrung des Bakteriums über eine derartige Eisenrekrutierung gefördert (OLIVER und KAPER, 2001).

2.5.4.5.3 Adhäsion

Auch für *V. parahaemolyticus* spielt wohl das Adhäsionsvermögen, das ein essentieller Schritt in der Pathogenese der meisten Enteropathogene bildet, eine wichtige Rolle (OLIVER und KAPER, 2001). Man beobachtete, dass alle in einer Studie getesteten Umwelt- wie klinischen Isolate in der Lage waren, sich an menschliche fetale Intestinalzellen (human fetal intestinal cells = HFI- Zellen) zu heften. Bei der Intensität der Anheftung konnten jedoch Unterschiede festgestellt werden. So war bei Patientenisolaten, unabhängig von deren Kanagawa-Reaktion, ein hohes Adhäsionsvermögen festzustellen. Im Fall von Kanagawa-negativen Stämmen, die aus marinen Fischereierzeugnissen isoliert wurden, war die Anheftung dagegen schwächer ausgeprägt (HACKNEY et al., 1980). Einige Adhäsionsfaktoren, wie die äußere Membran, eine laterale Flagelle, Pili oder auch Mannose-resistente Hämagglutinine, wurden bisher zur Diskussion gestellt (NAKASONE und IWANAGA, 1990; OLIVER und KAPER, 2001). Es

Schrifttum

wurde auch über einen groben Zusammenhang zwischen dem Adhäsionsvermögen an menschlicher Dünndarm-Mucosa und dem Grad an Hämagglutinin in klinischen, KP-positiven *V. parahaemolyticus* berichtet. Eine besondere Affinität zeigten die getesteten Stämme dabei zu den M-Zellen der Follikel-assoziierten Epithelzellschicht der Peyer'schen Platten (YAMAMOTO und YOKOTA, 1989). M-Zellen sind spezialisierte Zellen dieser Schicht in der Darmschleimhaut und dienen zu deren immunologischer Überwachung (SCHMIDT et al., 1998). YAMAMOTO und YOKOTA (1989) stellten bei ihren Untersuchungen weiterhin fest, dass 20 Stunden bei 37°C kultivierte Stämme geringere Mengen an Hämagglutininen enthielten, über ein weniger ausgeprägtes Adhäsionsvermögen verfügten und dass sie weniger beweglich waren als diejenigen, die nur drei Stunden bebrütet wurden. Auf der anderen Seite wiesen diese aber eine deutlichere Piliation auf. Die Bedeutung all dieser möglichen Faktoren bei der menschlichen Krankheitsentstehung bleibt bisher allerdings ungeklärt (OLIVER und KAPER, 2001).

2.5.4.5.4 Enzyme

Man geht davon aus, dass außer Hämolysinen auch Enzyme wie Urease, Lipase und Gelatinase zusätzlich zur Pathogenität von *V. parahaemolyticus* beitragen. Unter anderem BAFFONE et al. (2001) überprüften die enzymatische Aktivität von Umweltisolaten halophiler *Vibrio* spp., darunter auch *V. parahaemolyticus*, aus Meerwasser. Sie fanden heraus, dass nahezu alle untersuchten Stämme über Gelatinase- und Lipaseaktivität verfügten.

Ureaseaktivität ist immer wieder mit pathogenen *V. parahaemolyticus*-Stämmen in Verbindung gebracht worden. KAYSNER et al. (1994) berichteten von einem Zusammenhang zwischen der Harnstoffhydrolyse dieses Bakteriums und dem Vermögen, das Kanagawa-Hämolysin zu bilden. Diese Feststellung traf sowohl auf klinische als auch auf Umweltisolate zu. Daraufhin untersuchten OSAWA et al. (1996) 132 Stämme und stellten fest, dass die Ureaseaktivität keinen zuverlässigen Marker für TDH darstellt. Gleichzeitig schien die Urease aber ein Marker für das TDH verwandte Hämolysin (TRH) zu sein. OKUDA et al. (1997 b) bestätigten diese Vermutung, indem sie beobachteten, dass nahezu alle *trh*-haltigen Stämme auch Urease produzierten. Über die Effekte der Urease weiß man, dass sie zumindest bei *Helicobacter pylori* und *Yersinia enterocolitica* zu einer Steigerung der Säuretoleranz führt (DE KONING-WARD und ROBINSON-BROWNE, 1995; TURBETT et al., 1992).

2.5.4.5.5 Typ III Sekretions System

Einen weiteren möglichen Virulenzfaktor von *V. parahaemolyticus* stellt das Typ III-Sekretions-System (TTSS) dar. Darunter versteht man eine funktionelle Einheit von Prokaryonten zur Sekretion und Translokation von Virulenzproteinen im Cytosol der eukaryontischen Zielzelle. Die Existenz einer derartigen Einheit ist bei gram-negativen pathogenen Bakterien wie *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* und Pflanzenpathogenen, bekannt (IIDA et al., 2006).

MAKINO et al. (2003) entdeckten auch zwei Gensets für TTSS (TTSS1 und TTSS2) im Genom von *V. parahaemolyticus*, was den ersten Fund dieser Art bei *Vibrio* spp. überhaupt darstellte. Ein Charakteristikum des Genus *Vibrio* besteht darin, dass ihr Genom aus zwei zirkulären Chromosomen besteht. Im Fall von *V. parahaemolyticus* sind es ein großes von ca. 3 Mb und ein kleineres mit einer Größe von ca 2 Mb (YAMAICHI et al, 1997). MAKINO et al. (2003) konnten die TTSS-Gensets sowohl auf dem großen (TTSS1) als auch innerhalb einer

Schrifttum

Pathogenitätsinsel des kleinen Chromosomenrings (*TTSS2*) eines klinischen, KP-positiven Stammes lokalisieren. Eine anschließende Untersuchung von sowohl klinischen als auch Umweltisolaten zeigte, dass *TTSS2* lediglich bei KP-positiven *V. parahaemolyticus* zu finden ist, wogegen das *TTSS1*-Genet im großen Chromosom aller untersuchten Stämmen vorkommt (IIDA et al., 2006). Um herauszufinden, ob die *TTSS*-Gene überhaupt exprimiert werden und welche Bedeutung ihre Produkte bei der Pathogenität spielen, kreierten die Forscher um PARK verschiedene Mutanten des bereits sequenzierten Stammes und untersuchten deren cytotoxische Auswirkungen auf HeLa Zellen sowie die Enterotoxizität im Kaninchen-Hüft darm-Modell (PARK et al. 2004 a; PARK et al., 2004 b). Bei diesen Studien stellte sich heraus, dass *TTSS1* an einem cytotoxischen Effekt auf HeLa-Zellen und *TTSS 2* an einer Enterotoxizität im Kaninchen-Modell beteiligt sind. Die Bedeutung dieser Beobachtung im Infektionsgeschehen im Menschen blieb bisher noch ungeklärt. So kann man beispielsweise noch nicht sagen, ob *TTSS1*, das in allen *V. parahaemolyticus* Stämmen festgestellt wurde, allein schon eine Infektion auszulösen vermag.

Im Pathomechanismus von Shigellen und Salmonellen spielt *TTSS* als Auslöser entzündlicher Diarrhö eine Schlüsselrolle (IIDA et al., 2006).

Im Rahmen eines Gensequenzenvergleichs mit *V. cholerae* konnten MAKINO et al. (2003) keine solchen Gene feststellen. Homologe zum *TTSS1*-Gen ließen sich auch im Genom von *V. alginolyticus*, *V. tubiashii* und *V. harveyi* identifizieren. Für das *TTSS* letzterer Spezies konnte auch eine Funktionalität attestiert werden (HENKE und BASSLER, 2004).

2.5.5 Tenazität

2.5.5.1 Erforderliche Umweltbedingungen

Wie bei anderen marinen Bakterien auch, bilden Wassertemperatur und Nahrungsangebot für *V. parahaemolyticus* die beiden bedeutendsten Faktoren zur Vermehrung (MORIARTY und BELL, 1993). Dabei ist Kohlenstoff wesentlich, dessen Konzentration eine Größenordnung zwischen 80 μM im Oberflächenwasser und 40 μM in tiefem Wasser aufweist. Dieses Element liegt allerdings als Teil verschiedenster Verbindungen (z.B. Zuckern, Proteinen, Fette) vor, weshalb es dem Bakterium nicht immer zur uneingeschränkten Verfügung steht (WILLIAMS, 2000; MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006). Erreichen einer oder alle diese Faktoren nicht ein akzeptables Maß, so ist das Überleben der Art gefährdet. Um den Fortbestand des Bakteriums für die Zukunft zu gewährleisten, bedarf es deshalb geeigneter Strategien, wie z.B. die effiziente Anpassung an die verschiedenen Gegebenheiten. So werden *Vibrio* spp. sowohl in Gesellschaft höherer Organismen als auch in unbelebter Materie gefunden. Weiterhin machen sie einen nicht unbedeutenden Anteil der Flora des Gastrointestinaltrakts von Fischen und Wirbellosen aus (MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006).

2.5.5.2 Hitzebeständigkeit

VANDERZANT und NICKELSON (1972) untersuchten die Auswirkung von hohen Temperaturen auf *V. parahaemolyticus* und stellten fest, dass dieses Bakterium in geringer Konzentration (500 KbE/ml) in Shrimphomogenat eine Hitzeeinwirkung von 60 bzw. 80°C für 15 Minuten nicht überstand, wohl aber bei einer höheren Konzentration (2×10^6 KbE/ml) überlebte. Nach einer Behandlung von 100°C für 5 Minuten hingegen waren in beiden Ansätzen keine kultivierbaren Zellen mehr nachweisbar. TEMMYO (1960) berichtete dagegen von einer vollständigen Eliminierung von ca. 10^5 KbE/ml *V. parahaemolyticus* in Peptonwasser bei 60°C nach 5 Minuten. Der Befund deutet darauf hin, dass Garnelenfleisch als Matrix dem Bakterium einen gewissen Schutz bietet. DELMORE und CHRISLEY (1979) ermittelten D-Werte von *V. parahaemolyticus*. Dieser Parameter gibt die Zeitspanne an, innerhalb derer die Keimkonzentration einer Spezies bei einer vorgegebenen Temperatur um 90% abnimmt. Bezogen auf *V. parahaemolyticus* in Venusmuschelhomogenat betrug diese Zeitspanne 0,82; 0,66; 0,40 und 0,29 Minuten bei dazugehörigen Temperaturen von 49, 51, 53 und 55 °C (DELMORE und CHRISLEY, 1979). In einer Lösung mit 7,5% NaCl belief sich der D-Wert auf 65,1 min bei 47°C (BEUCHAT und WORTHINGTON, 1976). Weitere Untersuchungen zu diesem Thema demonstrierten jedoch ein gewisses Adaptionsvermögen von *V. parahaemolyticus*-Bakterien gegenüber Wärmeeinwirkung. WONG et al. (2002) beobachteten, dass Zellen dieser Spezies aus der log-Phase, kultiviert bei 25°C, eine Temperaturerhöhung auf 47°C überlebten, wenn sie zuvor 42°C für 30 min ausgesetzt waren. 42°C liegen im äußersten Bereich der normalen Wachstumstemperatur von *V. parahaemolyticus* (BAUMGART, 2007). Wurde hingegen auf diesen Zwischenschritt verzichtet, überlebten die Zellen einen Hitzeschock von 47°C nicht. CHANG et al. (2004) stellten darüber hinaus fest, dass derartig vorbehandelte *V. parahaemolyticus* auch die Einwirkung von 20 ppm Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder 8% Ethanol überlebten. Gleichzeitig war bei derartigen Zellen aber eine höhere Empfindlichkeit gegen Kühlschranks- und Tiefkühltemperaturen (-18 °C) zu verzeichnen. Bei dieser Studie war zum einen eine Änderung der Proteinzusammensetzung (An- und Abstieg ausgewählter Proteinfractionen) der Zellen während des Hitzeschocks von 42°C zu beobachten und zum anderen ein Austritt von Nukleinsäuren. Bemerkenswert ist auch die beginnende Produktion des hitzestabilen direkten Hämolytins (TDH) bei plötzlichem Einwirken dieser Temperatur. Bei einer Behandlung mit 37°C blieb ein derartiger Effekt aus. (WONG et al., 2002; CHANG, 2004).

2.5.5.3 Kältebeständigkeit

Die Auswirkung von Kälte auf das Überleben von *V. parahaemolyticus* überprüften VANDERZANT und NICKELSON (1972) ebenfalls. Sie untersuchten inokuliertes Shrimphomogenat sowie ganze Shrimps bei 10, 7, 3 und -18°C. Nach 8 Tagen Lagerung bei solchen Temperaturen war eine Keimzahlreduktion von 1 bis 2 log zu verzeichnen, wobei der Rückgang in den ersten 12 Stunden am deutlichsten ausfiel. Wurden ganze Shrimps bei 7°C gelagert, folgte einer initialen Reduktion ein leichter Anstieg der Keimzahlen nach den ersten 12 Stunden. Ansonsten war zwischen den beiden Matrices kein Unterschied zu beobachten. Festzuhalten aber blieb, dass auch nach einer Lagerung bei Tiefkühltemperaturen ursprünglich mit 10^5 KbE *V. parahaemolyticus* inokulierte Tiere noch 10^3 KbE/Shrimp aufwiesen. Diese Untersuchungsergebnisse korrelieren mit denen von gefrorenen Garnelen (VANDER-

Schrifttum

ZANT et al., 1970) und gefrorenem Meeressediment (WARD, 1968). MUTANDA-GARRIGA et al. (1995) beobachteten darüber hinaus ein Überleben von *V. parahaemolyticus* während einer Lagerung bei -24°C.

Auch bei Kälteeinwirkung weist *V. parahaemolyticus* ein gewisses Adaptationsvermögen auf. Studien zeigten, dass bei 20 bis 15°C für 2-4 Stunden vorgekühlte Stämme eine höhere Überlebensrate bei 5 und -18°C zeigten. So vorbehandelt, wiesen sie auch eine deutlichere Resistenz gegen Kristallviolett auf, gleichzeitig aber eine größere Empfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen (47°C), Wasserstoffperoxid sowie Milch- und Essigsäure (LIN et al., 2004). Auch die zellulären Veränderungen der Bakterien bei einem Kälteschock wurden untersucht. *Escherichia (E.) coli* diente bei den dazugehörigen Untersuchungen als Modellbakterium (BARTLETT, 2006). INGRAHAM und MARR (1996) berichteten über Veränderungen in der räumlichen Struktur, Membranflexibilität, Proteinen und Nukleinsäuren der meisten Mikroorganismen. Wurde *E. coli* einer deutlichen Temperatursenkung ausgesetzt, so stellte das Bakterium zunächst sein Wachstum ein, akklimatisierte sich über einen Zeitraum von etwa 7 Stunden, um dann sein Wachstum fortzusetzen. Während jener Phase erfolgte ein Anstieg der sogenannten Cold-Shock-Proteine (CSP) (GUALERZI et al., 2004). Einen Hauptteil dieser CSP machen Angehörige der Csp A-Familie mit ihrer überlappenden Funktion aus (XIA, 2001). Zu ihren Aufgaben zählt die Bindung einsträngiger Nukleinsäuren und der Eingriff in deren Sekundärstruktur. Sie fungieren auch als Begleiter von Nukleinsäuren und vereinfachen somit Transkription und Translation bei niedrigen Temperaturen (PHADTARE et al., 2004). Damit könnte es Aufgabe eines Teiles dieser CSP sein, zunächst die Translation zu unterbinden, um Fehlcodes zu vermeiden, während die restlichen CSP die Zelle bei der Anpassung an die tieferen Temperaturen unterstützen (ERMOLENKO und MAKHATADZE, 2002).

2.5.5.4 Säuren- und Basenbeständigkeit

Neben anderen Faktoren untersuchten VANDERZANT und NICKELSON (1972) in ihrer Studie auch die Auswirkung verschiedener pH-Werte auf das Überleben von *V. parahaemolyticus*. Dabei wurden Shrimphomogenate auf die pH-Werte 10,0; 9,0; 8,0; 7,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0 und 1,0 eingestellt. Bei pH-Werten zwischen 6-10 blieben die Keimzahlen auch nach 2 Stunden nahezu unverändert. Wies das Homogenat einen pH-Wert von 5 auf, dann kam es bereits nach 15 Minuten zu einem massiven Keimzahlabfall. Auf pH-Werte zwischen 1 und 4 gebracht, konnten in den Homogenaten bereits nach 5 min keine lebenden Zellen mehr festgestellt werden.

V. parahaemolyticus ist in der Lage, sich zu einem gewissen Grad an erhöhte Wasserstoffionenkonzentrationen anzupassen. WONG et al. (1998) beobachteten, dass bei einem pH-Wert von 7,5 angezüchtete Zellen eine pH-Wert-Senkung auf 4,4 eher widerstanden, wenn sie zuvor für 30 min einem pH-Wert von 5,0 ausgesetzt waren. Diese Überlebensrate konnte sich durch Zwischenschalten eines pH-Werts von 5,8 auch noch steigern. YEUNG und BOOR (2004) gelang sogar der Nachweis von *V. parahaemolyticus* bei einem pH-Wert von 3,6, wenn Zellen der log-Phase zuvor über eine Absenkung auf einen pH-Wert von 5,5 adaptiert worden waren. Derart angepasste Stämme wiesen auch eine höhere Widerstandskraft gegen Temperaturerhöhung (47°C), Kristallviolett, Galle und Desoxycholsäure auf (KOGA et al., 1999). Zellen der stationären Phase erreichten laut YEUNG und BOOR (2004) nach der

Schrifttum

Adaption nicht die gleiche Resistenz und zeigten eine verminderte Zytotoxizität als Zellen der log-Phase. Unabhängig von ihrem Wachstumsstadium war bei adaptierten *V. parahaemolyticus*-Zellen eine 1,2 - 4,8-fach geringere Zytotoxizität festzustellen.

2.5.5.5 Beständigkeit gegen Druck

Im Regelfall können Mikroorganismen hohen Druck überstehen, wachsen jedoch besser unter atmosphärischen Verhältnissen, also bei 1,013 bar. *Vibrio* spp. gelten gemeinhin als empfindlich gegenüber Druck (HOOVER et al., 1989). Einige Wissenschaftler untersuchten die Auswirkung von hohen Drücken auf *V. parahaemolyticus*. STYLES et al. (1991) berichteten von einer Reduktion von *V. parahaemolyticus* um 5 log-Stufen, nachdem sie in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) suspendiert 170 Megapascal (MPa) für 30 Minuten ausgesetzt waren. Eine Verringerung der Keimzahl um 6 log-Stufen in PBS gelang KOO et al. (2006) bei einem Druck von 241 MPa für 11 Minuten (inklusive 3 min Druckaufbau). CALIK et al. (2002) berichteten von einer kompletten Zerstörung der Keime in PBS innerhalb von 50 Sekunden bei 345 MPa bzw. 150 Sekunden bei 310 MPa, wobei die Ausgangskonzentration 10^8 KbE/g betrug.

Bei inokulierten Austern ergaben sich allerdings bis zu dreimal längere Zeitspannen für ein vergleichbares Reduktionsergebnis (KOO et al. 2006). CALIK et al. (2002) beobachteten bei inokulierten Austern nach 3 Minuten bei 310 MPa immer noch überlebende Vibrionen, nach 2 Minuten bei 345 MPa stellten sie dagegen keine Überlebenden mehr fest. KOO et al. (2006) fanden eine Reduktion von *V. parahaemolyticus* in ganzen Austern um 4,5 log Stufen nach 7,7 Minuten (inklusive 6,7 Minuten Druckaufbau) und eine vollständige Eliminierung des Pathogens bei 586 MPa schon während der 8-minütigen Druckaufbauzeit.

2.5.5.6 Beständigkeit gegenüber ionisierender Strahlung

Vibrio spp. zählen zu den Bakterien, die besonders empfindlich auf γ -Strahlung reagieren (MALLET et al. 1991). MATCHES und LISTON (1971) stellten fest, dass *V. parahaemolyticus* in Austernfleisch bei 0,3 bis 0,4 kGy um 4 bis 6 log₁₀ reduziert wurde. Bei inokulierten ganzen Austern mit 10^4 KbE/g pathogenen *V. parahaemolyticus* waren nach einer Behandlung mit 1,5 kGy keine lebenden Zellen mehr nachzuweisen (ANDREWS et al., 2003).

2.5.5.7 Beständigkeit im Magen-Darm-Trakt

VANDERZANT und NICKELSON (1972) untersuchten ebenfalls die Überlebensrate von *V. parahaemolyticus* im Inhalt verschiedener Abschnitte des Magendarm-Trakts von Schweinen während insgesamt acht Stunden bei 37°C. Die Wahl fiel auf diese Tierart, da deren Intestinaltrakt dem menschlichen sehr ähnelt. Die Inhalte von Magen, Dünn- und Dickdarm wurden jeweils mit 10^6 KbE *V. parahaemolyticus*/g inokuliert. Der aus frischem Grünfütter bestehende Mageninhalt besaß einen pH-Wert von 6,0. Dünn- und Dickdarminhalt wiesen einen pH-Wert von 7,2 bzw. 8,1 auf. Im Mageninhalt fand sogleich eine 100-fache Reduktion der Keimzahl statt, welche in den folgenden 30 Minuten nochmals um das 10-fache dezimiert wurde. Für die nächsten 1,5 Stunden blieb immerhin eine Keimkonzentration von 10^3 KbE/g erhalten. Nach Auffassung von FISHER et al. (1970) hängt die Effektivität der Magensäure als Keimbarriere von der Proteinzusammensetzung der Ingesta ab. In

Anwesenheit von Nahrung kann der pH-Wert des Mageninhalts deshalb deutlich ansteigen. In Dünn- und Dickdarm sank die Keimzahl während der ersten beiden Stunden ebenfalls, stieg aber danach wieder an und erreichte im Dünndarm sogar die Ausgangskonzentration (VANDERZANT und NICKELSON, 1972).

2.5.6 Vorkommen

2.5.6.1 Vorkommen in mariner Umgebung

V. parahaemolyticus ist an die Bedingungen von Küstengewässern angepasst, in denen dieses Bakterium weltweit vorkommt. Auch in deutschen Biotopen, wie Nord- und Ostseeküste oder auch im Unterlauf der Elbe, wird dieser Keim regelmäßig nachgewiesen (FELDHUSEN, 1999; BAUMGART, 2007). An der Küste findet man *Vibrio* spp. in Konzentrationen zwischen 10^2 bis 10^5 KbE/ml (EILERS et al., 2000; HEIDELBERG et al., 2002; THOMPSON et al., 2004 und 2005a). Wie andere *Vibrio* spp. (*V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*) dieses Lebensraumes vermag, *V. parahaemolyticus* noch bei Temperaturen zwischen 14 (-19) und 45°C und innerhalb einer großen Bandbreite an Salzkonzentrationen zu wachsen (OLIVER und KAPER, 2001; URAKAWA und RIVERA, 2006).

Die nachweisbare Dichte an *Vibrio* spp. im Wasser hängt stark von Untersuchungsmethode, geographischer Lage und Jahreszeit, aber auch vom Salzgehalt ab (AUSTIN et al. 1979; DE PAOLA et al., 1990; KASPAR und TAMPLIN, 1993; MOTES et al., 1998; RANDA et al., 2004). Weiterhin konnten LEE und RUBY (1994) einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Wirtsorganismen dokumentieren. Bezüglich der Methode kamen diese Wissenschaftler zum Ergebnis, dass die Menge an kulturell nachgewiesenen *Vibrio* spp. deutlich vom eingesetzten Kulturmedium abhängt. So ließen sich die höchsten *Vibrio*-Keimzahlen auf TCBS-Agar gefolgt von Simidu-Medium verzeichnen. Hinsichtlich der Temperaturgegebenheiten, liegen die höchsten Nachweisraten an *V. parahaemolyticus* in den wärmeren Monaten vor. Im Januar oder Februar finden sich in der Regel keine *V. parahaemolyticus* im Wasser (AUSTIN et al. 1979; FDA, 2005; HACKNEY et al., 1980). Nach Meinung von KANEKO und COLWELL (1978) reflektiert das Aufkommen von *Vibrio* spp. die Wassertemperatur. Der Bereich zwischen 14 und 19°C stellte dabei die kritische untere Wassertemperatur hinsichtlich des Nachweises von *V. parahaemolyticus* dar.

Bei einem Vergleich der saisonalen und regionalen *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen von Meerwasser und Austern aus Pazifik, Golf von Mexiko und Atlantik stellten DE PAOLA et al. (1990) deutliche regionale Unterschiede fest. Mit 22°C war die Golfküste am wärmsten und erbrachte mit $1,1 \times 10^4$ KbE/100 g Austern und 44 KbE/ml Meerwasser auch die höchste durchschnittliche Nachweisrate. Die Pazifikküste, mit 15°C die kälteste Region, zeigte mit $2,1 \times 10^3$ KbE/100 g Austern und 2 KbE/ml Meerwasser die geringsten durchschnittlichen *V. parahaemolyticus*-Funde. *V. parahaemolyticus* wurde immerhin in so nördlichen Gewässern wie denen Alaskas, Long Islands und New Yorks nachgewiesen (MC LAUGHLIN et al., 2005; TEPEDINO, 1982).

In Bezug auf den Salzgehalt des Wassers bevorzugt dieses Bakterium eine mäßige Konzentration von unter 13 ppt (=parts per trillion) (HACKNEY et al., 1980; KELLY and STROH, 1988). Indische Wissenschaftler sehen auch einen Zusammenhang zwischen dem Monsun und

Schrifttum

darauf folgenden geringen *Vibrio*-Funden, da die Monsun-bedingten zusätzlichen Regenwassermengen die Salzkonzentration sinken lassen (GOPAL et al., 2005). Geringe Mengen dieser Spezies (< 5 KbE/Liter) wurden bei warmen Temperaturen allerdings auch in Frischwasser nachgewiesen (KANEKO und COLWELL, 1978). Interessant ist dabei, dass mit sinkenden Temperaturen der Anteil an pathogenen (definiert durch das Vorhandensein von hitzestabilen Hämolytinen) *V. parahaemolyticus* steigt (DE PAOLA et al., 2003 b)

Auch in marinen Ablagerungen ist *V. parahaemolyticus* zu finden. In einer Studie stellten WILLIAMS und LA ROCK (1985) diesen Keim am häufigsten in einer Sedimentschicht oberhalb von 5 cm fest, fanden das Bakterium aber auch in einer Tiefe von 12 cm.

Das Vorkommen von *Vibrio* spp. wird zudem stark vom Planktonaufkommen beeinflusst (KANEKO und COLWELL, 1975; SIMIDU et al., 1971; SOCHARD et al., 1979). Dabei beherbergt Zooplankton (Plankton tierischer Natur) mehr *Vibrio* spp. als Phytoplankton (Plankton pflanzlicher Natur) (SIMIDU et al., 1977; SOCHARD et al., 1979). *Vibrio* ist das am häufigsten auftretende Bakteriengenus bei Ruderfüßern (Copepoda) und zählen auch zu der Flora von Pfeilwürmern (Chaetognatha) (NAIR et al., 1988; SIMIDU et al., 1971). Pro Gramm Plankton Nassgewicht sind bis zu 10^9 KbE an *V. parahaemolyticus* nachgewiesen worden. Im Wasser wurden gleichzeitig nur 10^2 KbE/ml entdeckt (KANEKO und COLWELL, 1973). HUG et al. (1983) konnten unterschiedliche Funde in Zooplankton und Wasser bestätigen. Als Bakterium mit Chitinabbauvermögen (KANEKO und COLWELL, 1973) wird das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in erster Linie durch chitinhaltiges Zooplankton gefördert (WATKINS und CABELLI, 1985). Ein niedriger Salzgehalt des Wassers begünstigt die Aufnahme von *Vibrio* spp. in Ruderfüßern (KANEKO und COLWELL, 1978).

2.5.6.2 Vorkommen in Lebensmitteln

V. parahaemolyticus ist in und an einem breiten Spektrum mariner Tierarten zu finden. So isoliert man das Bakterium regelmäßig aus Fischen und Schalentieren, wie zum Beispiel Austern, Hummern, Krabben, Shrimps, Venusmuscheln, Jakobsmuscheln, Miesmuscheln und anderem aus dem Meer gewonnenen Lebensmitteln tierischer Herkunft. *Vibrio* spp. sind Teil der autochthonen Mikroflora von Küstengewässern. Deshalb geht man davon aus, dass 30 bis 100% der Fische und marinen Fischereierzeugnisse dieser Standorte belastet sein können (KLEER und SINELL, 2007). Bei Austern und Jakobsmuscheln kommen *Vibrio* spp. überwiegend in Gewebe des Verdauungsapparates vor (DE PAOLA et al., 1997; GREENBERG et al., 1982; TAMPLIN und CAPERS, 1992). Hierdurch bestätigt sich die Vermutung von BAUMANN und BAUMANN (1977), die marine *Vibrio* spp. als marine Darmbakterien betrachteten.

- Fisch und marine Fischereierzeugnisse allgemein

Bereits 1975 und 1976 wurden in Großbritannien zahlreiche Schalentiere mikrobiologisch untersucht. Dabei fand man in 14% der frisch geernteten Muscheln *V. parahaemolyticus*. Die meisten Nachweise gelangen in den Sommermonaten (AYRES and BARROW, 1978). In einer weiteren umfangreichen Studie an gekochten und verzehrfertigen, geschälten Weichtieren (Herz- und Miesmuscheln sowie Wellhornschnecken), von denen etwa ein Drittel in Essig eingelegt war, wurde eine Prävalenz für *V. parahaemolyticus* von

Schrifttum

3% festgestellt (LITTLE et al., 1997).

In den Niederlanden (99 Proben) und Belgien (1299 Proben) ergab sich eine Häufigkeit in Schalentieren von 26 bzw. 24% (SCIPIONI, 2000; TILBURG et al., 2000). Bei Fisch, Shrimps und Muscheln aus der Adria Kroatiens stellten JAKŠIĆ et al. (2002) *V. parahaemolyticus* in 9,4% aller Proben fest.

Im französischen nationalen Referenzzentrum für Vibrionen und Cholera isolierte man 193 *Vibrio*-Stämme aus importierten marinen Fischereierzeugnissen aus 9 Ländern (China, Ecuador, Indien, Iran, Madagaskar, Senegal, Tansania, Thailand und Vietnam). 94 Stämme davon und damit 48,5% wurden dabei als *V. parahaemolyticus* identifiziert (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001).

- Austern

Eine US-amerikanische Untersuchung an marinen Fischereierzeugnissen ergab eine Belastung mit *V. parahaemolyticus* bei 86% aller Proben mit Keimzahlen von bis zu $1,3 \times 10^3$ KbE/g in Austern und $1,0 \times 10^3$ KbE/g in Krabbenfleisch, wobei 10 KbE /g für dieses Lebensmittel erwartet wurden (OLIVER und KAPER, 2001). In einer Studie von DE PAOLA et al. (2003 b) an Austern aus Alabama ergab sich sogar eine Kontamination mit *V. parahaemolyticus* von maximal $1,2 \times 10^4$ KbE/g Austern, wobei sich 21,8% der Stämme als pathogen erwiesen. LOWRY et al. (1989) stellten in ihrer Studie *V. parahaemolyticus* in 100% der untersuchten Austern fest. Indische Wissenschaftler ermittelten eine Inzidenz von 93,8% für *V. parahaemolyticus* in Austern bezogen auf ein Jahr. Von den Isolaten wurden 10,2% als pathogen eingestuft wurden. Die durchschnittliche Keimzahl lag bei $5,4 \times 10^3$ KbE/g an einer Probenahmestelle und $2,7 \times 10^3$ KbE/g an einer zweiten Probennahmestelle (DEEPANJALI et al., 2005).

- Miesmuscheln

SUNÉN et al. (1995) fanden in 36,36% von Miesmuschelproben aus dem spanischen Handel *V. parahaemolyticus*. Bei einer Untersuchung in Italien wurden von insgesamt 62 Miesmuschel-Proben aus der Adria, die zwischen September und Januar geerntet worden waren, lediglich eine positiv auf dieses Bakterium getestet (RIPABELLI et al, 1999). In einer späteren Studie, die über 3 Jahre verlief, ergaben sich bei Handelsproben von Miesmuscheln aus der Puglia-Region (Italien) 7,83% positive Ergebnisse (NORMANNO et al., 2006). In einer norwegischen Erhebung mit 885 Miesmuschelproben wurde aus 10, 3% der Proben dieser Keim isoliert (BAUER et al, 2006). Nach Untersuchungen des Instituts für Fischkunde Cuxhaven des niedersächsischen Landesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) aus dem Jahr 2007 waren 34% der untersuchten Muschelproben *V. parahaemolyticus*-positiv (BARTELT, 2008). In den Jahren 2004/2005 lag dieser Anteil noch bei 29,3% (LHAFI, 2006). Aussagen von STENGEL (2008) zufolge machte das Landeslabor in Neumünster, Schleswig-Holstein, ähnliche Beobachtungen wie die Kollegen in Niedersachsen.

Einige Autoren konnten beobachten, dass die Mengen an *Vibrio* spp., die sich in den verschiedenen Geweben von Muscheln aufgrund derer Filtrationstätigkeit biologisch akkumulieren, um bis zu 100 fach größer ausfallen als die des dazugehörigen Meerwassers (CROCI et al., 2001; JAKSIC, 2002; PRESEPI et al., 1997; RICHARDS, 1998). Bakterienkonzentrationen können aber auch innerhalb einer Charge Muscheln individuell

variieren (KAUFMAN et al., 2003; LART und HUDSON, 1997; YOUNGER et al., 2005).

2.5.7 Epidemiologie

2.5.7.1 Vektoren

Vögel stehen im Verdacht, als Vektoren für *Vibrio* spp. zu fungieren. So ist im Winter *V. cholerae* in geringem Maße aus dem Kot von Seevögeln, wie Möwen und Enten, isoliert worden, während sie gleichzeitig im Meerwasser nicht nachweisbar waren (BISGAARD und DRISTENSEN, 1975; LEE et al., 1981). ROBERTS et al. (1984) gelang es ebenfalls, *V. parahaemolyticus* zusammen mit *V. cholerae* und anderen Laktose-positiven *Vibrio* spp. im Fäzes von Vögeln nachzuweisen. Während der Wintermonate konnten MIYASAKA et al. (2005) in japanischen Seevögeln ebenfalls *V. parahaemolyticus* mit einer Prävalenz von 55,4% detektieren. Die nachgewiesenen Keimzahlen bei den erwähnten Untersuchungen nahmen durchweg niedrige Werte an (DRAKE et al., 2007). Die recht geringe Generationszeit der meisten *Vibrio* spp. gestattet es ihnen jedoch, ein wachsendes Nahrungsangebot für sich zu nutzen und damit andere Spezies zu verdrängen (GIOVANNI und RAPPÉ, 2000). So würde die niedrige Zellzahl von *V. parahaemolyticus* im Fäzes der Vögel zum Überdauern des Winters durchaus genügen, und *V. parahaemolyticus* könnte sich ab 14 bis 19 °C Wassertemperatur wieder regenerieren (KANEKO und COLWELL, 1978).

Auch die Affinität von *V. parahaemolyticus* zu Protozoen (s. Zooplankton) begünstigt seine Überlebenschance in den Wintermonaten. Die Keime werden dort nicht nur nachgewiesen, sondern sind auch in der Lage, sich in den Einzellern zu vermehren, weshalb beispielsweise Amöben eine Infektionsquelle darstellen könnten (BARKER und BROWN, 1994). Einige andere Studien betonen ebenfalls die Bedeutung von Zooplankton und anderen marinen Organismen als wichtiges Reservoir für *Vibrio* spp. (BARKER und BROWN, 1994; DUMONTET et al., 1996; MONTANARI et al., 1999).

2.5.7.2 Sediment

Sediment scheint für *V. parahaemolyticus* ebenso als Reservoir während ungünstiger Umweltgegebenheiten zu dienen. KANEKO und COLWELL (1973) beobachteten eine saisonbedingte Wanderung von *V. parahaemolyticus*. Während sich das Bakterium in den Sommermonaten in Zooplankton aufhielt, trat es im Winter verstärkt im maritimen Sediment auf. Interessant ist dabei, dass Angehörige des Genus *Vibrio* in der Regel einen geringen Teil der bakteriellen Flora des Sedimentes ausmachen, *V. parahaemolyticus* dort aber das ganze Jahr nachzuweisen ist.

2.5.7.3 Biofilmbildung

Biofilme setzen sich aus mikrobiellen Gemeinschaften zusammen, die sich an Oberflächen ihrer Umwelt anheften. Für gewöhnlich hüllen sie sich dabei in extrazelluläre Polysaccharide oder eine Schleimmatrix. Dabei können sich Biofilme auf jeder Art von Oberflächen bilden, an der ausreichend Feuchtigkeit und Nährstoffe vorhanden sind. Deshalb entwickeln sich

Schrifttum

Biofilme besonders schnell in fließenden Systemen (STURMAN et al., 2007). Zellen aus solch einer Formation können sich durch Ausbildung entsprechender Phänotypen aktiv gegen Fraß durch Protozoen schützen. Sie werden innerhalb dieses Films oftmals resistenter gegen Umwelteinflüsse, wie z.B. Säure (MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006). Es besteht die Hypothese, dass derart gestärkte pathogene Bakterien sich so gegen Abwehrmaßnahmen oder Einrichtungen ihres Wirtsorganismus, wie zum Beispiel der Magensäure, besser zu schützen vermögen (ZHU und MEKALANOS, 2003). Für viele *Vibrio* spp. ist die Ausbildung von Biofilmen beschrieben worden, so auch *V. parahaemolyticus*. Bei der Untersuchung dieses Phänomens hat man festgestellt, dass besonders in Minimalmedien kultivierte *V. parahaemolyticus*-Zellen eine Neigung zum Anheften entwickeln. Die Zugabe von Glukose und anderen Zuckern verhinderte sogar eine Anheftung (MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006; WONG et al., 2002). Die Biofilm-bedingte Anhaftung auf abiotischen und biotischen Oberflächen scheint sogar wichtig für das Überleben von Vibrionen, wie *V. parahaemolyticus*, in der Umwelt zu sein. Zu den besiedelten Oberflächen zählen Pflanzen, Fadenalgen, Pfeilwürmer, Krustaceen und Insekten (DUMONTET et al., 1996; HOOD und WINTER, 1997; KUMAZAWA et al., 1991; MONTANARI et al., 1999). Bakterien innerhalb eines Biofilms zeichnen sich durch langsamere Wachstumsraten mit einem reduzierten Stoffwechsel aus. Einige befinden sich im VBNC-Stadium (siehe 2.5.7.4), einem Ruhezustand der Zellen. Diese Phase der Untätigkeit bietet gleichzeitig Schutz vor negativen Umwelteinflüssen, da zum Beispiel auch keine antibiotisch wirksamen Gifte aufgenommen werden können (SZEWZYK und SZEWZYK, 2003).

2.5.7.4 Viable-but-non culturable-Stadium (VBNC)

Wenn *Vibrio* spp. dauerhaftem Stress, wie einer niedrigen Temperatur, ausgesetzt sind, so sinkt zwar die Zahl kultivierbarer Zellen doch bleibt die Gesamtzahl lebender Zellen konstant (OLIVER, 1995). Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz bietet der Eintritt dieser Bakterien in das Viable-but-non culturable-Stadium (VBNC) (BARER et al., 1993; COLWELL et al., 1983; OLIVER, 1993). Bei Zellen aus mariner Umgebung beschrieben XU et al. (1982) erstmalig diese Phase. OLIVER (1993) definiert Zellen des VBNC-Stadiums als nachweisbar metabolisch aktiv, jedoch gleichzeitig nicht in der Lage, ihr Zellteilungsvermögen aufrecht zu erhalten. Bisher ist dieses Phänomen bei 60 verschiedenen Bakterienarten beschrieben worden, darunter auch pathogene Spezies wie *V. parahaemolyticus* (OLIVER, 2005). Einige Stressoren sind bisher als Auslöser identifiziert worden. Darunter fallen Nahrungsmangel, ein inadäquater Salzgehalt, sichtbares Licht, niedrige Temperaturen sowie ein suboptimaler pH-Wert (GAUTHIER, 2000; MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006). Auch an *V. parahaemolyticus*-Stämmen wurden einige Untersuchungen durchgeführt, bei denen das VBNC-Stadium induziert wurde. Dies geschah entweder durch die Überführung optimal gezüchteter Zellen in Minimalmedien, z.B. Morita-Mineralisalzlösung (0,5% NaCl) und Inkubation bei 5°C, oder das Transferieren dieser Mikroorganismen in künstlich hergestelltes Meerwasser bei gleicher Temperatur (BAFFONE et al., 2003; COUTARD et al., 2005; COUTARD et al., 2007; WONG et al., 2004 a; WONG und WANG, 2004). Innerhalb der ersten Woche stellte sich eine Änderung der Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran ein und zwar zu Gunsten der gesättigten Pentadecansäure (C 15:0) und zu Lasten der ungesättigten Palmitinsäure (C 16:1). Eine Verschiebung des Fettsäureverhältnisses in Richtung gesättigter Fettsäuren war generell festzustellen. Gleichzeitig ließ sich keine Aktivität

Schrifttum

des Enzyms Superoxiddismutase, einem Enzym zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffverbindungen, mehr nachweisen. Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die in den Pentosephosphat-Zyklus eingreift, blieb dagegen auf dem ursprünglichen Niveau. Die induzierten VBNC-Zellen zeichneten sich durch eine höhere Resistenz gegen thermalen Stress von 42 bzw. 47°C, Salzkonzentrations-Stress (0%NaCl) und Säurestress (pH-Wert 4,0) aus (WONG und WANG, 2004).

VBNC-Zellen neigen zur Klumpenbildung, was auf eine Produktion von Exopolysacchariden hinweist und wodurch es zu einer Bläschenbildung (= engl. blebbing) in der äußeren Membran kommt (JOHNSTON und BROWN, 2002). Das sogenannte Blebbing stellt einen bekannten Resistenzmechanismus bei Bakterien dar (JOHNES et al., 1989).

Ältere Studien verneinten die Existenz solch eines VBNC-Stadiums und betrachteten nicht kultivierbare Zellen schlichtweg als tote Organismen (BOGOSIAN et al., 1996; BOGOSIAN et al., 1998; KELL et al., 1998). Sie argumentierten mit einer fehlenden Wiederbelebbarkeit dieser Zellen (MC DOUGALD und KJELLEBERG, 2006). Dieser Einwand wurde von einigen Studien, in denen induzierte VBNC-Zellen wieder kultiviert werden konnten, entkräftet (BAFFONE et al., 2003; COUTARD et al., 2005; COUTARD et al., 2007; WONG et al., 2004 a). So konnte *V. parahaemolyticus* im VBNC-Stadium in Minimalmedium nach einer Temperaturerhöhung auf 25°C innerhalb von 3 Tagen wiederbelebt werden. Die tatsächliche Wiederbelebungszeit war dabei Stamm-abhängig (WONG et al., 2004 b). COUTARD et al. (2007) gelang ebenfalls eine Wiederbelebung bei 20 und 37°C. Diese Autoren konnten weiterhin die Expression von Housekeeping-Genen bei Zellen dieses Stadiums feststellen, was ein Kennzeichen für die Lebensfähigkeit darstellt.

Bei der Wiederbelebung ist die Verwendung von Minimalmedien erforderlich. Als Folge des Sterilisationsprozesses enthalten nährstoffreiche Medien reaktive Sauerstoffverbindungen, durch die VBNC Zellen aufgrund ihres Mangels an Superoxiddismutase Schaden nehmen (BAIRD-PARKER und DAVENPORT, 1965; RAYMAN et al., 1978; WONG et al., 2004 a).

Auch die Virulenz von VBNC-Zellen haben einige Studien beleuchtet. In einer Untersuchung stellten OLIVER und BOCKIAN (1995) fest, dass eine intraperitoneale Applikation von 10⁵ VBNC-Zellen von *V. vulnificus* auf Mäuse tödlich wirkte. Nach WONG et al. (2004 a) verringerte sich dagegen die ursprüngliche Cytotoxizität der Bakterien gegen HEp 2-Zellen nach dem Versetzen in den VBNC-Zustand. Französische Forscher konnten während des VBNC-Zustandes auch keine Expression der *tdh1*, *tdh2* oder TTSS Gene, deren Produkte unter anderem als Virulenzfaktoren von *V. parahaemolyticus* betrachtet werden, feststellen. Nach einer einfachen Wiederbelebung durch Temperaturerhöhung war immer noch keine Transkription der betrachteten Virulenzgene nachweisbar (COUTARD et al., 2005; COUTARD et al., 2007). Dennoch ließ sich die Virulenz wiederherstellen. WONG et al. (2004a) gelang dies nach Anzucht auf einem Selektivmedium mit anschließender Injektion in Mäuse (in vivo-Wiederbelebung). BAFFONE et al. (2003) erreichten den gleichen Effekt nach direkter Verabreichung der VBNC-Zellen an Mäuse und darauffolgendem zweimaligen Passagieren im Ratten-Hüftdarm-Modell.

2.5.7.5 Regenerationsvermögen

Nach einem umweltbedingten Rückgang der Keimzahl und/oder reduziertem Stoffwechsel ist die anschließende Regeneration zum Zeitpunkt, an dem akzeptable/optimale Umweltbedin-

Schrifttum

gungen wieder erreicht werden, für den Fortbestand der Spezies essentiell. Dank einer relativen kurzen Generationszeit kann sich der Bestand an *V. parahaemolyticus* recht schnell erholen. Dieser Mikroorganismus benötigt unter kulturellen Bedingungen bei 37°C nur 8-9 Minuten, um seine Anzahl zu verdoppeln. Aber auch in marinen Fischereierzeugnissen wie rohen Pferdemaikrelen oder gekochten Oktopoden benötigt diese Spezies dafür nur 12-18 Minuten (OLIVER und KAPER, 2001; TWEDT, 1989). Bereits ab 8,3°C in Kulturmedium wurde ein Wachstum beobachtet (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001). In homogenisierten Austern vermehrte sich *V. parahaemolyticus* bei 12°C innerhalb von 7 Tagen von 5×10^3 KbE/g auf 5×10^8 KbE/g. Bei 25°C dauerte es 24 Stunden, um die Keimzahl von 10^2 KbE/g auf 10^8 KbE/g in homogenisierten Shrimps zu erhöhen (TWEDT, 1989).

2.5.7.6 Humane Krankheitsfälle und Ausbrüche

Infektionen des Magen-Darm-Trakts durch *V. parahaemolyticus* sind fast ausschließlich mit dem vorausgegangenen Genuss von ungekochten, unzureichend gekochten oder gekochten, aber rekontaminierten marinen Fischereierzeugnissen verbunden. Der erste Ausbruch, der mit diesem Keim in Verbindung gebracht wurde, fand 1951 in Osaka, Japan statt und betraf 272 Personen, von denen 20 Patienten starben. Alle Betroffenen hatten ein halbtrockenes Fischprodukt verzehrt (FUJINO et al., 1953). Bis Ende der 1960er/Anfang der 1970er wurde *V. parahaemolyticus* als Auslöser von Durchfall schon weltweit anerkannt (FDA, 2005).

Anfang der 80er Jahre wurde in Deutschland die erste *V. parahaemolyticus* bedingte Infektion dokumentiert. Nach dem Verkosten frischer, nicht ausreichend gegarter Venusmuscheln, importiert von der französischen Atlantikküste, entwickelte ein 42-jähriger Mann eine heftige Gastroenteritis mit Durchfall, Magenschmerzen und Abgeschlagenheit (MIHALOVIĆ et al., 1982).

In den 60er Jahren stellte *V. parahaemolyticus* die wichtigste Ursache von lebensmittelbedingten Krankheiten in Japan dar, denn bis zu 70% der einschlägigen Infektionen wurden diesem Mikroorganismus zugeschrieben (TWEDT, 1989). Bis 1994 verbuchten die japanischen Gesundheitsbehörden einen Rückgang von *V. parahaemolyticus*-Infektionen. In den Jahren 1994 und 1995 allerdings gab es wieder 2584 Meldungen, mit einem jeweiligen Peak der Fälle im August. In diesem Zeitraum überschritten *V. parahaemolyticus*-Lebensmittelinfektionen zahlenmäßig sogar die der Salmonellosen (IDSC, 1999). Zwischen 1996 und 1998 registrierte man in Japan 5210 *V. parahaemolyticus*-bedingte Lebensmittelinfektionen, davon mehrere hundert Ausbrüche mit geringeren Fallzahlen (unter 50 Patienten). Zugleich ereigneten sich aber auch zwei große Ausbrüche. Einer davon trat im Jahr 1996 auf, und betraf 691 Personen nach dem Genuss gekochter Krabben. Ein weiterer mit 1167 Patienten geschah im Jahr 1998 nach dem Verzehr einer „außer Haus“ gelieferten Mahlzeit (IDSC, 1999; ANONYM, 1999). Im Zeitraum 2000-2007 registrierten die japanischen Behörden insgesamt 3417 *V. parahaemolyticus*-Infektionen (IDSC, 2009)

In den USA gab es 1971 erste bestätigte Infektionen in Maryland nach dem Verzehr gedämpfter Krabben (DADISMAN et al., 1972). Insgesamt 40 Ausbrüche in 15 Bundesstaaten und dem Außengebiet Guam wurden den Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in der Zeit zwischen 1973 und 1998 gemeldet. All diese Fälle standen in Zusammenhang mit dem Konsum von marinen Fischereierzeugnissen und betrafen bis zu 416 Menschen in einem einzigen Ausbruch. Andere Quellen berichten von 42 Ausbrüche allein in der Zeit

Schrifttum

zwischen 1973 und 1987 (BEAN und GRIFFIN, 1990). Der bisher größte Ausbruch in den USA fand im Sommer 1978 statt und umfasste 1133 Personen (von insgesamt 1700), die bei einem Abendessen gekochte Shrimps zu sich genommen hatten. Diese Garnelen wurden am Morgen gekocht, wieder in die Holzschachteln (Lieferstandard) verpackt, in denen sie geliefert worden waren, und im warmen Zustand 40 Meilen in einem ungekühlten LKW transportiert. Bis zum Servieren vergingen vor Ort noch 7 bis 8 Stunden (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001). Seit 1998 ereigneten sich noch 4 weitere Ausbrüche, darunter je einer in New York und New Jersey 2002 mit 7 bzw. 11 Betroffenen und ein weiterer 2004 in Alaska mit 48 Patienten. Im Jahr 2006 wurden in New York, Oregon und Washington zusammen 177 Fälle von *V. parahaemolyticus* bedingten Lebensmittelinfektionen registriert (AGASAN, 2002; CDC, 2006; NEW JERSEY DEPT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION, 2002; POTEPA, 2004).

Einer Risikobewertung der FDA zufolge erwartet man in den USA jährlich 4500 *V. parahaemolyticus*-bedingte Erkrankungsfälle. Diese Schätzung schließt eine Dunkelziffer von 20 tatsächlichen Fällen auf einen registrierten Fall ein (FDA, 2005). Im Zeitraum von 2000-2007 wurden in den USA insgesamt 1703 *V. parahaemolyticus*-Infektionen dokumentiert (CDC, 2009).

Auch in Europa ereignen sich regelmäßig Infektionen mit *V. parahaemolyticus*. Dabei ist nicht nur Südeuropa betroffen, sondern die Fälle verteilen sich über den gesamten Kontinent.

Für den April 1997 vermeldete Frankreich einen Ausbruch, der 44 Menschen betraf. Diese Personen verzehrten im April 1997 aus Asien importierte Shrimps und entwickelten daraufhin gastrointestinale Symptome (LEMOINE et al., 1999). Zusätzlich wurden in einer retrospektiven Studie bezüglich Infektionen durch non-cholera-*Vibrio* spp. 7 weitere Infektionen mit *V. parahaemolyticus* beschrieben. 6 der Betroffenen hatten eine Magendarminfektion. Bei zwei dieser Personen handelte es sich um eine Infektion auf einer Asienreise und zwei weitere hatten zuvor rohe Austern zu sich genommen. Die Ursache der Erkrankung der beiden verbliebenen Patienten ließ sich nicht ermitteln. Eine immungeschwächte Person entwickelte sogar eine Septikämie (GENESTE et al., 2000).

In Spanien kam es im Jahre 1989 zu acht Fällen akuter Gastroenteritis, ausgelöst durch *V. parahaemolyticus* (MOLERO et al., 1989). Zwischen 1995 und 1998 wurden in diesem Land weitere 19 Durchfallerkrankungen im Zusammenhang mit diesem Pathogen gemeldet (ANONYM, 1996 und 1998). Im August/September 1999 gab es in Galizien nach dem Verzehr roher Austern aus einem der typischen Straßenläden wieder einen Ausbruch mit 64 betroffenen Personen (LOZANO-LEON et al., 2003). Im Zeitraum 2000 bis 2006 lagen dem INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (ISCIII, 2009) insgesamt 21 Berichte über *V. parahaemolyticus*-bedingte Erkrankungen vor.

In Großbritannien sind zwischen 1994 und 1999 121 Infektionen belegt, 115 davon ereigneten sich in England und Wales zwischen 1995 und 1999 und 6 in Schottland in der Zeit von 1994 bis 1999 (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001). Durch das COMMUNICABLE DISEASE SURVEILLANCE CENTER (CDSC) Nordirland wurden für den Zeitraum zwischen 1990 und 1999 keine Fälle registriert (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001).

Aus Dänemark berichteten HORNSTRUP und GAHRN-HANSEN (1993) über 23 dokumentierte Fälle von Wund- (13 Patienten) und Ohrinfektionen (10 Patienten) durch *V. parahaemolyticus* zwischen 1987 und 1992. Dem STATENS SERUM INSTITUT in Kopenhagen

Schrifttum

wurden zwischen 1980 und 2000 auch zwei Fälle von Gastroenteritis bekannt (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001). Im Jahre 2006 wurden aus weiteren 7 Patienten *V. parahaemolyticus* aus Wunden (3 Fälle), Ohren (2 Fälle) und Blut (1 Fall) sowie aus nicht weiter spezifizierten Quellen (1 Fall) isoliert (ANDERSEN, 2006).

Schweden verzeichnete zwischen 1992 und 1997 einen Ausbruch mit 350 Betroffenen nach dem Genuss von Flusskrebse aus China (LINDQUIST et al., 2000).

Auch in Norwegen gab es nach bisher unveröffentlichten Daten 4 Infektionen mit *V. parahaemolyticus* im Jahr 1999 (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001).

Weil innerhalb der Europäischen Gemeinschaft keine Meldepflicht für *V. parahaemolyticus*-bedingte Infektionen besteht, kann auch hier von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über dokumentierte humane Erkrankungsfälle durch *V. parahaemolyticus* der letzten 30 Jahre.

Land	Zeitraum	Anzahl der Fälle	Quelle
Japan	1994/95	2584	IDSC (1999)
	1996-1998	5210	IDSC (1999)
	2000-2007	3417	IDSC (2009)
USA	2000-2007	1703	CDC (2009)
Deutschland	1982	1	MIHAJLOVIĆ et al. (1982)
Frankreich	1997	44	LEMOINE et al. (1999)
		7	GENESTE et al. (2000).
Spanien	1989	8	MOLERO et al. (1989)
	1995-1998	19	ANONYM (1996 und 1998)
	1999	64	LOZANO-LEON et al. (2003)
	2000-2006	21	ISCI (2009)
Grossbritannien	1994-1999	121	EUROPÄISCHE KOMMISSION (2001)
Dänemark	1987-1992	23	HORNSTRUP und GAHRN-HANSEN (1993)
	1980-2000		EUROPÄISCHE KOMMISSION (2001)
	2006	7	ANDERSEN (2006)
Schweden	1992-1997	350	LINDQUIST et al. (2000)
Norwegen	1999	4	EUROPÄISCHE KOMMISSION (2001)

Tabelle 1: Humane Erkrankungsfälle durch *V. parahaemolyticus* der letzten 30 Jahre.

2.5.8 Bedeutung für die menschliche Gesundheit

2.5.8.1 Wege der Übertragung

Als halophiles Bakterium kommt *V. parahaemolyticus* in vielen marinen Tierarten vor, über die der pathogene Mikroorganismus auch vorwiegend übertragen wird. Durch den Genuss von rohen, nicht ausreichend gekochten oder rekontaminierten Seefischen, Schalentieren (z.B. Austern, Venusmuscheln, Jakobsmuscheln, Miesmuscheln) und Krustentieren (z.B. Hummer, Krabben, Garnelen), kann es zu einer Infektion durch dieses Bakterium kommen (DANIELS et al., 2000; DE PAOLA et al., 1997; FDA/CFSAN, 2001; TAMPLIN und CAPERS, 1992). In selteneren Fällen kommt es auch zu einer Übertragung durch Meerwasser, anderes Oberflächenwasser oder den Kontakt mit Meerestieren (COLLIER, 2002; DANIELS et al., 2000).

2.5.8.2 Begünstigende Faktoren

2.5.8.2.1 Alimentäre Faktoren

Die Zusammensetzung der Nahrung, wie Fett-, Säure- und Salzgehalt oder Proteinanteil, kann einen Einfluss auf das Infektionsrisiko nehmen. Eine eiweißreiche Mahlzeit beispielsweise regt die Produktion von Gastrin an, das seinerseits die Ausschüttung der bakteriziden Magensäure auslöst (FOEGEDING, 1997; WEST, 1985). Stark gepufferte Nahrungsmittel, zu denen gekochter Reis zählt, sind dagegen im Stande, die nötige Infektionsdosis des Mikroorganismus zu senken. Die Einnahme von Säurehemmern, die in der Therapie von Magenempfindlichen eingesetzt werden, besitzt die gleiche Auswirkung (FISHER et al., 1970; LEVINE et al., 1981).

2.5.8.2.2 Medizinische Faktoren

Die körperliche Verfassung eines Menschen spielt für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion ebenfalls eine Rolle. Faktoren hierbei sind der generelle Gesundheitsstatus, bereits bestehende Krankheiten und der Ernährungszustand. Physischer Stress vermag ebenfalls die Erkrankung zu begünstigen. Ebenso besitzt der Immunstatus eine große Bedeutung für die Empfänglichkeit gegenüber diesem Pathogen. Ein aufgrund von Krankheit oder Medikamentenapplikation geschwächtes Immunsystem kann genauso einen negativen Einfluss auf Wahrscheinlichkeit und Schweregrad einer Infektion nehmen. Aber auch intrinsische Faktoren, wie Alter, Geschlecht oder genetische Voraussetzungen wirken sich auf den Immunstatus aus (FDA, 2005; RKI, 2002).

2.5.8.2.3 Lagerung und klimatische Faktoren

Auch die unsachgemäße Lagerung von Fischereierzeugnissen im Kühlschrank kann zu einer Vermehrung dieses Organismus führen und damit das Risiko einer Infektion erhöhen (FDA/CFSAN, 2001). Infektionen mit *V. parahaemolyticus* sind in den warmen Klimazonen häufiger als in den gemäßigten Zonen. Dieses Phänomen ist dem Wärmebedürfnis dieser Spezies zuzuschreiben. Deshalb zeigen in den gemäßigten Zonen auftretende Krankheiten auch eine deutliche Saisonalität und treten meist in den wärmeren Monaten eines Jahres auf. In subtropischen Klimaregionen ist mit Infektionen das ganze Jahr über zu rechnen (BAUMGART, 2006; ELLIOT et al., 2004; FDA/CFSAN, 2001).

2.5.8.2.4 Mindestinfektionsdosis

Zur Ermittlung der Mindestinfektionsdosis von *V. parahaemolyticus* wurden schon in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts Untersuchungen angestellt.

Eine der ersten Studien zu diesem Thema wurde mit einem Kanagawa (KP)-positiven Stamm an freiwilligen Probanden vorgenommen. Eine von zwei Personen erkrankte nach der Ingestion von ca. 10^6 KbE und alle beide Patienten zeigten Diarrhö nach Aufnahme von ca. 10^7 KbE *V. parahaemolyticus*. Bei den Angaben der Keimkonzentration handelte es sich allerdings um Schätzungen, da man voraussetzte, dass bei der Kultivierung des Bakteriums eine maximale Keimdichte von 10^{10} KbE/ml erreicht wird (TAKIKAWA, 1958). Es ist also zu unterstellen, dass die eingesetzten Inokula tatsächlich bis zu 2 Zehnerpotenzen niedrigere Keimdichten als angenommen aufwiesen.

AISO und FUJIWARA (1963) verglichen die Wirkung von zwei KP-negativen *V. parahaemolyticus*-Stämmen und einem KP-positivem Stamm klinischer Herkunft sowie einem KP-negativen Umweltisolat aus einem Schalentier. Verabreicht wurden die Keime in gesalzener Milch nach einer Mahlzeit. Lediglich das KP-positive Isolat löste in einer Menge von 10^9 KbE innerhalb von 5 bis 11 Stunden Durchfall zusammen mit heftigen Bauchkrämpfen und Erbrechen bei allen vier Freiwilligen aus.

Dass die orale Applikation selbst hoher Dosen (10^{10} KbE) KP-negativer Stämme ohne Folgen bleibt, bestätigten verschiedene Untersuchungen (SAKAZAKI et al, 1968; SANYAL und SEN, 1974).

In einer anderen Studie mit einem klinischen, KP-positiven Stamm wurde eine Dosisabhängigkeit festgestellt. 200 verabreichte Zellen führten zu keiner Infektion, wohingegen 2×10^5 Zellen bei einem von 4 Freiwilligen Unwohlsein hervorrief und 3×10^7 KbE in einer anderen Vierergruppe bei zwei Patienten Diarrhoe verursachte. Alle Probanden waren mit Säurehemmern vorbehandelt und nahmen die Keime in einer Gelatinesuspension zu sich (SANYAL und SEN, 1974).

Es gibt jedoch auch Hinweise auf geringere Mindestinfektionsdosen. Diese Vermutung leitet sich aus Untersuchungen ab, die nach Erkrankungsfällen 1997 und 1998 zeitnah an Austern, welche aus den Ausbrüchen zugeordneten Erntegebieten stammten, durchgeführt wurden. Dabei ergaben sich Keimkonzentrationen von unter 200 KbE /g Muschelfleisch (CDC, 1999).

Nicht fachgerechte Lagerung scheint ein wesentlicher Auslöser für hohe *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen in Lebensmitteln zu sein. TWEDT (1989) schlussfolgerte, dass nach den typischen Keimzahlfinden in Fisch und Schalentieren sowie dem geringen Anteil an KP-positiven Zellen eine Mahlzeit mit rohen Schalentieren höchstens 10^4 KP-positive Zellen enthalten kann. Damit muss seiner Ansicht nach eine für eine Infektion ausreichende Konzentration pathogener *V. parahaemolyticus* sich erst nach der Ernte/dem Fang der Tiere entwickeln. BARKER et al. (1974) veranschlagten die Mindestinfektionsdosis mit 10^5 Zellen.

2.5.8.2.5 Symptome der Infektion

In der Regel gehören zu den Krankheitssymptomen, wie sie *V. parahaemolyticus* verursacht, Gastroenteritiden, Wundinfektionen und Septikämien. In einigen Fällen entwickeln sich Meningitiden, Herzrhythmusstörungen, Ohrinfektionen und Infektionen des Auges. Als Komplikationen können sich Kreislaufkollaps und Zyanose einstellen (HONDA und IIDA,

Schrifttum

1993; IIDA et al., 2006; JOSEPH et al., 1982; PAVIA et al., 1989; PENLAND et al., 2000; PODA, 1997; WEST, 1989). Nach einer Studie von HLADY und KLONTZ (1996) über Krankheitsfälle in Florida zwischen 1981 und 1993 äußerten sich 58% der Fälle von *V. parahaemolyticus* Infektionen in Gastroenteritiden, gefolgt von 27% Wundinfektionen und 8% primären Septikämien. Bei einem Patienten wurde eine Infektion des Urogenitaltraktes durch dieses Bakterium hervorgerufen. In 8% der Fälle wurde zwar eine Infektion mit *V. parahaemolyticus* dokumentiert, aber nicht die zugehörigen Symptome.

Folgende Symptome werden in der Hauptsache beobachtet:

- Gastroenteritis

Man geht davon aus, dass sich eine Krankheit einstellt, sobald sich das Bakterium im Dünndarm seines Wirtes angeheftet hat und beginnt, ein bislang nicht identifiziertes Toxin auszuscheiden. Symptome einer Infektion des Magen-Darm-Traktes durch *V. parahaemolyticus* treten in der Regel nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bis 4 Tagen auf. Durchschnittlich verstreichen 15 Stunden (FDA/CFSAN, 2001; BAUMGART, 2007). Die recht geringe Inkubationszeit dürfte auf die auffallend kurze Generationsfolgen von *V. parahaemolyticus* zurückgehen (OLIVER und KAPER, 2001; TWEDT, 1989).

Eine durch *V. parahaemolyticus* verursachte Gastroenteritis ist gekennzeichnet durch Diarrhö, abdominale Krämpfe, Übelkeit, Fieber und Erbrechen. Ebenso können allgemeine Schwäche, Kopfschmerzen und Schüttelfrost hinzukommen (ANONYM, 1978; HLADY und KLONTZ, 1996; HONDA und IIDA, 1993; JOSEPH et al., 1982; OLIVER und KAPER, 2001).

Der Vergleich von Krankheitsverläufen in den USA in den Regionen Louisiana (1978), Florida (1981-93) und Maryland (1971) zeigte, dass Durchfall, der in aller Regel von Krämpfen begleitet wird, in 95-100% der Fälle auftraten. Über Übelkeit klagten 23-73% der Patienten und 12-54% erbrachen sich. Fieber trat bei 23-58% der Betroffenen auf (ANONYM, 1978; HLADY und KLONTZ, 1996; OLIVER und KAPER, 2001).

In schwereren Fällen zeigt sich der Durchfall wässrig, mukös, blutig oder mukös und blutig. Des Weiteren kann Tenesmus auftreten (HONDA und IIDA, 1993; JOSEPH et al., 1982; OLIVER und KAPER, 2001).

Häufig dauern die Beschwerden 2-5 Tage an, können aber auch bis zu 10 Tagen anhalten (ANONYM, 1978; FDA/CFSAN, 2001; HONDA und IIDA, 1993; JOSEPH et al., 1982; OLIVER und KAPER, 2001).

- Wundinfektionen

Durch bestehende Hautläsionen, wie z.B. Schnittwunden oder Brandverletzungen, kann es beim Kontakt mit Meerwasser oder marinen Organismen zu Wundinfektionen mit *V. parahaemolyticus* kommen. Gefährdet sind dabei besonders Wassersportler mit Verletzungen während des Aufenthaltes im Meer sowie Personen, die regelmäßig mit Seefischen und Seafood umgehen (COLLIER, 2002; DANIELS et al., 2000; HLADY und KLONTZ, 1996; STROM und PARANIPYE, 2000). Die Wundinfektion zeigt sich als eine lokale Entzündung mit einer Rötung der Haut, begrenzter Hyperthermie, Schmerzhaftigkeit, einer Schwellung und gestörter Funktionalität der betroffenen Hautstelle. Im Falle einer phlegmonösen Ausbreitung kann sich auch eine Sepsis einstellen (GEORGO-

Schrifttum

POULUS und BURGMANN, 2007; HILDEBRANDT, 1998; STROM und PARANIPYE, 2000). HLADY und KLONTZ (1996) ermittelten bei ihren Untersuchungen eine Häufigkeit von 27% von Wundinfektionen oder Phlegmonen gemessen an der Gesamtzahl der Infektionen durch *V. parahaemolyticus*.

– Septikämien

Gelangt *V. parahaemolyticus* in die Blutbahn, vermag das Bakterium sich dort zu vermehren und eventuell auch Toxine zu produzieren. Über die Pfortader oder das intestinale Lymphsystem kann es zu einer Generalisation der Infektion und einer lebensbedrohlichen Septikämie kommen. Solch eine Septikämie ist gekennzeichnet durch Fieber (84% der Fälle) oder niedrigen Blutdruck und einen möglichen Nachweis des Pathogens im Blut. Weitere Symptome können geschwollene, schmerzhafte Extremitäten mit blutgefüllten Blasen sein (HLADY, 1997; KLONTZ, 1990; TACKET et al., 1984). Die Erhebung von HLADY und KLONTZ (1996) ergab einen Septikämie-Anteil von 8% .

2.5.8.2.6 Morbidität

Generell kann jede Person, die *V. parahaemolyticus* in irgendeiner Form ausgesetzt ist, auch infiziert werden. Jedoch unterliegen infizierte Menschen mit chronischen Vorerkrankungen einem höheren Risiko, eine Septikämie zu entwickeln, als gesunde Menschen (FDA, 2005; KUMAMOTO und VUKICH, 1998; STROM und PARANIPYE, 2000). Unter diese Vorerkrankungen fallen Leberleiden, Immunschwäche, Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüre, Magenoperationen, Diabetes mellitus, Herzerkrankungen, Alkoholismus, Nierenerkrankungen, Erkrankungen des Blutes, Krebs, Cortikosteroid-Behandlung und Transplantation (ANGULO und EVANS, 1999; CDC, 2005; KLONTZ, 1990; KLONTZ, 1997).

2.5.8.2.7 Mortalität

Magen-Darm-Infektionen aufgrund von *V. parahaemolyticus* nehmen in der Regel einen milden Verlauf und sind selbst-limitierend. In schwereren Fällen, bei denen es beispielsweise zu blutigem Durchfall, einer Dehydratation oder Herzrhythmusstörungen kommt, sind eine medikamentöse Therapie und unter Umständen ein Krankenhausaufenthalt notwendig. Tödliche Fälle infolge einer Gastroenteritis treten selten auf (DANIELS und SHAFI, 2000; EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2001; HONDA und IIDA, 1993; HLADY und KLONTZ, 1996; JOSEPH et al., 1982).

Die Inzidenz von Septikämien ist zwar gering, jedoch liegt die Mortalitätsrate hier bei 20-30%. (KUMAMOTO und VUKICH, 1998). Andere Autoren gehen hier von einer Mortalität von über 50% aus (TANTILLO et al., 2004).

2.5.8.2.8 Therapie

Da eine Magen-Darm-Infektion infolge von *V. parahaemolyticus* meist selbst limitierend ist, erübrigt sich oftmals eine ärztliche Behandlung. In schwereren Fällen mit Fieber, Schüttelfrost, blutigem oder mukösem Stuhl jedoch sind die Gabe von Antibiotika, Flüssigkeitssubstitution und auch Elektrolytersatz angezeigt (DANIELS und SHAFI, 2000; GEORGOPOULUS und BURGMANN, 2007).

Im Falle einer Wundinfektion kann ein chirurgisches Debridement oder sogar eine Amputa-

Schrifttum

tion von Nöten sein (STROM und PARANJPYE, 2000).

Ist eine Septikämie eingetreten, so erhöht eine frühzeitig eingeleitete antibiotische Therapie die Überlebenschancen (KLONTZ et al., 1988).

Wirksame Antibiotika bei Infektionen mit *Vibrio* spp. sind Doxycyclin, Fluorchinolone, Cephalosporine der 3. Generation (z.B. Ceftazidime), Aminoglykoside, Chloramphenicol und Carbapeneme (DANIELS et al., 2000; GEORGOPOULUS und BURGMANN, 2007).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Versuchsaufbau

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung der derzeitigen kulturellen Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *V. parahaemolyticus* in Miesmuscheln. Die Zusammensetzung der Nährmedien sind bei der zuverlässigen kulturellen Detektion von Bakterien von zentraler Bedeutung. Vor diesem Hintergrund standen sowohl der Versuch einer Verbesserung des gebräuchlichen Anreicherungsmediums für *Vibrio* spp., des alkalischen Peptonwassers (APW), als auch die Wahl eines geeigneten Festnährmediums zur Identifizierung von *V. parahaemolyticus* im Fokus. Optimale Methoden zur Erfassung der Keimzahl können abhängig sein von der Matrix, in der das Zielbakterium nachgewiesen werden soll. Aus diesem Grund wurden zwei kulturelle Zählverfahren für die Erfassung von *V. parahaemolyticus* in Miesmuscheln miteinander verglichen.

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* auf einem in Deutschland noch nicht routinemäßig eingesetzten chromogenen Agar (Chromvibrio-Agar, CVA; Handelsname: CHROMagar™Vibrio) im Vergleich zum konventionell eingesetzten festen Nährmedium (TCBS-Agar) untersucht.

Um die optimale Zusammensetzung des alkalischen Peptonwassers zu finden, wurde das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in modifiziertem APW, bei dem die Konzentration der Ingredienzien des herkömmlichen APW variiert wurde, über einen Zeitraum von 48 Stunden photometrisch überprüft. Da das Untersuchungsgut Einfluss auf die Isolationsquote nehmen kann, sollte das Wachstumsverhalten nicht nur in Proben mit Reinkulturen, sondern auch in Proben mit Reinkultur und Muschelhomogenat beobachtet werden. Aufgabe dieses Versuchs teils war letztlich die Ermittlung der idealen Bedingungen für die Vermehrung des Zielkeims als Reinkultur. Im Folgeschritt sollte das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Anwesenheit von definierter Begleitflora überprüft werden.

Zum quantitativen Nachweis von *V. parahaemolyticus* wurden zwei gebräuchliche Zählverfahren ausgewählt und deren Leistungsfähigkeit analysiert. Hierbei dienten Miesmuschelmaterial als Matrix und das optimierte APW als Nährmedium. Proben mit Muschelhomogenat wurde dafür mit dem Zielbakterium dotiert, dieses sowohl mit dem MPN-Verfahren als auch über das Oberflächenspatelverfahren quantitativ erfasst und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Abschließend wurde das zuvor ermittelte optimierte Anreicherungsmedium zusammen mit dem effektivsten Festnährmedium in Kombination mit dem leistungsfähigeren Zählverfahren auf die Untersuchung von mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten Muscheln angewendet.

Abbildung 4 stellt den Versuchsablauf schematisch dar.

Eigene Untersuchungen

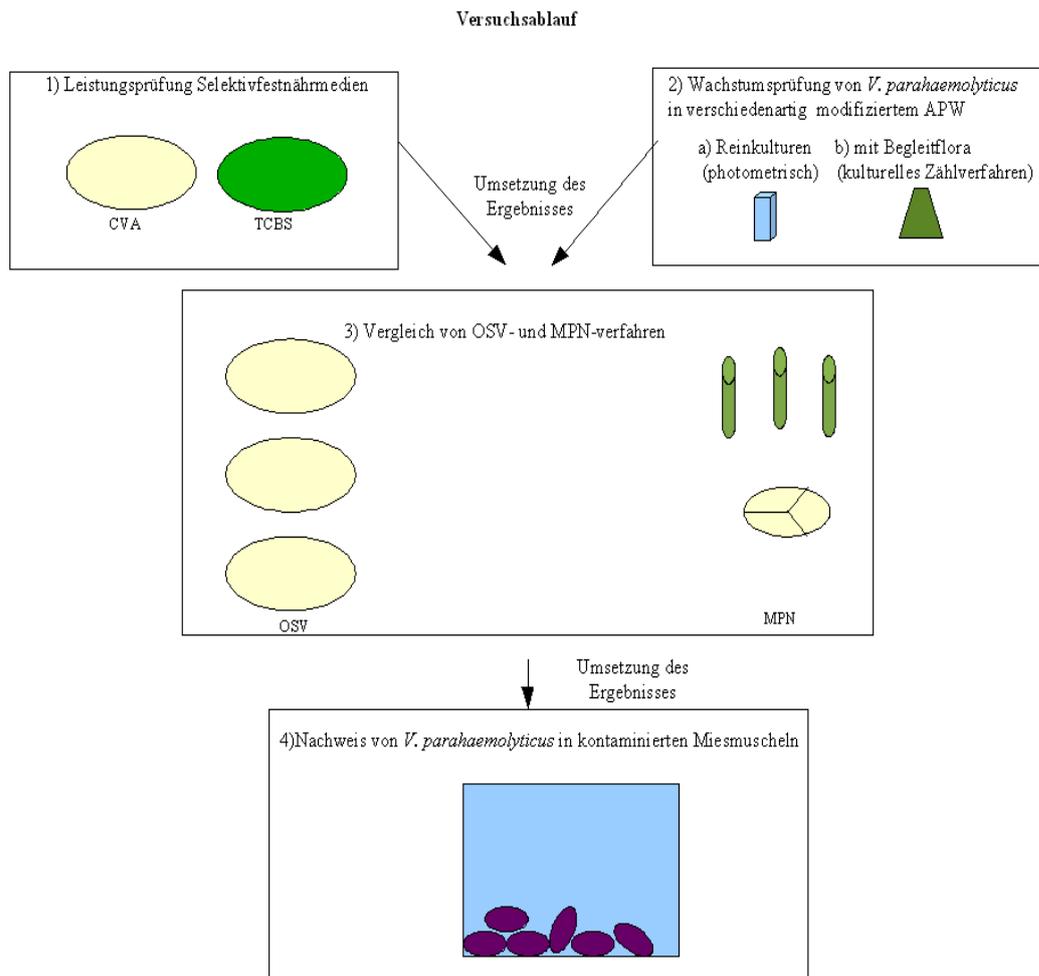


Abbildung 4: Optimierung der kulturellen Methoden zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* in Muscheln - Versuchsaufbau

3.2 Material

3.2.1 Arbeitsgeräte allgemein

Die Untersuchungen erfolgten in einem Labor mit mikrobiologischer Standardausstattung zur Verfügung. Dabei wurden folgende Gerätschaften verwendet: Impfösen, Bunsenbrenner (Neolab, Fireboy), Scheren, Pinzetten, Glaswaren, Pipetten, Reaktionsgefäße, Rüttler (Neolab, Vortex), eine Waage (Sartorius, Typ AC 121 S), ein Mikroskop, ein Kühlschrank (steril und unsteril), ein Kühlbrutschrank (Heraeus, BK 1660), ein -20°C-Tiefkühlschrank (Bosch, Economic froster super), ein -80°C-Tiefkühlschrank (Heraeus, HFU 586), ein Sterilisator und ein Autoklav (Tuttnauer, 1730 EK).

3.2.2 Arbeitsgeräte zur Herstellung von Proben mit Muschelhomogenat

Für die Herstellung des Homogenates wurden - abgesehen von der üblichen Laborausrüstung ein Muschelmesser, Einmalhandschuhe (Flexam, Allegiance), schnittfeste Handschuhe, ein Beutelwalkmischgerät (Seward, Stomacher Lab Blender 400, Typ BA 7021) und Beutel für das Walkmischgerät "Stomacher Lab Blender 400" mit Filter (VWR, Art.-Nr. 432-0003) und ohne Filter (VWR, Art.-Nr.432-0001) verwendet.

3.2.3 Arbeitsgeräte zur Sterilisation der Proben mit Muschelhomogenat

Zur Zentrifugation der Proben mit Muschelhomogenat dienten 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel (Roth, Art.-Nr. N 463.1) und eine kühlbare Zentrifuge (Heraeus, Varifuge 3.0R). Für das Vorfiltrieren mittels Wasserstrahlpumpe wurden ein Edelstahltrichter 500 ml (Sartorius, VWR Art.-Nr. 516-7034) mit Deckel (Sartorius, VWR Art.-Nr. 512-3426), Membranfilter aus Cellulosenitrat, 50 mm (Sartorius, Art.-Nr. 11301-050N), ein Silikondichtungsgsring, eine Saugflasche (Schott) und Silikonstopfen mit Bohrung (Schott, 500 ml) benutzt. Für die Sterilfiltration des Homogenates kamen folgende Arbeitsgeräte hinzu: Eine Pumpe für Druckluft (Sartorius, SM 16617), ein Hochdruckkessel (Sartorius, SM 17530), ein Edelstahlfiltrationsgerät (Sartorius, SM 16249) und ein Kapsulenfilter (Sartorius, Sartobran 300, Art.-Nr. 5231307H5-00-B).

3.2.4 Arbeitsgeräte zum Dotieren und zur Untersuchung der Proben mit Muschelhomogenat

Für diese Arbeitsschritte wurden ein Densimat (Biomerieux), ein Spektralphotometer (Zeiss, PM 6), 1,5 ml Photometriküvetten (Brand, Plastibrand, VWR Art.-Nr. 634-8112), ein pH-Meter (Knick) und pH-Indikatorstreifen (Merck) eingesetzt.

3.2.5 Arbeitsgeräte für die molekularbiologische Untersuchung

Als Hilfsmittel für die molekularbiologischen Arbeiten dienten ein Thermomixer (Eppendorf, Thermomixer comfort 5355), eine kühlbare Mikrozentrifuge (Eppendorf, 5417 R), eine

Eigene Untersuchungen

UV-Werkbank (Heraeus, Typ HS 12), 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biozym, Hess. Oldendorf, Art.-Nr. 711088), ein Thermocycler (Mastercycler Gradient), eine Gelkammer (Mini-Sub-Cell-GT), eine Elektrophoresekammer Mini-Sub-Cell GT (Bio-Rad, Art.-Nr. 1704467) und ein Dokumentationssystem (BIOcaptMW1, LTF Labortechnik, Wasserburg).

3.2.6 Muschelmaterial

3.2.6.1 Muscheln für die Wachstumsversuche

Frische Miesmuscheln für die Wachstumsversuche wurden aus dem Berliner Groß- und Einzelhandel während der Muschelsaison von September bis März bezogen. Die Tiere wurden in tiefgezogenen Kunststoffverpackungen in Mengen zwischen 1 und 2 kg angeboten. Ihr Transport geschah in wärmeisolierten Behältnissen unter Kühlung durch tiefgefrorene Kühlakkus. Nach Ankunft im Labor schloss sich eine Lagerung bei 4°C im Kühlschrank bzw. ein Tiefkühlagerung bei -20°C an.

3.2.6.2 Kontaminierte Muscheln

Kontaminierte Miesmuscheln wurden aus dem Zentrum für experimentelle Tierhaltung des Bundesinstituts für Risikobewertung bezogen. Die Tiere der dortigen Muschelhaltung stammen ursprünglich aus der Ostsee.

3.2.7 Flüssignährmedien

3.2.7.1 Alkalisches Peptonwasser (APW)

10g	Pepton (Bacto Pepton, Becton Dickinson)
3g	Hefeextrakt (Mast, RM 70 B)
20g	Natriumchlorid (Roth, 9265)
ad 1000ml	Aqua bidest.
pH-Wert	8,6 ± 0,2

Die Ingredienzien wurden unter Erwärmen und Aufrühren gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert eingestellt und die Lösung für 15 min bei 121°C autoklaviert.

3.2.7.2 Modifiziertes APW

3.2.7.2.1 Trispuffer-Stammlösung (1 M)

121,1g	Trisbase (Sigma, T 1503)
ad 1000ml	Aqua bidest.

Die verschiedenen gewünschten pH-Werte (7,5; 8,0 und 8,5) wurden mit HCl (37%/12,1N) eingestellt. Der Tris-HCl-Puffer besitzt mit 0,03 einen vergleichsweise hohen Temperaturkoeffizienten. Dieser hat zur Folge, dass der pH-Wert pro K Temperaturanstieg um 0,03 sinkt. Damit der Puffer bei 37°C den gewünschten pH-Wert aufweist, musste dieser deshalb bei Raumtemperatur (ca. 25° C) um 0,3 höher eingestellt werden.

Eigene Untersuchungen

3.2.7.2.2 Tris-gepuffertes APW (T-APW) (0,1 M) pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5

100ml Tris-Puffer-Stammlösung (pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5)
10g Pepton (Bacto Pepton, Becton Dickinson)
3g Hefeextrakt (Mast, RM 70 B)
20g Natriumchlorid (Roth 9265)
ad 1000ml Aqua bidest.

Zunächst wurden 100ml Tris-Puffer-Stammlösung (pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5) mit 500 ml Aqua bidest aufgefüllt und darin die weiteren Zutaten gelöst. Danach wurde mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt. Falls nötig, wurde mit 1N HCl bzw. 1M Trisbase (Trispufferstammlösung) auf den gewünschten pH-Wert (7,5; 8,0 oder 8,5) korrigiert. Danach wurde das Medium autoklaviert.

3.2.7.2.3 Tris-gepuffertes APW (0,05 M) pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5

50 ml Tris-Puffer-Stammlösung (pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5)
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,1 M).

3.2.7.2.4 Tris-gepuffertes APW (0,01 M) pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5

10 ml Tris-Puffer-Stammlösung (pH-Wert 7,5; 8,0 oder 8,5)
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,1 M).

3.2.7.3 Weitere Modifikationen (Grundlage: T-APW (0,01 M; pH 8,5))

3.2.7.3.1 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5) 3% NaCl

30g NaCl
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,01 M ; pH 8,5).

3.2.7.3.2 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5) 5% NaCl

50g NaCl
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5).

3.2.7.3.3 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 3% Pepton

50g NaCl
30g Pepton
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5).

3.2.7.3.4 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 5% Pepton

50g NaCl
50g Pepton
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5).

3.2.7.3.5 Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) 2% Arabinose

50g NaCl
20g L-Arabinose (Sigma, A 3256)
restliche Rezeptur und Zubereitung wie Tris-gepuffertes APW (0,01 M; pH 8,5). Die Zugabe der in T-APW gelösten Arabinose erfolgte steril nach dem Autoklavieren.

3.2.8 Festnährmedien

3.2.8.1 Cholera Medium TCBS (Oxoid, CM 0333)

5g	Hefeextrakt
10g	Bakteriologisches Peptonkonzentrat
10g	Natriumthiosulfat
10g	Natriumcitrat
8g	Rindergalle
20g	Saccharose
10g	Natriumchlorid
1g	Eisencitrat
0,04g	Bromthymolblau
0,04g	Thymolblau
14g	Agar
ad 1000ml	Aqua bidest.
pH-Wert	8,6 ± 0,2

88g der Fertigtrockensubstanz wurden in Aqua bidest verbracht. Zum vollständigen Auflösen der Trockensubstanz wurde das Medium aufgekocht, jedoch nicht autoklaviert! Das Nährmedium wurde ohne weiteres Erhitzen in Petrischalen gegossen.

3.2.8.2 CHROMagar™Vibrio (Mast Diagnostica, VB 910/ VB 912)

15g	Agar
8g	Pepton und Hefeextrakt
51,4g	Salze
0,3g	Mischung chromogener Stoffe
ad 1000ml	Aqua bidest.
pH-Wert	9,0 ± 0,2

Die Trockensubstanzen wurden langsam in Wasser aufgelöst, bis der Agar zu quellen begann. Diese Mixtur wurde unter Rühren mehrfach auf 100°C erhitzt. Dieser Vorgang konnte auch per Autoklavieren erfolgen, wobei wiederholt der Druck geändert wurde. 100°C wurden aber in keinem Falle überschritten. Zum Auflösen des Agars konnte auch die Mikrowelle benützt werden. Sobald die Mixtur kochte, wurde sie aus dem Gerät genommen und behutsam aufgerührt, wieder erhitzt und erneut aufgerührt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Agarkörner komplett aufgelöst waren. In einem Wasserbad wurde die Flüssigkeit unter Rühren auf 48°C herunter gekühlt. Anschließend erfolgte die Abfüllung in Petrischalen. Zum Trocknen wurden die Platten stehen gelassen.

3.2.8.3 Columbiablutagar (COLB A; Basis: Merck 1100455)

23g Spezial-Nährsubstrat
1g Stärke
5g NaCl
10g Agar-Agar
ad 1000ml Aqua bidest
pH-Wert $7,3 \pm 0,2$
50ml Schafblut (steril, defibriniert, von institutseigenen Tieren)

42 g der Trockensubstanz wurden zunächst mit wenig Aqua bidest. angeschlämmt und dann mit weiterem Aqua bidest. unter Rühren aufgefüllt. Die Mixtur wurde zum Kochen gebracht, bis sich die Festbestandteile vollständig aufgelöst hatten. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert korrigiert. Dann wurde das Basismedium bei 121°C für 15 min autoklaviert. Anschließend wurde das Blut unter Rühren hinzugefügt, und die homogene Lösung in Petrischalen abgefüllt.

3.2.8.4 Schafblut-Agar (SBA; Basis: Standard-I-Nähragar, Merck 1.07881)

15g Pepton
3g Hefeextrakt
6g NaCl
1g Glukose
12g Agar
ad 1000ml voll entsalztes (VE) Wasser
pH-Wert $7,5 \pm 0,2$
50ml Schafblut (steril, defibriniert, von institutseigenen Tieren)

Zunächst wurden 37 g der Basis in VE-Wasser unter Rühren und Kochen (100°C) aufgelöst, ggf. der pH-Wert korrigiert und bei 121°C für 15 min autoklaviert. Das sterile Basismedium wurde kräftig aufgerührt und im Wasserbad auf 45-50°C temperiert. Anschließend wurde das Blut (Raumtemperatur) unter Rühren beigemischt und das Medium in Petrischalen abgefüllt.

3.2.9 Medien zur biochemischen Identifikation/Verdünnung

3.2.9.1 Sulphide Indole Motility-Agar (SIM Agar, Oxoid CM 435)

20g Caseinpepton
6,1g Pepton
0,2g Ammoniumeisen(III)-sulfat Dodecahydrat ($H_4NFeO_8S_2 \times 12H_2O$)
0,2g Natriumthiosulphat ($Na_2O_3S_2$)
3,5g Agar
ad 1000 ml Aqua bidest.
pH-Wert $7,3 \pm 0,2$

Nach Auflösen der 30g Trockensubstanz in Aqua bidest. wurde der pH-Wert eingestellt und die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert. Anschließend wurde das Medium in verschließbare Reagenzgläser abgefüllt.

3.2.9.2 Eisen-Dreizucker-Agar (Triple Sugar-Iron-Agar, TSI; Merck 1.03915)

15g	Pepton aus Caseinpepton
5g	Pepton aus Fleisch
3g	Fleischextrakt
3g	Hefeextrakt
5g	NaCl
10g	Lactose
10g	Saccharose
1g	D(+)-Glucose
0,5g	Ammoniumeisen(III)citrat ($C_6H_8O_7 \cdot nFe \cdot nH_3N$)
0,5g	Natriumthiosulphat ($Na_2O_3S_2$)
0,024g	Phenolrot
12g	Agar
ad 1000ml	Aqua bidest.
pH-Wert	$7,4 \pm 0,2$

Nach Auflösen der 65 g Trockensubstanz in Aqua bidest. wurde der pH-Wert eingestellt und die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert. Anschließend wurde das Medium in verschließbare Reagenzgläser abgefüllt.

3.2.9.3 Peptonwasser

1g	Bacto Peptone (Difco 118-3)
10g	NaCl
ad 1000ml	Aqua bidest

Die jeweiligen Substanzen wurden unter Rühren gelöst, dann wurde der pH-Wert eingestellt, die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert und in verschließbare Reagenzgläser abgefüllt.

3.2.9.4 Peptonwasser zur Salztoleranzmessung

10g	Bacto Peptone (Difco 118-3)
0g/10g/30g/80g/100g	NaCl
ad 1000ml	Aqua bidest.
pH-Wert	$7,4 \pm 0,2$

Die jeweiligen Substanzen wurden unter Rühren gelöst, dann wurde der pH-Wert eingestellt, die Lösung bei 121°C für 15 min autoklaviert und in verschließbare Reagenzgläser abgefüllt.

3.2.10 Reagenzien/Chemikalien für kulturelle und biochemische Tests

Substanz	Hersteller/Vertreiber	Artikelnummer
Cytochromoxidaseteststäbchen	Merck	1.13300
JAMES (\approx Kovacz Reagenz)	Biomérieux	70542
Kaliumhydroxidlösung (50%)	Roth	7949.1
Natriumchlorid	Roth	9265
O129 Testplättchen 10 μ g	Oxoid	DD14
O129 Testplättchen 150 μ g	Oxoid	DD15
Paraffinöl	Biomérieux	70100
TDA	Biomérieux	70402
VP1 + VP2	Biomérieux	70422

3.2.11 Reagenzien/Chemikalien für die Multiplex PCR

Substanz	Hersteller/Vertreiber	Artikelnummer
Agarose Molecular Grade	Bioline	BIO41025
Aqua bidest	BfR	eigene Herstellung
Bromphenolblau	VWR	1.08122.0005
Chelex® 100 Resin	BioRad	1422832
dNTP-Mix (10mM)	Bioline	BIO39044
EDTA	Merck	1.12029.0100
Eisessig	Merck	818755
Ethidiumbromid-Lösung (1%ig)	VWR	1.116080030
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich	F4375
MgCl ₂	Bioline	BIO37026
Primer	Biotez	-
Taq-Polymerase	Bioline	BIO21040
Tris	VWR	1.08418.1000
100bp-Größenmarker	Bioline	BIO33030
Hyperladder IV		
10xReaktionspuffer	Bioline	BIO37066

Eigene Untersuchungen

3.2.11.1 1 xTE-Puffer

0,12g Tris-HCl (10 mM)
0,034g Na-EDTA (1 mM)
in 100ml Aqua bidest.
pH-Wert 8,0

Die Zutaten wurden in 80 ml Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit HCl eingestellt. Anschließend wurde das Volumen mit Aqua bidest. auf 100ml ergänzt.

3.2.11.2 Chelex® 100 Resin-Lösung (5%)

10g Chelex® 100 Resin (BioRad, 142-2832)
200ml Aqua bidest.

Die Ingredienzien wurden in einer 500ml Schraubflasche (Schott) gut vermischt. Chelex® 100 Resin lösen sich nicht in Wasser, weshalb die Teilchen vor jedem Pipettieren aufgewirbelt werden mussten. Deshalb war es ratsam, sich nach dem Ansetzen der Lösung Aliquots in kleinere Schraubfläschchen abzufüllen.

3.2.11.3 50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer

242g Tris (VWR, Art.Nr. 1.08418.1000)
57,1ml Eisessig
100ml EDTA (0,5M, pH-Wert 8,0)
ad 1000ml Aqua bidest.

Die Trockensubstanz wurde abgewogen, dann die flüssigen Anteile hinzugefügt und unter Rühren gelöst. Um die Gebrauchslösung (1x TAE-Puffer) zu erhalten, wurde das Konzentrat 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt.

3.2.11.4 Ladepuffer

10ml Ficoll® 400 Lösung 15% (Grundsubstanz: Sigma-Aldrich, Art.Nr. F4375)
0,25ml Bromphenolblaulösung 5% , gelöst in TAE-Puffer (Grundsubstanz: VWR, Art. 1,08122.0005)
30,75ml Aqua bidest.

Die Bestandteile wurden gut gemischt und in jeweils 1ml Portionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert.

3.2.11.5 Ethidiumbromid-Färbelösung

0,5 ml Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung 1% (VWR, Art.Nr. 1.11608.0030)
in 1000ml Aqua bidest

Die Ethidiumbromid-Lösung wurde mit Aqua bidest gemischt und unter dem Abzug abgedunkelt aufbewahrt.

3.2.11.6 Agarosegel 2%

2g Agarose (Bioline, Art.Nr. Bio-41025)
100ml TAE-Puffer

Eigene Untersuchungen

Die Zutaten wurden in einer Schraubflasche gemischt, in der Mikrowelle aufgekocht und vorsichtig geschüttelt, dann wieder in der Mikrowelle aufgekocht und wieder vorsichtig geschüttelt. Der Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. In einem vorgeheizten Wasserbad (56°C) wurde die Agarose ca. 20 Minuten abgekühlt und in den in eine Gelkammer eingespannten Schlitten mit Kamm luftblasenfrei eingefüllt. Nach circa. 20-30 min war das Gel erstarrt.

3.3 Methoden

3.3.1 Leistungsprüfung des Chrom-Vibrio-Agar (CVA)

Das CVA-Selektivnährmedium wird unter dem Handelsnamen CHROMagar™Vibrio kommerziell vertrieben und ist seit dem Jahr 2006 auch in Deutschland erhältlich. Das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* auf diesem Festnährmedium im Vergleich zum herkömmlichen Festnährmedium TCBS wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ überprüft. Das erwartete Erscheinungsbild von verschiedenen *Vibrio* spp. auf CVA ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Bakterienspezies	Koloniemorphologie CVA	
	Durchmesser	Farbe
<i>V. parahaemolyticus</i>	3-5 mm	violett
<i>V. cholerae</i>	3 mm	grünblau bis türkis
<i>V. vulnificus</i>	5 mm	grünblau bis türkis
<i>V. alginolyticus</i>	5-6 mm	milchigweiß/creme

Tabelle 2: Nährbodenvergleich - Koloniemorphologie von *Vibrio* spp. auf CVA (Quellen: GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; HARA-KUDO et al. 2001; MAST DIAGNOSTICA, 2006)

3.3.2 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Reinkulturen

Für den qualitativen Vergleich des Wachstums von *Vibrio* spp. auf TCBS-Agar bzw. CVA kamen Reinkulturen sowohl von Feldisolaten als auch von Referenzstämmen (DSM, NCTC, ATCC) zum Einsatz. Die eingesetzten Feldstämme wurden im Rahmen der Arbeit des NRL für bakterielle Muschelkontaminanten zwischen 2001 und 2005 aus Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) und Austern (*Ostrea* sp., *Crassostrea* sp.) isoliert und identifiziert. Ebenso wurde das Wachstum von Nicht-Vibriolen auf den beiden Medien untersucht. Auch diese sind Teil der Stammsammlung des NRL.

Tabellen 3 und 4 zeigen alle in diesem Versuchsteil eingesetzten Stämme.

Tabelle 5 stellt Art und Anzahl der eingesetzten Bakterienstämme in einer Synopsis dar.

Eigene Untersuchungen

Vibrio spp.		
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
DSM 10027	DSM 2171	ATCC 27565
NC 10885	NC 10675	RVI5
08/02 M9f	08/02 M9n	CH 1512
08/02 M9i	16/03-M22f	CH 545
03/05 M7a	16/03-M22g	<i>V. fluvialis</i>
03/05 M7k	01/07-M23b	4/01-M4Esb
42-40/07-1	03/04-M24b	05/04 M26a
CH 1377	04/04-M25d	05/04 M26b
CH 1585	04/04-M25f	03/05 M7d
CH 1652	11/05-M31-1	M34 B
CH 1653	14/05-M32-1	M35-1
CH 1679	14/05-M32-2	<i>V. mimicus</i>
RT 14.2A	15/05-M33-1	V0047-1
RT 14.3A	104/06-M34A	RT 14.1A
RT 14.5A	RT 14.4A	<i>V. cholerae</i>
V0046-2	179/06-36-1	V0046-1
V0046-3	179/06-36-2	NC 8042-05
<i>V. furnissii</i> NC 11218	246/06-M37/1	Kursstamm Hamburg
<i>V. damsela</i> 03/05-06a	246/06-M37/2	
<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264		

Tabelle 3: Zum Nährbodenvergleich eingesetzte *Vibrio* spp. Stämme

Nicht-Vibrio spp.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 15/05-M33-2
<i>Aeromonas hydrophila</i> DSM 30187
<i>E. coli</i> DSM 1103
<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054
<i>Salmonella</i> Thyphimurium DSM 11320
<i>Shewanella putrefaciens</i> DSM 6067
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 1117
<i>Proteus mirabilis</i> M 60 B

Tabelle 4: Zum Nährbodenvergleich eingesetzte Nicht-*Vibrio* spp. Stämme

Eigene Untersuchungen

Bakterienspezies	Anzahl
<i>V. parahaemolyticus</i>	17
<i>V. vulnificus</i>	4
<i>V. fluvialis</i>	6
<i>V. alginolyticus</i>	19
<i>V. mimicus</i>	2
<i>V. cholerae</i>	3
<i>V. furnissii</i>	1
<i>V. damsela</i>	1
<i>V. anguillarum</i>	1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
<i>E. coli</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1

Tabelle 5: Nährbodenvergleich (qualitativ): Überblick über Art und Anzahl der eingesetzten *Vibrio* spp.- und Nicht-*Vibrio* spp.-Stämme

Die unterschiedlichen Vibrionenspezies bzw. -Stämme sowie die Nicht-Vibrionen wurden zunächst auf Columbia-Agar (ohne Blutzusatz) angezüchtet und 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Dann wurde je eine Öse Koloniematerial in alkalisches Peptonwasser (APW) überimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Hieraus wurde je ein fraktionierter Ausstrich auf CVA und TCBS-Agar angefertigt, und nach weiterer 24-stündiger Inkubation bei 37°C das Wachstum sowie die Koloniefarbe und -morphologie beurteilt.

Die Berechnung von Sensitivität und Spezifität erfolgte in Anlehnung an SU et al. (2005).

3.3.3 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Mischkulturen

In einem weiteren Nährbodenvergleich wurde überprüft, ob Mischungen verschiedener *Vibrio* spp.-Reinkulturen die Wiederfindungsrate beeinflussen. Im Rahmen dieses Modellversuches wurde je ein Aliquot von 1 ml eines über Nacht bei 37°C in APW angereicherten Stammes entnommen und in einer dekadischen Verdünnungsreihe bis zur benötigten Stufe in Peptonwasser verdünnt. Daraufhin wurden aus der gleichen Verdünnungsstufe jeweils 1 ml der zu mischenden Stämme in einem leeren Reagenzglas auf einem Rüttler aufgerührt. Von dieser Mixtur wurden dann im Doppelansatz je 0,1 ml sowohl auf CVA als auch auf TCBS-Agar ausgespatelt und die Platten bei 37°C 18-24 Stunden bebrütet.

Tabelle 6 zeigt die verwendeten Mischkulturen.

Eigene Untersuchungen

1	<i>V. parahaemolyticus</i> NCTC 10885 + <i>V. vulnificus</i> ATCC 27562
2	<i>V. parahaemolyticus</i> NCTC 10885 + <i>V. alginolyticus</i> DSM 2171
3	<i>V. parahaemolyticus</i> NCTC 10885 + <i>V. alginolyticus</i> DSM 2171+ <i>V. fluvialis</i> (Feldstamm)
4	<i>V. parahaemolyticus</i> NCTC 10885 + <i>V. cholerae</i> (Feldstamm)

Tabelle 6: Nährbodenvergleich (quantitativ): Eingesetzte *Vibrio* spp.-Stämme und deren Kombinationen

3.3.4 Messung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen Modifikationen von APW

3.3.4.1 Varianten der APW-Zusammensetzung

Basis der verschiedenen APW-Modifikationen bildete die APW Rezeptur, wie sie im NRL für die mikrobiologische Analyse bakterieller Muschelkontaminanten verwendet wird.

Zunächst wurde der Einfluss einer Pufferung des Nährmediums mit Trisbase/HCl-Puffer auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* jeweils auf den pH-Wert-Stufen 7,5; 8,0 sowie 8,5 getestet. Um die Auswirkung des Pufferungsgrades auf die Vermehrung des Zielkeimes beurteilen zu können, wurden dabei auf jeder pH-Wert-Stufe die Konzentrationen 0,1M; 0,05M und 0,01M Trisbase/HCl eingesetzt. Das konventionelle APW ist nicht gepuffert.

Nach Ermittlung des optimalen pH-Werts mit dazugehöriger Puffer-Konzentration wurde der NaCl-Gehalt des APW erhöht (das Nährmedium wurde „aufgesalzt“). Dabei wurde eine NaCl-Konzentration von 5% gewählt. Die Salzmenge des üblichen APW liegt bei 2%.

Nach Ermittlung des geeigneten NaCl-Prozentsatzes wurde abschließend der Einfluss verschiedener Peptonkonzentrationen überprüft. Es wurden Pepton-Gehalte von 3% und 5% überprüft. Im traditionell verwendeten APW liegt die Peptonkonzentration bei 1%.

Einen Überblick über die Art der getesteten Modifikationen des herkömmlichen APW gibt Tabelle 7

geänderte Zutat/Bedingung	Varianten
pH-Wert	7,0; 8,0; 8,5
Konzentration Trisbase/HCl-Puffer	0,1M; 0,05M; 0,01M
Konzentration NaCl	5%
Konzentration Pepton	3%, 5%

Tabelle 7: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen - Überblick über die Art der Modifikationen

3.3.4.2 Auswahl der Test-Stämme

Das Wachstum der *V. parahaemolyticus* Referenzstämme DSM 10027 und NCTC 10885 sowie der *V. parahaemolyticus* Feldstämme CH 1585 und CH 1652 wurde parallel überprüft. Zum Vergleich wurde gleichzeitig das Verhalten des *V. vulnificus*-Referenzstammes ATCC 27562 und des *V. vulnificus* Feldstamms RVI 5 ermittelt.

Die ausgewählten Teststämme gehören zur Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für bakterielle Muschelkontaminanten.

3.3.4.3 Herstellung der Bakteriensuspensionen

Die Herstellung der Bakteriensuspensionen erfolgte in Anlehnung an HSU et al. (1998). Auf Columbiablutagar wurden Reinkulturen der Testkeime angelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um Keime in der log-Phase zu erhalten, wurden von diesen Kulturen ca. 5 Kolonien in 10 ml APW übertragen und für ca. 2 Stunden bebrütet. Von jeder Voranzucht wurden dann 60 µl abgenommen und in je 24 ml zimmerwarmes Nährmedium überführt. Die Suspension wurden dann bei 37°C bebrütet.

3.3.4.4 Durchführung der photometrischen Messung

Die photometrische Messung geschah ebenfalls in Anlehnung an HSU et al. (1998). Die Suspensionen wurden gründlich geschüttelt und dann je ein 1ml Aliquot zur photometrischen Messung in Photometrie-Küvetten pipettiert. Die optische Dichte (OD) der Suspension wurde im Photometer (Zeiss, PM 6) bei einer Wellenlänge 420 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Aliquot sterilen Nährmediums.

Die Vorgehensweise bei der Keimzahlbestimmung mittels Photometrie stellt Abbildung 5 dar.

Eigene Untersuchungen

Keimzahlbestimmung mittels Photometrie

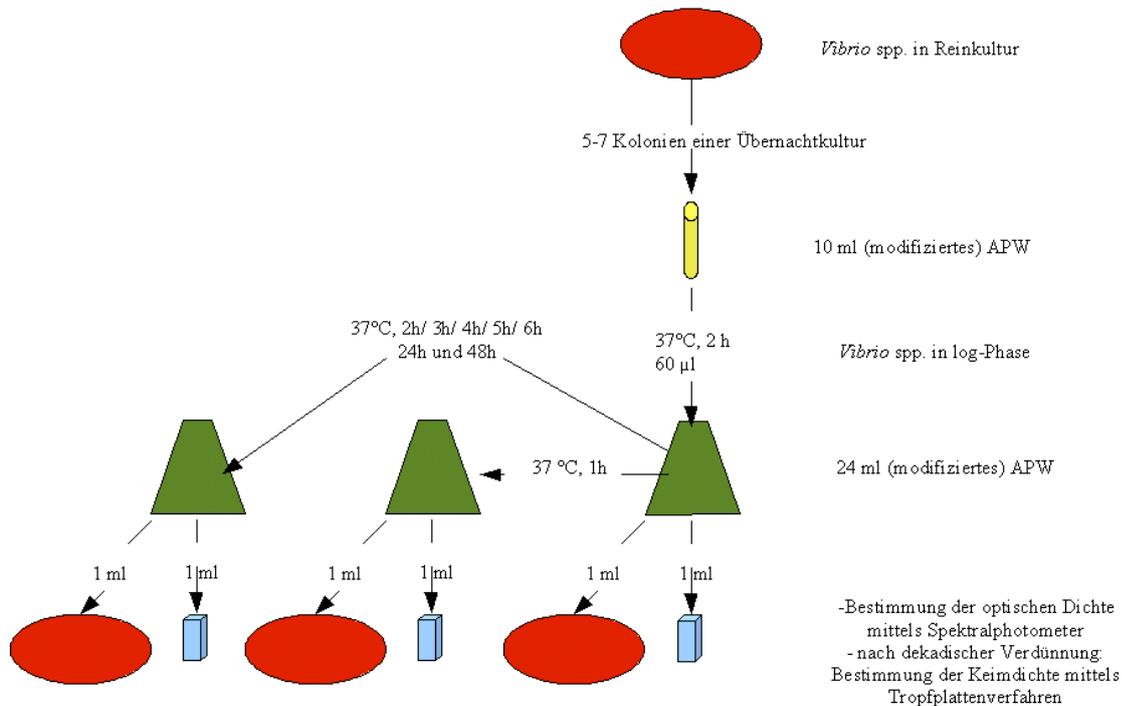


Abbildung 5: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen - Keimzahlbestimmung mittels Photometrie (hier: Vorgehen bei Anfertigung der Eichkurve; bei den Messreihen entfiel mit Ausnahme der 48-Stunden-Messung die zusätzliche kulturelle Keimzahlbestimmung bei den einzelnen Messungen)

3.3.4.5 Anfertigung der Eichkurven

Um den Extinktionswerten eine Zellzahl zuordnen zu können, wurde zunächst eine Eichkurve angefertigt. Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde direkt nach Versuchsbeginn und danach stündlich über einen Zeitraum von 6 Stunden gemessen. Eine weitere Messung erfolgte dann nach 24 Stunden und eine letzte Messung nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C. Von jedem Testbakterium wurden Doppelansätze angefertigt. Zusätzlich wurde zum Zeitpunkt aller photometrischen Messungen je ein weiteres 1ml-Aliquot der Keimsuspensionen abgenommen, dekadisch bis zur gewünschten Stufe verdünnt und die Zellzahl per Tropfplattenverfahren im Doppelansatz auf Schafblutagar bestimmt. Die Tropfplatten wurden 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Um etwaige Unterschiede zu erkennen, wurden die Untersuchungen zur Eichkurvenerstellung sowohl mit

Eigene Untersuchungen

Proben mit Reinkulturen als auch Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Doppelansätze) durchgeführt.

Für die Erstellung der Eichkurve wurde das Wachstum sämtlicher ausgewählter Keime in Proben mit Reinkulturen in herkömmlichem, ungepuffertem APW untersucht. Um etwaige Unterschiede zum modifizierten APW zu erkennen, wurde zusätzlich das Wachstum von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 sowie *V. vulnificus* RVI5 sowohl in T-APW (0,1M; pH 8,0) als auch T-APW (0,05M; pH 8,0) überprüft.

Nach der Auswertung des Wachstums in Proben mit Reinkulturen und Konstruktion der dazugehörigen Eichkurve wurde das Vorgehen zur Erstellung der Eichkurve für Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat wiederholt. Zu diesem Zweck wurde stellvertretend das Wachstum von *V. parahaemolyticus* DSM 10027, *V. parahaemolyticus* NCTC 10885, *V. vulnificus* RVI5 und *V. vulnificus* ATCC 27562 in Proben mit Muschelhomogenat mit herkömmlichem, ungepuffertem APW verfolgt.

3.3.4.6 Ermittlung des Wachstumsverlaufs

Die optische Dichte der Bakteriensuspensionen wurde direkt nach Versuchsbeginn und danach stündlich über einen Zeitraum von 6 Stunden gemessen. Eine weitere Messung erfolgte dann nach 24 Stunden und eine letzte Messung nach 48 Stunden Inkubationszeit. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C. Von jedem Testbakterium wurden Doppelansätze angefertigt.

Nach 48 Stunden wurde zusätzlich zur photometrischen Messung eine Keimzahlbestimmung mittels Tropfplattenverfahren auf Schafblutagar durchgeführt.

Das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* wurde sowohl in Proben mit Reinkulturen als auch in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat untersucht.

3.3.4.7 Herstellung der Proben mit Muschelhomogenat

Die Miesmuscheln wurden steril aus ihrer Verpackung entnommen und in einem desinfizierten Drahtkorb unter fließendem Trinkwasser gereinigt. Zum Abtropfen wurde der Korb mit den Muscheln anschließend auf Zellstoff gestellt. Einzelne Tiere wurden entnommen und nach Durchtrennung des hinteren Adduktormuskels mit einem sterilen Muschelmesser geöffnet. Mittels sterilem Messer und Pinzette wurden Fleisch und Schalenflüssigkeit steril aus den Muschelschalen entnommen, in einen Stomacherbeutel mit Filter überführt und auf einer Laborwaage abgewogen. Zu der Einwaage wurde die 9-fache Menge an APW hinzugefügt und somit eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Zum Schutz vor Auslaufen wurde der Stomacherbeutel in einen weiteren Stomacherbeutel (ohne Filter) überführt. Homogenisiert wurde das Muschel-APW-Gemenge mittels Stomachergerät auf höchster Stufe für 120 Sekunden.

Zur Verarbeitung gelangten bei frischen Muscheln nur lebende Tiere und zwar vor Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatums. Im Zweifelsfall wurden die Vitalfunktionen (Klopftest) überprüft. Beschädigte Exemplare wurden ebenso wie tote Tiere vom Versuch ausgeschlossen. Bei Verwendung von tiefgefrorenen Tieren wurden diese über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und wie zuvor beschrieben verarbeitet.

3.3.4.8 Sterilfiltration der Proben mit Muschelhomogenat

Das wie oben beschrieben homogenisierte Material wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000U/min (= ca. 5422g) für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Vakuumfiltriereinheit mit Wasserstrahlpumpe durch einen Membranfilter mit 8,0 µm Porenweite vorfiltriert. Dieses Erstfiltrat wurde dann mit Drücken zwischen 1 und 4 bar durch einen Kapsulenfilter mit Porenweiten von 0,45 µm und 0,2 µm sterilfilteriert. Die Sterilität des so gewonnenen Produkts wurde überprüft, indem ein Aliquot im Doppelansatz auf Schafblutagar übertragen, ausgespatelt und bei 37°C für 24 Stunden bebrütet wurde.

3.3.5 Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Begleitflora

Um einen möglichen Einfluss von Begleitflora auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* zu überprüfen wurden Proben mit Muschelhomogenat dotiert. Als Nährmedien kamen hierbei herkömmliches APW und modifiziertes APW (pH 8,5; 0,01M Tris; 5% NaCl) zum Einsatz. Nach Auswertung der Ergebnisse wurde zusätzlich noch das Wachstum in Proben mit Muschelhomogenat mit einem weiter modifizierten APW getestet (pH 8,5; 0,01M Tris; 5% NaCl; 2% Arabinose).

3.3.5.1 Auswahl der Stämme

Sowohl die Auswahl der Bakterienstämme, die als Begleitflora herangezogen wurden, als auch die Konzentration, in der sie den Proben mit Muschelhomogenat beigemischt wurden, erfolgte gemäß der qualitativen und quantitativen Untersuchungsergebnisse von Muscheln aus dem Handel am Nationalen Referenzlabors für bakterielle Muschelkontaminanten aus dem Jahre 2004.

Nachfolgend sind in Tabelle 8 die verwendeten Bakterienstämme und deren Konzentrationen aufgelistet.

Spezies	Bezeichnung	eingesetzte Konzentration
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DSM 10027	10 KbE/g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	DSM 10027	100 KbE/g
<i>Vibrio alginolyticus</i>	DSM 2171	10 KbE/g
<i>Vibrio alginolyticus</i>	42-179/06 M36/2	10 KbE/g
<i>Vibrio fluvialis</i>	05/04 M26b	10 KbE/g
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	10 KbE/g
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	100 KbE/g
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 30187	100 KbE/g
<i>Salmonella typhimurium</i>	DSM 11320	10 KbE/g
<i>Shewanella putrefaciens</i>	DSM 6067	10.000 KbE/g

Tabelle 8: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen - Eingesetzte Bakterienspezies und -konzentrationen in Wachstumsuntersuchungen mit Begleitflora

Eigene Untersuchungen

Die ausgewählten Teststämme sind Teil der Stammsammlung des Nationalen Referenzlabors für bakterielle Muschelkontaminanten.

3.3.5.2 Einstellen der Keimkonzentration

Die einzelnen Bakterienstämme wurden auf Columbia-Agar mit Blutzusatz ausgestrichen und bei 37°C über Nacht bebrütet. Die Grundkeimdichte wurde mittels Dichtemessung mit dem Densimaten eingestellt. Dazu wurde mit einer Impföse Koloniematerial in vorgelegtes Peptonwasser in einem Densimatenröhrchen eingerieben, mit einem Schüttler aufgerührt und die Bakteriendichte im Densimaten gemessen. Sämtliche so hergestellte Suspensionen wurden auf eine Dichte von 0,5 McFarland (entspricht ca. 10^8 KbE/ml) eingestellt. Über eine dekadische Verdünnungsreihe in Peptonwasser mit Agartzusatz wurde diese Ausgangsdichte dann auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Die tatsächliche Keimzahl der Suspensionen wurde zusätzlich mittels Tropfplattenverfahren auf Schafblutagarplatten überprüft. Die Festnährmedien wurden 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend ausgezählt.

3.3.5.3 Dotieren der Proben mit Muschelhomogenat

Das sterilfiltrierte Homogenat wurde in Erlenmeyerkolben vorgelegt. Ihm wurden die in Tabelle 8 angegebenen Spezies in verschiedenen Kombinationen in der dort ebenfalls aufgeführten Konzentration hinzugefügt. Die Verdünnung der Probe (1g Muschelinhalt/10ml) durch das Hinzufügen der Testkeime sollte möglichst gering gehalten werden. Deshalb wurde das Bakterienmaterial statt aus der letzten (nötigen) Verdünnungsstufe aus der vorausgehenden entnommen, weil hier die gewünschte Bakterienkonzentration bereits in einem Zehntel des Volumens enthalten ist. Tabelle 9 zeigt die Art der gewählten Kombinationen.

Die Vorgehensweise bei Einstellung der Keimkonzentration und beim Dotieren der Probe zeigt Abbildung 6.

Eigene Untersuchungen

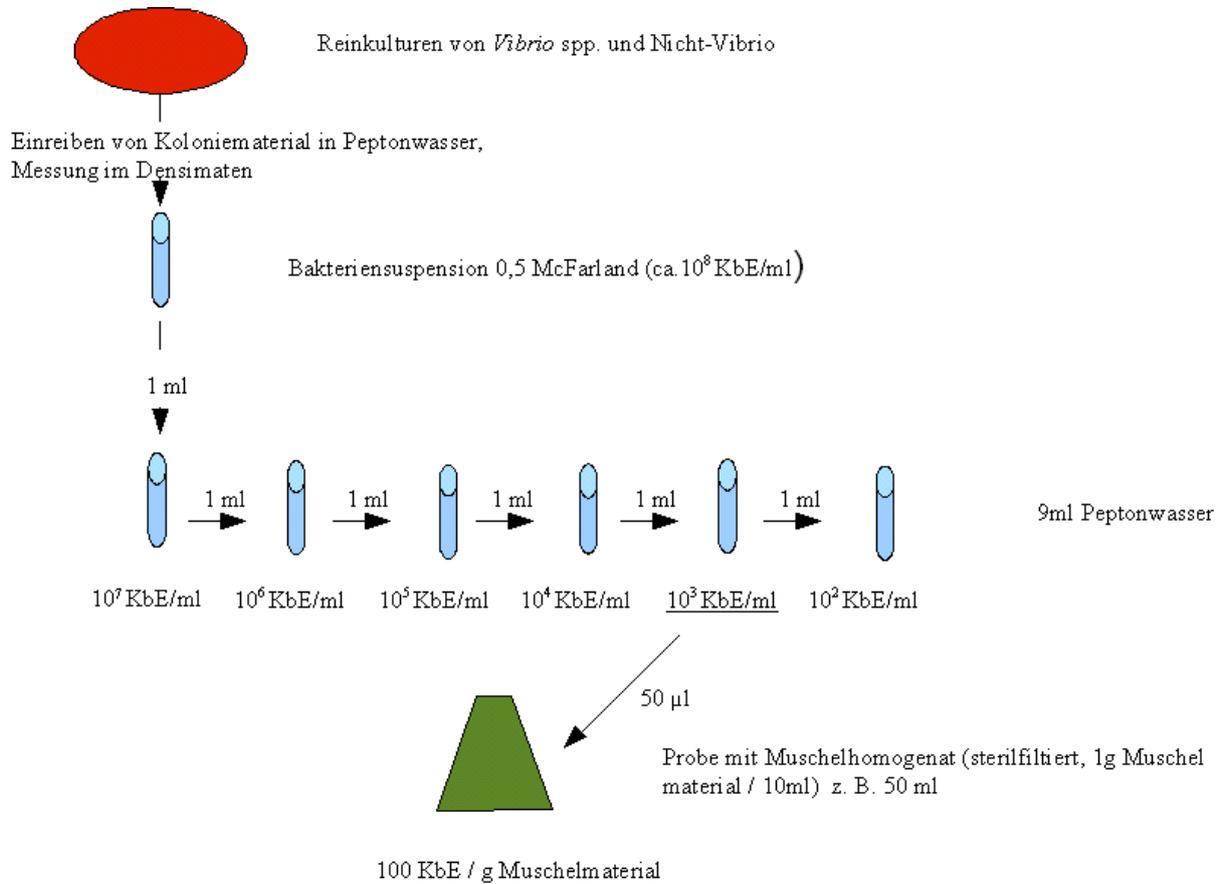


Abbildung 6: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora: Herstellung eines Inokulums und Dotieren der Probe

Homogenat	<i>V. parahaemolyticus</i> DSM10027 (10KbE/g)	<i>V. parahaemolyticus</i> DSM10027 (100KbE/g)	<i>V. alginolyticus</i> DSM 2171	<i>V. alginolyticus</i> 42-179/06 M36/2	restliche Begleitflora
1	+		+		
2	+		+		+
3		+	+		
4		+	+		+
5	+			+	
6	+			+	+
7		+		+	
8		+		+	
9			+		+
10				+	+

Tabelle 9: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora - Spezieskombinationen und -konzentrationen

3.3.5.4 Untersuchung der Proben

Nach Zugabe der Keime wurden die Proben zunächst gründlich geschüttelt. Anschließend wurden jeweils Aliquots zur Durchführung des MPN-Verfahrens sowie des Spatelverfahrens abgenommen. Die verbliebenen Volumen der dotierten Proben mit Muschelhomogenat wurden 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Daraufhin wurde je ein 1 ml Aliquot entnommen und in einer dekadischen Verdünnungsreihe in Peptonwasser verdünnt. Je 100 µl der 6. Verdünnungsstufe wurden im Doppelansatz auf CVA, TCBS-Agar und Schafblutagar ausgespatelt. Die Platten wurden dann 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend ausgezählt.

3.3.6 Vergleich der Keimzählmethoden

Die Leistungsfähigkeit des MPN-Verfahrens beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 in Miesmuscheln wurde im Vergleich zum Oberflächenspatelverfahren untersucht.

3.3.6.1 Herstellung des Untersuchungsmaterials

Der Vergleich zweier Methoden wurde an Proben mit Muschelhomogenat durchgeführt, die mit *V. parahaemolyticus* DSM 10027 dotiert waren. Zum einen wurden dazu die gespikten Proben mit Muschelhomogenat aus den Wachstumsversuchen mit Begleitflora verwendet, zum anderen wurden extra Proben mit Muschelhomogenat gefertigt. Proben, die eigens für den Vergleich der Keimzählmethodenvergleich dienten, wurden mit T-APW mit 5% NaCl und 2% Arabinose hergestellt. Diesmal wurde das Homogenat nicht sterilfiltriert.

Die Einstellung der gewünschten Keimkonzentration erfolgte wie unter 3.3.5.2 und 3.3.5.3 beschrieben.

Überprüft wurde das Nachweisvermögen der beiden Keimzählmethoden an Homogenaten mit zugegebenen Keimmengen zwischen 1-10 KbE/g, 11-100 KbE/g oder 101-1000 KbE/g. Pro Untersuchungsansatz und beigemengtem Keimniveau wurden Doppelansätze angefertigt. Bei jedem Versuchsansatz wurden ebenfalls nicht gespikte Homogenate als Kontrolle mitgeführt.

3.3.6.2 MPN-Verfahren

Die Durchführung des MPN-Verfahrens erfolgte in Anlehnung an Methoden nach BOCKE-MÜHL (1992) und BAUMGART (2006). Ausgehend von der Erstverdünnung (1:10) wurde zunächst eine dezimale Verdünnungsreihe in Peptonwasser angelegt. Die Anzahl der Verdünnungsschritte entsprach der erwarteten Keimzahl. Nachfolgend wurden von der 1:10 Erstverdünnung drei mal 10 ml abgenommen und in leere Reagenzgläser pipettiert. Der Anteil an Muschelmaterial pro Reagenzglas betrug somit 1g. Anschließend wurden aus der Grundverdünnung drei mal 1 ml abgenommen und in Reagenzgläser mit vorgelegten 9 ml Nährmedium überführt. Aus jeder weiteren Verdünnungsstufe des dotierten Homogenats wurden ebenfalls drei mal 1 ml in entsprechend vorbereitete Reagenzgläser übertragen.

Die Reagenzgläser wurden 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Im Anschluss wurde pro Reagenzglas ein Öse Material, das durch Eintauchen der Öse in die bebrütete Suspension bis knapp unter die Oberfläche gewonnen worden war, auf CVA ausgestrichen. Bei Reagenzglä-

Eigene Untersuchungen

ern mit Erstverdünnung wurde dieses Material auf einer ganzen Platte, bei den anderen Reagenzgläsern nur auf einem Drittel einer Platte ausgestrichen. Die so beimpften Platten wurden dann ebenfalls 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Die positiv bewachsenen Platten oder Segmente pro Verdünnungsstufe wurden notiert und daraus der dreistellige MPN-Code ermittelt. Als positiv galten Platten/Segmente, auf denen *V. parahaemolyticus*-verdächtige Kolonien vorhanden waren. Anhand dieses Codes konnte über eine MPN-Tabelle (BAUMGART, 2006) die zugehörige wahrscheinlichste Keimzahl abgelesen werden.

Die Vorgehensweise bei Weiterverarbeitung der gespikten Proben (vgl. Abbildung 6) zur Beurteilung des Wachstums und Vergleich der quantitativen Methoden stellt Abbildung 7 dar.

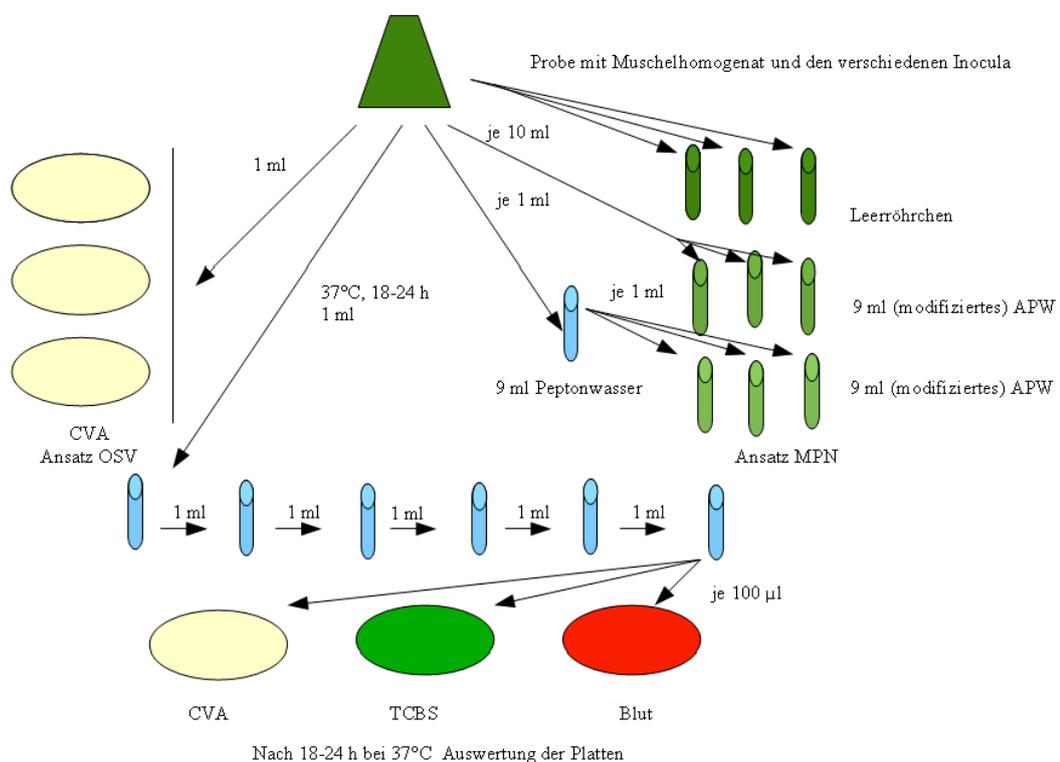


Abbildung 7: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora: a) Wachstumsvergleich b) Ansetzen von MPN (Darstellung der im zweiten Schritt beimpften Platten fehlt) und OSV

3.3.6.3 Oberflächenspatelverfahren

Das Oberflächenspatelverfahren wurde in Anlehnung an die amtliche Methode 06.00-18 nach §64 des LFGB (ANONYM, 2005 b) durchgeführt und ausgewertet. Entsprechend der erwarteten Keimzahl wurden im Doppelansatz 1 ml des gespikten Homogenats zu gleichen Teilen auf drei CVA-Platten verteilt und ausgespatelt. Die beimpften Platten wurden dann 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden *V. parahaemolyticus*-verdächtige Kolonien gezählt und die tatsächlich vorhandene Keimzahl nach folgender Formel hochgerechnet:

$$\frac{\sum A,B,C,D,E,F}{2} \times 10 = \text{Keimzahl/g}$$

- $\sum A,B,C,D,E,F$ = Summe aller verdächtigen Kolonien auf den Platten A,B,C,D,E,F
(auf denen insgesamt 2 ml Erstverdünnung ausgespatelt wurden)
- Dividend (2) = Berechnung der Keimzahl für 1 ml Erstverdünnung
- Faktor (10) = Verdünnungsfaktor

3.3.7 Muschelkontamination

3.3.7.1 Herkunft, Transport und Haltung der Versuchstiere

Geerntet wurden die Muscheln jeweils in der Ostsee in Gebieten der Kieler Außen- und Innenförde bei Wassertemperaturen zwischen 8 und 25°C, Salzgehalten zwischen 9 und 19 ‰ und pH-Werten zwischen 7,9 und 8,3. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von durchschnittlich 12°C ohne Wasser in Styropor®-Thermokisten mit Kühlakkus transportiert. Nach Ankunft im Labor wurden die Muscheln zunächst an eine Temperatur von 15°C adaptiert, bevor die Transportkisten dann mit künstlichem Meerwasser (15°C und 20‰ Salzgehalt) besetzt wurden. Über einen Zeitraum von 1-2 Tagen und mehrmaligem Wasserwechsel wurde den Tieren Gelegenheit gegeben, grobe Partikel wie Sand und Schlack abzusondern. Anschließend wurden die Muscheln von Anhaftungen in Form von Algen und Seepocken gesäubert. Danach wurden die Tiere für wenige Stunden in Süßwasser gebadet. Es folgte eine 5-tägige Quarantänehaltung der Muscheln unter Bedingungen, die auch in der Haltungsanlage herrschten. Die Muscheln wurden in mit Ozon (100mg/h) und UV-C-Licht behandeltem Wasser (15°C und 20‰ Salzgehalt) eines Kreislaufsystems gehalten. Die Merkmale der Wasserqualität sind in Tabelle 10 aufgeführt. Gefüttert wurden die Tiere mit einer Algenmischung (*Nanochloropsis oculata*, *Nanochloropsis salina*, *Tetraselmis suecica* und *Chlorella* spp.) in einer Konzentration von 10³ bis 10⁴/ml sowie mit Detritus (Staubfutter für Jungfische).

Eigene Untersuchungen

Merkmale	Dimension
Gesamtvolumen	600 Liter
Sauerstoff (O ₂)	8-9 mg/l
Salzgehalt (S ‰)	20 ± 2 ‰
Temperatur T	15 ± 2 °C
pH-Wert	8,0-8,5
Ammoniak (NH ₃)	0,020mg/l
Nitrat (NO ₃ ⁻)	10-70 mg/l
Nitrit (NO ₂ ⁻)	0,05-0,1 mg/l

Tabelle 10: Wasserqualität der Halteanlage

3.3.7.2 Kontamination der Versuchstiere

Die Kontamination der Miesmuscheln erfolgte in Anlehnung an LIU et al. (2006). Dazu wurden die Schalentiere etwa eine Stunde vor der eigentlichen Kontamination aus ihren Haltebecken genommen und ohne Wasser bei Raumluft gelagert. Dann wurden die Tiere in ein zuvor sterilisiertes 12-Liter-Aquarium gesetzt, das mit 8 Litern künstlichem Meerwasser gefüllt war. Diesem Wasser wurde ein Aliquot einer frischen Bakterienkultur (über Nacht bei 37°C in modifiziertem APW inkubiert) hinzugefügt. Zur Kühlung des Systems befand sich das Kontaminationsbecken wiederum in einem weiteren meerwassergefüllten Aquarium, welches an ein Kühlaggregat angeschlossen war. Die Muscheln verblieben 12-16 Stunden im Kontaminationsbecken, wurden dann herausgenommen und gelangten mit Kühlakkus gekühlt in Styropor®-Thermokisten zur bakteriologischen Untersuchung in die Räume des NRL. Beim ersten Drittel der Ansätze wurde ausschließlich *V. parahaemolyticus* hinzugegeben, in den restlichen dann zusätzlich *V. alginolyticus* beigemischt. Bei den einzelnen Kontaminationen kamen verschiedene Stämme (Referenz- und Feldstämme) von *V. parahaemolyticus* und auch von *V. alginolyticus* in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz. Zumeist entsprach dabei die verwendete Menge an *V. alginolyticus* der Menge von *V. parahaemolyticus*. Die jeweils eingesetzten Stämme und deren verwendete Konzentrationen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Abbildung 8 zeigt den Aufbau der Anlage für die Kontamination.

Eigene Untersuchungen



Abbildung 8: Kontaminationsanlage: links Kühlaggregat, rechts Kontaminationsbecken im Kühlbecken (PUND, 2008)

Versuchs-Nr.	<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. alginolyticus</i>	
	Stamm	Konzentration (KbE/ml)	Stamm	Konzentration (KbE/ml)
1	CH 1652	$7,68 \times 10^3$	-	-
2	CH 1585	$4,48 \times 10^2$	-	-
3	51-10	$4,88 \times 10^4$	-	-
4	DSM 10027	0	-	-
5	NC 10885	$8,27 \times 10^3$	-	-
6	DSM 10027	$7,61 \times 10^3$	DSM 2171	$3,7 \times 10^3$
7	DSM 10027	$9,48 \times 10^1$	42-30/07 5	$2,10 \times 10^2$
8	M 52-16	$3,10 \times 10^2$	M52-14	$1,33 \times 10^3$
9	42-40/07-1	$2,38 \times 10^1$	42-40/07-2	$2,27 \times 10^2$
10	42-40/07-1	$5,0 \times 10^1$	42-40/07-2	$4,76 \times 10^2$
11	CH1827	$1,81 \times 10^1$	M 50-9	$3,31 \times 10^2$
12	M 49-3	$1,74 \times 10^2$	CH 1805	$8,68 \times 10^1$
13	M 49-3	$7,7 \times 10^1$	CH 1805	$5,0 \times 10^1$
14	M 49-3	$2,89 \times 10^2$	CH 1805	$1,87 \times 10^2$
15	M 9 f	$1,0 \times 10^{-1}$	M9 n	$4,54 \times 10^2$

Tabelle 11: Nachweis von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Muscheln - Verwendete *Vibrio* spp. Stämme und deren Konzentration /ml Tankwasser

Eigene Untersuchungen

3.3.7.3 Untersuchung der kontaminierten Miesmuscheln

Von jeder Charge kontaminierter Muscheln wurden sechs verschiedene Proben genommen. Diese unterschieden sich in der Menge des verwendeten Muschelmaterials. Um eine mögliche Abhängigkeit zwischen Muscheleinwaage und *V. parahaemolyticus*-Nachweisrate nachweisen zu können, wurden für die Erstverdünnungen jeweils im Doppelansatz ca. 20g, ca. 25g bzw. ca. 30g Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit eingewogen. Die 1:10 Erstverdünnungen wurden wie zuvor beschrieben hergestellt. Als Nährmedium wurde hier ausschließlich modifiziertes APW (pH 8,5; 0,01M Tris; 5% NaCl; 2% Arabinose) eingesetzt. Als Zählmethode wurde das MPN-Verfahren wie in unter 3.3.6.2 beschrieben angewendet.

Die Vorgehensweise bei Kontamination der Muscheln und deren späteren Untersuchung zeigt Abbildung 9.

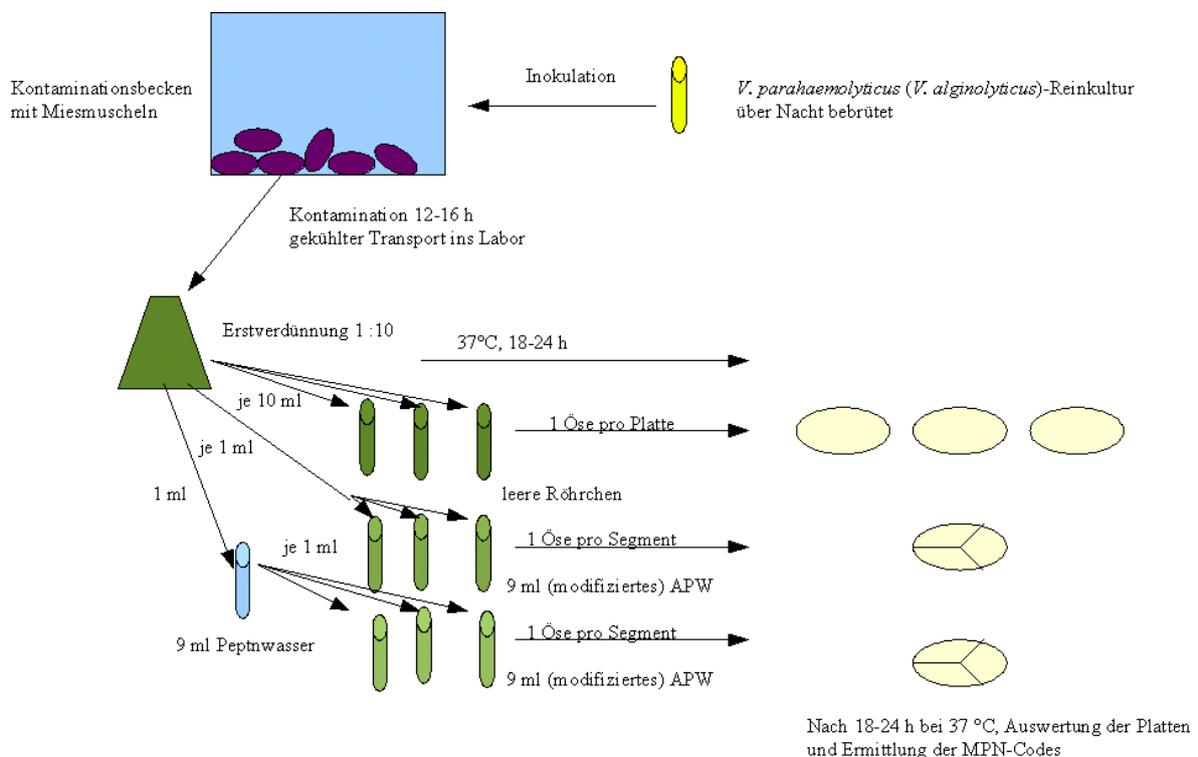


Abbildung 9: Nachweis von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Muscheln - Kontamination und Untersuchung der Tiere

3.3.7.4 Identifizierung nachgewiesener Bakterien

Die isolierten Bakterienstämme wurden sowohl biochemisch/kulturell sowie teilweise per PCR identifiziert.

Eigene Untersuchungen

3.3.7.4.1 Biochemische/kulturelle Identifizierung

Die biochemisch/kulturellen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die Methoden nach BOCKEMÜHL (1992) und BAUMGART (2007).

– Herstellung der Reinkulturen

Zur Identifikation wurden von den gewachsenen Kolonien zunächst Reinkulturen hergestellt, indem von jeweils einer Kolonie des zu differenzierenden Keims ein fraktionierter Verdünnungsaustrich (3-Ösenaustrich) auf Schafblutagar angefertigt wurde. Diese Reinheitsausstriche wurden bei 37°C für 18-24 Stunden inkubiert.

3.3.7.4.2 Biochemische Identifikation

– Oxidase-Test

Koloniematerial (Einzelkolonien) einer frischen Reinkultur wurde auf der Reaktionszone des Cytochromoxidase-Teststäbchens (Bactident Oxidase, Merck, Art Nr. 1.13300) verrieben. Nach 30 Sekunden wurde die Farbe des Reaktionsfeldes mit der Farbskala des Herstellers verglichen.

Interpretation:

blau-blauviolett = Oxidase positiv

keine Verfärbung = Oxidase negativ

Mit Ausnahme von *V. metschnikovii* sind *Vibrio* spp. Oxidase positiv.

– String-Test

Mit dem sogenannten String-Test wurde das Gramverhalten der Bakterien überprüft. Dazu wurde Koloniematerial der frischen Reinkultur in 1 bis 3 Tropfen 3% Kaliumhydroxidlösung (KOH-Lösung) mit einer Impföse auf einem Objektträger verrieben. Die dünne Zellwand gram-negativer Bakterien wird dabei zerstört und deren Nukleinsäuren freigesetzt, weshalb es zur Schlierenbildung kommt. Darüber hinaus kommt es beim langsamen Herausziehen der Öse zu einer Fadenbildung zwischen Öse und Tropfen.

Aufgrund der dicken Zellwand ist dieses Phänomen bei gram-positiven Bakterien nicht zu beobachten. *Vibrio* spp. sind gram negativ.

– Nativpräparat

Zur Beurteilung der Zellform und der Beweglichkeit wurde ein Nativpräparat angelegt. Dazu wurde Koloniematerial der frischen Reinkultur in 1 bis 3 Tropfen 1% NaCl-Lösung auf einem Objektträger verrieben und dann ein Deckgläschen aufgelegt. Betrachtet wurde das Präparat mit einem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

Zellen von *Vibrio* spp. sind beweglich und stäbchenförmig.

– Prüfung auf Schwefelwasserstoff (H₂S)-, Indolbildung und Beweglichkeit (Movement) mit SIM-Agar

Mit Koloniematerial einer frischen Reinkultur (Einzelkolonien) auf einer Impfnadel wurde das halb feste SIM-Medium stichbeimpft. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 Stunden

Eigene Untersuchungen

bei 37°C und Überprüfung der Beweglichkeit und Sulfidbildung wurde das Medium zum Test auf Indolbildung mit 1-2 Tropfen Kovacz-Reagenz überschichtet.

Interpretation

Trübung des Agars um den Stichkanal = Beweglichkeit

Schwarzfärbung = Schwefelwasserstoff wurde gebildet

Rosafärbung nach Überschichtung mit Kovacz-Reagenz = Indol wurde gebildet

Vibrio spp. sind in der Regel beweglich und bilden keinen Schwefelwasserstoff. *V. parahaemolyticus* ist in der Lage, Indol zu produzieren.

- **Prüfung auf Zuckerverstoffwechslung, Schwefelwasserstoff (H₂S)-Bildung und Gasbildung mit Triple-Sugar-Iron-(TSI)-Schrägagar**

Mit dem Drei-Zucker-Eisen- Schrägagar (Triple-Sugar-Iron-Agar) werden folgende Fähigkeiten überprüft: oxidative und fermentative Verstoffwechslung von Glukose, Laktose oder Saccharose, Schwefelwasserstoffbildung und Gasbildung. Dazu wurde das Medium im Hochschichtbereich zunächst mit einer Öse Koloniematerial (Einzelkolonien) der frischen Reinkultur stichbeimpft und das Material beim Herausziehen der Öse zusätzlich auf der Schrägfläche des Nährmediums ausgestrichen. Der so inokulierte Agar wurde dann 18-24 Stunden (bei unklarer Reaktion auch 48 Stunden) bei 37°C inkubiert.

Interpretation:

Schrägfläche:

Rot = weder Laktose- noch Saccharoseabbau

Gelb = Laktose- und/oder Saccharoseabbau

Hochschichtbereich:

Rot = Keine Fermentation, das Bakterium ist obligat aerob

Gelb = Fermentation hat stattgefunden, Säure wurde gebildet, Bakterium ist fakultativ anaerob

Blasen/Risse = Gasbildung hat stattgefunden

Schwarz = Schwefelwasserstoff wurde gebildet

Gelbfärbung ausschließlich im Hochschichtbereich = nur Glukoseabbau, Bakterium ist fakultativ anaerob

Vibrio spp. können Zucker sowohl aerob als auch anaerob abbauen. Dabei produzieren sie mit Ausnahme von *V. furnissii* kein Gas. Schwefelwasserstoffbildung findet ebenfalls nicht statt. *V. parahaemolyticus* verstoffwechselt weder Laktose noch Saccharose; Glukose wird fermentiert. Dieser Keim ist fakultativ anaerob.

- **Morphologie auf Schafblutagar**

Zur Beurteilung der Morphologie auf Schafblutagar wurden die Platten herangezogen, auf denen die Reinheitsausstriche angefertigt wurden.

V. parahaemolyticus präsentiert sich auf Schafblutagar als mittelgroße bis große, grau-weiße Kolonien, die häufig einen β-Hämolysehof zeigen.

- **Empfindlichkeit gegenüber O 129-Vibriostatikum (2,4-Diamino-6,7-diisopropyl-pteridin-Phosphat)**

Eigene Untersuchungen

- Für den Vibrastatikum-Empfindlichkeits-Test wurde Koloniematerial der frischen Reinkultur mit einer Impföse über die gesamte Fläche einer Platte mit Schafblutagar oder Columbia-Agar verteilt. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die komplette Oberfläche nach der Inkubation über dicht mit Bakterienkolonien bewachsen sein würde. Anschließend wurden je ein Plättchen mit 10 µg O 129 (Oxoid, DD 14) und ein Plättchen mit 150 µg O 129 (Oxoid, DD 15) mit einer sterilen Pinzette auf die beimpfte Agarplatte übertragen und leicht angedrückt. Nach der Inkubation für 18-24 Stunden bei 37°C wurden die Platten auf Hemmhofbildung untersucht. Ein Keim galt als sensibel gegenüber einer Konzentration des Vibriostatikums, sobald sich um das entsprechende Plättchen ein Hemmhof von mindestens 2 mm gebildet hatte. Bei einem nicht eindeutigen Ergebnis wurde die Platte weitere 24 h bebrütet und erneut ausgewertet.

Vibrio spp. verhalten sich gegenüber 10 µg O 129 unterschiedlich sensitiv, gegen 150 µg des Vibriostatikums sind jedoch alle Spezies dieses Genus empfindlich. *V. parahaemolyticus* gilt als resistent gegenüber 10 µg O 129, jedoch sensibel gegenüber 150 µg dieses Stoffes.

- **Wachstumsvermögen bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen**

Um die Halotoleranz eines Stammes zu testen, wurde Koloniematerial (Einzelkolonien) der frischen Reinkultur in fünf Peptonwasser-Röhrchen mit NaCl-Konzentrationen 0%, 1%, 3%, 8% bzw. 10% verteilt und mittels Rüttler gut aufgeschüttelt. Die so beimpften Röhrchen wurden bei 37°C für 18-24 Stunden inkubiert. Ein Röhrchen galt als bewachsen, sobald eine Trübung der bebrüteten Suspension festzustellen war. Bei nicht eindeutiger Trübung wurden die Röhrchen weitere 24 Stunden bebrütet. Mit Ausnahme von *V. cholerae* und *V. mimicus* benötigen *Vibrio* spp. zum Wachstum eine Salzkonzentration von mindestens 1%.

V. parahaemolyticus-Stämme wachsen bei Salzkonzentrationen bis 8% sicher, können sich aber in wenigen Fällen auch bei Salzgehalten von 10% und 12% noch vermehren.

- **Differenzierung der Stämme mit dem API 20 E**

Die Durchführung des API 20 E (Biomérieux, 20100)-Tests geschah - bis auf die geforderte Salzkonzentration der Suspensionslösung - nach Herstellerangaben. Zu diesem Zwecke wurde Koloniematerial (Einzelkolonien) der frischen Reinkultur in 5ml 1% NaCl-Lösung übertragen und auf einem Rüttler gut aufgeschüttelt. Die Inkubationswanne wurde mit ca. 5ml Aqua bidest. befüllt. Mittels Einmalpipette wurde die Suspension in die Reaktionsgefäße des Teststreifens in der jeweils angezeigten Menge eingefüllt. Entsprechend gekennzeichnete Reaktionsgefäße wurden anschließend zusätzlich mit einigen Tropfen Paraffinöl (Biomérieux, 70100) überschichtet. Nach Inkubation der in der Inkubationswanne befindlichen Teststreifen bei 37°C für 24 Stunden wurden die Ergebnisse abgelesen. Tabelle 12 zeigt die Art der Tests dieses Systems und ihre Interpretationen. Fielen mindestens drei Reaktionen positiv aus, so wurden die weiteren vom Hersteller vorgesehenen Tests (Tryptophandesaminase/Indolbildung/Acetoinbildung = VogesProskauer) durchgeführt. Bei weniger als drei positiven Reaktionen wurde auf die weiteren Tests verzichtet und der Teststreifen weitere 24 Stunden bebrütet.

Die Testergebnisse wurden in einem Vordruck eingetragen. Jeweils drei Reaktionen bildeten eine von insgesamt sieben Testgruppen. Allen positiven Ergebnissen war jeweils

Eigene Untersuchungen

ein Zahlenwert zugeordnet. Die Zahlenwerte innerhalb der einzelnen Testgruppen wurden addiert und die Summen pro Testgruppe notiert. Es ergab sich damit ein 7-stelliger numerischer Code. Der Keim, der diesem Profil zugeordnet wird, wurde entweder in der zugehörigen Profilliste nachgeschlagen oder durch Eingabe in die entsprechende Maske auf der Internetseite des Herstellers ermittelt.

Test	Substrate	Reaktion/Enzym des Keimes	Ergebnisinterpretation	
			negativ	positiv
ONPG	2-Nitrophenyl-βD-Galaktopyranosid	β-Galaktosidase (Ortho-Nitrophenyl-βD-Galaktopyranosid)	farblos	gelb
ADH	L-Arginin	Arginin-Dihydrolase	gelb	rot / orange
LDC	L-Lysin	Lysin-Decarboxylase	gelb	rot / orange
ODC	L-Ornithin	Ornithin-Decarboxylase	gelb	rot / orange
CIT	Trinatriumcitrat	Citratverwertung	hellgrün/gelb	blaugrün/blau
H₂S	Natriumthiosulfat	H ₂ S-Bildung	farblos/gräulich	schwarzer Niederschlag
URE	Harnstoff	Urease	gelb	rot / orange
TDA	L-Tryptophan	Tryptophandesaminase	gelb	rotbraun
IND	L-Tryptophan	Indolbildung	farblos hellgrün/gelb	rosa
VP	Natrimpyruvat	Acetoinbildung (Voges-Proskauer)	farblos	rosa/rot
GEL	Gelatine	Gelatinase	keine Diffusion	Diffusion der Tusche
GLU	D-Glukose	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb/gelbgrau
MAN	D-Mannit	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
INO	Inosit	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
SOR	D-Sorbit	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
RHA	L-Rhamnose	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
SAC	D-Saccharose	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
MEL	D-Melibiose	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
AMY	Amygdalin	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb
ARA	Arabinose	Oxidation/Fermentation	blau/blaugrün	gelb

Tabelle 12: API 20 E: Tests/Reaktionen und Interpretationsanweisung

– Kontrollstämmе

Zur Kontrolle der Medien und phänotypischen Reaktionen wurden folgende Stämme mitgeführt:

- V. parahaemolyticus* DSM 10027
- V. alginolyticus* DSM 2171
- E. coli* DSM 1103
- Aeromonas hydrophila* DSM 30187

– Stammhaltung auf Mikrobank

Für die Stammhaltung wurden isolierte Keime in Mikrobanksystemen (Mast Diagnostica 291604) aufbewahrt. Dabei wurde gemäß den Herstellervorschriften ca. eine halbe Öse

Eigene Untersuchungen

Koloniematerial von frischen Reinkulturen in die Mikrobankgefäße übertragen, gut geschüttelt und die überstehende Suspension abschließend abpipettiert. Die gut verschlossenen Mikrobankgefäße wurden dann bei -80°C tiefgefroren.

3.3.7.4.3 Molekularbiologische Identifizierung

– DNA-Isolation mit Chelex® 100 Resin zur Vorbereitung der PCR

Das Harz Chelex ist ein Chelatbildner, der eine hohe Affinität für polyvalente Metallionen aufweist. Chelex setzt sich aus Styrene-Divinylbenzene Kopolymeren zusammen, die Iminodiazetationen als komplexbildende Gruppen besitzen. Durch seine den pH-Wert verändernden Eigenschaften beim Erhitzen führt es zur Zerstörung der Zellwände und damit zur Freisetzung der DNA. Dazu wurde eine halbe Impföse Koloniematerial einer frischen Reinkultur in 400 µl 0,1% Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf) auf einem Rüttler aufgeschüttelt. Das so gewaschene Material wurde daraufhin bei 14.000 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, 400 µl frisch aufgewirbelte 5% Chelex® 100 Resin (BioRad, 142-2832)-Lösung auf das verbleibende Pellet gegeben und mit einem Rüttler aufschüttelt. Die Suspension wurde dann in einem Thermomixer zunächst für 1 Stunde bei 56°C und 700 U/min und anschließend weitere 15 Minuten bei 95°C und 700 U/min inkubiert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße sofort auf Eis gekühlt und dann zur Trennung der DNA von Zelltrümmern und Chelex® 100 Resin Teilchen bei 14.000 U/min und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Mit der im Überstand verbleibenden DNA konnte dann eine PCR durchgeführt werden.

– Multiplex PCR

Die Durchführung der Multiplex PCR geschah in Anlehnung an KIM et al. (1999) und TADA et al. (1992).

Herstellung der Reaktionsansätze

Bei der Multiplex PCR zur Detektion von *V. parahaemolyticus* dienten Abschnitte auf den Genen *toxR*, *tdh* und *trh* als Zielsequenzen. Tabelle 13 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primerpaare zur Detektion der zuvor genannten Gene sowie die Größe der entsprechenden PCR Produkte.

Primer	Sequenz 5' nach 3'	Größe des PCR-Produkts
toxR forward	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	368 bp
toxR reverse	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	
trh forward	GGCTCAAATGGTTAAGCG	251 bp
trh reverse	CATTTCCGCTCTCATATGC	
tdh forward	CCACTACCACTCTCATATGC	425 bp
tdh reverse	CCATCTGTCCCTTTCTCTGC	

Tabelle 13: Molekularbiologischer Nachweis von *V. parahaemolyticus* mittels PCR - Sequenzen der Primerpaare und Größe des PCR-Produkts (bp = basepairs) nach KIM et al. (1999) und TADA et al (1992)

Eigene Untersuchungen

Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, um mögliche Ungenauigkeiten beim Pipetieren der geringen Mengen in den Einzelansätzen zu umgehen. Dieser enthielt sämtliche Komponenten eines Einzelansatzes in einer für alle Ansätze (inklusive einer Reserve) ausreichender Menge bei gleichem Mischungsverhältnis. Dazu wurden unter einer sterilen, zuvor mit UV-Licht dekontaminierten Werkbank steriles Aqua bidest., 10xPCR-Puffer, Magnesiumchlorid (MgCl₂), eine Mischung der vier Dinucleotidtriphosphate (dNTP), drei Primerpaare und taq Polymerase in ein steriles, per UV-Licht dekontaminiertes Reaktionsgefäß pipettiert. Tabelle 14 zeigt Art und Menge der einzelnen Komponenten. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Rüttler gut aufgeschüttelt. 24,5 µl Aliquots des Mastermixes wurden dann in sterile, per UV-Licht dekontaminierte 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Außerhalb der Werkbank erfolgte dann unverzüglich die Zugabe von 0,5 µl isolierter DNA der Proben sowie der Kontrollen.

	Einzelmenge	Mastermix (Beispiel)
Anzahl der Ansätze	1	25
Einheit	[µl]	[µl]
Aqua bidest	17,5	437,5
Puffer	2,5	62,5
MgCl₂ (50mM)	2	50
dNTPs (2,5 mM each)	0,5	12,5
trh 1 (100 pmol)	0,25	6,25
trh 2 (100 pmol)	0,25	6,25
tdh D1 (50 pmol)	0,5	12,5
tdh D3 (50 pmol)	0,5	12,5
toxR1 (100 pmol)	0,25	6,25
toxR3 (100 pmol)	0,25	6,25
gesamt	24,5	612,5

+ 2 µl **taq Polymerase**
+ 0,5 µl **DNA/ Probe**

Tabelle 14: Molekularbiologischer Nachweis von *V. parahaemolyticus* mittels PCR - Art und Menge der PCR-Komponenten

Als Positivkontrollen diente DNA eines *V. parahaemolyticus*-Stammes ohne Hämolysingene und eines Stammes, der beide Hämolysingene aufwies, während *E.coli* als Negativkontrolle verwendet wurde. Ein Reaktionsansatz ohne DNA fungierte als Leerprobe. Zur Kühlung standen die einzelnen Komponenten und Reaktionsgefäße während sämtlicher Arbeitsschritte auf Eis.

Amplifikation der DNA im Thermocycler

Zur Amplifizierung der DNA wurden die gut verschlossenen Reaktionsgefäße in den PCR-Block gesetzt und das Programm bei Betriebstemperatur gestartet. Dabei erfolgte eine längere initiale Denaturierung, der sich 35 Zyklen - bestehend aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Synthese (Elongation) - anschlossen. Die PCR endete mit einer längeren terminalen Synthesephase, nach der die Reaktionsgefäße unverzüglich auf 4°C abgekühlt wurden. Tabelle 15 zeigt Dauer und Temperatur der einzelnen PCR-Schritte.

Eigene Untersuchungen

Phase	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Denaturierung (initial)	96 °C	5 Min	-
Denaturierung	94 °C	1 Min	30 Zyklen
Annealing	58 °C	1 Min	
Elongation	72 °C	1 Min	
Elongation (terminal)	72 °C	7 Min	-
Aufbewahrung	4 °C		-

Tabelle 15: Molekularbiologischer Nachweis von *V. parahaemolyticus* mittels PCR - Thermocycler-Programm

Gelvorbereitung und Gelelektrophorese

Vorbereitend wurde zunächst der Kamm aus dem erstarrten 2%igen Agarose-TAE-Gel gelöst. Anschließend wurde das Gel mitsamt dem Schlitten aus der Gelkammer entfernt und in eine Elektrophoresekammer gelegt. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x TAE-Puffer (10-fach verdünnter 10fach-konzentrierter = 10x TAE-Puffer) gefüllt, bis das Gel bedeckt war. Vor der Beschickung des Gels wurden die Proben mit jeweils 4 µl Ladepuffer versehen und gut durchmischt.

In die erste und in die letzte und bei Bedarf auch in die mittlere Tasche wurden jeweils 5 µl Größenmarker eingefüllt. Pro Probe wurden 12,5 µl Substrat in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer verschlossen und für eine Stunde an ein elektrisches Feld von 100 V bei einem Strom von 200 mA angeschlossen.

Gelfärbung und Auswertung

Nach dem Elektrophoresevorgang wurde das Gel für ca. 15 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad geschwenkt und anschließend für 20 Minuten in Aqua bidest. gewässert.

Die entstandenen Banden wurden mittels UV-Licht in einer speziellen Kammer sichtbar gemacht und über eine daran angeschlossene Fotoapparatur mit einem spezifischem Programm des IT-Systems dokumentiert. Somit konnte das Gelbild sowohl gespeichert, ausgedruckt als auch ausgewertet werden.

Der Nachweis des *tox R* Gens und damit von *V. parahaemolyticus* galt als erbracht, sobald ein Amplifikat von 425 bp (=base pairs = Basenpaare) nachgewiesen werden konnte. Amplifikate von 425 bp oder 251 bp sprachen für die Anwesenheit des *tdh* bzw. *trh* Gens. Als Vergleichswert dienten Banden der Marker und der Positivkontrollen. Gleichzeitig durften die *E. coli* Negativkontrolle und der Leerwert keine entsprechenden Ampflikate enthalten.

V. parahaemolyticus lag nicht vor, wenn kein *tox R*-Amplifikat bei den Proben nachgewiesen werden konnte, wohl aber bei den Positivkontrollen.

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde die Programme SPSS 12.0 und 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet. Unterstützt wurde dieser Teil der Untersuchungen durch Fachgruppe 33 „Epidemiologie, Biometrie und mathematische Modellierung“ des Bundesinstituts für Risikobewertung in Form von Beratung bezüglich geeigneter statistischer Tests sowie deren teilweiser Durchführung und Auswertung.

4 Ergebnisse

4.1 Leistungsprüfung des Chrom-Vibrio-Agar (CVA)

4.1.1 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Reinkulturen

– Koloniemorphologien auf TCBS-Agar

Auf TCBS-Agar bildeten alle überprüften Bakterienstämme von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* und *V. damsela* grüne Kolonien von 2-3 mm Durchmesser. Die Stämme von *V. cholerae*, *V. alginolyticus* und *V. fluvialis* erschienen auf diesem Festnährmedium als gelbe Kolonien. Kolonien von *V. furnissii* besaßen ein dunkelgelbes Aussehen. Abgesehen von *V. alginolyticus* mit 2-5 mm und *V. furnissii* mit 2-4 mm, lag der Koloniedurchmesser der zum Saccharoseabbau befähigten *Vibrio* spp. bei 1-2 mm. Bei *V. anguillarum* konnte kein Wachstum auf diesem Nährmedium festgestellt werden. Unter den Bakterien, die nicht dem Genus *Vibrio* zuzuordnen sind, wuchsen auch *Salmonella* Typhimurium und *Pseudomonas aeruginosa* zu winzigen grünen Kolonien heran. *Pseudomonas fluorescens* war in der Lage, 5mm große, gelbe und *Enterobacter cloacae* 2 mm große, hellgelbe Kolonien auf TCBS-Agar zu produzieren. Bei *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* und *Shewanella putrefaciens* hingegen konnte auf diesem Agar kein Wachstum beobachtet werden.

– Koloniemorphologien auf CVA

15 von 17 überprüften *V. parahaemolyticus*-Stämmen erschienen nach 18-24 Stunden Bebrütung auf CVA-Agar als Kolonien mit violetterm Zentrum und irisierendem Rand. Zwei Vertreter dieser Spezies bildeten auf CVA Kolonien mit milchigem, zart rötlichem Zentrum und wiesen ebenfalls einen irisierenden Rand auf. Alle Kolonien von *V. parahaemolyticus* erreichten einen Durchmesser von 2-4 mm, waren glattrandig und zeigten eine glatte Oberfläche. Die getesteten Stämme von *V. vulnificus*, *V. cholerae* und *V. mimicus* produzierten auf diesem Agar türkisfarbene Kolonien von 1-2 mm Durchmesser. Ein Stamm *V. fluvialis* bildete auch türkisfarbene Kolonien von 2 mm Durchmesser. Kolonien der 5 anderen Stämme dieser Spezies waren hingegen milchig und nur 1mm groß. Ein ebenfalls milchiges Aussehen besaßen *V. alginolyticus* und *V. furnissii*, deren Kolonien mit 2-5 mm bzw 2-4 mm deutlich größer als die von *V. fluvialis* ausfielen. *V. anguillarum* und *V. damsela* vermochten es nicht, sich auf diesem Nährmedium zu vermehren. Auch ein Wachstum Nicht-Angehöriger des Genus *Vibrio* auf CVA war zu beobachten. *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* entwickelten jeweils milchige Kolonien von 2-4 mm bzw. winzigem Durchmesser. Die Kolonien von *Enterobacter cloacae* und *Salmonella* Typhimurium erschienen türkisfarben oder waren farblos und ebenfalls winzig. Ein Wachstum von *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* oder *Shewanella putrefaciens* kam auf diesem Festnährmedium nicht vor.

Ergebnisse

Abbildung 10 zeigt die Koloniemorphologie von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* auf CVA-Agar. Es handelt sich hierbei jeweils um Hellfeldaufnahmen.

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die Anzahl der getesteten Stämme und deren Erscheinungsbild sowohl auf TCBS-Agar als auch CVA-Agar.

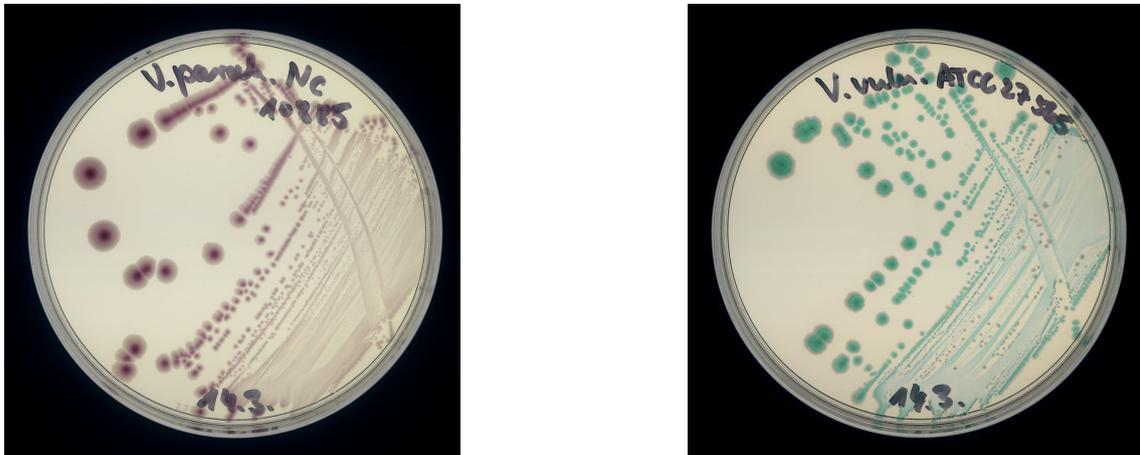


Abbildung 10: Nährbodenvergleich - Reinkulturen von *V. parahaemolyticus* (links) und *V. vulnificus* (rechts) auf CVA im Hellfeld aufgenommen

Ergebnisse

Bakterienart	Stamm- anzahl	CVA		TCBS-Agar	
		Koloniefarbe	Koloniedurch- messer	Koloniefarbe	Koloniedurch- messer
<i>V. parahaemolyticus</i>	15	violett	2-4mm	grün	2-3mm
	2	milchig	2-4mm	grün	2-3mm
<i>V. vulnificus</i>	4	türkis	2mm	grün	2-3mm
<i>V. fluvialis</i>	5	milchig	1mm	gelb	1mm
	1	türkis	2mm	gelb	2mm
<i>V. alginolyticus</i>	19	milchig	2-5mm	gelb	2-5mm
<i>V. mimicus</i>	2	türkis	1-2mm	grün	2mm
<i>V. cholerae</i>	3	türkis	1-2mm	gelb	1-2mm
<i>V. furnissii</i>	1	milchig	2-4mm	dunkelgelb	2-4mm
<i>V. damsela</i>	1	kW	kW	grün	2-3mm
<i>V. anguillarum</i>	1	kW	kW	kW	kW
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	milchig	2-4mm	gelb	5mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	milchig	winzig	grün	winzig
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	kW	kW	kW	kW
<i>E. coli</i>	1	kW	kW	kW	kW
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	türkis	winzig	hellgelb	2mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	farblos	winzig	grün	winzig
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	kW	kW	kW	kW

kW=kein Wachstum

Tabelle 16: Nährbodenvergleich - Koloniemorphologie der untersuchten Keime vergleichend auf CVA und TCBS-Agar

4.1.2 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Mischkulturen

Nach Ausspateln einer 1:1 Mischung von *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 und *V. vulnificus* ATCC 27562 auf TCBS-Agar erschienen alle Kolonien grün. Eine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen den eingesetzten Spezies war hier nicht möglich. Auf CVA-Agar dagegen ließen sich die beiden Keimarten farblich deutlich voneinander abgrenzen. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von *V. alginolyticus* DSM 2171 und *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 war sowohl auf TCBS als auch auf CVA-Agar keine Verdrängung von *V. parahaemolyticus* durch *V. alginolyticus* zu beobachten. Auch bei der Mischung von *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 mit *V. alginolyticus* DSM 2171 und *V. fluvialis* (Feldstamm) konnten alle Vibrionenarten auf beiden Agarsorten klar voneinander unterschieden werden.

Bei einer Mischung von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2 (Feldstamm) dagegen war auf TCBS-Agar keine deutliche Differenzierung mehr möglich, da eng beieinander liegende Kolonien von *V. alginolyticus* hier ebenfalls eine grüne Farbe annahmen, und sich auch über ihren Durchmesser nicht sicher von *V. parahaemolyticus*

Ergebnisse

abgrenzen ließen. *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2- Kolonien in Randlage erreichten die gewöhnliche Größe sowie gelbe Farbe. Kolonien mit Mischfarben (gelb und grün) waren ebenfalls zu beobachten (vgl. Abbildung 11). Ausgespatelt auf CVA konnten die beiden Stämme eindeutig unterschieden werden. Des Weiteren war auf beiden Agarsorten eine Dominanz von *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2 festzustellen.

Auch bei der Mischung von *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 mit *V. cholerae* (Feldstamm) konnten die Kolonien der beiden verwendeten Keime sowohl auf TCBS als auch auf CVA auseinandergelassen werden. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die verwendeten Keime, deren Mischungen sowie deren Verteilung auf CVA bzw. TCBS -Agar.

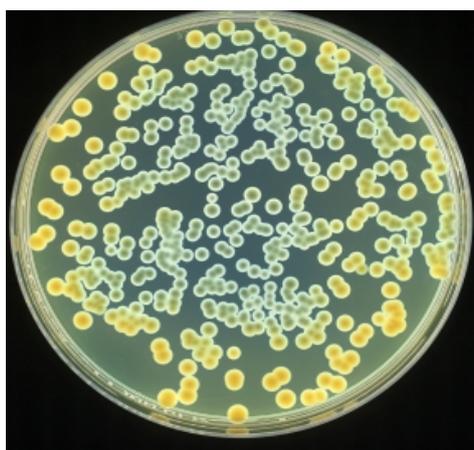


Abbildung 11: Nährbodenvergleich
- *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2
auf TCBS-Agar

Mischung	Stamm	Chrom-A.	TCBS-A.
1	<i>V. parahaemolyticus</i>	97% violett	100% grün
	<i>V. vulnificus</i>	3% türkisgrün	
2	<i>V. parahaemolyticus</i>	83% violett	96% grün
	<i>V. alginolyticus</i>	17% milchig	4% gelb
3	<i>V. parahaemolyticus</i>	63% violett	49% grün
	<i>V. alginolyticus</i>	1% milchig	2% gelb
	<i>V. fluvialis</i>	26% milchig-klein	49% gelb-klein
4	<i>V. parahaemolyticus</i>	98% violett	83% grün
	<i>V. cholerae</i>	2% türkisgrün	17% gelb

Tabelle 17: Nährbodenvergleich - Anteile (%) und Farben der koloniebildenden Einheiten (KbE) der verschiedenen *V. parahaemolyticus*-Mischungen vergleichend auf CVA und TCBS-Agar.

Abbildung 12 zeigt eine Mischung von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* auf CVA-Agar im Vergleich zu TCBS-Agar. Nur CVA gestattet eine klare makroskopische Unterscheidung der beiden Vibrionenarten.

Ergebnisse

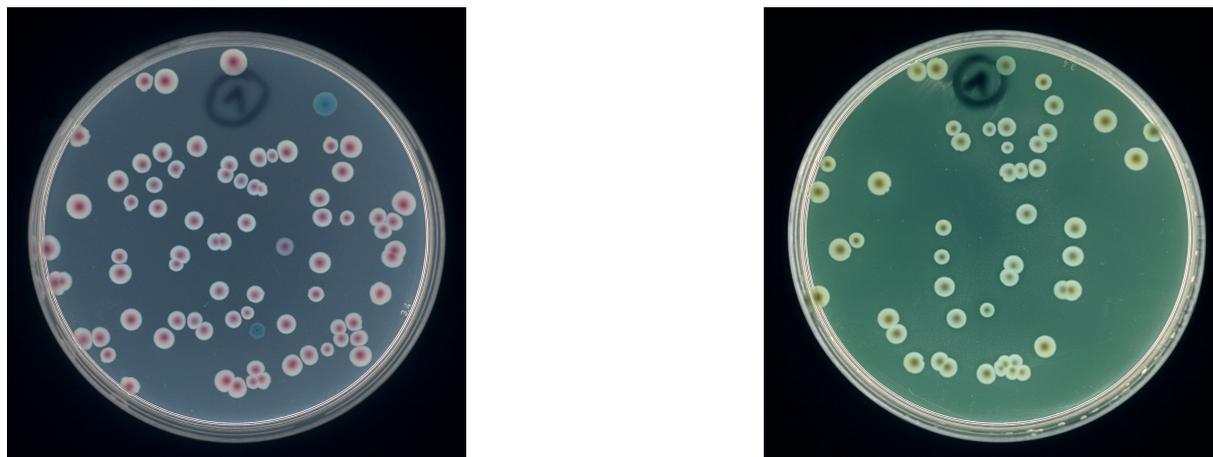


Abbildung 12: Nährbodenvergleich - Mischungen von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* auf CVA (links) und TCBS-Agar (rechts) im Dunkelfeld

4.1.3 Vergleich des Koloniewachstums auf CVA und TCBS-Agar: Sensitivität und Spezifität

Auf TCBS-Agar angezüchtet, produzierten alle 17 Stämme von *V. parahaemolyticus* grüne, 2-3mm große Kolonien. Allerdings bildeten auch 9 Stämme, die nicht zu dieser Spezies gehörten, den gleichen Phänotyp aus. Falschnegative Ergebnisse, also Kolonien anderer Farbe, die sich nach biochemischer/molekularbiologischer Bestätigung als *V. parahaemolyticus* herausstellten, wurden nicht beobachtet. Die Sensitivität bzw. Spezifität beider Kulturmedien beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* wurden nach der Methode von DUAN und SU (2005) gemäß folgender Formeln berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven Proben (p)}}{p + \text{Anzahl falsch positiver Proben} + \text{Anzahl falsch negativer Proben}} \times 100$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen Proben (n)}}{n + \text{Anzahl falsch positiver Proben} + \text{Anzahl falsch negativer Proben}} \times 100$$

Demnach ergibt sich beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf TCBS eine Sensitivität von 65% und eine Spezifität von 80%. Bei der Verwendung von CVA zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* wurden insgesamt 17 Stämme untersucht. 15 dieser Stämme bildeten auf diesem Agar Kolonien in der erwarteten violetten Farbe. Zwei der untersuchten *V. parahaemolyticus*-Stämme hingegen produzierten milchige Kolonien. Falsch positive Ergebnisse, also Keime, die verdächtige (violett, 2-4 mm, irisierender Rand) Kolonien ausprägten, aber keine *V. parahaemolyticus* waren, kamen bei diesem Agar nicht vor. Es ergibt sich somit für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf CVA eine Sensitivität von 89% und eine Spezifität von 96%. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die Verteilung der

Ergebnisse

Ergebnisse bei der Sensitivitäts- bzw. Spezifitätsprüfung von TCBS bzw CVA im Fall des Nachweis von *V. parahaemolyticus*.

	Gesamt- probenzahl	Richtig positive Proben	Falsch positive Proben	Richtig negative Proben	Falsch negative Proben	Sensitivität	Spezifität
TCBS	61	17	9	35	0	65%	80%
CVA	61	15	0	44	2	88%	96%

Tabelle 18: Nachweis von *V. parahaemolyticus* - Nährbodenvergleich: Überblick der Ergebnisse der Sensitivitäts- bzw. Spezifitätsprüfung von TCBS bzw CVA

4.2 Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW

4.2.1 Statistische Auswertung der Eichkurven

4.2.1.1 Korrelation

Mit der Bestimmung der Korrelation wurde die Stärke des Zusammenhangs zwischen Keimzahl in log 10 KBE/ml und optischer Dichte ermittelt und durch den dimensionslosen Korrelationskoeffizienten (r), bestimmt nach Pearson, ausgedrückt. Der Parameter kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Bei einem Wert von +1 ist der Zusammenhang der Merkmale vollständig positiv und bei -1 vollständig negativ. Nimmt r einen Wert von 0 an, besteht keine Beziehung zwischen den Merkmalen.

– Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen

Ein Korrelationskoeffizient von $r = .806$ kennzeichnet den statistischen Zusammenhang zwischen den logarithmierten Keimzahlen von *V. parahaemolyticus* bei $n = 108$ Wertepaaren. Damit besteht zwischen Keimzahl und optischer Dichte ein starker Zusammenhang, der auf einem Niveau von .01 auch signifikant ist.

Betrachtet man dagegen nur die ersten 6 Stunden der Messung, erhöht sich die Korrelation zwischen beiden Merkmalen sogar auf $r = .876$. Dass die Messungen nach 24 Stunden und 48 Stunden zur Verschlechterung des Zusammenhangs maßgeblich beitragen, zeigt ein Korrelationskoeffizient von $r = .123$. Hieraus lässt sich schließen, dass zu diesen Zeitpunkten der Zusammenhang zwischen dem Wert der optischen Dichte und der tatsächlichen Keimzahl sehr viel lockerer wird.

– Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen

Ein Korrelationskoeffizient von $r = .718$ charakterisiert den Zusammenhang zwischen Keimzahlen von Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und der dazugehörigen optischen Dichte. Damit erwies sich die Zusammenhangsstärke zwar immer noch als hoch, aber nicht in dem Maße, wie sie in dieser Konstellation bei *V. parahaemolyticus* vorlag.

Ergebnisse

- Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Bei der Betrachtung aller Werte, die in den Untersuchungszeiträumen von jeweils 48 Stunden pro Keim und Medium ermittelt wurden, ergibt sich in dieser Konstellation ein Korrelationskoeffizient von $r = .765$.

Zieht man zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nur die Beobachtungen der ersten 6 Stunden ein, steigt der Wert auf $r = .934$ und attestiert somit einen sehr starken Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Auch hier lässt sich der Unterschied zwischen den beiden Korrelationswerten (Beobachtungszeitraum: 6 Stunden/ 48 Stunden) mit der recht geringen Korrelation der Werte zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden ($r = .568$) erklären.

- Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs der logarithmierten Keimzahl von *V. vulnificus* in Proben mit Muschelhomogenat und der entsprechenden optischen Dichte tritt die bereits bei *V. parahaemolyticus* beschriebene Differenz noch deutlicher in Erscheinung. Werden die Beobachtungen der Gesamtuntersuchungszeit von 48 Stunden für die Berechnung des Korrelationskoeffizienten herangezogen, so ergibt sich ein Wert von $r = .064$; d.h. zwischen den Merkmalen optische Dichte und logarithmierte Keimzahl besteht bei Proben mit Muschelhomogenat nahezu kein Zusammenhang. Um sie logarithmieren zu können, wurden Keimzahlen unter der Nachweisgrenze, die bei dieser Untersuchung auftraten, dem Wert 1 gleichgesetzt. Der Logarithmus von Keimzahlen unter der Nachweisgrenze, nimmt damit einen Wert von 0 an. Lässt man die Ergebnisse der 24 Stunden /48 Stunden-Beobachtung nicht in die Berechnung einfließen, so erhöht sich der Korrelationskoeffizient auf $r = .746$ und zeigt damit eine verbesserte Zusammenhangsstärke.

4.2.1.2 Regressionsanalyse

Mit der Regressionsanalyse wird zum einen die Art der Zusammenhänge zwischen logarithmierter Keimzahl und optischer Dichte untersucht, zum anderen dient sie auch der Aufstellung einer Eichkurve, über deren zugrundeliegenden Formel die Keimdichte anhand der gemessenen optischen Dichte bestimmt werden kann.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die beobachteten Werte in einem Streudiagramm aufgetragen. Je nach Verteilung der Daten erfolgte die Ableitung einer Regressionsgeraden oder -kurve, die dann als Eichkurve verstanden werden kann. Um eine logarithmische Regressionskurve zu erhalten, durften nur Beobachtungen mit einer optischen Dichte größer als 0 berücksichtigt werden.

Nach Anfertigung der Regressionsgeraden/-kurve konnte auch das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt werden, welches die Güte der Anpassung durch die Regressionsgerade charakterisiert. R^2 kann höchstens einen Wert von 1 annehmen. Der Maximalwert bedeutet, dass 100% der Varianz der abhängigen Variablen (logarithmierte Keimzahl) durch Varianz der unabhängigen Variablen (optische Dichte) erklärt werden kann.

Ergebnisse

– Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen

Abbildung 13 zeigt die Verteilung der Beobachtungspunkte, wie sie durch die Zuordnung der logarithmierten Keimzahl von *V. parahaemolyticus* zur entsprechenden optischen Dichte zustande kommt. Gleichzeitig ist die dazugehörige Regressionsgerade bzw. -kurve eingezeichnet.

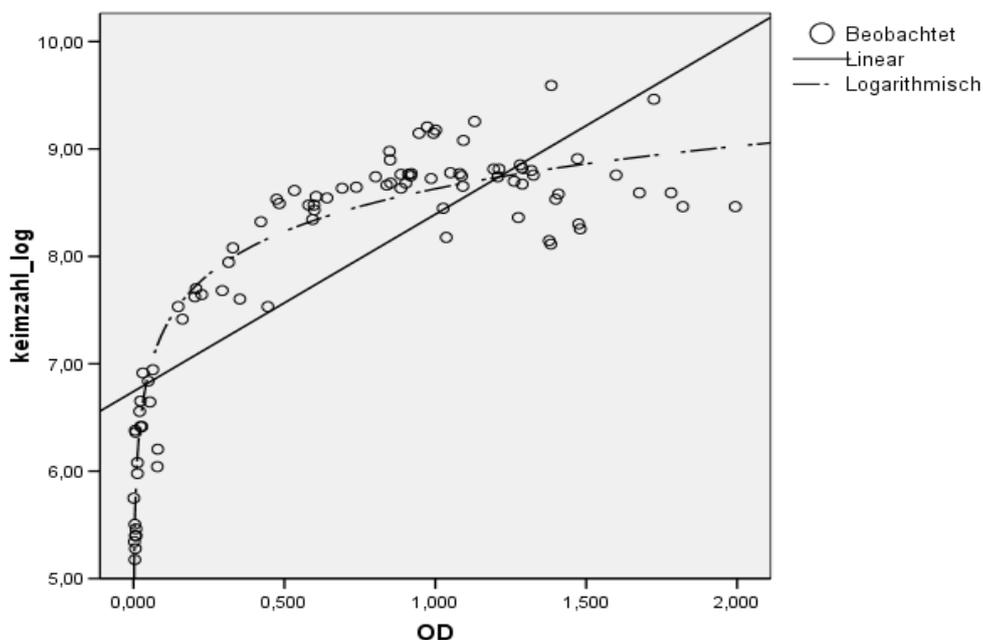


Abbildung 13: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden

Das von der Regressionsgerade/-kurve abgeleitete Bestimmtheitsmaß gibt die Tabelle 19 wieder. Der Liste lassen sich außerdem der y-Achsen (Ordinaten)-Abschnitt b_0 und der Regressionskoeffizient (=Kurvensteigung = b_1) der entsprechenden Geraden-/ Kurvengleichung entnehmen.

Ergebnisse

Modell	Allgemeine Formel	Bestimmtheitsmaß R^2	Regressionskoeffizient b_1	Ordinatenabschnitt b_0
lineares Modell	$y = b_1 \cdot x + b_0$.623	1,650	6,742
logarithmisches Modell	$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$.897	0,573	8,629

Tabelle 19: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 48 Stunden

Anhand des Geradenverlaufs (Abbildung 13) sowie des Werts des Bestimmtheitsmaßes von $R^2 = .623$ (Tabelle 19) wurde deutlich, dass sich eine lineare Regression zur Abschätzung der Keimzahl von *V. parahaemolyticus* über die optische Dichte wenig eignet.

Im logarithmischen Modell (Regressionskurve) lässt sich die berechnete Funktion dagegen sehr gut an die beobachteten Werte anpassen. Das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = .897$ zeigt, dass fast 90% der Varianzen der logarithmierten Keimzahl (abhängige Variable) durch Varianzen der optischen Dichte (unabhängige Variable) erklärt werden können. Beim linearen Modell sind es dagegen nur 62%.

Die allgemeine Formel der logarithmischen Kurve lautet:

$$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$$

Durch Einsetzen des berechneten Regressionskoeffizienten $b_1 = 0,573$ und des Ordinatenabschnitts $b_0 = 8,629$ in die Formel und der gemessenen optischen Dichte x konnte nun die dazugehörige Keimzahl annäherungsweise berechnet werden.

Die Regressionsgleichung für Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen (48 Stunden) lautet danach:

$$y = 0,573 \cdot \ln(x) + 8,629$$

Setzt man für die optische Dichte (x) beispielsweise den Wert $OD = 1,000$ ein, so ergibt sich für y ein Wert von $8,629 \log_{10} \text{ KbE/ml}$. Umgerechnet entspricht dies einer Keimzahl von $4,3 \times 10^8 \text{ KbE } V. parahaemolyticus / \text{ml}$.

Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass ab einer optischen Dichte von circa $OD = 1,000$ die beobachteten Werte stärker vom Regressionskurvenverlauf abweichen als bei niedrigeren Werten. Damit kann die errechnete Keimdichte auch deutlich von der tatsächlichen differieren. Meist betraf dies Beobachtungen der 24-Stunden/ 48-Stunden-Messungen. Deshalb ist es sinnvoll, eine weitere Regressionsanalyse ausschließlich für Beobachtungen bis 6 Stunden durchzuführen. Abbildung 14 gibt das dazugehörige Streudiagramm mit Regressionskurve an und Tabelle 20 die entsprechenden Werte für das Gütemaß, den Ordinatenabschnitt und den Regressionskoeffizienten.

Ergebnisse

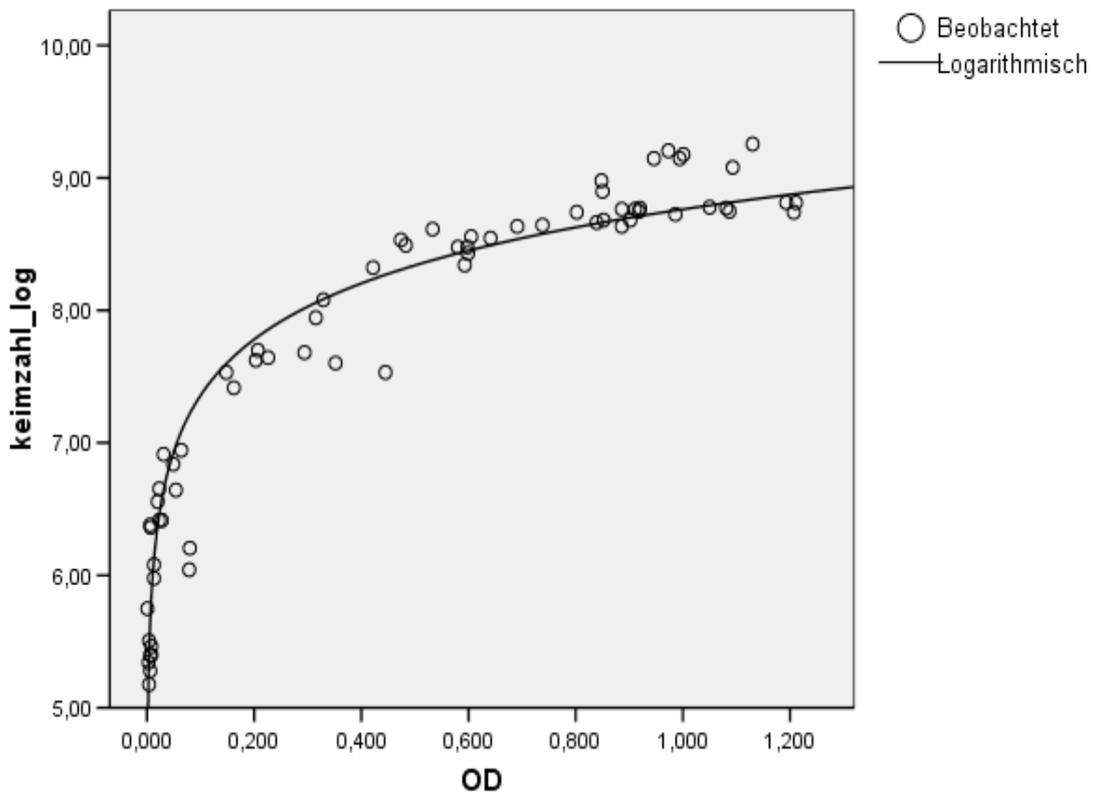


Abbildung 14: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden

Merkmal	Allgemeine Formel	Bestimmtheitsmaß R^2	Regressionskoeffizient b_1	Ordinate-abschnitt b_0
Regressionskurve	$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$.924	0,610	8,763

Tabelle 20: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 6 Stunden

Ergebnisse

Beim 6-Stunden-Beobachtungszeitraum beträgt das Bestimmtheitsmaß $R^2 = .942$. Demnach können in diesem Fall 92% der Varianzen der logarithmierten Keimzahl durch Varianzen der optische Dichte erklärt werden. Die Berechnungsformel für die Keimzahlbestimmung lautet hier:

$$y = 0,610 \cdot \ln(x) + 8,763$$

- **Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen**

Führt man eine Regressionsanalyse für den Zusammenhang der beiden Merkmale logarithmierte Keimzahl von *V. vulnificus* und optische Dichte, beobachtet über 48 Stunden, durch ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß $R^2 = .900$. Der Regressionskoeffizient lautet $b_1 = 0,650$ und der Ordinatenabschnitt $b_0 = 8,783$.

- **Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat**

Das Streudiagramm mit Regressionskurve zur logarithmierten Keimzahl von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Muschelhomogenat und der dazugehörigen Dichte ist in Abbildung 15 dargestellt. Das Diagramm beinhaltet Beobachtungen während 48 Stunden.

Ergebnisse

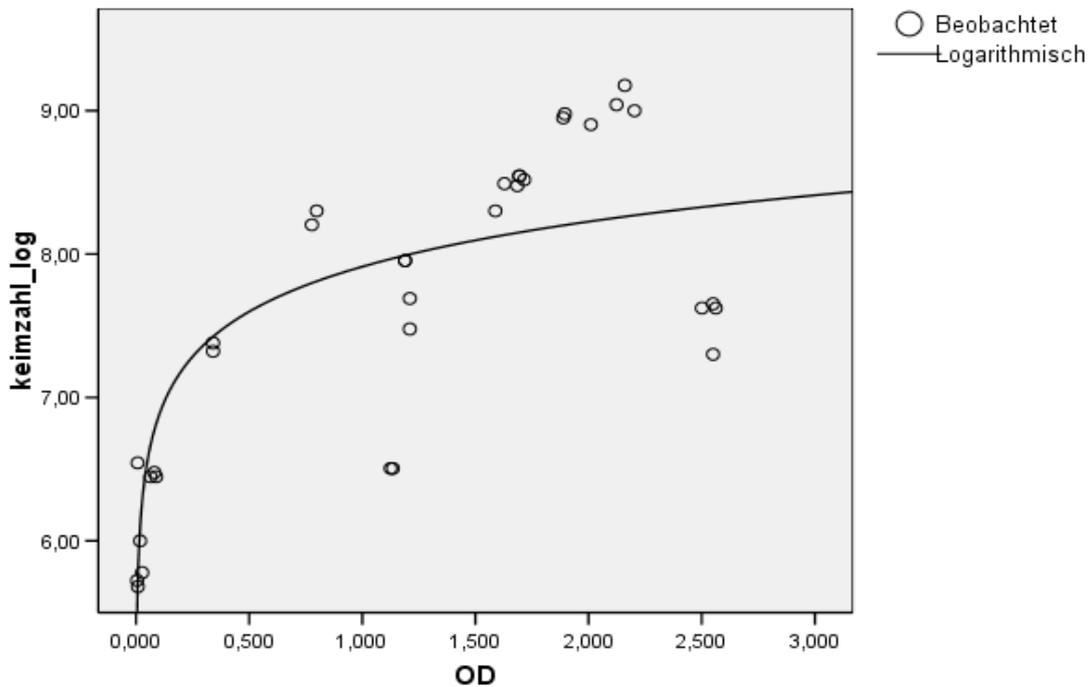


Abbildung 15: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) und Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden

Das Diagramm dokumentiert eine große Streuung der einzelnen Punkte. Berücksichtigt man die Beobachtungen über 48 Stunden, so ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß $R^2 = .655$ (vgl. Tabelle 21). Demnach erklären sich lediglich circa 66% der Varianz der logarithmierten Keimzahl durch die Varianz der optischen Dichte.

Merkmal	Allgemeine Formel	Bestimmtheitsmaß R^2	Regressionskoeffizient b_1	Ordinatenabschnitt b_0
Regressionskurve	$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$.655	0,453	7,912

Tabelle 21: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 48 Stunden

Ergebnisse

Beim Vergleich der Beobachtungen der ersten 6 Stunden reduziert sich die Streuung deutlich (vgl. Abbildung 16). Für die entsprechende Regressionskurve ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = .907$ (vgl. Tabelle 22). In diesem Falle können also fast 91% der Varianzen der logarithmierten Keimzahl von *V. parahaemolyticus* durch die Varianzen der optischen Dichte begründet werden.

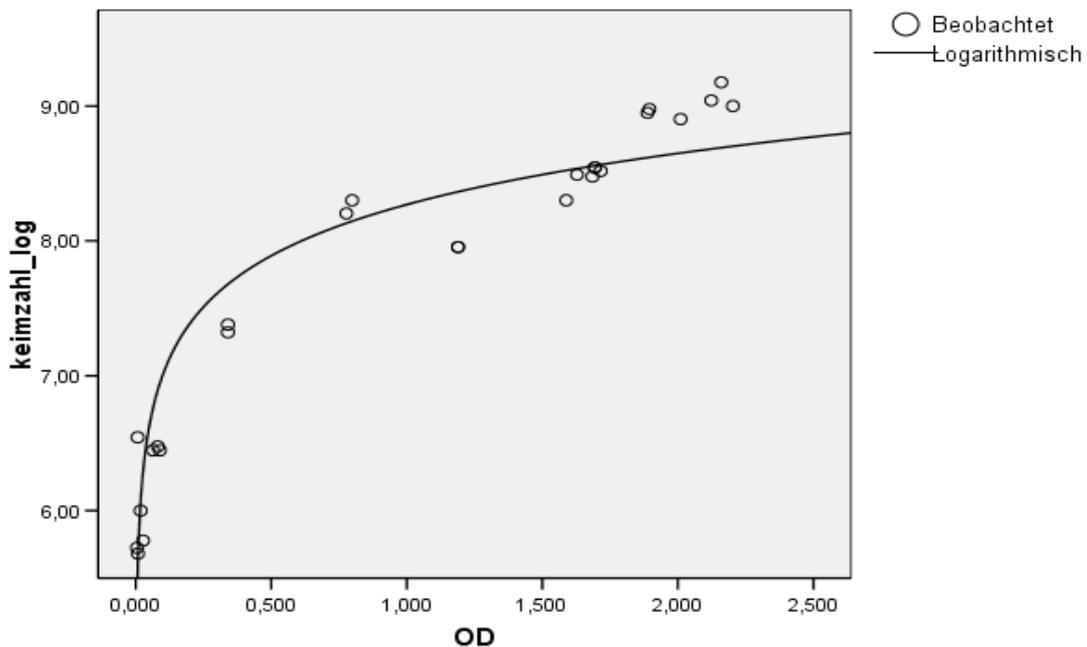


Abbildung 16: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden

Der in Abbildung 16 dargestellten Regressionskurve läßt sich der Regressionskoeffizient $b_1 = 0,547$ und der Ordinatenabschnitt $b_0 = 8,270$ zuordnen (vgl. Tabelle 22).

Ergebnisse

Merkmal	Allgemeine Formel	Bestimmtheitsmaß R^2	Regressionskoeffizient b_1	Ordinatenabschnitt b_0
Regressionskurve	$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$.907	0,547	8,270

Tabelle 22: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Parameter der Regressionskurve (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 6 Stunden

Die Regressionsgleichung für *V. parahaemolyticus* in Proben mit Muschelhomogenat lautet somit:

$$y = 0,547 \cdot \ln(x) + 8,270$$

Misst man nun beispielsweise eine optische Dichte von $OD = 2,000$ und setzt diesen Wert für die Variable x in die Gleichung ein, ergibt sich eine in \log_{10} ausgedrückte *V. parahaemolyticus*-Keimzahl von $y = 8,649$ in Proben mit Muschelhomogenat. Dieser Wert entspricht $4,5 \times 10^8$ KBE *V. parahaemolyticus*/ml.

Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Bei der Regressionsanalyse der Merkmale „logarithmierte Keimzahl von *V. vulnificus* in Proben mit Muschelhomogenat“ und dazugehöriger optischer Dichte waren die Unterschiede zwischen den Beobachtungszeiträumen 6 Stunden bzw. 48 Stunden ganz besonders deutlich. Nach 24/48 Stunden waren hier bei einigen Beobachtungen trotz hoher optischer Dichte keine kultivierbaren Bakterien in der Suspension feststellbar. Aus diesem Grund verläuft die gemeinsame Regressionskurve horizontal. Mit einem Wert von $R^2 = .000$ ist dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß zu entnehmen, dass die Varianzen der logarithmierten Keimzahl von *V. vulnificus* in Proben mit Muschelhomogenat nicht über die Varianzen der optischen Dichte erklärt werden können.

Ergebnisse

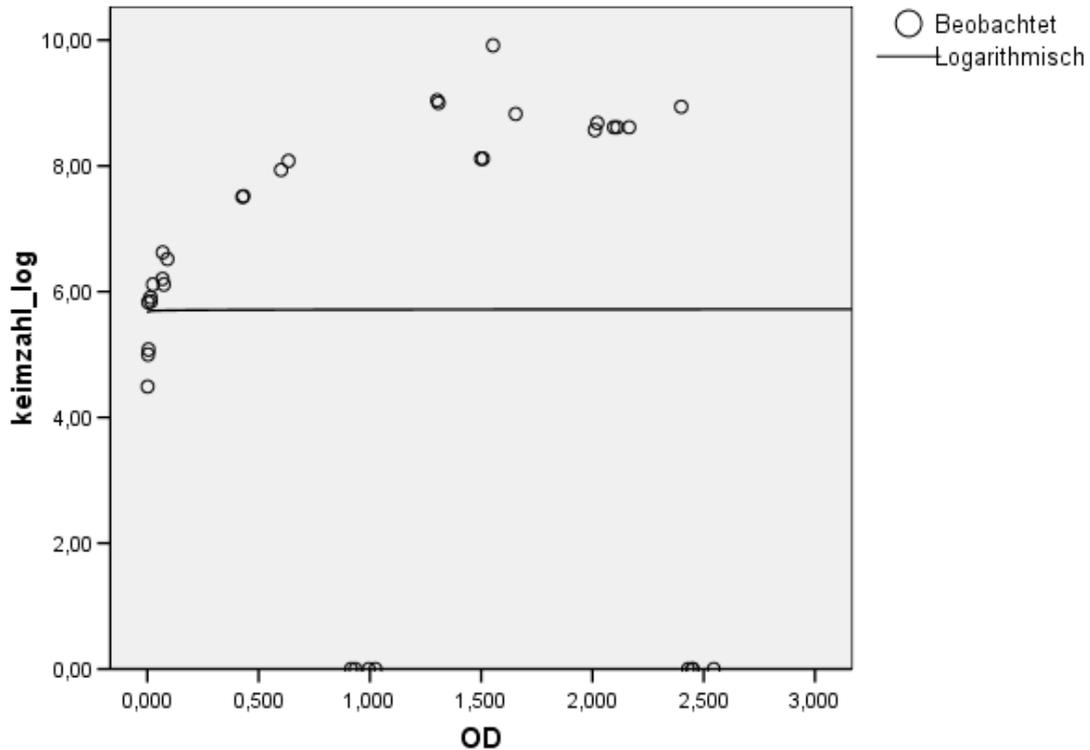


Abbildung 17: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden

Bezieht man hingegen nur die Beobachtungen der ersten 6 Stunden (vgl. Abbildung 18) in die Regressionsanalyse mit ein, so ergibt sich ein ganz anderes Bild. Die beobachteten Werte liegen wiederum recht nah an der Regressionskurve. Ferner drückt das Bestimmtheitsmaß von $R^2 = .914$ aus, dass die Varianzen der log₁₀ Keimzahl zu 91% durch die Varianzen der optischen Dichte erklärt werden können.

Ergebnisse

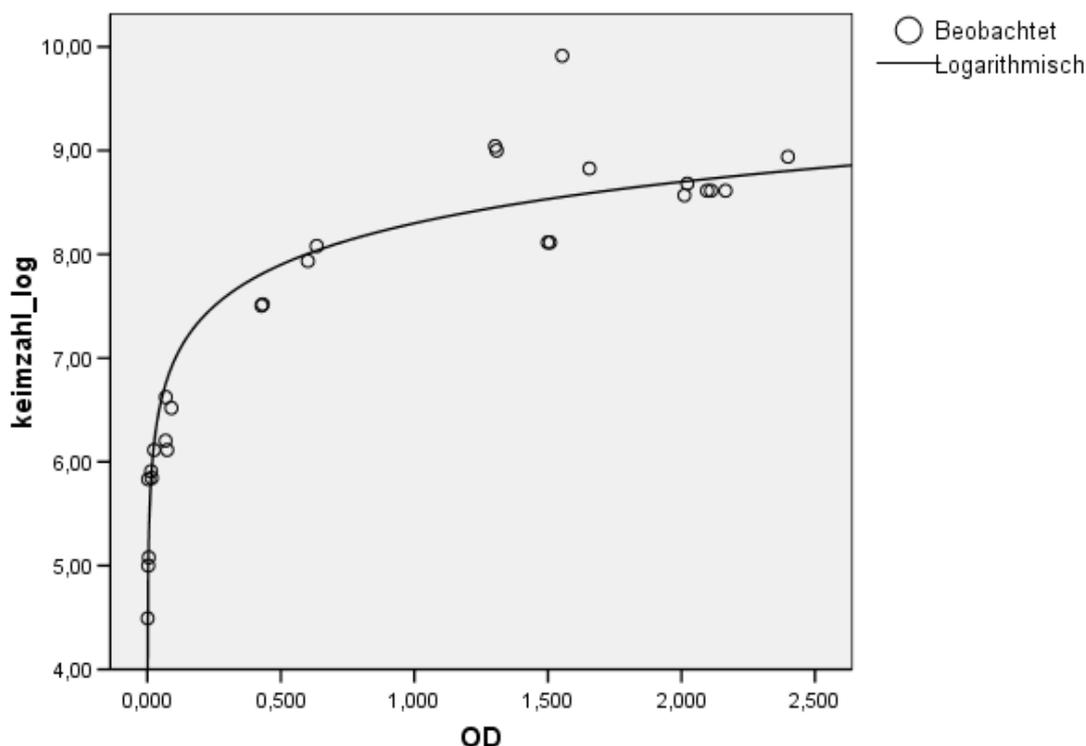


Abbildung 18: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm(Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden

Zu der in Abbildung 18 dargestellten Regressionskurve gehören der Regressionskoeffizient $b_1 = 0,576$ und der Ordinatenabschnitt $b_0 = 8,299$ (vgl. Tabelle 23).

Merkmal	Allgemeine Formel	Bestimmtheitsmaß R^2	Regressionskoeffizient b_1	Ordinatenabschnitt b_0
Regressionskurve	$y = b_1 \cdot \ln(x) + b_0$.914	0,576	8,299

Tabelle 23: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve) nach 6 Stunden: Parameter der Regressionskurve (Keimzahl gegen optische Dichte)

4.2.2 Wachstum von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* in verschiedenartig modifiziertem alkalischen Peptonwasser

Im Folgenden wird das Wachstumsverhalten über die Entwicklung der optischen Dichte während der ersten 6 Stunden in OD-Zeitdiagrammen dargestellt. Die Messwerte der verschiedenen eingesetzten Stämme (vgl. eingesetzte Stämme bei Ermittlung der Eichkurve) wurden dabei gemittelt.

4.2.2.1 Alkalisches Peptonwasser: Modifikation des pH-Werts, gepuffert mit verschiedenen Tris-Konzentrationen

4.2.2.1.1 Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen

Zunächst wurde der Wachstumsverlauf von *V. parahaemolyticus* in APW, dessen pH-Wert über Tris-Konzentrationen von 0,1; 0,05 und 0,01 M auf 8,5; 8,0 und 7,5 eingestellt worden war, verglichen. Die Abbildungen 19-22 zeigen die entsprechenden Vermehrungskurven (Darstellung der OD-Mittelwerte). In Abbildung 19 finden sich sämtliche pH-Wert-Modifikationen, in den Abbildungen 20-22 die jeweils Kurven für die pH-Werte 8,5; 8,0 und 7,5.

Ergebnisse

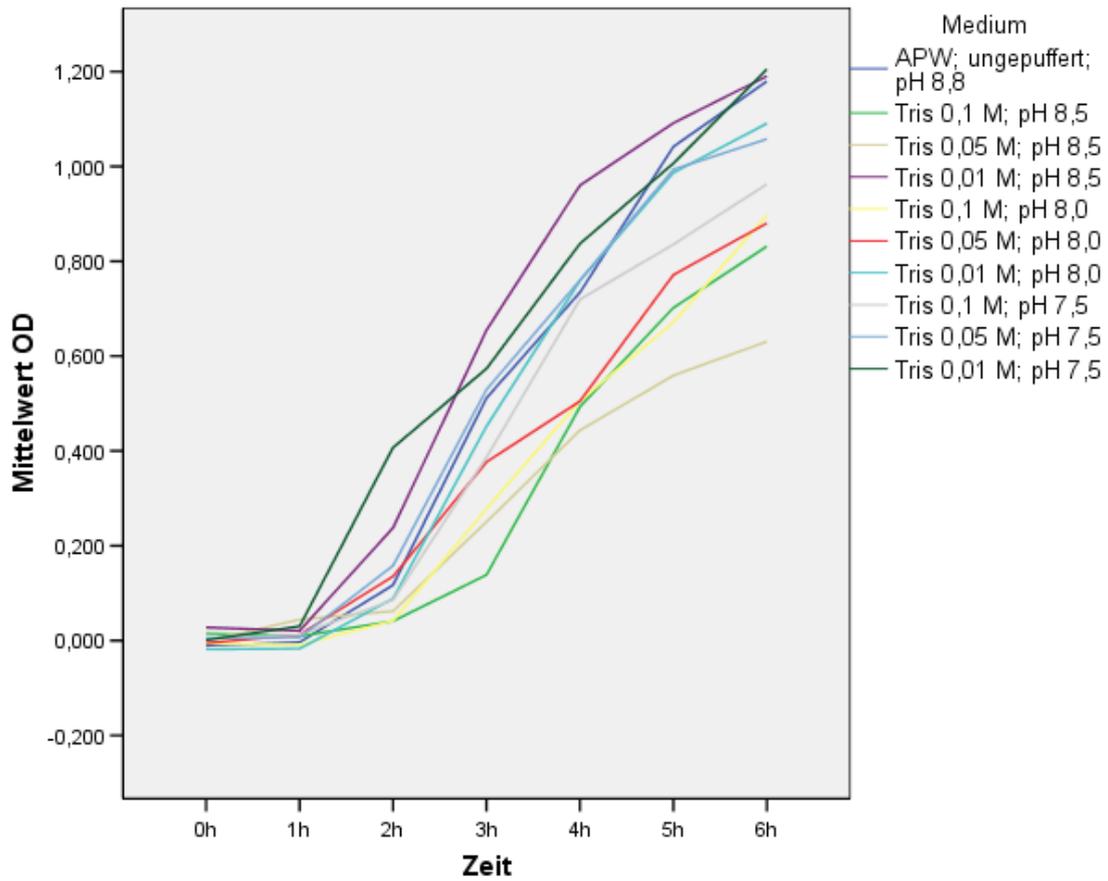


Abbildung 19: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variation des pH-Werts und verschiedene Tris-Konzentrationen: Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden)

Ergebnisse

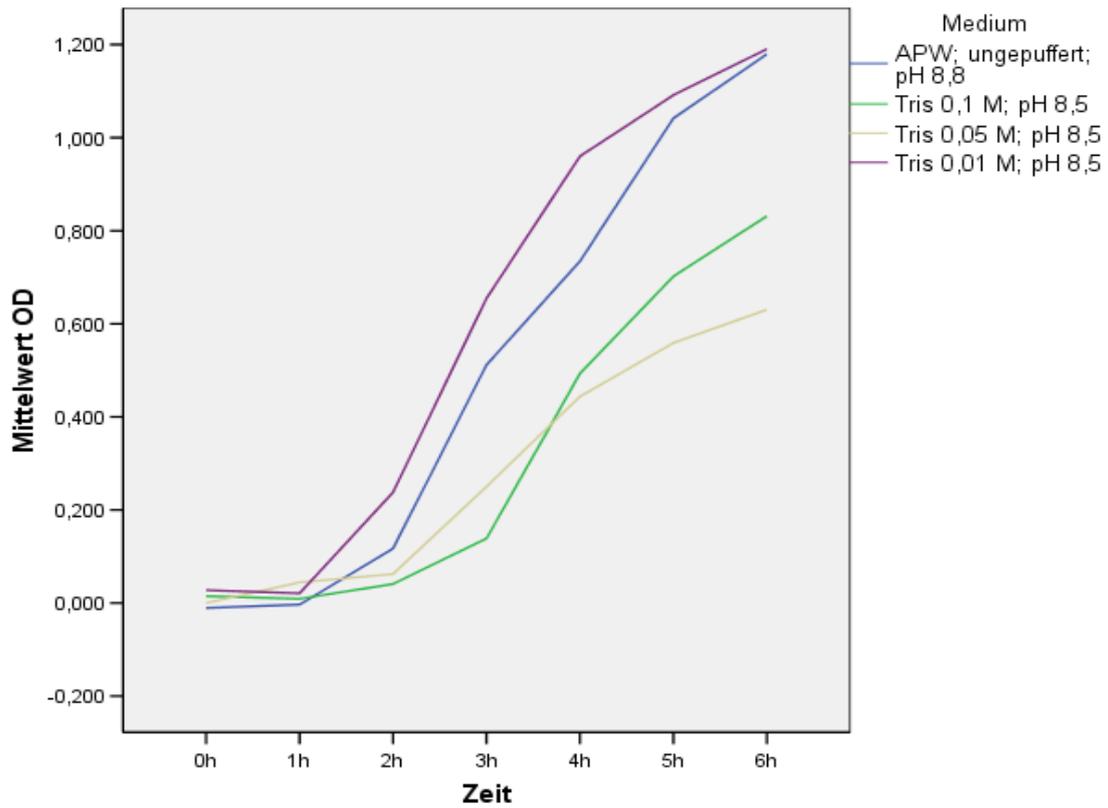


Abbildung 20: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. Parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - ungepuffertes APW und Tris-APW, pH 8,5 (verschiedene Tris-Konzentrationen): Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden)

Ergebnisse

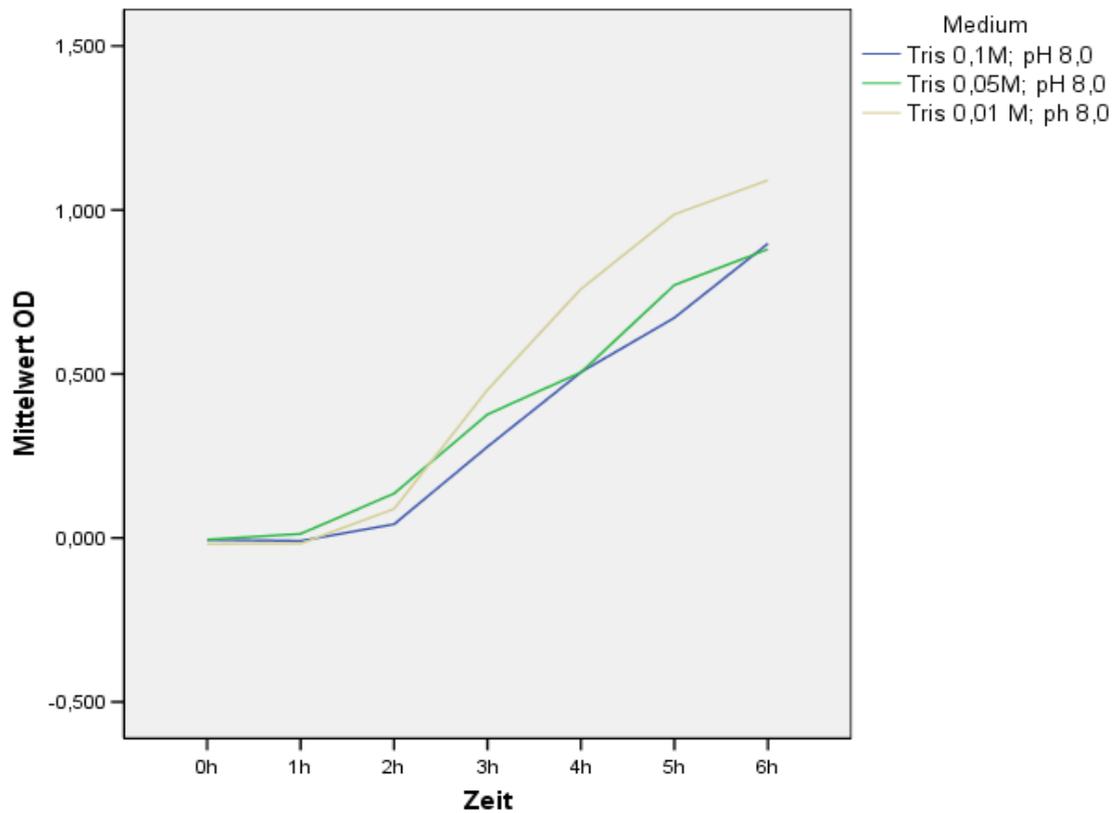


Abbildung 21: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Tris-APW, pH 8,0 (verschiedene Tris-Konzentrationen) Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden)

Ergebnisse

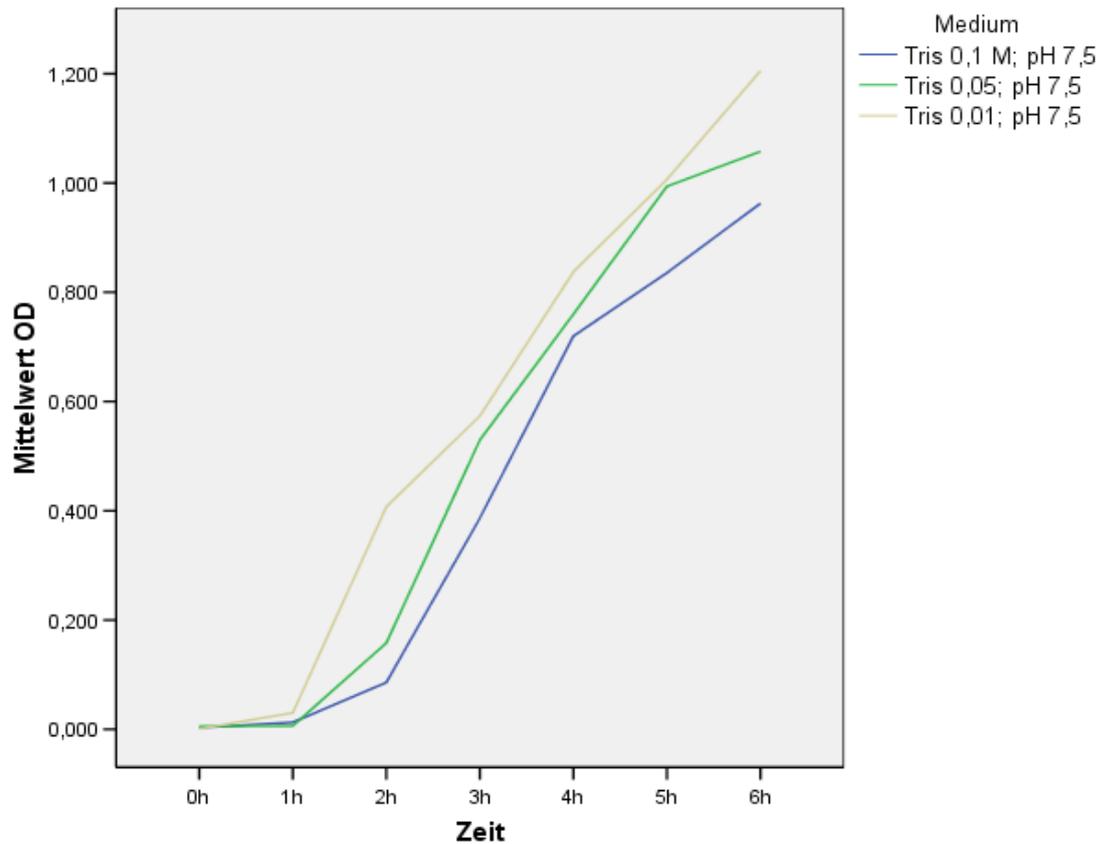


Abbildung 22: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Tris-APW; pH 7,5 (verschiedene Tris-Konzentrationen): Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden)

Ergebnisse

Tabelle 24 enthält Mittelwert (\bar{x}), Median (x_s), Minimal (x_{\min})- und Maximalwert (x_{\max}) bezüglich der optischen Dichte von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen nach 6 Stunden, geordnet aufgrund der Größe des Mittelwerts der optischen Dichte und der danach errechneten Keimzahl.

Mediummodifikation	Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Errechnete Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
	Mittelwert \bar{x}	Median x_s	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}			
Tris 0,01 M; pH 7,5	1,205	1,217	1,083	1,349	0,266	8,88	$7,5 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 8,5	1,191	1,193	0,979	1,352	0,373	8,86	$7,2 \cdot 10^8$
APW, ungepuffert; pH 8,8	1,180	1,208	0,938	1,296	0,331	8,86	$7,2 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 8,0	1,091	1,100	0,920	1,174	0,254	8,82	$6,6 \cdot 10^8$
Tris 0,05 M; pH 7,5	1,058	1,070	0,898	1,263	0,365	8,80	$6,3 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 7,5	0,963	0,983	0,743	1,169	0,462	8,74	$5,5 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 8,0	0,897	0,895	0,733	1,059	0,326	8,70	$5,0 \cdot 10^8$
Tris 0,05 M; pH 8,0	0,880	0,888	0,632	1,145	0,513	8,69	$4,9 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 8,5	0,831	0,854	0,633	0,980	0,347	8,65	$4,7 \cdot 10^8$
Tris 0,05 M; pH 8,5	0,631	0,704	0,386	0,746	0,360	8,48	$3,0 \cdot 10^8$

Tabelle 24: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW: Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration - Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter und Umrechnung der optischen Dichte nach 6 Stunden

Durch Einsetzen der Mittelwerte der gemessenen optischen Dichte nach 6 Stunden in die Formel $y = 0,610 \cdot \ln(x) + 8,763$ (vgl. Tabelle 20) wurden die zugehörigen Keimdichten in KbE/ml errechnet.

Den Messergebnissen zufolge erreichen *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen in Tris (T)-APW (0,01 M; pH 7,5) mit $\bar{x} = 1,205$ die höchste optische Dichte, die einer ungefähren Keimzahl von $7,5 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml entspricht. Im Medium T-APW (0,05 M; pH 8,5) wuchs dieses Bakterium - gemessen an der optischen Dichte ($\bar{x} = 0,631$) - vergleichsweise schlecht. Die dort erreichte optische Dichte von $\bar{x} = 0,631$ entspricht ungefähr einer Keimzahl von $3,0 \times 10^8$ KbE/ml. Das ungepufferte APW sowie die 0,01 M Tris-gepufferten Varianten wiesen diesen Messungen zufolge nach 6 Stunden die höchsten Keimdichten auf. Die Höhe des pH-Wertes nahm dabei keinen entscheidenden Einfluss. Die Spannweiten reichten von $R = 0,254$ (T-APW; 0,01M; pH 8,0) bis $R = 0,513$ (T-APW 0,05M; pH 8,0).

4.2.2.1.2 Wachstum in Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Das Wachstumsverhalten von *V. parahaemolyticus* (Entwicklung der optischen Dichte) während der ersten 6 Stunden in den verschiedenen Proben mit Muschelhomogenat ist in Abbildung 23 dargestellt.

Ergebnisse

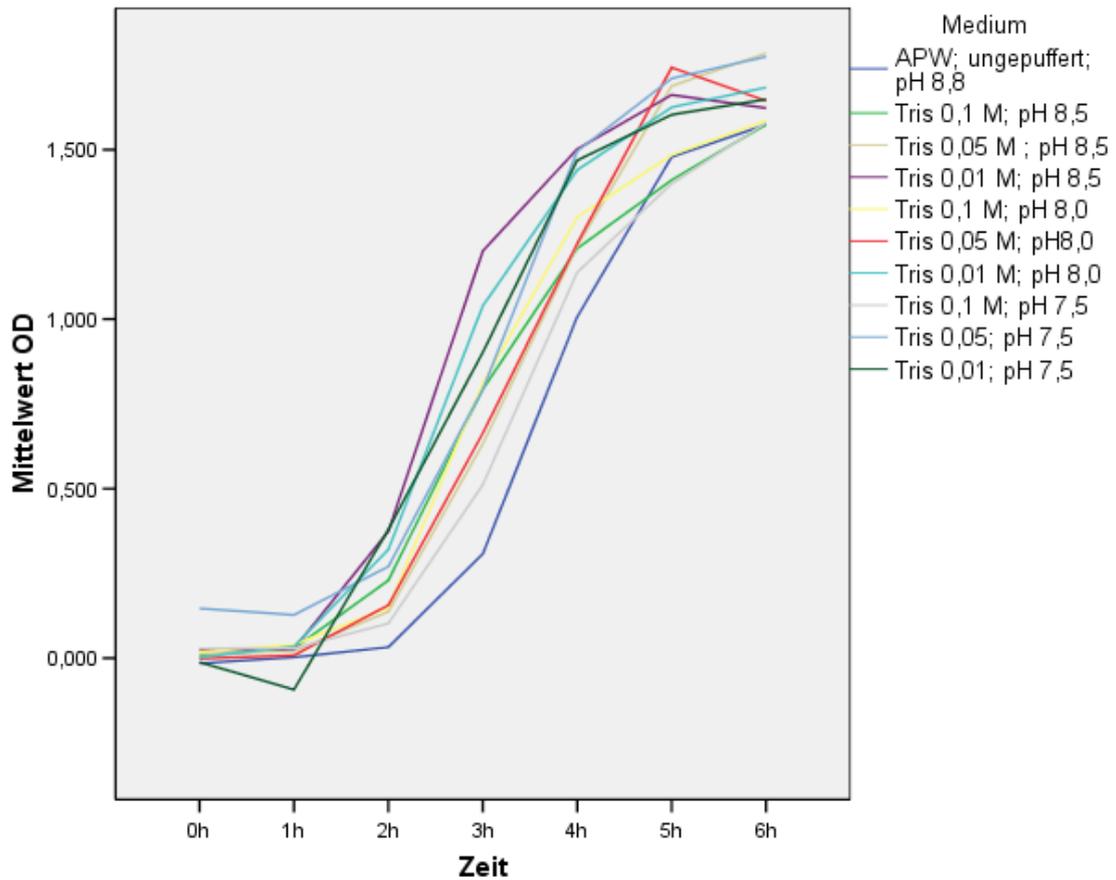


Abbildung 23: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Streudiagramm mit Regressionskurve, Keimzahl in log 10 und optischer Dichte über 6 Stunden

Ergebnisse

Mediummodifikation	Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Errechnete Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
	Mittelwert \bar{x}	Median x_s	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}			
Tris 0,05 M; pH 8,5	1,785	1,790	1,703	1,870	0,167	8,59	$3,9 \cdot 10^8$
Tris 0,05 M; pH 7,5	1,775	1,747	1,374	2,369	0,995	8,58	$3,8 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 8,0	1,683	1,741	1,434	1,820	0,386	8,55	$3,6 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 7,5	1,648	1,679	1,439	1,780	0,341	8,54	$3,5 \cdot 10^8$
Tris 0,05 M; pH 8,0	1,644	1,605	1,493	1,925	0,432	8,54	$3,5 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 8,5	1,622	1,611	1,495	1,781	0,286	8,53	$3,4 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 8,0	1,586	1,604	1,404	1,741	0,337	8,52	$3,3 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 7,5	1,580	1,596	1,346	1,749	0,403	8,52	$3,3 \cdot 10^8$
Tris 0,1 M; pH 8,5	1,575	1,563	1,422	1,803	0,381	8,52	$3,3 \cdot 10^8$
APW, ungepuffert; pH 8,8	1,574	1,586	1,339	1,772	0,433	8,52	$3,3 \cdot 10^8$

Tabelle 25: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Statistische Parameter und Umrechnung der optischen Dichte nach 6 Stunden

Tabelle 25 zeigt Mittelwert (\bar{x}), Median (x_s), Minimal (x_{\min})- und Maximalwert (x_{\max}) für die optische Dichte von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat nach 6 Stunden, geordnet auf Grund der Größe des Mittelwerts und der dadurch errechneten Keimzahl.

Durch Einsetzen der Mittelwerte in $y = 0,547 \cdot \ln(x) + 8,270$ (vgl. Tabelle 22) wurden dann die entsprechenden Keimdichten berechnet.

Im Medium T-APW (0,05 M; pH 8,5) mit Reinkulturen und Muschelzusatz wurde mit $\bar{x} = 1,785$ die höchste optische Dichte erreicht. Das entspricht einer ungefähren Keimzahl von $3,9 \times 10^8$ KbE/ml. Die geringste optische Dichte mit $\bar{x} = 1,574$ zeigte sich nach 6 Stunden in ungepuffertem alkalischen Peptonwasser. Die entsprechende Keimzahl mit $3,3 \times 10^8$ KbE/ml liegt allerdings nicht deutlich unter dem Höchstwert. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien bezüglich der erreichten Keimzahl sind im Zehntelbereich anzusiedeln. Damit konnte nach 6 Stunden in keinem Medium ein hervorragendes Wachstum festgestellt werden. Die Spannweiten reichen von $R = 0,167$ (T-APW 0,05 M; pH 8,5) bis $R = 0,995$ (T-APW 0,05; pH 7,5)

4.2.2.1.3 Wachstum in Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen

Nach 6 Stunden erreichte *V. vulnificus* in den verschiedenartig modifizierten APW im Durchschnitt Keimdichten von $\bar{x} = 3,1 \times 10^8$ KbE/ml. Auch hier ergaben sich in ungepuffertem APW und T-APW (0,01 M) die höchsten optischen Dichten. Innerhalb dieser Gruppe (Tris 0,01M) wurde bei einem pH-Wert von 8,5 die höchste Dichte und bei einem pH-Wert von 7,5 die niedrigste Dichte gemessen. Bei den restlichen Modifikationen konnten keine Zusammenhänge zwischen erreichter optischer Dichte und Abstufung von pH-Wert oder Tris-Molarität festgestellt werden.

Ergebnisse

4.2.2.1.4 Wachstum in Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Nach 6 Stunden lag in den verschiedenartig modifizierten APW eine durchschnittliche Keimzahl von $\bar{x} = 3,6 \times 10^8$ KbE/ml vor. Ein Zusammenhang zwischen den Abstufungen der Tris-Molarität bzw. des pH-Wertes und der festgestellten Keimdichte ließ sich nicht erkennen.

4.2.2.2 Gesamtkeimzahlen nach 48 Stunden

Nach 48 Stunden wurde neben der Messung der optischen Dichte auch die tatsächlich erreichte Keimzahl ermittelt.

4.2.2.2.1 Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen

Tabelle 26 zeigt die erreichten Gesamtkeimzahlen nach 48 Stunden Bebrütung von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen in absteigender Reihenfolge. Neben dem Mittelwert sind auch Minimal- und Maximalwert mit dem zugehörigen Keim dargestellt. Die Medien T-APW (0,1 M; pH 8,5) und T-APW (0,01 M; pH 8,0) wurden nicht mit Reinkulturen getestet und fehlen deshalb bei der Darstellung.

Mediummodifikation	Mittelwert	Minimum x_{\min} / zugehöriger Stamm	Maximum x_{\max} / zugehöriger Stamm
Tris 0,05 M; pH 7,5	$4,4 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885	$5,5 \cdot 10^8$ Vp CH 1652
Tris 0,1 M; pH 7,5	$3,6 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^8$ Vp CH 1585	$4,7 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,05 M; pH 8,0	$3,6 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$ Vp CH 1585	$5,3 \cdot 10^8$ Vp CH 1652
Tris 0,01 M; pH 7,5	$3,5 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$ Vp DSM 10027	$4,1 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,01 M; pH 8,5	$2,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$ Vp DSM 10027	$3,3 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
APW, ungepuffert; pH 8,8	$2,5 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$ Vp DSM 10027	$3,9 \cdot 10^8$ Vp CH 1585
Tris 0,1 M; pH 8,0	$2,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$ Vp DSM 10027	$2,2 \cdot 10^8$ Vp DSM 10027
Tris 0,05 M; pH 8,5	$1,9 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^8$ Vp CH 1585	$2,8 \cdot 10^8$ Vp CH 1652

Vp = *Vibrio parahaemolyticus*

Tabelle 26: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen; kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden (Angaben in KbE/ml)

Tabelle 26 zeigt, dass die Gesamtkeimzahlen von *V. parahaemolyticus* nach 48 Stunden in Proben mit Reinkulturen zwischen $\bar{x} = 1,9 \times 10^8$ KbE/ml und $\bar{x} = 4,1 \times 10^8$ KbE/ml liegen. Die höchsten Keimzahlen wurden im Medium T-APW (0,05 M; pH 7,5) und die niedrigsten in T-APW (0,05 M; pH 8,5) erreicht. Bei einer Aufgliederung nach den eingesetzten Stämmen über alle APW-Modifikationen wiesen *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und CH 1585 bis auf eine Ausnahme die niedrigsten Keimdichten auf, während *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 und CH 1652 bis auf eine Ausnahme die größten Werte pro ml produzierten.

Die Keimzahlen nach 48 Stunden fielen in der Regel niedriger aus als jene nach 6 Stunden. Tabelle 27 zeigt die Differenzen zwischen dem 6-Stunden-Wert und dem 48-Stunden-Wert. Die Daten dieser Differenzen sind dabei nach pH-Wert und Tris-Konzentration angeordnet.

Ergebnisse

APW Modifikation	pH-Wert-Einstellung		
	8,5	8,0	7,5
Tris 0,1M	nicht getestet	$2,8 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$
Tris 0,05M	$1,1 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^8$
Tris 0,01M	$4,4 \cdot 10^8$	nicht getestet	$4,0 \cdot 10^8$
APW ungepuffert	$4,7 \cdot 10^8$		

Tabelle 27: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen; Differenzen zwischen 6h- und 48-h-Keimdichten

Bei der Verwendung von Proben mit Reinkulturen reichten die Differenzen zwischen 6h- und 48-h-Keimdichten von $1,1 \times 10^8$ Kbe/ml in T-APW (0,05 M; pH 8,5) und $4,7 \times 10^8$ Kbe/ml in herkömmlichem APW. Bei den vorgenommenen Messungen waren die höchsten Differenzen ($4,0$ - $4,7 \cdot 10^8$ Kbe/ml) in herkömmlichem APW und in T-APW (0,01M) festzustellen. Bei höheren Konzentrationen des Puffers zeigten sich die Differenzen ($1,1$ - $2,8 \cdot 10^8$ Kbe/ml) durchweg niedriger. Auswirkungen des pH-Werts auf die Höhe der Differenzen konnten bei dieser Erhebung nicht festgestellt werden.

4.2.2.2 Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen

Die Keimzahlen von *V. vulnificus* nach 48 Stunden in Proben mit Reinkulturen reichten von $\bar{x} = 1,9 \times 10^8$ Kbe/ml (herkömmliches APW) bis $\bar{x} = 5,0 \times 10^8$ Kbe/ml (T-APW 0,05 M; pH 7,5). Die Differenzen zu den 6-Stunden-Werten lagen zwischen $2,1 \times 10^8$ Kbe/ml (herkömmliches APW) und $-1,8 \times 10^8$ Kbe/ml (T-APW 0,05 M; pH 7,5). Bei der vorliegenden Erhebung ergaben sich die höchsten Differenzen bei Medien mit einem pH-Wert von 8,5 und zwar unabhängig von der Tris-Konzentration.

4.2.2.3 Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Die nach 48 Stunden ermittelten Keimzahlen von *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat sind in absteigender Reihenfolge in Tabelle 28 zu finden. Auch in dieser Tabelle sind Mittelwert, Minimal- und Maximalwert aufgeführt.

Ergebnisse

	Mittelwert \bar{x}	Minimum x_{\min} / zugehöriger Stamm	Maximum x_{\max} / zugehöriger Stamm
Tris 0,01 M; pH 8,5	$3,8 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^8$ Vp CH 1652	$4,1 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,05 M; pH 8,5	$3,3 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^7$ Vp DSM 10027	$4,8 \cdot 10^8$ Vp CH 1652
APW, ungepuffert; pH 8,8	$3,2 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$ Vp CH 1585	$3,7 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,05 M; pH 8,0	$1,6 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^7$ Vp CH 1585	$4,3 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,1 M; pH 8,0	$1,4 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^7$ Vp DSM 10027	$3,6 \cdot 10^8$ Vp NCTC 10885
Tris 0,01 M; pH 7,5	$7,8 \cdot 10^7$	< 20 Vp DSM 10027	$3,1 \cdot 10^8$ Vp CH 1585
Tris 0,1 M; pH 8,5	$4,4 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$ Vp CH 1585	$6,7 \cdot 10^7$ Vp CH 1652
Tris 0,1 M; pH 7,5	$5,0 \cdot 10^6$	< 20 Vp DSM 10027	$2,1 \cdot 10^7$ Vp CH 1585
Tris 0,05 M; pH 7,5	< 20	< 20	< 20
Tris 0,01 M; pH 8,0	< 20	< 20	< 20

Vp = *V. parahaemolyticus*

Tabelle 28: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden (Angaben in KbE/ml)

Bei Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat reichten die Gesamtkeimzahlen nach 48 Stunden von $\bar{x} =$ „unter der Nachweisgrenze“ bis $\bar{x} = 3,8 \times 10^8$ KbE/ml. T-APW (0,01 M; pH 8,5) wiesen dabei die höchste Keimzahl auf, während in den Medien T-APW (0,05 M; pH 7,5) und T-APW (0,01 M; pH 8,0) die Keimzahlen unter der Nachweisgrenze von 20 KbE/ml lagen. In dieser Konstellation erreichten die Stämme CH 1652 und NCTC 10885 zumeist die höchsten Keimzahlen. Die Stämme CH 1585 und DSM 10027 zeigten bis auf eine Ausnahme hier die geringsten Keimdichten.

Homogenat			
APW Modifikation	pH-Einstellung		
	8,5	8,0	7,5
Tris 0,1M	$2,9 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^8$
Tris 0,05M	$0,6 \cdot 10^8$	$1,9 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^8$
Tris 0,01M	$- 0,4 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^8$
APW ungepuffert	$0,1 \cdot 10^8$		

Tabelle 29: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat Differenzen zwischen 6h- und 48h-Keimdichten

Ergebnisse

Die Differenzen zwischen 6h- und 48-h-Keimdichte bei Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat, wie sie in Tabelle 29 wiedergegeben sind, schwanken zwischen $-0,4 \times 10^8$ KbE/ml in T-APW (0,01 M; pH 8,5) und $3,8 \times 10^8$ KbE/ml in T-APW (0,05 M; pH 7,5). Die Medien mit einem pH-Wert von 8,5 und Tris-Konzentrationen von 0,01 bzw. 0,05 M sowie herkömmliches APW wiesen insgesamt die geringsten Keimzahldifferenzen auf. Zugleich waren bei den Medien mit einem pH-Wert von 8,5 mit sinkender Pufferkonzentration eine sinkende Keimzahldifferenz festzustellen.

4.2.2.2.4 Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Sämtliche Proben von *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat ergaben Keimzahlen unter der Nachweisgrenze von 20 KbE/ml.

4.2.2.3 T-APW (0,01 M; pH 8,5): Modifikation des Salzgehaltes

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Auswirkung eines erhöhten Salzgehaltes (aufsalzen) auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* untersucht. Die herkömmliche Konzentration von 2% NaCl wurde dabei auf 5% NaCl angehoben. Wiederum wurde das Wachstumsverhalten in Proben mit Reinkulturen wie auch in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat untersucht.

4.2.2.3.1 *V. parahaemolyticus* in aufgesalztem Medium

Abbildung 24 zeigt den Verlauf der optischen Dichte von *V. parahaemolyticus* in Medien mit 5% NaCl. Das Diagramm gibt sowohl die Entwicklung in Proben mit Reinkulturen als auch im Medium mit Reinkulturen und Muschelhomogenat wieder.

Ergebnisse

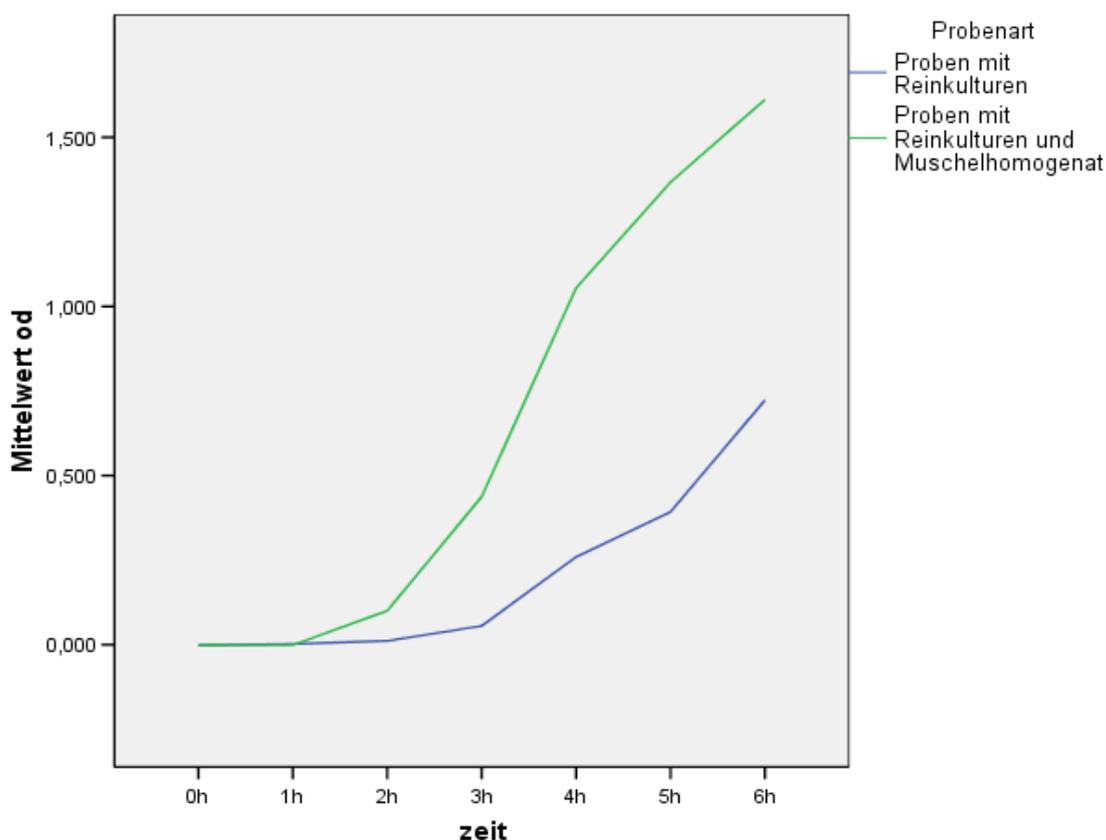


Abbildung 24: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen/ Reinkulturen und Muschelhomogenat; Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden

Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
Mittelwert \bar{x}	Median $x_{.5}$	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}			
0,723	0,769	0,201	1,211	1,010	8,57	$3,6 \cdot 10^8$

Tabelle 30: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter der 6-Stunden Werte

Tabelle 30 zeigt die statistischen Maßzahlen der OD 6-Stunden-Werte in aufgesalzten Proben mit Reinkulturen. Danach erreichte die optische Dichte in Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen nach 6 Stunden Bebrütung durchschnittlich einen Wert von $\bar{x} = 0,723$, was einer ungefähren Keimdichte von $3,6 \times 10^8$ KbE/ml entspricht. Unter den einzelnen Stämmen erreichten *V. parahaemolyticus* CH 1652 und NCTC 10885 die höchsten Keimdichten,

Ergebnisse

während die Proben mit *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und CH 1585 die niedrigsten Werte aufwiesen. Die Spannweite der optischen Dichten betrug $R = 1,010$, mithin $7,0 \times 10^8$ KbE/ml.

Nach 48 Stunden wurde eine durchschnittliche Keimdichte von $\bar{x} = 4,2 \times 10^8$ KbE/ml gemessen. Damit lag diese um $6,0 \times 10^7$ KbE/ml höher als die bei 6 Stunden Bebrütung errechnete.

Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
Mittelwert \bar{x}	Median $x_{,5}$	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}			
1,611	1,682	1,265	1,805	0,540	8,53	$3,4 \cdot 10^8$

Tabelle 31: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat Analyse der 6-Stunden Werte

In Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat (Tabelle 31) wurde durchschnittlich eine optische Dichte von $\bar{x} = 1,611$ erreicht. Die danach berechnete ungefähre Keimzahl beträgt $3,4 \times 10^8$ KbE/ml. Die Spannweite zwischen geringster und höchster gemessener optischer Dichte belief sich auf $R = 0,540$, was einer Differenz von $1,4 \times 10^8$ KbE/ml entspricht. Unter diesen Bedingungen erreichten CH 1652 und NCTC 10885 die höchsten Keimdichten und *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und CH 1585 die geringsten.

Weiterhin wurden nach 48 Stunden durchschnittlich $\bar{x} = 4,5 \times 10^8$ KbE/ml ermittelt. Damit ist die Keimdichte um $1,1 \times 10^8$ KbE/ml höher als die nach 6 Stunden berechnete.

4.2.2.3.2 *V. vulnificus* in aufgesalzbem Medium

In Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen wurden nach 6 Stunden negative optische Dichten gemessen, wodurch die Berechnung einer Keimzahl (vgl. Eichkurven) nicht möglich war. Nach 48 Stunden konnte eine durchschnittliche Keimdichte von $\bar{x} = 9,0 \times 10^7$ KbE/ml ermittelt werden.

In Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat wurde durchschnittlich eine optische Dichte von $\bar{x} = 0,116$ erreicht, was einer Keimzahl von $1,4 \times 10^7$ KbE/ml entspricht. Nach 48 Stunden war die Keimdichte dann unter die Nachweisgrenze von 20 KbE/ml gesunken.

4.2.2.4 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl): Modifikation des Peptongehaltes

Es wurde auch die Auswirkung von verschiedenen Peptongehalten des Mediums auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* wurde in diesem Untersuchungsabschnitt untersucht. Hierfür wurde der Peptongehalt von 1% (vgl. 4.2.2.3) in herkömmlichem APW auf 3% bzw. 5% angehoben.

4.2.2.4.1 Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen

Abbildung 25 zeigt den Verlauf der optischen Dichte beim Wachstum von *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen in T-APW (0,01 M; pH-Wert 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton (vgl. 1% Pepton = ursprüngliche Konzentration; Abbildung 24).

Ergebnisse

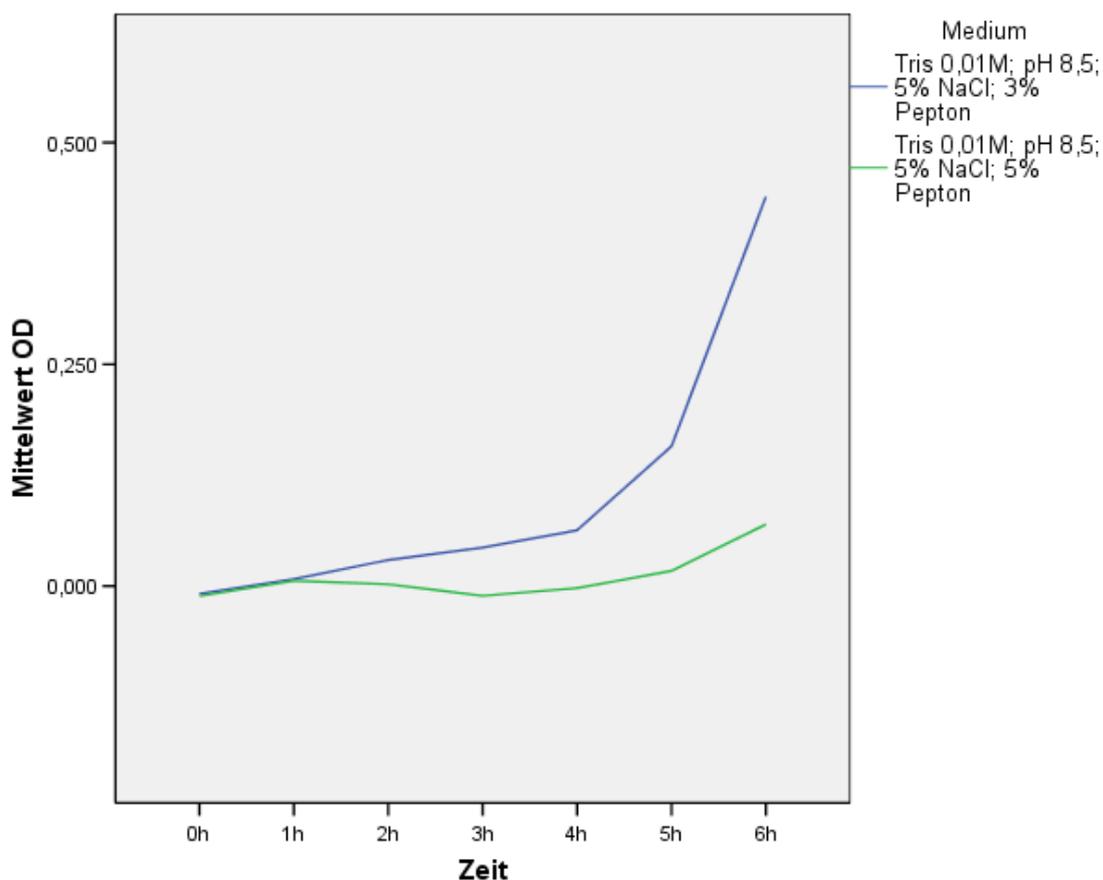


Abbildung 25: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen: Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden.

Die statistischen Parameter der 6-Stunden-Werte für die optische Dichte ist in Tabelle 32 dargestellt (vgl. 1% Pepton = ursprüngliche Konzentration; Tabelle 30)

Mediummodifikation	Optische Dichte nach 6 Stunden					Spannweite R	Errechnete Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
	Mittelwert \bar{x}	Median x_s	Minimum x_{min}	Maximum x_{max}				
Tris 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 3% Pepton	0,439	0,344	0,059	0,968	0,014	8,26	$1,9 \cdot 10^8$	
Tris 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 5% Pepton	0,069	0,018	0,001	0,267	0,266	7,13	$1,3 \cdot 10^7$	

Tabelle 32: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter der 6-Stunden Werte

Ergebnisse

Bei einem Peptongehalt von 3% wurde in Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen nach 6 Stunden eine optische Dichte von $\bar{x} = 0,439$ und bei 5% Peptongehalt durchschnittlich $\bar{x} = 0,069$ gemessen. Diese Werte entsprechen einer Keimdichte von $1,9 \times 10^8$ KbE/ml bzw. $1,3 \times 10^7$ KbE/ml. Die Spannweiten zwischen Minimal (x_{\min})- und Maximalwert (x_{\max}) der jeweiligen Medien lagen dabei zwischen $R = 0,014$ (3% Pepton) und $R = 0,266$ (5% Pepton). *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 und CH 1652 erreichten auch hier innerhalb eines Mediums die höchsten Keimdichten.

Nach 48 Stunden ließ sich eine Keimzahl von jeweils $\bar{x} = 4,6 \times 10^8$ KbE/ml messen. Damit übersteigt sie die Ergebnisse der 6 Stunden-Messung um $2,7 \times 10^8$ KbE/ml (3% Pepton) und $3,3 \times 10^8$ KbE/ml (5% Pepton).

4.2.2.4.2 Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat

Abbildung 26 zeigt den Verlauf der optischen Dichte beim Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH-Wert 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton mit Muschelmaterial (vgl. 1% Pepton Abbildung 24).

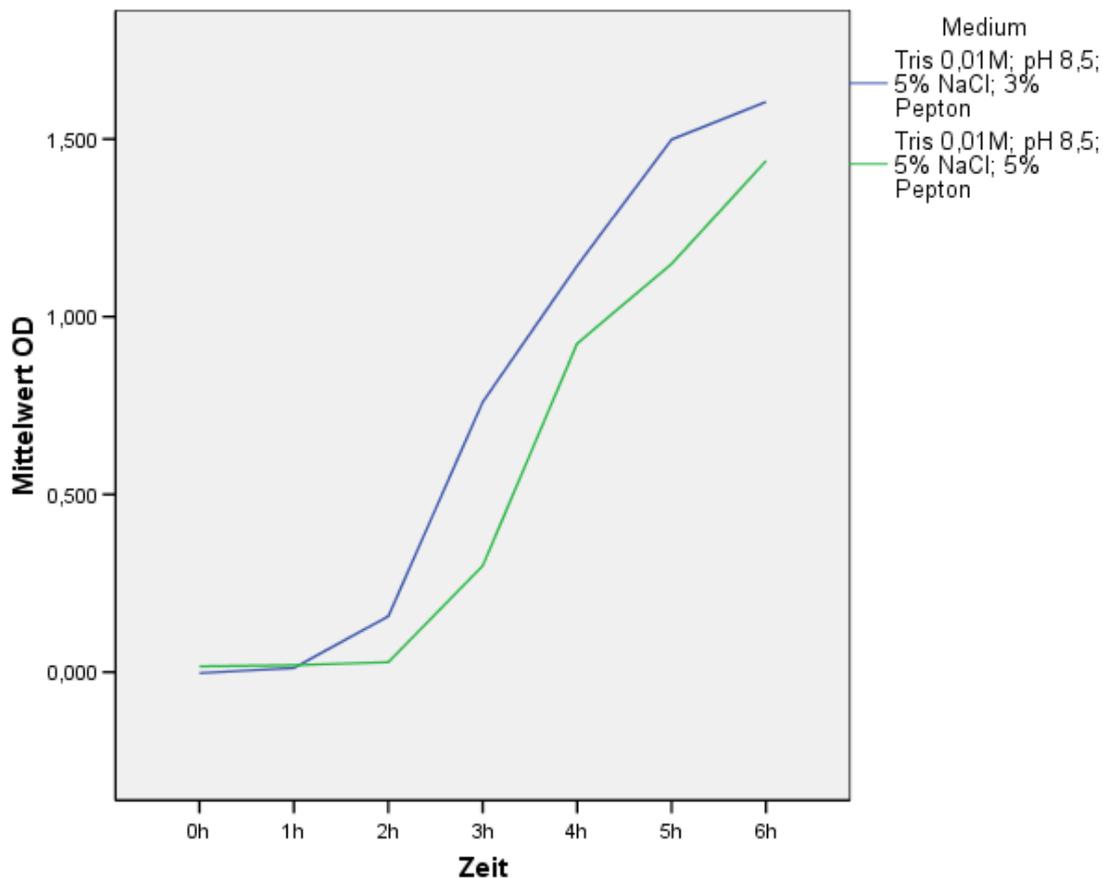


Abbildung 26: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat: Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden

Ergebnisse

Tabelle 33 gibt die statistischen Parameter der 6-Stunden-Werte für die optische Dichte wieder (vgl. 1% Pepton = ursprüngliche Konzentration; Tabelle 31).

Mediummodifikation	Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Errechnete Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl
	Mittelwert \bar{x}	Median $x_{.5}$	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}			
Tris 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 3% Pepton	1,605	1,758	0,973	1,880	0,907	8,53	$3,3 \cdot 10^8$
Tris 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 5% Pepton	1,439	1,553	1,053	1,659	0,606	8,47	$2,9 \cdot 10^8$

Tabelle33: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; statistische Parameter der 6-Stunden Werte

Nach 6 Stunden Bebrütung konnten in den Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat optische Dichten von $\bar{x} = 1,605$ (3% Peptongehalt) und $\bar{x} = 1,439$ (5% Peptongehalt) gemessen werden. Die daraus berechneten Keimdichten liegen bei $3,3 \cdot 10^8$ KbE bzw. $2,9 \cdot 10^8$ KbE/ml. Die Spannweite zwischen Minimal(x_{\min})- und Maximalwert(x_{\max}) betragen dabei $R = 0,907$ bzw. $R = 0,606$, was einem Keimdichteunterschied von $2,8 \cdot 10^8$ KbE/ml (3% Pepton) bzw. $1,5 \cdot 10^8$ KbE/ml (5% Pepton) entspricht. Unter den Teststämmen dominierte hier der Keimdichte nach *V. parahaemolyticus* NCTC 10885.

Die 48-Stunden-Keimzahlen betragen dann $\bar{x} = 3,4 \cdot 10^8$ KbE/ml (3% Peptongehalt) und $\bar{x} = 4,2 \cdot 10^8$ KbE/ml (5% Peptongehalt). Damit liegen diese Keimdichten um $0,1 \cdot 10^8$ KbE/ml bzw. $1,3 \cdot 10^8$ KbE/ml über dem Wert der 6-Stunden-Messung.

4.2.2.4.3 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen

Insgesamt wuchs *V. vulnificus* in beiden Modifikaten des Mediums deutlich schlechter. In keiner der Messungen wurde eine Keimzahl von $7,9 \cdot 10^7$ KbE/ml, wie sie sich für Proben mit Reinkulturen ergaben, überschritten. In Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat lag die Keimdichte nach 48 Stunden unter der Nachweisgrenze.

4.2.3 Prüfung der Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchungen zum Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5) und T-APW (0,01 M; pH 8,5, 5% NaCl) im Vergleich zu herkömmlichen APW - jeweils Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat - wurden bis zu 6 mal wiederholt. Neben der 6-Stunden-Werte wurde das Augenmerk auch auf die Keimdichten nach 48 Stunden Inkubation gelegt.

Ergebnisse

Mediummodifikation	Optische Dichte nach 6 Stunden				Spannweite R	Keimzahl logarithmiert	Errechnete Keimzahl 6h	GKZ 48h
	Mittelwert \bar{x}	Median $x_{,5}$	Minimum x_{\min}	Maximum x_{\max}				
APW, ungepuffert; pH 8,8	1,753	1,780	1,339	1,990	0,651	8,58	$3,8 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^9$
Tris 0,01 M; pH 8,5	1,841	1,860	1,495	2,099	0,604	8,60	$4,0 \cdot 10^8$	$2,9 \cdot 10^9$
Tris 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl	1,580	1,658	1,007	1,850	0,843	8,52	$3,3 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^9$

Tabelle 34: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Statistische Parameter der Wiederholungsuntersuchungen

Gemäß Tabelle 34 konnte nach 6 Stunden mit durchschnittlich $\bar{x} = 1,841$ die höchste optische Dichte von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5) erzielt werden. In herkömmlichem APW wurde mit $\bar{x} = 1,754$ der nächsthöhere Wert gemessen. In T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) lag zu diesem Zeitpunkt mit $\bar{x} = 1,580$ der geringste Wert vor. In Keimzahlen umgerechnet waren somit Keimdichten von $4,0 \cdot 10^8$ KbE/ml, $3,8 \cdot 10^8$ KbE/ml bzw. $3,3 \cdot 10^8$ KbE/ml zu verzeichnen. Die Spannweiten für die jeweiligen Medien bewegten sich dabei zwischen $R = 0,604$ (T-APW 0,01 M; pH 8,5) und $R = 0,843$ (T-APW 0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl), was Keimdichtenunterschieden von $1,6 \cdot 10^8$ KbE/ml und $2,2 \cdot 10^8$ KbE/ml entspricht. Nach wie vor produzierten die Stämme *V. parahaemolyticus* CH 1652 und NCTC 10885 zu diesem Zeitpunkt die höchsten Keimzahlen.

Nach 48 Stunden wurde in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) mit einem durchschnittlichen Wert von $\bar{x} = 5,0 \cdot 10^8$ KbE/ml die mit Abstand höchste Keimdichte ermittelt. Im Vergleich zum 6-Stunden-Wert bedeutete dies einen Anstieg um $1,7 \cdot 10^8$ KbE/ml. Nach 48 Stunden in herkömmlichem APW oder T-APW (0,01 M; pH 8,5) konnten lediglich Keimzahlen von durchschnittlich $\bar{x} = 2,7 \cdot 10^8$ KbE/ml bzw. $2,9 \cdot 10^8$ KbE/ml gemessen werden. Im Vergleich zu den 6-Stunden-Messungen bedeutet dies eine mittlere Keimabnahme von jeweils $1,1 \cdot 10^8$ KbE/ml.

Ergebnisse

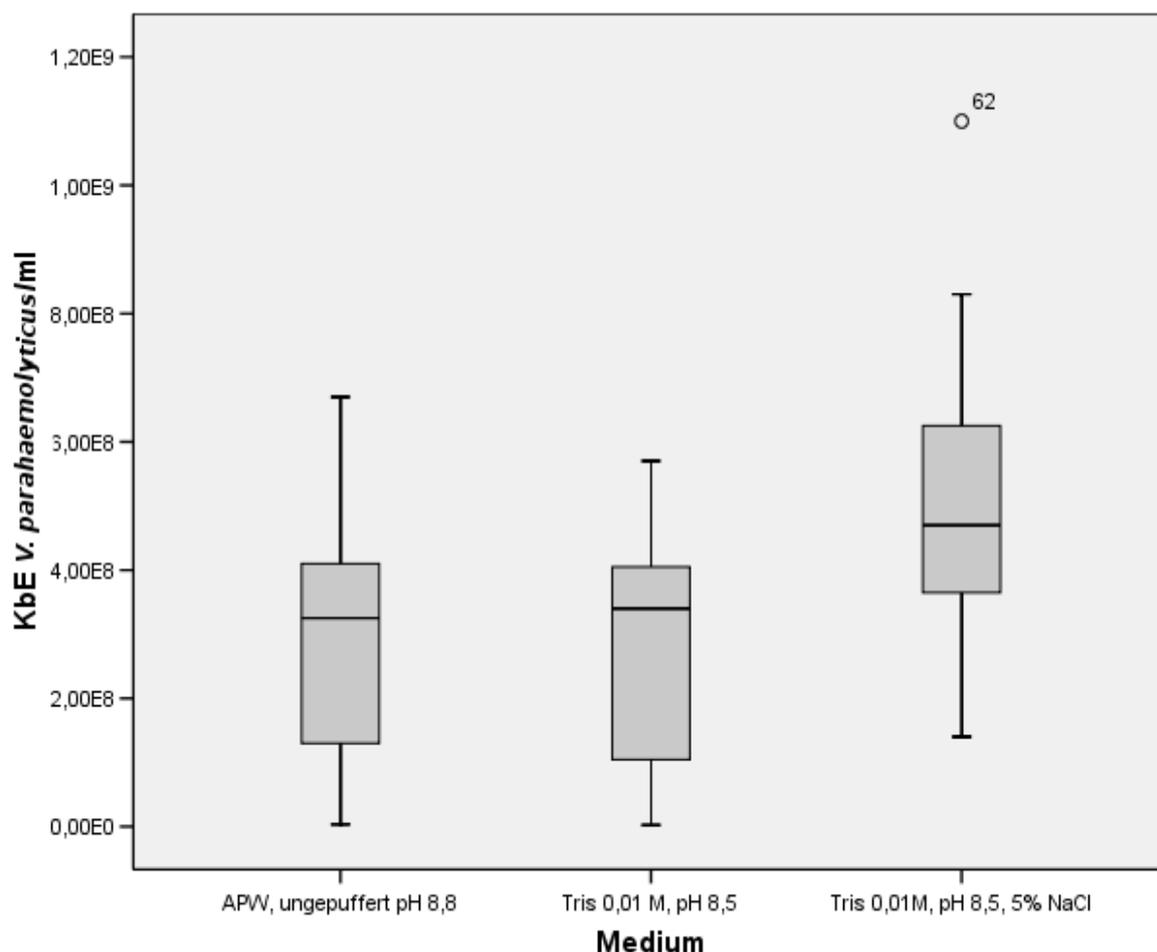


Abbildung 27: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden

Die Boxplotdarstellung in Abbildung 27 zeigt die Verteilung der 48-Stunden-Gesamtkeimzahlen geordnet nach den eingesetzten Medien. Kreise (und Sterne) in dieser Datendarstellungsform markieren Ausreißer. Die horizontalen Begrenzungen der „Box“ zeigen den $x_{.25}$ -Wert (untere Begrenzung; unteres Quartil) und den $x_{.75}$ -Wert (obere Begrenzung; oberes Quartil) an und umschließen die „mittleren 50%“ der Werte. Die horizontale Linie innerhalb der „Box“ repräsentiert den Median ($x_{.5}$). Die vertikalen Linien (Whisker), welche von der „Box“ ausgehen stellen die „unteren bzw. oberen 25% der Werte dar.“

Im Falle von T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) lag die 48-Stunden-Gesamtkeimzahl im ungünstigsten Fall bei $x_{\min} = 1,4 \times 10^8$ KbE/ml und im besten bei $x_{\max} = 1,1 \times 10^9$ KbE/ml. Der Median betrug dabei bei $x_{.5} = 5 \times 10^8$ KbE/ml. Die mittleren 50% der gemessenen Keimdichten in diesem Medium bewegten sich im Bereich von ca. $x_{.25} = 4 \times 10^8$ KbE/ml bis $x_{.75} = 6 \times 10^8$ KbE/ml. Keimzahlen von bis zu $1,1 \times 10^9$ KbE/ml erreichte hier ausschließlich der Stamm *V. parahaemolyticus* CH 1585, der in anderen Untersuchungen weniger gut gedieh. In

Ergebnisse

herkömmlichen APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5) lagen die Minimalwerte bei $x_{\min} = 3,2 \times 10^6$ Kbe/ml bzw. bei $x_{\min} = 2,7 \times 10^6$ Kbe/ml, wofür jeweils eine Probe mit *V. parahaemolyticus* DSM 10027 verantwortlich war. Im Maximalfall wurden $x_{\max} = 6,7 \times 10^8$ Kbe/ml bzw. $x_{\max} = 5,7 \times 10^8$ Kbe/ml erreicht. Jeweils $x_{.75} = 4,0 \cdot 10^8$ Kbe/ml bildeten das obere Quartil (vgl. Lage der Box). Die Mediane für die beiden Medien waren jeweils bei ca. $x_{.5} = 3 \times 10^8$ Kbe/ml platziert.

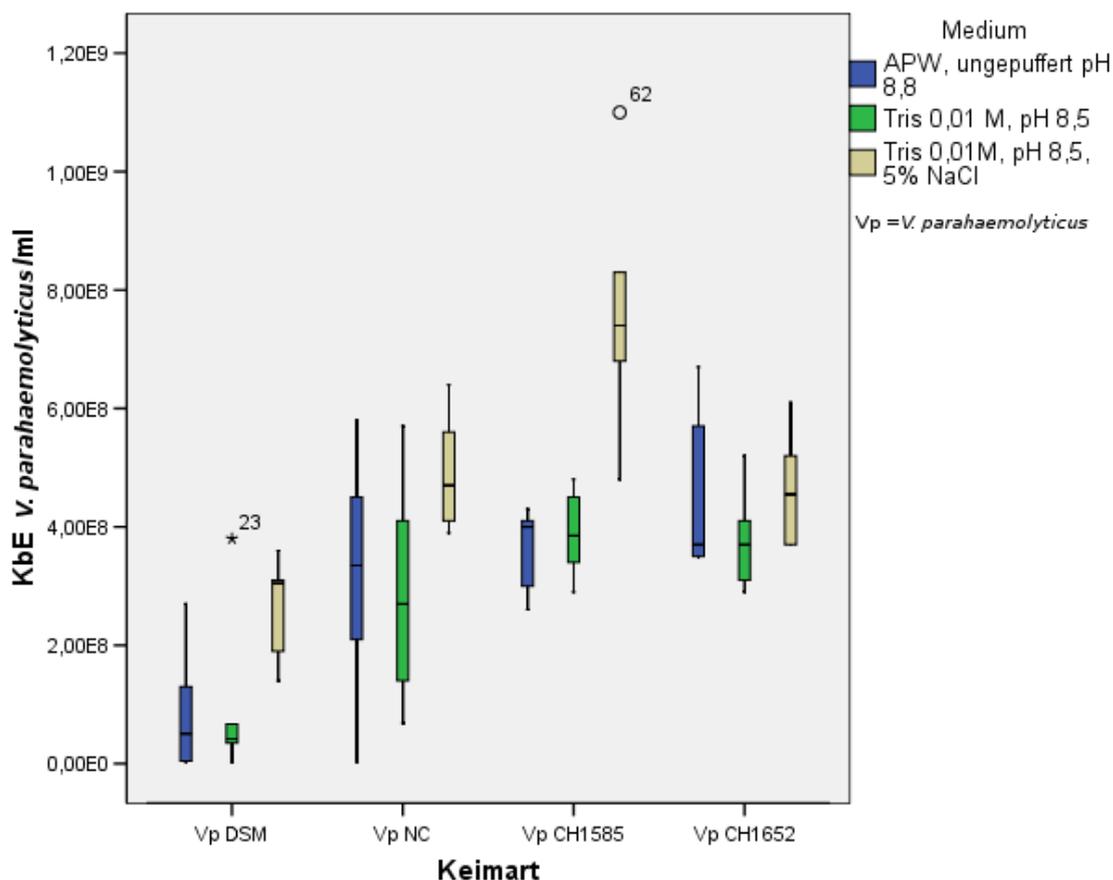


Abbildung 28: Photometrische Untersuchung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden aufgetrennt nach den eingesetzten Stämmen

Die Boxplotdarstellung macht deutlich, dass die Keimdichte in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) unabhängig vom eingesetzten *V. parahaemolyticus*-Stamm höher ausfiel als in den Vergleichsmédien. Bei *V. parahaemolyticus* DSM 10027 zeigte sich dieser Unterschied am deutlichsten. Abgesehen davon wies dieser Stamm nach 48 Stunden grundsätzlich die niedrigsten Keimzahlen auf. Das Diagramm lässt erkennen, dass die Keimzahlentwicklung von *V. parahaemolyticus* CH 1585 durch T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) besonders begünstigt wurde. Die geringsten Keimzahlunterschiede im Vergleich der Médien zeigte *V. parahaemolyticus* CH 1652, die höchste Keimzahlstreuung war dagegen bei *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 festzustellen.

4.2.4 Statistische Auswertung der 48-Stunden-Gesamtkeimzahlmessung

Die statistische Auswertung der 48-Stunden-Gesamtkeimzahlen von *V. parahaemolyticus* in den Substraten herkömmliches APW (T-APW 0,01M; pH 8,5) und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) sollte belegen, inwieweit die Medien einen signifikanten Einfluss auf die Keimzahlen nehmen.

Prüfung auf Normalverteilung

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests für eine Stichprobe. Die zweiseitige asymptotische Signifikanz liegt mit Werten zwischen $p = 0.471$ und $p = 0.954$ über dem kritischen Wert von $p > 0.05$. Damit sind die 48-Stunden-Keimdichten in herkömmlichem APW, T-APW (0,01 M; pH 8,5) und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) normalverteilt.

Prüfung mittels One-way deskriptiven Statistiken

Die One-way deskriptive Statistik zeigte, dass die durchschnittliche Keimzahl in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5) jeweils bei 3×10^8 KbE/ml liegt, während sie in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) bei 5×10^8 KbE/ml anzusiedeln ist. Die Standardabweichungen bewegen sich dabei zwischen $1,7 \times 10^8$ KbE/ml (T-APW 0,01 M, pH8,5) und $2,2 \times 10^8$ KbE/ml (T-APW 0,01 M; pH-Wert 8,5; 5% NaCl)

Prüfung auf Homogenität der Varianzen

Auch die Homogenität der Varianzen wurde überprüft. Mit einem Wert von $p = 0.834$ ist die Signifikanz größer als der kritische Wert von $p > 0.05$. Die Annahme einer homogenen Verteilung der Varianzen war damit bestätigt.

Prüfung mittels One-Way-Anova

Varianzanalytisch wurde geprüft, ob die festgestellten Keimdichtenunterschiede zwischen den betrachteten Medien signifikant sind. Die Signifikanz liegt hier bei $p = 0.000$ und damit unter dem kritischen Wert $p < 0.05$, weshalb die Unterschiede signifikant ausfallen.

Prüfung mittels Post-Hoc- Test

Nachdem mit der One-Way-Anova ein signifikanter Unterschied bei den 48-Stunden-Keimdichten von *V. parahaemolyticus* in den betrachteten 3 Medien nachgewiesen wurde, zeigt der Post-Hoc-Test nach Bonferroni konkret, zwischen welchen Medien diese Signifikanz besteht.

Der Test nach Bonferroni ergibt, dass die mittlere Differenz der 48-Stunden-Keimzahlen von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) zu denen in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5) $2,0 \times 10^8$ KbE/ml bzw. $2,1 \times 10^8$ KbE/ml erreicht. Die Signifikanz beträgt dabei $p = 0.003$ bzw. $p = 0.001$. Damit ist die Annahme bestätigt, dass die Keimdichte des Zielkeimes in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) signifikant (kritischer Wert $p < 0.05$) über der in den beiden anderen betrachteten Medien liegt. Zwischen den Keimdichten in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5) ist mit einer Signifikanz von $p = 1.000$ auf dem Niveau von $p < 0.05$ kein signifikanter Unterschied feststellbar. Die mittlere Differenz der Keimzahlen zwischen diesen beiden Medien liegt bei $9,5 \times 10^6$ KbE/ml.

4.3 Vergleich des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von Begleitflora

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Anwesenheit von anderen in Muscheln typischen Bakterien untersucht. Dabei wurde die Vermehrungskinetik in herkömmlichem APW dem in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) gegenübergestellt. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf der Relation von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 (Ursprungsinokulum 10 KbE/g) zu *V. alginolyticus* NCTC 10885 bzw. *V. alginolyticus* Feldstamm, sowie der restlichen Nicht-Vibrio-Begleitflora. Dieser Teil der Untersuchung umfasste 48 Ansätze mit herkömmlichem APW und 32 Ansätze mit T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl).

Abbildung 29 stellt die Verteilung der 24-Stunden-Keimzahlen von *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* und Nicht-Vibrio-Begleitflora in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) dar.

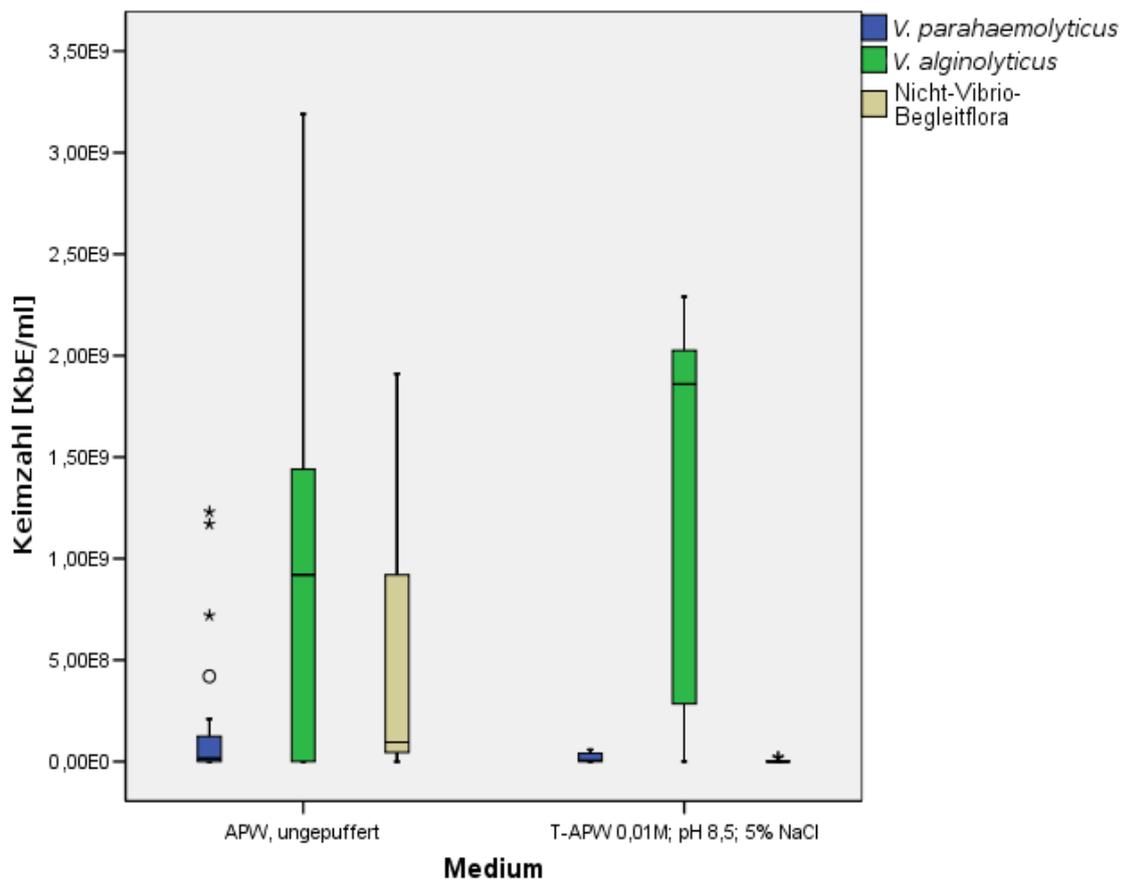


Abbildung 29: Vergleich des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von *V. alginolyticus* und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimzahlen nach 24-stündiger Bebrütung

Ergebnisse

Nach 24 Stunden in herkömmlichem APW erreichte *V. parahaemolyticus* DSM 10027 im arithmetischen Mittel eine Keimdichte von $\bar{x} = 1,6 \times 10^8$ KbE/ml, während der Median bei $1,0 \times 10^7$ KbE/ml lag. Die mit Kreis/Stern gekennzeichneten Fälle stellen Ausreißer dar. Zur gleichen Zeit wies *V. alginolyticus* (Stämme NCTC 10885 und 42-149/06 M36/2) einen Mittelwert von $\bar{x} = 9,6 \times 10^8$ KbE/ml und einen Median von $x_{,5} = 9,2 \times 10^8$ KbE/ml auf. Die Nicht-Vibrio-Begleitflora war als Ganzes durchschnittlich mit $\bar{x} = 5,2 \times 10^8$ KbE/ml bzw. $x_{,5} = 9,5 \times 10^7$ KbE/ml vertreten.

Die mittlere Keimdichte von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) betrug $\bar{x} = 5,6 \times 10^7$ KbE/ml. Hier lag der Median bei $x_{,5} = 7,5 \times 10^6$ KbE/ml. Die beiden *V. alginolyticus* Stämme erreichten in diesem Medium im Schnitt $\bar{x} = 1,4 \times 10^9$ KbE/ml bzw. $x_{,5} = 1,9 \times 10^9$ KbE/ml. Mit einem Mittelwert von $\bar{x} = 6,9 \times 10^6$ KbE/ml bzw. $x_{,5} = 5,0 \times 10^6$ KbE/ml fiel die Keimdichte der Nicht-Vibrio-Begleitflora gering aus.

Bei der Analyse der Keimzahlen fiel auf, dass es unter den beiden eingesetzten Stämmen von *V. alginolyticus* deutliche Unterschiede unabhängig vom eingesetzten Medium gab. Die Boxplotdarstellung in Abbildung 30 veranschaulicht diese Aussage.

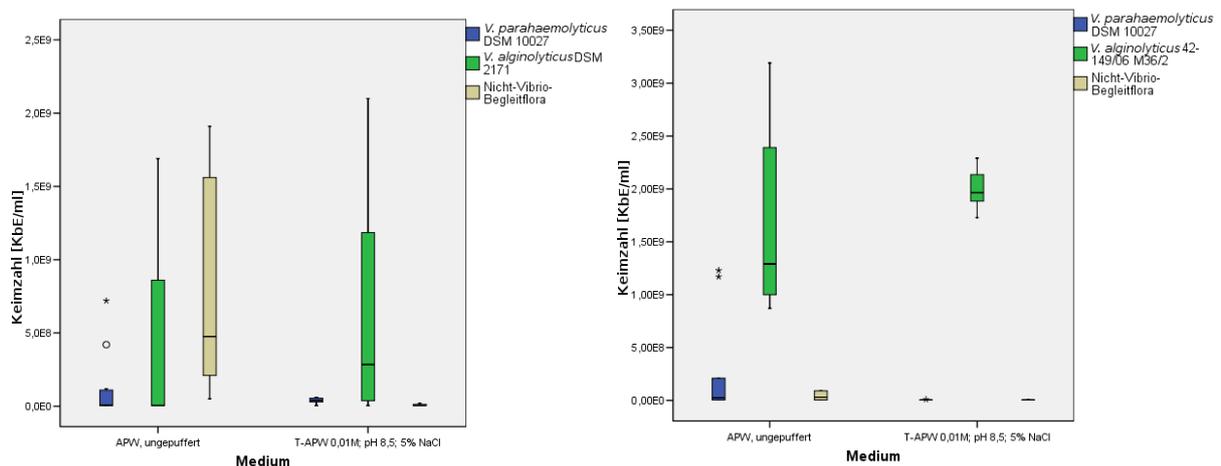


Abbildung 30: Vergleich des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von *V. alginolyticus* und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimzahlen von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und *V. alginolyticus* DSM 2171 (links) bzw. *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2 (rechts) und Nicht-Vibrio-Begleitflora nach 24-stündiger Bebrütung

V. alginolyticus DSM 2171 erreichte nach 24 Stunden in herkömmlichem APW eine durchschnittliche Keimdichte von $\bar{x} = 3,1 \times 10^8$ KbE/ml, wobei der Median bei $x_{,5} = 5,0 \times 10^6$ KbE/ml lag. In T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) lauteten die entsprechenden Werte $\bar{x} = 6,6 \times 10^8$ KbE/ml und $x_{,5} = 2,9 \times 10^8$ KbE/ml.

Bei *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2 dagegen wuchs in herkömmlichem APW durchschnittlich eine Keimzahl von $\bar{x} = 1,9 \times 10^9$ KbE/ml bzw. $x_{,5} = 1,3 \times 10^9$ KbE/ml heran. In T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) erreichte dieser Stamm eine durchschnittliche Keimdichte von $\bar{x} = 2,0 \times 10^9$ KbE/ml bei fast identischem Median. Nicht-Vibrio-Begleitflora entwickelte in

Ergebnisse

herkömmlichem APW in Anwesenheit von *V. alginolyticus* DSM 2171 einen Keimzahlmittelwert von $\bar{x} = 8,6 \times 10^8$ KbE/ml ($x_{.5} = 4,8 \times 10^8$ KbE/ml) sowie von $\bar{x} = 4,2 \times 10^7$ KbE/ml ($x_{.5} = 3,0 \times 10^7$ KbE/ml) in Gegenwart von *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2.

In T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) konnten in Anwesenheit von *V. alginolyticus* DSM 2171 noch $\bar{x} = 8,8 \times 10^7$ KbE/ml Nicht-Vibrio-Begleitflora nachgewiesen werden. Bei *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2 lag die mittlere Keimdichte der Nicht-Vibrionen bei $\bar{x} = 5,0 \times 10^6$ KbE/ml. Der Median betrug in beiden Fällen $x_{.5} = 5,0 \times 10^6$ KbE/ml.

4.3.1 Statistische Auswertung

Mit Hilfe biometrischer Tests sollte untersucht werden, welche der Versuchsparameter einen signifikanten Einfluss auf die *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen ausüben.

Prüfung auf Normalverteilung

Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests wurde geprüft, ob die *V. parahaemolyticus* Keimzahlen normalverteilt sind. Die Analyse ergibt eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.000$ (herkömmliches APW) bzw. $p = 0.002$ T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl). Beide Werte liegen somit unter $p < 0.05$. Hieraus ergibt sich, dass die Keimdichten von *V. parahaemolyticus* in diesen Medien nicht normalverteilt sind. Dieser Test angewendet auf *V. alginolyticus* und Nicht-Vibrio-Begleitflora spricht ebensowenig für eine Normalverteilung.

Prüfung mittels Mann-Whitney-U-Test

Da die Keimdichten in den vorliegenden Versuchen nicht normalverteilt sind, machte es keinen Sinn, auf dem arithmetischen Mittelwert basierende statistische Tests anzuwenden. Beim Mann-Whitney-U-Test werden Ränge für Keimdichten in den einzelnen Medien gebildet und miteinander verglichen. Die hierbei errechnete asymptotische Signifikanz liegt mit dem Wert $p = 0.490$ über dem kritischen Wert von $p < 0.05$. Damit kann ein signifikanter Unterschied der *V. parahaemolyticus*-Keimdichten bei Gegenüberstellung der beiden Medien statistisch nicht abgesichert werden. In Bezug auf die Keimdichten von *V. alginolyticus* (asymptotische Signifikanz: $p = 0.009$) und Nicht-Vibrio-Begleitflora (asymptotische Signifikanz: $p = 0.000$) können diesem Test zufolge statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Medien bewiesen werden.

4.4 Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) mit dem Zusatz von Arabinose

Dem Medium T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) wurden hier 2% Arabinose hinzugefügt und anschließend das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Gegenwart von Begleitflora auch in diesem Medium untersucht (32 Ansätze).

Ergebnisse

4.4.1 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose): Wachstum von *V. parahaemolyticus*

In T-APW (0,01 M; pH-Wert 8,5, 5% NaCl) mit dem Zusatz von 2% Arabinose wurden nach 24-stündiger Bebrütung durchschnittlich $\bar{x} = 3,2 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml nachgewiesen. Der Median lag hier bei $x_{,5} = 1,9 \times 10^8$ KbE/ml. *V. alginolyticus* wurde in einer Keimdichte von durchschnittlich $\bar{x} = 3,5 \times 10^8$ KbE/ml ($x_{,5} = 3,5 \times 10^7$ KbE/ml) gefunden, während an Nicht-Vibrio-Begleitflora im arithmetischen Mittel Keimzahlen von $\bar{x} = 9,3 \times 10^7$ KbE/ml festzustellen waren. Der Median der Nicht-Vibrio-Begleitflora lag dagegen bei $x_{,5} = 5,0 \times 10^6$ KbE/ml.

Abbildung 31 stellt die Ergebnisse der Keimdichten-Untersuchung von herkömmlichem APW, T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) gegenüber.

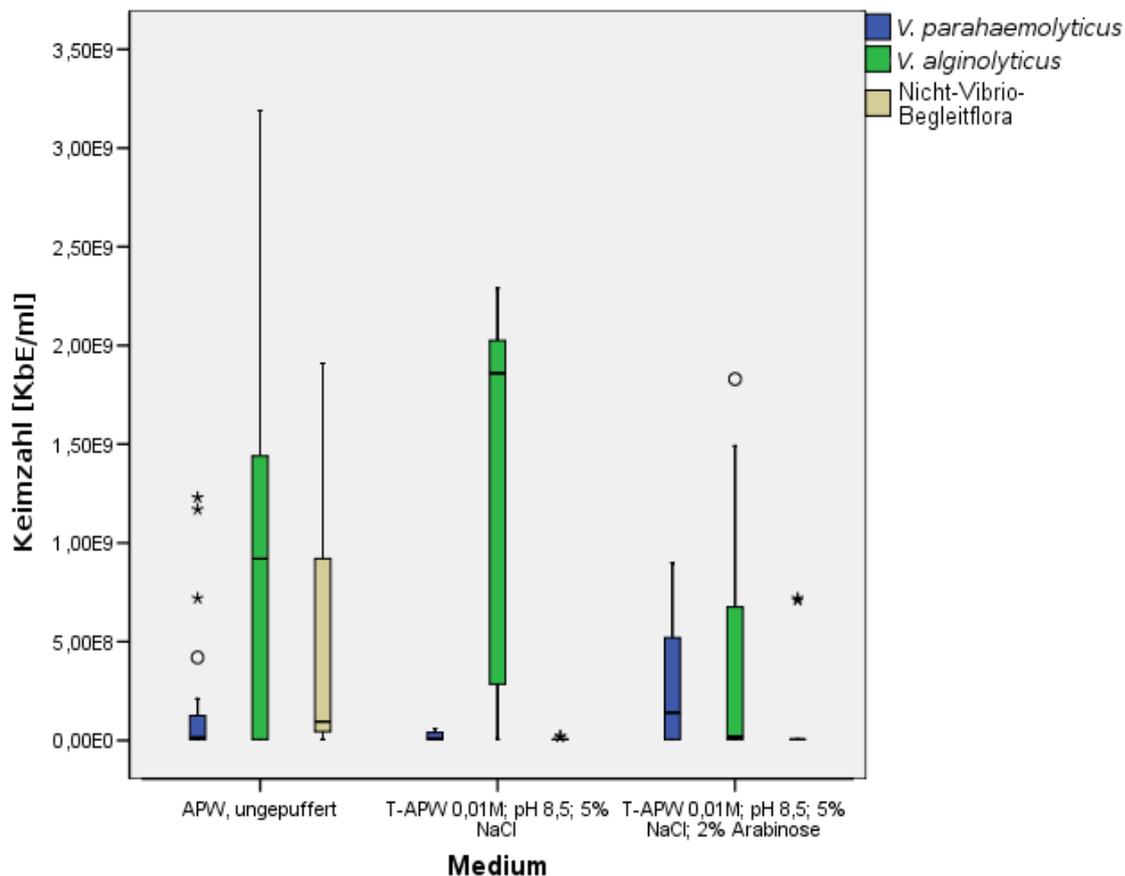


Abbildung 31: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Anwesenheit von *V. alginolyticus* und Begleitflora - Vergleich zu herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl): Boxplotdarstellung der Keimzahlen nach 24-stündiger Bebrütung

4.4.2 T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose): Gegenüberstellung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus*

Bei der Auswertung der Keimdichtenergebnisse für T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) verdient auch die Betrachtung der Keimdichten-Relation von *V. parahaemolyticus* zu *V. alginolyticus* - aufgetrennt nach den eingesetzten *V. alginolyticus*-Stämmen - Interesse (Abbildung 32). Bei diesem Arabinose-haltigem Medium schien sich die Keimdichte von *V. alginolyticus* jeweils proportional zur Keimdichte von *V. parahaemolyticus* zu verhalten. Bei der Betrachtung von herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) nach den gleichen Gesichtspunkten konnte dies Phänomen nicht festgestellt werden. Hier überschritten die Keimdichten von *V. alginolyticus* stets diejenigen von *V. parahaemolyticus* deutlich (Abbildung 30).

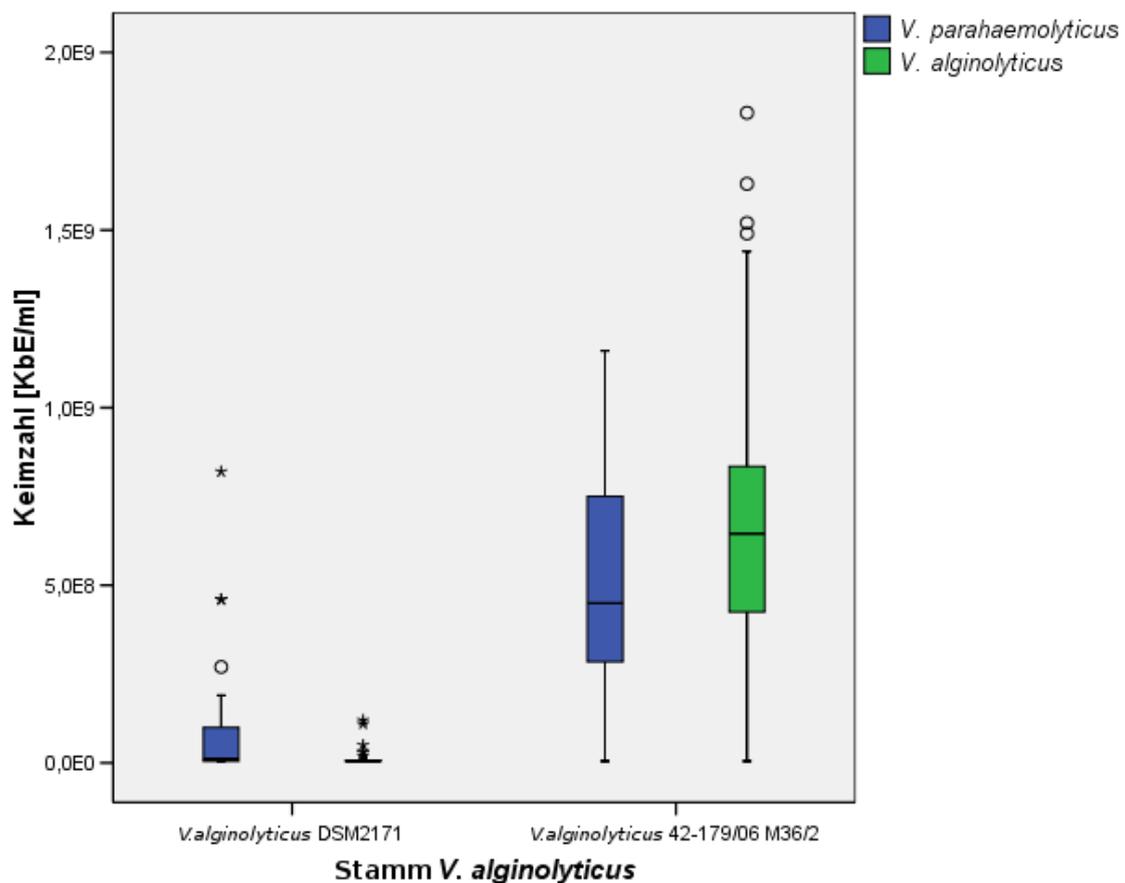


Abbildung 32: Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Anwesenheit von *V. alginolyticus* und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimdichten von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 im Verhältnis zu *V. alginolyticus* DSM 2171 (links) bzw. *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2 (rechts)

4.4.3 Statistische Auswertung

Folgende Statistik vergleicht herkömmliches APW mit T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) bezüglich ihres Effekts auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Anwesenheit von definierter Begleitflora.

Prüfung auf Normalverteilung

Dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest zufolge kann mit einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0.000$ keine Normalverteilung der *V. parahaemolyticus*-Keimdichten festgestellt werden.

In T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) dagegen liegt diese Spezies mit einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0.221$ normalverteilt vor.

Für *V. alginolyticus* wurde in beiden Medien eine asymptotische Signifikanz ermittelt, die unter dem kritischen Wert von $p < 0.05$ liegt. Diese Spezies ist demnach ebenfalls nicht normalverteilt. Mit einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0.059$ zeigt die Nicht-Vibrio-Begleitflora in herkömmlichem APW eine Normalverteilung. Für T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) trifft diese Aussage nicht zu.

Prüfung mittels Mann-Whitney-U-Test

Um der fehlenden Normalverteilung für *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW Rechnung zu tragen, wurde der Mann-Whitney-U-Test (Bildung und Vergleich von Rängen) zur Bewertung der Medien herangezogen. Hierbei ergibt sich eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.009$, womit der kritische Wert von $p < 0.05$ unterschritten wird. Deshalb besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen in beiden Medien.

Die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests auf die Keimdichten von *V. alginolyticus* ergibt eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.029$ für die zwei Medien. Weil dieser Wert unter dem kritischen Wert von $p < 0.05$ liegt, kann auch hier von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Medien ausgegangen werden.

Für die Nicht-Vibrio-Begleitflora ergibt dieser Test eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.000$ und folglich auch einen signifikanten Unterschied.

Prüfung mit dem sogenannten T-Test für unabhängige Stichproben

Im Gegensatz zu herkömmlichem APW folgen die *V. parahaemolyticus*-Keimdichten in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) einer Normalverteilung. Deshalb kann für diese Daten zusätzlich ein T-Test (Vergleich der Mittelwerte) angewendet werden. Das Ergebnis des ebenfalls durchgeführten Levène-Tests zeigt, dass *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen nicht nur normalverteilt sind, sondern auch eine Homogenität der Varianzen vorliegt. Der T-Test ergibt eine zweiseitige Signifikanz von $p = 0.034$ und liegt damit unter dem kritischen Wert von $p < 0.05$. Somit erbringt auch dieser Test einen signifikanten Unterschied der Keimdichten in den beiden Medien. Das Ergebnis des T-Tests lässt sich zugleich mit dem des Mann-Whitney-U-Tests vereinbaren.

Angewendet auf die Keimdichten der Nicht-Vibrio-Begleitflora ergibt der Levène-Test keine Homogenität der Varianzen. Dennoch liegt die zweiseitige Signifikanz mit $p = 0.009$ unter dem kritischen Wert von $p < 0.05$. Somit wird das Ergebnis des Mann-Whitney-U-Test auch hier bestätigt.

4.5 Vergleich quantitativer, kultureller Nachweismethoden: Oberflächen-Spatelverfahren (OSV) und Most-Probable-Number (MPN)- Methode

Im Rahmen der Arbeit wurde auch die Leistungsfähigkeit des Oberflächen-Spatelverfahrens (OSV) sowie der Most-Probable-Number (MPN)-Methode als kulturelle, quantitativ - mikrobiologische Methoden miteinander verglichen. Bei der Durchführung beider Verfahren wurde ausschließlich T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) als Flüssignährmedium eingesetzt. Zur Auswertung kamen jeweils 40 Proben der Inokulum-Stufen 1-10 KbE/g und 11-100 KbE/g, sowie 24 Proben der Inokulum-Stufe 101-1000 KbE/g.

Abbildung 33 zeigt die Verteilung der Keimdichten, die mit den beiden Verfahren ermittelt worden sind, geordnet nach der Inokulum Stufe.

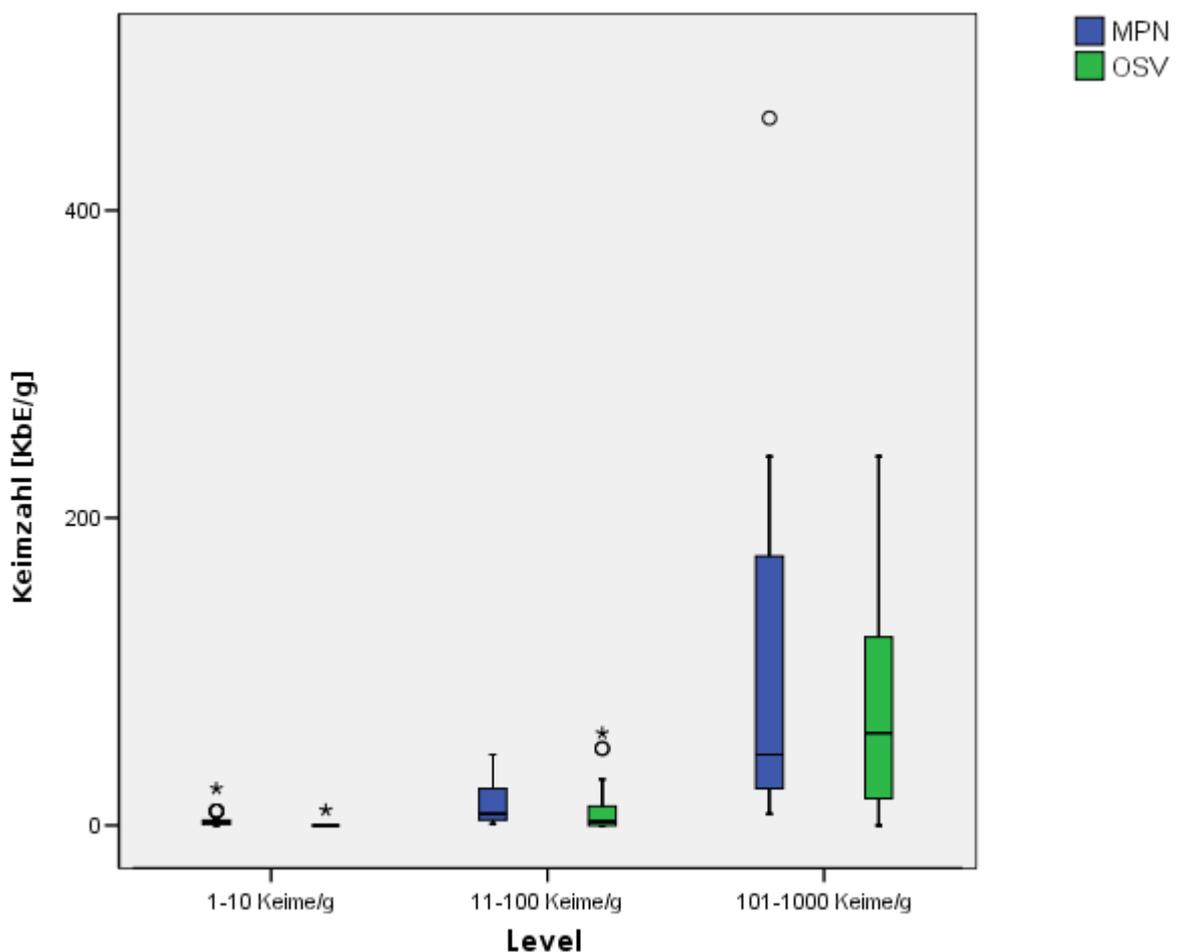


Abbildung 33: Gegenüberstellung von MPN und OSV-Verfahren: Boxplotdarstellung der ermittelten Keimzahlen von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose)

Ergebnisse

Bei einem vorgegebenen Inokulum im Bereich zwischen 1 und 10 KbE *V. parahaemolyticus*/g wurden bei einer durchschnittlichen theoretischen Keimzahl von 4,0 Keimen/g über das MPN-Verfahren im Mittel $\bar{x} = 3,1$ KbE/g gefunden, während sich über die OS-Methode durchschnittlich $\bar{x} = 0,25$ KbE/g nachweisen ließen.

Bei dotierten 11-100 KbE/g ergab sich eine durchschnittliche theoretische Keimzahl (Keimzahl, mit der das Muschelmaterial zuvor beschickt wurde) von $\bar{x} = 41$ KbE/g. Von diesen konnten mit der MPN-Technik $\bar{x} = 15,6$ KbE nachgewiesen werden, während mit dem Oberflächenpatelverfahren auf dieser Stufe im Mittel $\bar{x} = 9$ KbE gefunden wurden.

Im Inokulum-Bereich von 101-1000 KbE/g lag die theoretische Keimzahl bei $\bar{x} = 444,1$ KbE/g. Über das MPN-Verfahren ergaben sich durchschnittlich $\bar{x} = 106,8$ KbE/g, während mit der OS-Methode $\bar{x} = 78,5$ KbE ermittelt wurden.

4.5.1 Statistische Auswertung

Die statistische Überprüfung sollte die Frage beantworten, ob zwischen den beiden Verfahren zur quantitativen Erfassung von *V. parahaemolyticus* signifikante Unterschiede bestehen.

Prüfung auf Normalverteilung

Die Auswertung der Daten über den Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest ergibt, dass die ermittelten Keimdichten in der Inokulum-Stufe 1-10 KbE/g mit einer asymptotischen Signifikanz von $p = 0.001$ für das MPN-Verfahren und $p = 0.000$ bei der OS-Prozedur nicht normalverteilt sind.

Mit Werten von $p = 0.004$ (MPN) und $p = 0.000$ (OSV) liegt die asymptotische Signifikanz für die Keimdichten im Bereich von 11-100 KbE/g ebenfalls unter dem kritischen Wert von $p > 0.05$, weshalb auch diese Daten nicht als normalverteilt zu betrachten sind.

Bei Proben mit theoretischen Keimdichten zwischen 101-1000 KbE/g ergibt sich für Werte aus dem MPN-Verfahren eine Signifikanz von $p = 0.113$ und für die der OS-Methode eine Signifikanz von $p = 0.576$. Beide Ergebnisse überschritten also den kritischen Wert von $p > 0.05$, sodass man hier von einer Normalverteilung der jeweils ermittelten Keimdichten sprechen kann.

Prüfung mittels Wilcoxon-Test

Zum statistischen Vergleich nicht normalverteilter Keimdichten eignet sich am besten der Wilcoxon-Test. Bei diesem Test werden Ränge der absoluten Differenzen der beiden Variablen (Keimdichten MPN-Keimdichten OSV) gebildet und miteinander verglichen.

Bei einer theoretischen Keimvorgabe zwischen 1-10 KbE *V. parahaemolyticus*/g ergab sich eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.000$. Damit liegt dieser Wert unter dem kritischen Wert von $p < 0.05$, weshalb ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden besteht.

Auf dem Niveau von 11-100 KbE/g attestiert der Wilcoxon-Test eine asymptotische Signifikanz von $p = 0.001$. Somit sind die Unterschiede der Keimdichten der beiden zu vergleichenden Nachweismethoden ebenfalls signifikant.

Ergebnisse

Prüfung mittels T-Test für gepaarte Stichproben

Die ermittelten Keimdichten von *V. parahaemolyticus* bei einem ursprünglichen Inokulum von 101-1000 KbE/g erwiesen sich bei den zwei quantitativen Analysemethoden als normalverteilt. Damit war hier zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede ein statistischer Vergleich der Mittelwerte sinnvoll. Der T-Test für gepaarte Stichproben basiert auf dem Vergleich der Mittelwerte beider Variablen. Der Test ergibt für diese Konstellation eine zweiseitige Signifikanz von $p = 0.135$. Damit lässt sich bei einem kritischen Wert von $p < 0.05$ ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Nachweismethoden nicht absichern.

4.6 Nachweis von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Miesmuscheln

4.6.1 Nachweis von *V. parahaemolyticus*

Um die Praxisgegebenheiten zu simulieren, sollte die Leistungsfähigkeit des modifizierten Mediums in Kombination mit dem MPN-Verfahren beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Muscheln untersucht werden.

Das Balkendiagramm in Abbildung 34 stellt den Durchschnitt (\bar{x}) der tatsächlich nachgewiesenen Keimdichte der jeweils theoretisch möglichen Keimdichten gegenüber.

Ergebnisse

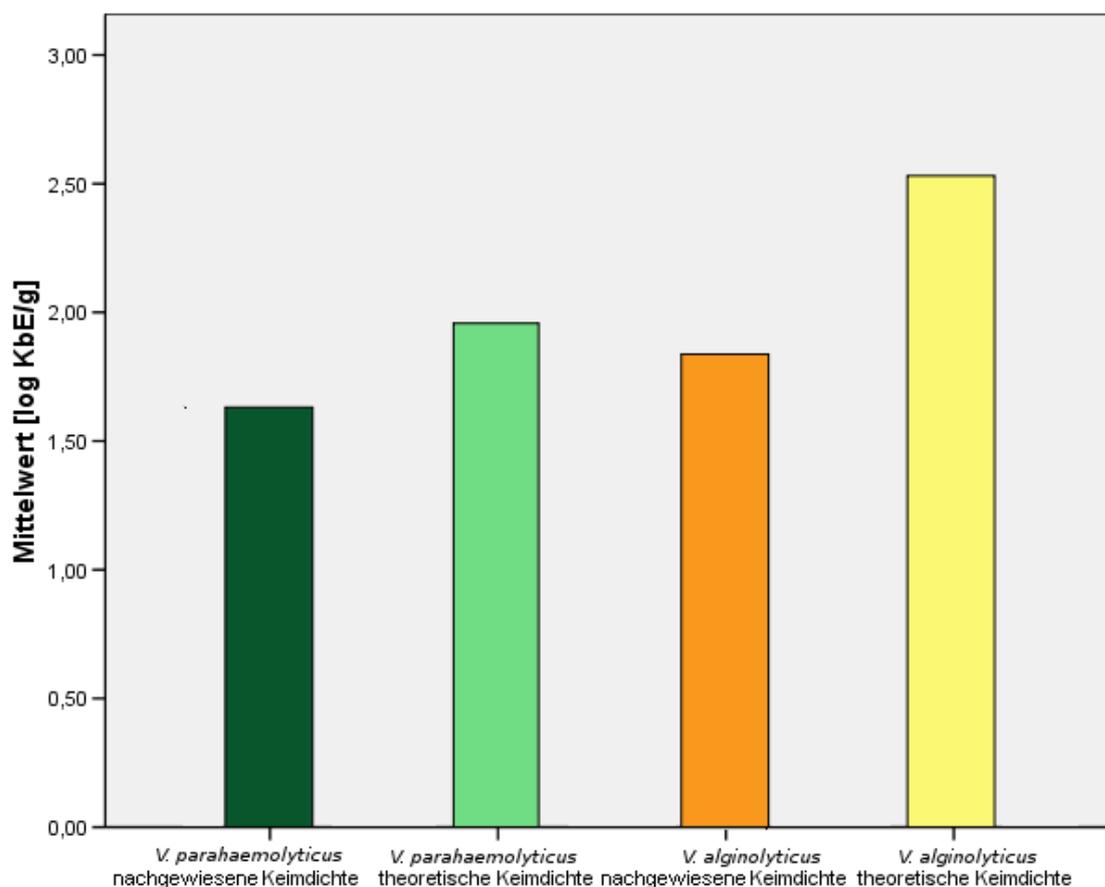


Abbildung 34: Nachweis von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* in kontaminierten Muscheln mittels MPN-Methode und T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose): Balkendiagramm der Mittelwerte

Dem Versuchsansatz entsprechend wurden dem artifiziellen Meerwasser des Kontaminationsbeckens durchschnittlich $\bar{x} = 1,96 \log \text{KbE } V. \text{ parahaemolyticus/ml}$ zugefügt und davon im Mittel $\bar{x} = 1,63 \log \text{KbE/g}$ Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit in den Tieren nachgewiesen. In den Fällen, in denen auch *V. alginolyticus* Teil der Kontaminationsflora bildete, wurden im Mittel $\bar{x} = 2,53 \log \text{KbE } V. \text{ alginolyticus/ml}$ hinzugefügt, von denen durchschnittlich $\bar{x} = 1,83 \log \text{KbE/g}$ in den Miesmuscheln wiedergefunden wurden.

Zur Ermittlung der Effektivität der Nachweismethode wurden Differenzen zwischen eingegebener Keimzahl pro/ml artifizielles Meerwasser und nachgewiesener Keimdichte/g Miesmuschelfleisch und -schalenflüssigkeit gebildet. Die Boxplotdarstellung aus Abbildung 35 zeigt diese Differenzen gestaffelt nach ursprünglich eingegebener Keimmenge.

Ergebnisse

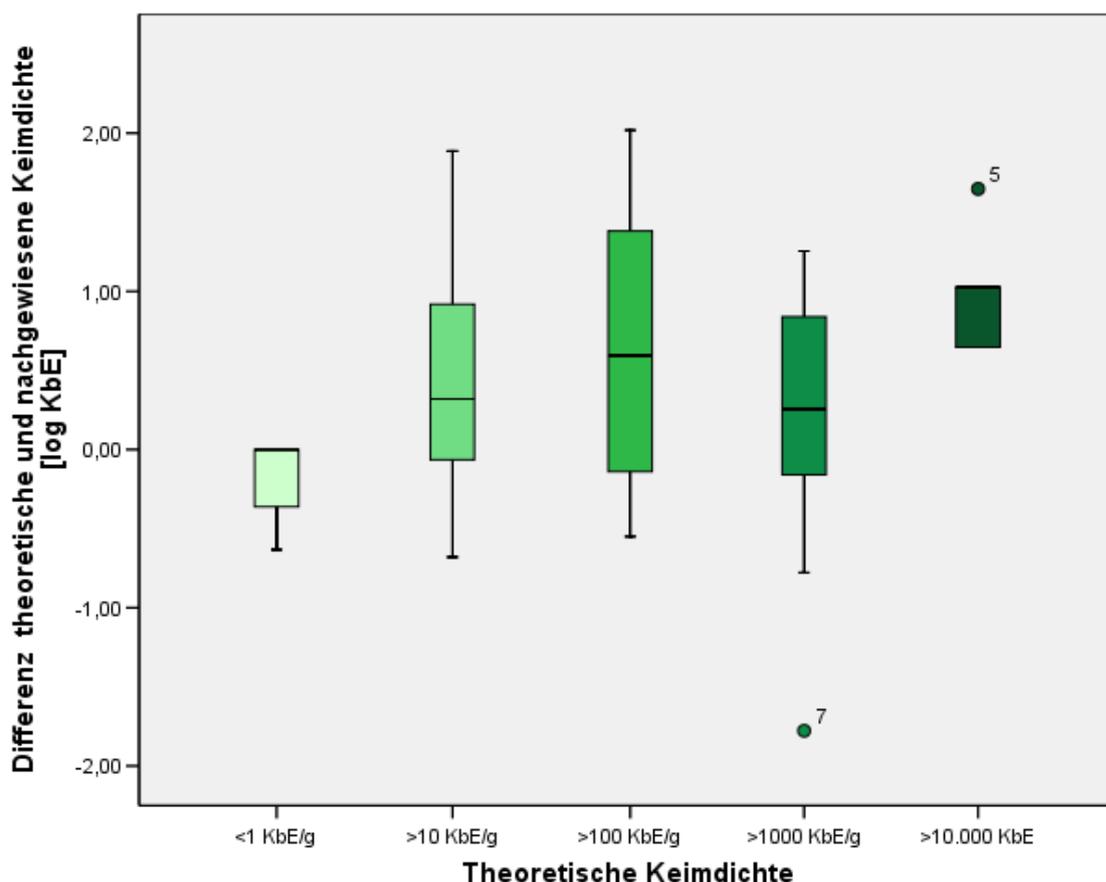


Abbildung 35: Nachweis von *V. parahaemolyticus* mittels MPN-Methode und T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose): Differenzen zwischen theoretischer und praktischer Keimdichte

Bei der Ergebnisinterpretation ist zu beachten, dass positive Differenzen gleichbedeutend mit nachgewiesenen Keimdichten sind, die geringer als die theoretische Keimdichte (die Konzentration *V. parahaemolyticus*, die das Wasser des Muschelbeckens nach der Inokulation aufwies) ausfielen. Bei negativen Differenzen überstiegen die gefundenen Keimzahlen jeweils die erwarteten Keimdichten.

Bei den mit über 10.000 KbE *V. parahaemolyticus* /ml (insgesamt 1 Ansatz mit 6 Proben, Eingabe von 4,69 log KbE/ml) kontaminierten Miesmuscheln konnte im Median eine Keim-dichtendifferenz von $x_{.5} = 1,0$ log zur tatsächlich nachgewiesenen Keimdichte festgestellt werden. Im günstigsten Fall wurde eine Differenz von $x_{\min} = 0,65$ log festgestellt, bei einem Ausreißer betrug sie $x_{\max} = 1,65$ log.

Bei Muscheln, die einer Keimdichte von über 1000 KbE/ml (3 Ansätze mit jeweils 6 Proben, durchschnittliches Inokulum $\bar{x} = 3,89$ log KbE/ml) ausgesetzt waren, wurde beim Vergleich mit den gefundenen Keimdichten im Median eine Differenz von $x_{.5} = 0,25$ log berechnet. Die mittleren 50% der Differenzen lagen zwischen $x_{.75} = 0,84$ log bzw. $x_{.25} = -0,16$ log, während sich Maximalwert und Minimalwert auf $x_{\max} = 1,26$ log und $x_{\min} = -0,78$ log beliefen.

Ergebnisse

Setzte man dem künstlichen Meerwasser des Kontaminationsbeckens *V. parahaemolyticus* in Keimdichten von durchschnittlich $\bar{x} = 2,46 \log \text{KbE/ml}$ zu (4 Ansätze mit jeweils 6 Proben, $> 100 \text{ KbE/ml}$), erreichte die durchschnittliche Differenz einen Median von $x_{.5} = 0,59 \log$. Betrachtete man alle Differenzen, so lagen sie zwischen $x_{\max} = 1,97 \log$ und $x_{\min} = -0,55 \log$.

Bei weiteren 5 Ansätzen mit jeweils 6 Proben wurden im Kontaminationsbecken Keimdichten von durchschnittlich $\bar{x} = 1,81 \log \text{KbE/ml}$ erzeugt. Nach Vergleich mit den nachgewiesenen Keimzahlen ergaben sich Differenzen im Median von $x_{.5} = 0,32 \log$. Die mittleren 50% der berechneten Differenzen waren hier einem Bereich von $x_{.75} = 0,92 \log$ bis $x_{.25} = -0,08 \log$ zuzuordnen. Insgesamt reichte die Spannweite von $x_{\max} = 1,68 \log$ bis $x_{\min} = -0,67 \log$.

In einem letzten Ansatz wurden die Muscheln im Kontaminationsbecken einer Keimdichte von weniger als 1 KbE/g ausgesetzt. In den 6 Proben dieses Ansatzes lag die Differenz im Median bei $x_{.5} = 0,00 \log$. Bei den mittleren 50% der Proben reichte die Box von 0 bis $-0,43 \log$. Insgesamt wurden Differenzen bis zu $x_{\min} = -0,63 \log$ festgestellt.

Betrachtete man sämtliche 85 Proben dieser Versuchsreihe so ergab sich für die berechneten Differenzen ein Median von $x_{.5} = 0,48 \log$ und zugehörige Extremwerte von $x_{\max} = 2,02 \log$ im Höchstfall, bis $x_{\min} = -1,78 \log$ im geringsten Fall.

4.6.2 Einfluss von *V. alginolyticus* auf den Nachweis von *V. parahaemolyticus*

In weiteren Versuchen galt es herauszufinden, ob die zusätzliche Kontamination der Miesmuscheln mit *V. alginolyticus* einen signifikanten Einfluss auf die nachgewiesene Keimdichte von *V. parahaemolyticus* nimmt. Dazu wurden die durchschnittlichen Differenzen (theoretische/ tatsächliche Keimdichte) der logarithmierten Keimdichte von *V. parahaemolyticus* der Proben, die nur mit *V. parahaemolyticus* (6 Ansätze à 6 Proben) kontaminiert waren, mit denen verglichen, die mit beiden Spezies kontaminiert (8 Ansätze à 6 Proben) waren.

4.6.2.1 Statistische Auswertung

Prüfung auf Normalverteilung

Zunächst wurden die logarithmierten Differenzen von theoretischer Keimdichte und nachgewiesener Keimdichte beider Vergleichsgruppen über den Kolmogorov-Smirnov-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Die Differenzen der ausschließlich mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten Muscheln weisen dabei eine zweiseitige, asymptotische Signifikanz von $p = 0,315$ auf. Der entsprechende Wert der anderen Gruppe betrug $p = 0,201$. Beide Signifikanzwerte liegen über dem kritischen Wert von $p > 0,05$, womit von einer Normalverteilung der Differenzen in beiden Gruppen ausgegangen werden darf.

Prüfung mittels T-Test bei unabhängigen Stichproben

Zur Feststellung etwaiger signifikanter Unterschiede zwischen den beiden Gruppen kam der T-Test für unabhängige Stichproben zur Anwendung. Grundlage dieses Tests ist ein Vergleich von Mittelwerten. Der Mittelwert der Keimdichtendifferenzen bei ausschließlich mit *V. parahaemolyticus* kontaminierten Muscheln betrug $\bar{x} = 0,61 \log \text{KbE}$. Wurden die Muscheln mit beiden Spezies kontaminiert, ergab sich eine mittlere Differenz von $\bar{x} = 0,33 \log \text{KbE}$. Beim ebenfalls durchgeführten Levène-Test errechnet sich eine Signifi-

Ergebnisse

kanz von $p = 0.235$. Damit kann eine Homogenität der Varianzen festgestellt werden. Der anschließende T-Test ergibt eine über dem kritischen Wert von $p > 0.05$ liegende Signifikanz von $p = 0.133$. Damit sind die Differenzen zwischen tatsächlicher und theoretischer Keimdichte von *V. parahaemolyticus* in Anwesenheit von *V. alginolyticus* signifikant geringer. In anderen Worten ausgedrückt wurden bei gleichzeitiger Anwesenheit von *V. alginolyticus* und *V. parahaemolyticus* in der Probe signifikant höhere Keimdichten an *V. parahaemolyticus* nachgewiesen, als dies ohne Beteiligung von *V. alginolyticus* der Fall war.

4.6.3 Einfluss der Muschelfleisch-/Schalenflüssigkeitseinwaage auf die nachgewiesene Keimdichte

Bei der geschilderten Versuchsreihe sollte zugleich festgestellt werden, ob die eingewogene Menge an Muschelfleisch und Schalenflüssigkeit bei einem konstanten Verdünnungsverhältnis von 1:10 die Höhe der nachgewiesenen Keimdichte von *V. parahaemolyticus* bzw. *V. alginolyticus* beeinflusst.

Prüfung auf Normalverteilung

Wendet man den Kolmogorov-Smirnov Test auf die *V. parahaemolyticus*-Keimichtenverteilung bezogen auf alle untersuchten Proben an, so ergibt sich eine asymptotische Signifikanz von

$p = 0.018$ für *V. parahaemolyticus* und $p = 0.000$ für *V. alginolyticus*. Beide Werte liegen damit unter der kritischen Grenze von $p > 0.05$, weshalb nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann.

Benutzt man den Kolmogorov-Smirnov Test allerdings für die Keimichtenverteilung der einzelnen Kontaminationsansätze, dann ergeben sich Signifikanzen zwischen $p = 0.155$ und $p = 0.794$. Damit waren die Keimichten innerhalb eines Kontaminationsansatzes stets normalverteilt.

Prüfung mittels Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test dient zur Überprüfung der Unterschiede zwischen Werten verschiedener Gruppen, wenn keine Normalverteilung der Daten besteht. Er basiert auf Bildung und Vergleich von Rängen (statt Mittelwerten) und kann als Analogon der One-Way-Anova (normalverteilte Daten) verstanden werden.

Beim Vergleich der Einwaage-Gruppen von 30g, 25g und 20g und den dazugehörigen ermittelten Keimdichten kann diesem Test zufolge eine Signifikanz von $p = 0.526$ für *V. parahaemolyticus* und $p = 0.964$ für *V. alginolyticus* festgestellt werden. Da diese Zahlen deutlich über dem kritischen Wert von $p < 0.05$ liegen, können statistisch somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. Bei konstantem Verhältnis zum Nährmedium (Erstverdünnung 1:10) nahm die Höhe der Einwaage des Muschelmaterials in einem Bereich von 20-30g demnach keinen Einfluss auf die Höhe der Keimdichte.

Prüfung mittels One-Way-Anova

Geht man von einer Normalverteilung der Keimichten aus, so bietet sich zum Vergleich der verschiedenen Einwaage-Gruppen die One-Way-Anova an, der ein Vergleich der Mittelwerte zugrunde liegt. Der Levène-Test zum Test auf Homogenität der Varianzen ist dabei ebenfalls anzuraten.

Ergebnisse

Dem Levène-Test zufolge ist mit einer Signifikanz von $p = 0.034$ (*V. parahaemolyticus*) sowie $p = 0.937$ (*V. alginolyticus*) lediglich bei *V. alginolyticus* eine Homogenität der Varienzen gegeben.

Die Signifikanzwerte der One-Way-Anova liegen bei $p = 0.396$ (*V. parahaemolyticus*) bzw. $p = 0.996$ (*V. alginolyticus*). Beide Werte überschreiten damit deutlich den kritischen Wert von $p < 0.05$, weshalb kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Die One-Way-Anova bestätigt also die Aussage des Kruskal-Wallis-Tests.

4.6.4 Biochemisch-kulturelle mikrobiologische Analyse der Proben

Mit biochemischen und kulturellen Tests konnten alle verdächtigen Kolonien auf CVA als Isolate der Spezies *V. parahaemolyticus* (CVA: violette Kolonien, 2-4 mm, irisierender Rand) bzw. *V. alginolyticus* (CVA: cremefarbene Kolonien, 3-5mm) bestätigt werden.

Der kommerzielle API 20 E-Test vermochte die Ergebnisse der restlichen Tests nicht immer zu untermauern. In einigen Fällen kam es zu untypischen Reaktionen beim Test auf die Lysin-decarboxylase sowie zu falsch negativen Ergebnissen bei verschiedenen Zuckern. Irriger Weise erbrachte die Auswertung des API 20 E dann die Diagnose *Aeromonas salmonicida* statt *V. parahaemolyticus* (DSM 10027).

Bis auf den letzten Kontaminationsansatz (<1 KbE *V. parahaemolyticus*/ml) lag in den Kontrollproben (nicht kontaminierte Muscheln der gleichen Charge) kein Hinweis auf eine natürliche Belastung der Tiere mit *V. parahaemolyticus* vor.

In einigen Fällen konnten weitere Bakterienspezies in den Muscheln identifiziert werden. Den biochemisch-kulturellen Tests zufolge handelte es sich dabei um *Shewanella spp.*, *Pasteurella pneumotropica*, *Mannheimia haemolytica*, *Burkholderia cepacia*, *Xanthomonas maltophilia* und *V. fluvialis*.

4.6.5 Molekularbiologische Untersuchung des DNA-Materials

Über eine Multiplex-PCR mit Zielsequenzen auf den Genen für *toxR*, *tdh* und *trh* konnten sämtliche verdächtige Kolonien auch molekularbiologisch bestätigt werden. Das Regulationsgen *tox R* ließ sich dabei auf jeder DNA verdächtigter Kolonien nachweisen.

Bei den Stämmen, die zur Kontamination der Muscheln verwendet wurden, besitzt *V. parahaemolyticus* DSM 10027 als einziger Stamm das Gen *trh*, welches für das TDH-verwandte Hämolysin kodiert. Sämtliche anderen Stämme, die zur Kontamination der Muscheln herangezogen wurden, wiesen weder das *trh*- noch das *tdh*-Gen auf. Wurden Muscheln mit *V. parahaemolyticus* DSM 10027 kontaminiert, so konnte dieses Gen auch auf der DNA von *V. parahaemolyticus* Kolonien, die aus diesen Muscheln isoliert worden waren, nachgewiesen werden. Auf der DNA der anderen aus den kontaminierten Muscheln isolierten *V. parahaemolyticus*-Stämmen ließen sich weder *tdh* noch *trh* nachweisen. Zur Gegenprobe wurden auch die DNA der übrigen isolierten Spezies untersucht. Dabei konnten keine *V. parahaemolyticus*-typischen DNA-Abschnitte nachgewiesen werden.

5 Diskussion

5.1 Bewertung der eigenen Untersuchungsergebnisse

5.1.1 Leistungsprüfung von CVA

Ziel der durchgeführten Arbeit war unter anderem die Prüfung des Leistungsvermögens von CVA und TCBS-Agar hinsichtlich der Differenzierung von *V. parahaemolyticus* sowohl gegenüber anderen *Vibrio* spp. als auch Nicht-*Vibrio*-Stämmen. Aufgrund der für diese Fragestellung verhältnismäßig geringen Gesamtprobenzahl von insgesamt 54 *Vibrio* spp.- Stämmen und 7 Nicht-*Vibrio*-Isolaten sollten die Ergebnisse als Orientierung verstanden werden. Hinsichtlich des Nachweises von *V. parahaemolyticus* auf TCBS-Agar ergab sich eine Sensitivität von 65% und Spezifität von 80%. Bei der Anzucht der gleichen Stämme auf CVA hingegen konnte eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 96% bei der Detektion des Zielkeimes festgestellt werden. SU et al. (2005) und DUAN und SU (2005) ermittelten für den Nachweis von *V. parahaemolyticus* auf TCBS eine Sensitivität von 54%, während sie auf CVA eine Sensitivität von 84% fanden. Die Spezifität betrug ihren Untersuchungen zufolge bei der Benutzung von TCBS 77%. Beim Einsatz von CVA stieg dieser Wert auf 94% an. Hinsichtlich der Spezifität der zwei Kulturmedien lagen die Ergebnisse beider Arbeiten damit dicht beieinander.

Bezüglich der Sensitivität manifestierte sich bei der vorliegenden Untersuchung jedoch kein ganz so deutlicher Unterschied zwischen TCBS und CVA. Ursächlich dafür ist möglicherweise der recht geringe Anteil an *V. vulnificus*, *V. mimicus* und *V. damsela*, welche auf TCBS-Agar in der Regel ebenso wie *V. parahaemolyticus* grüne Kolonien von ähnlicher Größe bilden. Es ist davon auszugehen, dass ein Anheben des Anteils der genannten *Vibrio* spp. zu einer Abnahme der berechneten Sensitivität des TCBS-Agar beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* führen dürfte. Die hier erzielten Ergebnisse zu Sensitivität und Spezifität des CVA erfordern zudem eine differenzierte Betrachtung. In der vorliegenden Studie zeigten zwei von 17 untersuchten *V. parahaemolyticus*-Stämmen auf CVA eine milchige, zartrötliche Farbe im Zentrum und einen irisierenden Randbereich. SU et al. (2005) haben zwar auch vereinzelte (drei von 148 Stämmen) milchige, falsch negative Kolonien beobachtet, gingen aber nicht speziell auf deren Morphologie ein. Auch in der vorliegenden Studie wurde gemäß der bisherigen Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit von CVA die deutlich violette Pigmentierung als Hauptdifferenzierungsmerkmal herangezogen. Abgesehen von diesem Merkmal war jedoch für alle der hier untersuchten *V. parahaemolyticus*-Stämme auch der irisierende Rand typisch. Zieht man diesen Rand als weiteres charakteristisches Kriterium heran, so würde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Zahl falsch negativer Ergebnisse auf Null sinken. Die Berücksichtigung des irisierenden Randes würde folglich zu einem Anstieg der Spezifität und auch Sensitivität des *V. parahaemolyticus*-Nachweises auf CVA führen.

HARA-KUDO et al. (2001) berichteten von Farbüberlagerungen bei *V. parahaemolyticus*-Kolonien auf TCBS-Agar. Sie stellten fest, dass sowohl der Agar als auch *V. parahaemolyticus*-Kolonien in der Umgebung saccharoseabbauender Bakterien eine gelbe Farbe annehmen können. Diesen Umstand schrieben die Autoren diffundierender Säure zu, die beim Abbau

Diskussion

von Zuckern entsteht. Derartige Beobachtungen konnten auch in den eigenen Untersuchungen gemacht werden. In der vorliegenden Studie wurde zusätzlich das Auftreten grüner Kolonien von *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2 auf TCBS-Agar beobachtet, was eine makroskopische Differenzierung zu *V. parahaemolyticus*-Kolonien erschwerte. Grüne Kolonien von *V. alginolyticus* 42-179/06 M36/2 traten insbesondere dann auf, wenn die einzelnen Kolonien eng benachbart waren. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte so genanntes Quorum sensing sein, welches Einzellern erlaubt, die Zelldichte ihrer Population über chemische Kommunikation zu messen. Dieser Regulationsmechanismus ermöglicht die Aktivierung und auch Deaktivierung bestimmter Gene in Abhängigkeit von der Zelldichte eines Stammes. Die Existenz von Quorum sensing-Mechanismen ist auch bei *Vibrio* spp. nachgewiesen worden. (MC DOUGALD und KJELLBERG, 2006).

In der vorliegenden Untersuchung konnte des Weiteren eine Farbveränderung der Kolonien verschiedener *Vibrio* spp. im Verlauf der Lagerung von beimpften TCBS-Agarplatten festgestellt werden. Dieser Farbumschlag äußerte sich bei einigen Isolaten in einer mit der Zeit zunehmenden Vergrünung ursprünglich gelber Kolonien. Das Phänomen trat sowohl bei Lagerung bei Raumtemperatur als auch bei Aufbewahrung im Kühlschrank auf. Beobachtungen dieser Art wurden auch von SIEFFERT (2003) beschrieben. Eine Ursache für die Vergrünung ist bisher nicht gefunden worden.

5.1.2 Optimierung der Zusammensetzung von APW

5.1.2.1 Darstellung und Begründung der Untersuchungsabschnitte/-abfolge

5.1.2.1.1 Keimzahlbestimmung mittels Photometrie

Eichkurven

Die Eichkurven verliefen anfangs sehr steil, d.h. kleine Veränderungen der optischen Dichte signalisierten dort erhebliche Anstiege der logarithmierten Keimzahlen. Bei Erreichen eines Bereichs von $7,5 \times 10^7$ KbE *Vibrio* spp./ml bis 10^8 KbE *Vibrio* spp./ml (wurde nach 6 h grundsätzlich erreicht) flachte der Kurvenverlauf jedoch deutlich ab, womit hier eine genauere Abschätzung des Keimgehaltes über die optische Dichte möglich war. Bei Messungen nach 24 Stunden oder 48 Stunden war die Korrelation zwischen optischer Dichte und tatsächlicher Keimzahl zu gering für eine solide Schätzung. Zu diesen Zeitpunkten schwankte die optische Dichte zwischen OD = 0,500 und OD = 2,500 ohne erkennbare Beziehung zur Bakterienzahl. Dieser Umstand spiegelte sich auch im jeweils zugehörigen Korrelationskoeffizienten bzw. Bestimmtheitsmaß wider.

Bei *V. vulnificus* als Vergleichskeim konnte ein ähnlicher Verlauf der Eichkurve beobachtet werden. In Proben mit *V. vulnificus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat ließen sich nach 24 Stunden/48 Stunden mittels Tropfplattenverfahren keine lebenden Kulturen mehr nachweisen, während die dazugehörigen optischen Dichten bei bis zu OD = 2,500 lagen.

Bei den Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat konnte die Absenkung des Wertes des Ordinatenabschnitts (b_0) um durchschnittlich 0,5 verglichen mit den Proben ohne Homogenatzusatz beobachtet werden. Bei gleicher optischer Dichte war in

Diskussion

den homogenatfreien Ansätzen eine um $\log 0,5$ geringere Keimzahl zu erwarten. Umgekehrt wurden in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat bei gleicher (kulturell bestimmter) Keimzahl höhere Werte für die optische Dichte gemessen. Die Differenz zu Proben mit Reinkulturen betrug hier mindestens 0,800 und reichte bis ca. 1,100. Offensichtlich - und durchaus nachvollziehbar - erhöhte die Zugabe von Muschelhomogenat die optische Dichte der Proben.

Die Auswertung der Eichkurven zeigte, dass eine Keimzahlabeschätzung an Hand der optischen Dichte während der ersten 6 Stunden eines Inkubationsversuches grundsätzlich möglich war, wenn die gemessenen optischen Dichten während dieses Zeitraums zwischen $OD = 0,001$ und $OD = 1,200$ (Proben mit Reinkulturen) bzw. $OD = 0,001$ und $OD = 2,500$ (Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat) liegen. Den vorliegenden Untersuchungen zufolge ist auch bei *V. vulnificus* eine derartige Keimzahlabeschätzung innerhalb der ersten 6 Stunden ihres Wachstums möglich.

Messreihen

Wie schon bei Ermittlung der Eichkurven wurden die optischen Dichten auch in diesem Teil der Untersuchung sowohl in Proben mit Reinkulturen als auch in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat bestimmt. Unabhängig von der Probenart (mit Reinkultur/ mit Reinkultur und Muschelhomogenat) lagen alle gemessenen optischen Dichten in den für die Berechenbarkeit geforderten Bereichen ($OD = 0,001 - 1,2000$ bzw. $OD = 0,001 - 2,500$). Damit war die Abschätzung der Keimdichte auf Grundlage der optischen Dichte möglich.

Weiterhin war bei den Messreihen festzustellen, dass die optische Dichte in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat bei gleicher Keimzahl anfangs ähnliche Werte wie bei den Proben mit Reinkulturen annahm, im Laufe der Bebrütung aber deutlich schneller anstieg. Eine Veränderung der Beschaffenheit durch das Muschelhomogenat im Laufe der Bebrütung könnte eine denkbare Ursache sein.

Auch wurden in Proben mit Reinkulturen mit $5,3 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml nach sechs Stunden Bebrütung durchschnittlich höhere Keimdichten als in Medium mit Muschelzusatz festgestellt. Dort lagen nach 6 Stunden $3,4 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml vor. Gleichzeitig zeigten die Keimdichten in Medium mit Muschelzusatz aber auch die geringsten Schwankungen der Mittelwerte.

Ein Zusammenhang zwischen Höhe der anfänglich gemessenen optischen Dichte (2 h-Wert) und den nach 6 Stunden gemessenen Werten konnte nicht festgestellt werden. Die technisch bedingten kleinen Schwankungen in den Keimdichten der Inokula schlugen sich damit nicht in den 6 Stunden-Werten nieder und können als Einflussgröße auf das 6-Stunden-Ergebnis ausgeschlossen werden.

Eine plausible Begründung für die relativ geringeren Keimdichten der *V. parahaemolyticus*-Stämme in Muschelhomogenat dürften Komponenten der humoralen und auch zellulären Immunabwehr der Muschel sein. Wasserlösliche Enzyme, Lektine und antimikrobielle Peptide, aber auch Enzyme der Hämozyten, werden möglicherweise beim Homogenisieren der Tiere freigesetzt und treten in das Nährmedium über, um dort ihre bakterizide bzw. bakteriostatische Wirkung zu entfalten. Eine weitere Erklärung bietet aber auch das eventuelle Vorhandensein *V. parahaemolyticus*-spezifischer Phagen, welche sich bereits von vornherein in den Muscheln befinden. Mit einer Porenweite der Kapsulenfilter von $0,2 \mu\text{m}$ stellt auch die vorgenommene Sterilfiltration des Muschelhomogenats keine Barriere für die genannten

Diskussion

Stoffe dar, da für sie ein Durchtritt ohne weiteres möglich ist.

Verhalten der einzelnen Stämme

Bei Betrachtung der optischen Dichte der einzelnen verwendeten Keime nach 6 Stunden fiel unabhängig von der Probenart (Reinkultur/Reinkultur und Muschelhomogenat) ein regelmäßiges Verhalten auf. So wiesen *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 und *V. parahaemolyticus* CH 1652 bei allen eingesetzten Medien die höchsten Werte auf, während *V. parahaemolyticus* DSM 10027 und *V. parahaemolyticus* CH 1585 stets die niedrigsten Werte erbrachten. So waren die Minimalwerte *V. parahaemolyticus* DSM 10027 oder CH 1585 zuzuordnen, während die Maximalwerte von *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 oder CH 1652 herrührten. Die Spannweite zwischen Minimal- und Maximalwert war in den Medien mit den höchsten Keimdichten für beide Probenarten sehr gering. Damit kann man davon ausgehen, dass es zwischen den einzelnen Stämmen in diesen Substraten keine deutlichen Wachstumsunterschiede gab. Eine Proportionalität zwischen Spannweite und Durchschnittskeimzahl in den einzelnen Medien konnte jedoch nicht festgestellt werden.

5.1.2.1.2 Kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden

Da in den vorangegangenen Untersuchungen bereits festgestellt wurde, dass sich die Keimzahl nach 24 bzw. 48 Stunden nicht mehr über die gemessene optische Dichte abschätzen ließ, wurde zusätzlich die Menge an lebenden Kolonien pro ml kulturell über das Tropfplattenverfahren bestimmt. Nach 48 Stunden konnte davon ausgegangen werden, dass die Keime in die Absterbephase übergetreten waren. Wiesen die Medien in dieser Phase noch relativ hohe Restkeimzahlen auf, ließ dies auf hohe Keimzahlen in der vorausgegangenen Plateauphase des Bakterienwachstums schließen. Bei Proben mit Reinkulturen wurden dabei $\bar{x} = 3,0 \times 10^8 \text{ KbE } V. \text{ parahaemolyticus/ml}$ gefunden, während in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat im Durchschnitt $\bar{x} = 1,5 \times 10^8 \text{ KbE } V. \text{ parahaemolyticus/ml}$ nachgewiesen werden konnten. In Proben mit Reinkulturen war ein durchschnittlicher Rückgang der Keimdichte um fast $3,0 \times 10^8 \text{ KbE/ml}$ im Vergleich zum 6-Stunden-Wert festzustellen. Mit $2,0 \times 10^8 \text{ KbE/ml}$ fiel zwar die Reduktionen der Keimdichte in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat durchschnittlich geringer aus, die Keimabnahme in den verschiedenen Medien unterlag dagegen stärkeren Schwankungen.

Wie schon in den Messreihen beobachtet, wiesen *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 und CH 1652 verglichen mit *V. parahaemolyticus* DSM 10027 oder CH 1585 (unabhängig vom eingesetzten Medium) auch nach 48h die höchsten Keimdichten auf.

Der bei den Messungen für die Eichkurven bereits beobachtete massive Einfluss des Muschelhomogenats auf das Wachstum von *V. vulnificus* (keine lebensfähigen Kolonien nach 24 Stunden) konnte auch in dieser Phase der Untersuchungen durchgängig festgestellt werden. Hier ließen sich nach 48 Stunden durchschnittlich $\bar{x} = 3,5 \times 10^8 \text{ KbE/ml}$ nachweisen, während in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat die Werte durchweg unter der Nachweisgrenze lagen. Es wäre deshalb denkbar, dass sich diese Matrix im Nährmedium generell negativ auf das Wachstum von *Vibrio* spp auswirkt.

Ziel der Untersuchungen war es, den Nachweis von *V. parahaemolyticus* in Miesmuscheln zu optimieren. Deshalb wurde in den folgenden Untersuchungen das Augenmerk auf die Keimdichten dieser Spezies in Versuchsreihen mit Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat gelegt. Die Erhebungen zeigten, dass *V. parahaemolyticus* in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat in T-APW (0,01 M; pH 8,5) nach 48 Stunden durchschnittlich die

Diskussion

höchste Keimzahl aufwies. Gleichzeitig gab es in diesem Medium die geringsten Keimzahlschwankungen zwischen den jeweils untersuchten Stämme sowie die geringste Keimzahldifferenz bezogen auf den 6-Stunden-Wert.

Wachstumsverhalten in aufgesalztem Medium

Sowohl in aufgesalztem Medium mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen allein, als auch in Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen und Muschelhomogenat konnten nach 6 Stunden ca. $3,5 \times 10^8$ KbE/ ml gemessen werden. Nach 48 Stunden lagen die Keimdichten beider Probenarten mit ca. $4,4 \times 10^8$ KbE/ ml noch über dem 6 Stunden-Niveau. *V. vulnificus* erreichte in aufgesalztem Medium deutlich geringere Dichten als in den zuvor getesteten Medien. Nach 48 Stunden in aufgesalztem Medium fiel die Keimdichte unter der Nachweisgrenze.

Insgesamt erwies sich das Aufsalzen des Nährmediums als günstig für das Wachstum von *V. parahaemolyticus*. In den folgenden Untersuchungsabschnitten wurde deshalb T-APW (0,01M; pH 8,5, 5% NaCl) eingesetzt.

Modifikation des Peptongehalts

Durch Anheben des Peptongehalts von 1% auf 3% bzw 5% konnten in Proben mit Reinkulturen nach 6 Stunden bestenfalls $1,9 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml (3% Pepton) ermittelt werden. In Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat lag die Keimdichte zu dieser Zeit bei ca. 3×10^8 KbE *V. parahaemolyticus*/ml. Nach 48 Stunden waren dann bei Proben mit Reinkulturen $\bar{x} = 4,6 \times 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml nachzuweisen. In Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat erreichten die Keimzahlen dagegen maximal $\bar{x} = 4,2 \cdot 10^8$ KbE *V. parahaemolyticus*/ml (5% Pepton). Das Wachstum von *V. vulnificus* war nach dieser Modifikation allgemein deutlich gehemmt.

Weil sich durch die Modifikation des Peptongehalt keine weitere Verbesserung des Wachstums von *V. parahaemolyticus* erzielen ließ, wurde in den folgenden Untersuchungsabschnitten auf die Erhöhung des Peptongehalts verzichtet und weiterhin T-APW (0,01M; pH 8,5, 5% NaCl) eingesetzt.

Prüfung auf Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Um die Ergebnisse der vorgenommenen Untersuchungen statistisch abzusichern, wurden die Untersuchungen für die Medien, in denen das beste Wachstum von *V. parahaemolyticus* beobachtet werden konnte (T-APW 0,01M; pH 8,5 und T-APW 0,01M; pH 8,5, 5% NaCl), wiederholt. Die Untersuchungen für das herkömmliche APW wurden als Referenz ebenfalls parallel durchgeführt. Die Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchungen bestätigten T-APW (0,01M; pH 8,5, 5% NaCl) als günstigstes Medium für das Wachstum von *V. parahaemolyticus*.

Vergleich des Wachstums von *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW und T-APW (0,01M; pH 8,5, 5% NaCl) in Anwesenheit von Begleitflora

Ob der begünstigende Effekt von T-APW (0,01M; pH 8,5, 5% NaCl) auf das Wachstum von *V. parahaemolyticus* auch in Anwesenheit von Begleitflora bestand hat, wurde in einer zusätzlichen Versuchsreihe überprüft. Bei *V. parahaemolyticus* DSM 10027 konnte in den vorherigen Tests meist das schlechteste Wachstum festgestellt werden. Für den in Rede stehenden Untersuchungsabschnitt erschien dieser Stamm als "Indikator" geeignet, da man davon ausgehen konnte, dass Begleitflora gerade für ihn eine Konkurrenz darstellt.

Diskussion

Das Augenmerk lag bei dieser Untersuchung auf der Konkurrenzsituation von *V. parahaemolyticus* zu *V. alginolyticus* (Referenz- und Feldstamm).

Entgegen den Studien an Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat, bei denen *V. parahaemolyticus* DSM 10027 nach 48 Stunden in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) durchschnittlich $\bar{x} = 2,2 \times 10^8$ KbE/ml ($\bar{x} = 7,7 \times 10^7$ KbE/ml in herkömmlichen APW) erreichte, konnte eine signifikante Überlegenheit dieses Mediums nach 24 Stunden und in Gegenwart von Begleitflora nicht mehr bestätigt werden. Zugleich zeigte sich die Entwicklung von Nicht-Vibrio-Begleitflora, die beim Nachweis des Zielkeimes unerwünscht ist, in T-APW signifikant geringer als in herkömmlichem APW.

V. alginolyticus erreichte in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) dagegen signifikant höhere Keimdichten. *V. alginolyticus* 42-149/06 M36/2 (Feldstamm) entwickelte dabei besonders hohe Keimdichten (10^9 KbE/ml) in beiden Flüssignährmedien. Die Konkurrenz dieser Spezies bildete demnach eine mögliche Erklärung für die schlechtere Entwicklung von *V. parahaemolyticus*.

Wachstum von *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl) mit dem Zusatz von Arabinose

Den Erkenntnissen der vorangegangenen Untersuchungen zufolge schien es zweckvoll, das Wachstum des unterlegenen Keimes zu unterstützen, wofür sich die Zugabe von Arabinose zum Flüssignährmedium anbot.

Dieser Untersuchungsschritt ergab, dass ein Supplementieren des Mediums T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) mit Arabinose auch in Anwesenheit von Begleitflora zu signifikant höheren Keimdichten von *V. parahaemolyticus* führt. Deshalb wurde in den anschließenden Untersuchungsabschnitten ausschließlich T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) verwendet (vgl. 5.1.3.6.).

5.1.3 APW-Modifikationen im Einzelnen

5.1.3.1 pH-Wert

Beim Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln spielt der pH-Wert des dafür verwendeten Nährmediums eine bedeutende Rolle. Als marines Bakterium bevorzugt *V. parahaemolyticus* ein pH-Wert-Niveau, wie es im Meer zu finden ist. Dieses Biotop weist in der Regel einen pH-Wert zwischen 7,9 und 8,3 auf (BEARD und Mc GREGOR, 2004; SOMMER, 2006). In der vorliegenden Untersuchung wurde der pH-Wert der APW-Modifikationen auf einen Bereich zwischen 7,5 und 8,8 eingestellt. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen erreichter Keimdicke und pH-Wert konnte dabei nicht erkannt werden. Dieser Befund bestätigt die Beobachtungen von MA-LIN und BEUCHAT (1980), die den Effekt von pH-Werten zwischen 7,0 und 9,0 auf die Entwicklung von ungekühlten und gekühlten *V. parahaemolyticus* in Horie-Arabinose-Ethylviolett-(HAE)-Medium untersuchten. Generell besaß pH-Wert in diesem Bereich keine signifikante Auswirkung auf die Keimdichten von *V. parahaemolyticus*. Lediglich bei kältegestressten *V. parahaemolyticus* ergab sich bei den pH-Werten 9,0 und 7,0 eine signifikant geringere Keimdicke.

Allgemein nimmt der pH-Wert einen maßgeblichen Einfluss auf die Molekülform von Prote-

Diskussion

inen, die Aktivität von Enzymen, die Permeabilität von Zellmembranen sowie direkt auf bakterielle Stoffwechselfvorgänge. Im Normalfall wachsen Bakterien bevorzugt in pH-Wert-neutraler Umgebung (ROLLE und MAYR, 2002). Das pH-Wert-Optimum von *V. parahaemolyticus* hingegen liegt zwischen 7,5 und 8,5 (BAUMGART, 2007). In vorliegender Untersuchung konnte kein genereller Zusammenhang zwischen pH-Wert und Keimdichte festgestellt werden. Bei Proben mit Muschelhomogenat und T-APW (0,01M, pH 8,5) war jedoch die geringste Keimdichtendifferenz (6-Stunden-Wert - 48-Stundenwert) zu verzeichnen. Mit einem pH-Wert von 8,5 liegt die Wasserstoffionenkonzentration des hier zusammengestellten T-APW weiterhin deutlich im alkalischen Bereich und behält damit ihre selektierende Wirkung.

5.1.3.2 Pufferung

Eine tägliche pH-Wert-Messung von gelagertem APW ergab eine Absenkung des pH-Wertes von 8,8 auf 8,3 innerhalb von 5 Tagen nach Herstellung und weiterhin auf 8,1 nach zusätzlichen 11 Tagen Lagerung. Nach diesen Beobachtungen erschien die Pufferung des Mediums sinnvoll.

5.1.3.3 Wahl des Puffers und dessen Konzentration

Unter Puffern versteht man wässrige Lösungen von Substanzen (Substanzgemischen), die in der Lage sind, Hydroxid- bzw. Wasserstoffionen abzufangen oder nachzuliefern, um auf diese Weise den pH-Wert einer Lösung innerhalb gewisser Grenzen konstant zu halten.

Für eine effektive Pufferung in einem pH-Wert-Bereich von 7,2 - 9,0 ist Tris-HCl-Puffer (hier nach Gomori) in der Mikrobiologie gebräuchlich (BAST, 2001). Da dieser Bereich dem pH-Wert des Meeres und auch das pH-Wert-Optimum von *V. parahaemolyticus* repräsentiert, fiel die Wahl des Puffers in der vorliegenden Untersuchung auf dieses System.

Neben der Entscheidung für eine geeignetes Puffersystem kann jedoch auch die Konzentration des Puffers eine bedeutende Rolle spielen. Einerseits lässt sich über die Erhöhung der Menge die Pufferkapazität zusätzlich steigern. Auf der anderen Seite weiß man, dass einige Puffer eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Mikroorganismen oder auf die Aktivität bestimmter Enzyme besitzen. Aufgrund etwaiger toxischer Effekte wird empfohlen, die Konzentration des Puffersystems möglichst niedrig zu halten (BAST, 2001). In vorliegender Untersuchung wurden Pufferkonzentrationen von 0,1 M, 0,05 M und 0,01 M verwendet. Dabei konnte kein deutlicher Zusammenhang zwischen eingesetzter Pufferkonzentration und Keimdichte festgestellt werden. Aufgrund dessen wurde die geringste Pufferkonzentration (0,01M) für die weiteren Untersuchungen gewählt.

5.1.3.4 Wahl des Kochsalzgehaltes

In der Regel liegt der Salzgehalt von Bakterien zwischen 0,5 und 1% der Zelltrockenmasse. Daran orientiert sich auch der Salzgehalt üblicher Nährmedien (ROLLE und MAYR, 2002). Erfahrungsgemäß toleriert *V. parahaemolyticus* Salzgehalte dieser Größenordnung. Als halophiles Bakterium bevorzugt diese Spezies jedoch eine Salzkonzentration von 3%, allerdings werden auch 5% NaCl problemlos toleriert (BAUMGART, 2007). Die Erhöhung des Salzgehaltes in der Rezeptur des herkömmlichen APW auf 5% NaCl (statt 2% NaCl) verfolgte den

Diskussion

Zweck, auftretende Begleitflora zu unterdrücken. Vorliegende Untersuchung zeigt, dass über das Anheben des Salzgehaltes im Medium als Einzelmaßnahme die gewünschte deutliche Unterdrückung unerwünschter Begleitflora prinzipiell erreicht wird. Ein negatives Resultat dieser Aufsalzung bildete indessen die unbeabsichtigte Unterstützung des Wachstums von *V. alginolyticus*. Diese Spezies gehört ebenfalls zu den halophilen *Vibrio* spp. und toleriert ohne weiteres Salzgehalte von 10% und mehr (FARMER et al., 2003; OLIVER und KAPER, 2001; PODA, 1997). Die Keimdichtenentwicklung von *V. parahaemolyticus* schien durch diesen Konkurrenzkeim besonders in aufgesalztem Medium tendenziell gehemmt.

5.1.3.5 Wahl des Peptongehalts

Für ihr Wachstum benötigen Mikroorganismen Peptone. Deshalb vermehren sie sich am besten in Nährmedien, denen diese partiell angedauten Proteine hinzugefügt wurden (GERTEN, 1993). Die dabei verwendete Menge an Peptonen zur Herstellung der Medien für die verschiedenen Bakteriengenera beruhen zumeist auf Empirie (ROLLE und MAYR, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von 3 bzw. 5% Bacto Pepton™ (Becton Dickinson), enzymatisch verdautem, tierischem Protein, untersucht.

Die Befunde in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) mit 3% bzw. 5% Pepton bildeten die einzigen Ausnahmen zu der Tendenz, dass geringere Keimzahlen in Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat auftraten. Nach 6 Stunden waren in Proben mit Reinkulturen mit $1,9 \times 10^8$ KbE/ml bzw. $1,3 \times 10^8$ KbE/ml weniger *V. parahaemolyticus* feststellbar als in Proben mit Muschelhomogenat ($2,9 \times 10^8$ KbE/ml bzw. $3,3 \times 10^8$ KbE/ml) zur gleichen Zeit. Für die relativ geringe Zellvermehrung während der ersten 6 Stunden Bebrütung in Proben mit *V. parahaemolyticus*-Reinkulturen war eine verlängerte lag-Phase verantwortlich (vgl. Abbildung 25). Die Ausdehnung dieser Phase unter dem Einfluss hoher Peptonkonzentrationen beim Wachstum von Angehörigen der γ -Gruppe der Proteobakterien stellten auch VELA und ROSENTHAL (1972) fest. Dieser Effekt verhielt sich konzentrationsabhängig, was auch erklärt, warum das Phänomen hier bei einem Peptongehalt von 3% weniger stark ausgeprägt war als bei einem Peptongehalt von 5%.

Eine absolute Keimdichtenerhöhung aufgrund des Pepton-Zusatzes zum Nährmedium konnte nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten von VELA und ROSENTHAL (1972). Die genannten Autoren fügten dem Nährmedium für *Azotobacter vinelandii*, welches wie *V. parahaemolyticus* zu der γ -Gruppe der Proteobakterien gehört, Peptongehalte von 2 bzw. 5% hinzu und konnten ebenso wenig eine Steigerung des Wachstums dieses Bakterium feststellen.

5.1.3.6 Erweiterung der APW-Zutaten durch Arabinose

In der Literatur wird *V. parahaemolyticus* im Gegensatz zu *V. alginolyticus* überwiegend das Vermögen zugeschrieben, L-Arabinose zu verstoffwechseln (ALCAIDE et al., 1999; ALSINA und BLANCH, 1994; ELLIOT et al., 1995; FARMER et al., 2003; FDA, 2004; PODA, 1997). *V. alginolyticus* ist eine der am häufigsten nachgewiesenen *Vibrio*-Spezies in Fischereiprodukten (BARBIERI et al., 1999; CAVALLO und STABILI, 2002; CHAN et al., 1989; MATTE et al. 1994). LHAFI (2006) stellte bei Erhebungen in den Jahren 2004 bis 2005 einen 51%-igen Anteil von *V. alginolyticus* unter den gefundenen *Vibrio* spp. fest. Demnach

Diskussion

gilt die gleichzeitige Anwesenheit von *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* in einer Seafood-Probe als sehr wahrscheinlich.

Die Annahme, dass es möglich ist, die Entwicklung von *V. parahaemolyticus* über die Zugabe von Arabinose zu unterstützen, ohne dasselbe gleichzeitig für *V. alginolyticus* zu tun, konnte an Hand der vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden.

Ähnliche Ergebnisse verzeichneten auch andere Autoren. MIYAMOTO et al. (1990) verwendeten Arabinose-Gluconat (AG)-Medium (das außerdem Pepton, Hefeextrakt, Polymyxin B-sulfat, Ammoniumsulfat und NaCl enthält) statt des üblichen Trypton-NaCl-Polymyxin-Hexametaphosphatmediums beim indirekten Nachweis von *V. parahaemolyticus*. Sie verwendeten dieses Medium in einem fluorometrischen Verfahren, bei dem die sogenannte Trypsin-like-Aktivität gemessen wird. Im Gegensatz zum Trypton-NaCl-Polymyxin-Hexametaphosphatmedium zeigte bei Verwendung von Arabinose-Gluconat-Medium nur noch *V. parahaemolyticus* eine Trypsin-like-Aktivität, selbst wenn hohe Dosen *V. alginolyticus* hinzugegeben wurden. VENKATESWARAN et al. (1996) wendeten das AG-Medium ebenfalls bei diesem fluorometrischen Verfahren zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* an, konnten aber auch bei anderen Spezies eine Trypsinaktivität feststellen. Diese Autoren verglichen zusätzlich die Leistungsfähigkeit des AG-Mediums im Vergleich zu APW und befanden das AG-Medium besser zur Anreicherung von *V. parahaemolyticus* geeignet.

HORIE et al. (1967, 1978) testeten den Zusatz von Arabinose in Ammonium-Sulfat-Cholat-Medium und stellten ebenfalls eine unterstützende Wirkung dieses Zuckers beim Nachweis von

V. parahaemolyticus fest. ANN und BEUCHAT (1980) stellten bei ihren Untersuchungen zum Nachweis kältegestresster *V. parahaemolyticus* die erzielten Keimdichten des Zielkeimes in Horie-Arabinose-Ethylviolett-(HAE)-Medium denen in Glucose-Salz-Teepol-(GST)-Medium gegenüber. Das HAE-Medium erwies sich auch dort als das effektivere Medium.

MURAKAMI et al. (1975) verwendeten bei der Durchführung des MPN-Verfahrens zum quantitativen Nachweis von *V. parahaemolyticus* Arabinose in Arabinose-Colistin-Peptonwasser und bestätigten ebenfalls deren positive Wirkung.

5.1.4 Wachstum von *V. parahaemolyticus* in Anwesenheit von *V. alginolyticus*

In vorliegender Arbeit wurden beim Medienvergleich auch die erreichten Keimdichten von *V. parahaemolyticus* im Verhältnis zu *V. alginolyticus* verglichen. Hierbei fiel auf, dass die Keimdichten von *V. alginolyticus* in herkömmlichem APW wie auch in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl) deutlich über denen von *V. parahaemolyticus* lagen. In T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) dagegen hatten sich die Keimdichten der beiden Spezies deutlich angenähert. Bei der Kombination von *V. parahaemolyticus* mit *V. alginolyticus* DSM 2171 lag die durchschnittliche Keimdicke von *V. alginolyticus* sogar unter derjenigen von *V. parahaemolyticus*. Ursache dieses Phänomens war möglicherweise die Anwesenheit von Arabinose in diesem Medium.

Beim bakteriellen Abbau von Zuckern entsteht Säure. Das pH-Wert-Optimum für *Vibrio* spp. liegt in der Regel im neutralen (ca. pH-Wert 7,0) bis mäßig alkalischen Bereich (ca. pH-Wert 9,0). Auf saure pH-Werte dagegen reagieren Angehörige dieses Genus sehr empfindlich

Diskussion

(OLIVER und KAPER, 2001; TANTILLO, 2004). *V. parahaemolyticus* toleriert zwar saure pH-Werte bis 4,8 (BAUMGART, 2007), stellt damit aber die Ausnahme unter den sonstigen Spezies dieses Genus dar.

Des Weiteren wären auch antagonistische Effekte zwischen den beiden *Vibrio*-Spezies denkbar. In der einschlägigen Literatur werden antagonistische Wechselbeziehungen von Bakterien in Mischkulturen beschrieben (ROLLE und MAYR, 2002). Hinzu kommt, dass *V. parahaemolyticus* und *V. alginolyticus* eng miteinander verwandt sind (TARR et al., 2007). So könnte *V. parahaemolyticus* möglicherweise vom Abbau oder Abbauprodukten von *V. alginolyticus* profitieren, indem es die dabei entstehenden Stoffe für seinen eigenen Stoffwechsel nutzt. In Anbetracht dessen scheint es wahrscheinlich, dass das Wachstum von *V. alginolyticus* durch die oben erwähnte Ansäuerung des Nährmediums negativ beeinflusst wurde.

5.1.5 Vergleich Oberflächenspatelverfahren und MPN-Technik

In vorliegenden Untersuchungen wurde die Leistungsfähigkeit der MPN-Technik und eines Koloniezählverfahrens als quantitative Nachweismethoden miteinander verglichen. Um das Oberflächenspatelverfahren sensitiver zu gestalten, wurde hier 1 ml (die 10-fache Menge des üblichen Aliquots) der Erstverdünnung auf drei Agarplatten ausgespatelt. Damit wurde die untere Nachweisgrenze dieses Verfahrens um das zehnfache auf 10 KbE/g gesenkt. Die hier vorgestellten Untersuchungen belegen, dass das MPN-Verfahren beim Nachweis von Keimzahlen unter 100 KbE/g dennoch signifikant höhere Ausbeuten erbringt als das Oberflächenspatelverfahren.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ausführungen von HILDEBRANDT und ARNDT (1982) zu diesen beiden Verfahren. Als Begründung sahen die beiden Autoren zum einen die günstigeren Wachstumsbedingungen der Bakterien in flüssigen Nährmedien im Vergleich zu festen Substraten. Zum anderen wird durch den möglichen Einsatz größerer Probenvolumina von 10 ml und mehr eine recht niedrige Nachweisschwelle und damit hohe Empfindlichkeit erreicht. Durch seine Variabilität bezüglich des Verdünnungsfaktors und Wahl der Röhrenchenanzahl kann das MPN-Verfahren schon im Vorfeld an die erwartete Keimdichte angepasst bzw. seine Genauigkeit gesteuert werden.

Die Ergebnisse stimmten daher auch mit dem Nachweis-Protokoll der FDA (2004) überein, welches ebenfalls die MPN-Schätzung zur Quantifizierung von *V. parahaemolyticus* vorsieht.

Die Keimzahlen sind bei pathogenen Mikroorganismen stets im Zusammenhang mit Grenzwerten zu sehen. So haben bisher verschiedene Europäische Institutionen Leitlinien und Empfehlungen zur lebensmittelrechtlichen Bewertung von *V. parahaemolyticus*-Nachweisen in Fischereiprodukten herausgegeben. Beispielsweise schlägt die INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF, 1986) einen Richtwert von 100 KbE/g und einen Warnwert von 1000 KbE/g vor. Die niederländische PRODUKTSCHAP VOOR VIS EN VISPRODUCTEN (1994) unterscheidet bei ihren Empfehlungen nach dem Zeitpunkt der Untersuchung. So macht sie für die Stufe des Imports keine Angaben zu den Anforderungen der Fischereiproduktqualität hinsichtlich *V. parahaemolyticus*, im Augenblick des Verkaufs hingegen verlangt sie Keimzahlen von unter 100 KbE *V. parahaemolyticus*/g.

Diskussion

Die PUBLIC HEALTH LEADERSHIP SOCIETY in Großbritannien schlägt vor, sogenannte Seafood-Produkte als zufriedenstellend zu bewerten, wenn weniger als 20 KbE *V. parahaemolyticus* /g nachgewiesen werden. Als zulässig gelten Produkte, die mehr als 20 KbE/g, aber weniger als 100 KbE/g enthalten. Bei *V. parahaemolyticus*-Nachweisen zwischen 100 KbE/g und 1000 KbE/g gilt die Ware als nicht zufriedenstellend, während Keimzahlen von über 1000 KbE/g als nicht akzeptabel/potentiell gesundheitsgefährdend eingestuft werden (PHLS, 1996).

Lediglich die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA, 1998) sieht erst ab 10.000 KbE *V. parahaemolyticus*/g unabhängig von ihrem Kanagawa-Verhalten einen Handlungsbedarf. Nach Aussagen einer FDA-Risikobewertung (2005) kann aber bereits ab 50 KbE *V. parahaemolyticus*/g eine Erkrankung hervorgerufen werden.

Vor dem Hintergrund dieser recht geringen zulässigen Keimzahlen ist eine besonders sensitive quantitative Nachweismethode erforderlich. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass sich das MPN-Verfahren hierfür besser eignet als das Oberflächenspatelverfahren.

5.1.6 T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Kombination mit CVA

Bei Anwendung von herkömmlichem APW in Kombination mit TCBS-Agar im Zuge des MPN-Verfahrens gab es in der Vergangenheit immer wieder Probleme mit *V. alginolyticus*-Stämmen, die *V. parahaemolyticus* überwachsen können (KOURANY, 1983; MIWA, 2003). Insbesondere auf Festnährmedien mit ausgestrichener Erstverdünnung lag regelmäßig ein derart dichter Rasen von *V. alginolyticus* vor, dass *V. parahaemolyticus*-Kolonien makroskopisch nicht differenzierbar waren. Auch das Austreichen der Erstverdünnung auf je 1 TCBS-Platte pro Röhrchen (statt eine segmentierte TCBS-Platte für alle 3 Röhrchen) brachte hier keine Abhilfe. Auf Festnährmedien mit dem Ausstrich höherer Verdünnungen dagegen konnten Kolonien von *V. parahaemolyticus* in mehreren Segmenten eindeutig ausgemacht werden. In den eigenen Vorversuchen wurde dieses Phänomen ebenfalls festgestellt.

Nach der Verwendung von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) als Flüssignährmedium und CVA als Festnährmedium waren auch in Erstverdünnungen mit hohem *V. alginolyticus*-Anteil die *V. parahaemolyticus*-Kolonien deutlich zu erkennen.

5.1.7 Nachweis von *V. parahaemolyticus* in kontaminierten Miesmuscheln

Bei der Untersuchung der kontaminierten Muscheln unter Anwendung von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) wurden mit dem MPN-Verfahren bezogen auf alle Proben im Median um 0,48 log geringere Keimdichten nachgewiesen, als erwartet. Nicht selten wurden andererseits auch *V. parahaemolyticus*-Keimzahlen ermittelt, die über den erwarteten Keimdichten lagen. Diese vergleichsweise breite Streuung an nachgewiesenen Keimdichten in den Muscheln eines jeden Kontaminationsversuchs liegt möglicherweise in den individuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Tieren begründet. So wurde beispielsweise vielfach beobachtet, dass ein Muschelindividuum überhaupt nicht filtrierte (also keine Nahrung aufnimmt), während ein anderes aber in unmittelbarer Nachbarschaft stark filtrierte (PUND,

Diskussion

2008). Andere Autoren bestätigten derartige Unterschiede (KAUFMAN et al., 2003; LART und HUDSON, 1993; YOUNGER et al., 2005).

Durch Filtrieraktivität kommt es zusätzlich auch zur Anreicherung der absorbierten Partikel im Muschelgewebe. Diese Aufkonzentration kann dazu führen, dass die Bakterienzahl innerhalb des Tieres um bis zu zwei Zehnerpotenzen höher liegt als im umgebenden Wasser (CROCI et al., 2001; PRESEPI et al., 1997; RICHARDS, 1998).

Einige der Muschelchargen wurden bei diesen Untersuchungen nicht nur mit *V. parahaemolyticus* sondern gleichzeitig mit *V. alginolyticus* kontaminiert. Bei der Untersuchung dieser doppelt belasteten Tiere wurde festgestellt, dass die detektierte *V. parahaemolyticus*-Keimdichte signifikant näher an die theoretischen Keimzahlen heranreichte. Diese Beobachtung lässt wiederum an antagonistische Vorgänge zwischen den beiden Spezies in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) als mögliche Erklärung denken.

5.1.8 Auftretende natürliche Begleitflora in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose)

Nicht nur *V. parahaemolyticus* ist in der Lage Arabinose zu verstoffwechseln, *V. fluvialis*, *V. harveyi* sowie *V. anguillarum* wird dieses Vermögen ebenfalls zugeschrieben (BAUMANN et al., 1984; OKA und TAKASAKA, 1976; SHIMIZU, 1976). Auch einige Spezies der Genera *Pseudomonas* und *Aeromonas* können diesen Zucker verwerten. Derartige Keime haben insofern Bedeutung, als sie in mariner Mikroflora vorherrschen und das Wachstum gram-negativer Bakterien behindern können (BAUMANN et al., 1984; PALLE-RONI, 1984; POPOFF, 1984; SHIMIZU, 1976). Den Nährmedien zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* werden daher oft Polymyxin B, Colistin oder auch Cholate (vgl. Arabinose-Colistin-Peptonwasser, AG-Medium, Arabinose-Ammonium-Sulfat-Cholat-Medium) zur Unterdrückung des Wachstums gram-negativer Bakterien wie *Pseudomonas* oder *Aeromonas* hinzugefügt (DONOVAN und VAN NETTEN, 1995; GOATCHER und WESTHOFF, 1975; HOLT und KRIEG, 1994; MONSUR, 1963; SIFIN, 2006; SUMIKI, 1961). Die Fähigkeit von *V. fluvialis* und auch *Aeromonas hydrophila*, in Anwesenheit von Arabinose zu wachsen, konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. *V. fluvialis* ließ sich jedoch aufgrund seiner Koloniemorphologie auf CVA zum einen bereits deutlich von *V. parahaemolyticus* abgrenzen, zum anderen beeinträchtigte dessen Keimdichte den Nachweis von *V. parahaemolyticus* nicht. Die in den Untersuchungen eingesetzten Referenzstämme *Aeromonas hydrophila* DSM 30187 sowie *V. anguillarum* ATCC 19264 waren nicht in der Lage, auf CVA zu wachsen und stellten somit auch kein Problem bei der Untersuchung der Proben auf *V. parahaemolyticus* dar.

5.1.9 Biochemische Identifikation von *Vibrio* spp.

Die biochemische Identifikation von *Vibrio* spp. gestaltet sich arbeitsintensiv.

Mit dem Ziel, den Nachweis zu rationalisieren, wird im Nationalen Referenzlabor für bakterielle Muschelkontaminanten (NRL) statt der Gramfärbung der weitaus schnellere und weniger materialaufwändige Stringtest mit gutem Erfolg verwendet. ARTHI et al. (2003) bestätigten die Zuverlässigkeit dieser Methode.

Diskussion

Bezüglich der biochemischen Identifizierung gibt es immer wieder Berichte über Fehlidentifikationen von *Vibrio* spp. bei der Benutzung von kommerzieller Testkits. Am häufigsten ist hierbei eine Verwechslung von *Vibrio* spp. mit *Aeromonas* (ABBOTT, 1998; PARK, 2003). In vorliegender Studie wurden derartige Fehler ebenfalls beobachtet. So wurde *V. parahaemolyticus* DSM 10027 über das API 20E-System mehrfach mit hoher Wahrscheinlichkeit (97%) als *Aeromonas salmonicida* bestimmt. Das API 20E-System wurde eigentlich für die Identifizierung von *Enterobacteriaceae* und anderen anspruchsvollen gram-negativen Bakterien entwickelt und ist insofern für die Identifikation von marinen Bakterien wie *Vibrio* spp. nicht uneingeschränkt zu empfehlen. Dieses Testkit gilt unter den anderen gängigen kommerziellen Identifikationssystemen dennoch als Produkt der Wahl zum Nachweis von *V. parahaemolyticus* (CROCI et al., 2006; O'HARA et al., 2003). Zur Verbesserung der Identifikation von *V. parahaemolyticus* mit kommerziellen Kits wurde eine Erhöhung der Salzkonzentration der Bakteriensuspension zur Beschickung der Reaktionskammern auf 2% NaCl, statt 0,85% NaCl (Herstellerangaben) vorgeschlagen (CROCI, 2006; MAC DONELL, 1982). Im Rahmen der Routinearbeit des NRL wurden diese beiden Salzkonzentrationen parallel verwendet. Ein Unterschied in den Identifikationsergebnissen konnte aber nicht festgestellt werden.

Abgesehen von den oben angeführten Schwierigkeiten bei der Identifikation, berichten GOPAL et al. (2005) auch von untypischen biochemischen Reaktionen bei *V. parahaemolyticus*. Sie stellten bei 17 isolierten *V. parahaemolyticus* für je vier Stämme die Fähigkeit zum Saccharose- bzw. Cellobioseabbau fest. Ein weiteres Isolat konnte Maltose nicht verstoffwechseln. In zwei Fällen reagierte *V. parahaemolyticus* positiv bei Arginindihydrolase und in drei Fällen negativ für Lysindecaboxylase. Bei diesen Untersuchungen kamen keine kommerziellen Identifikationskits zum Einsatz.

5.1.10 Identifikation von *V. parahaemolyticus* mittels molekularbiologischer Methoden

Nach BAUMGART et al. (2007) wird in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der Europäischen Kommission (2001) und nach dem Beschluss der 51. Arbeitstagung des Arbeitskreises der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen Sachverständigen (1998) bis zur Festlegung verbindlicher Standards gefordert, in Lebensmitteln nachgewiesene *V. parahaemolyticus*-Stämme auf die Hämolytine TDH und TRH zu untersuchen und die Ware im positiven Falle als nicht verkehrsfähig zu beurteilen. Da neueren Veröffentlichungen zufolge außer TDH und TRH auch Typ III Sekretions-Systeme (TTSS) im Verdacht stehen, Pathogenitätsfaktoren von *V. parahaemolyticus* zu sein, reicht die alleinige Überprüfung auf *tdh* bzw. *trh* zur Abklärung der Pathogenität möglicherweise nicht aus (MAKINO et al., 2003). Aufgrund der nicht immer zuverlässigen Ergebnisse der biochemischen Identifikation von *V. parahaemolyticus* schlagen CROCI et al. (2006) generell eine Überprüfung mittels molekularer Methoden vor.

In vorliegender Untersuchung wurde dieser Empfehlung gefolgt. Die biochemischen Identität der verschiedenen eingesetzten und später isolierten *V. parahaemolyticus*-Stämme wurde über eine Multiplex-PCR eindeutig bestätigt. Bei einigen unklaren biochemischen Befunden (Fehlidentifizierung von *V. parahaemolyticus* DSM 10027 als *Aeromonas* spp. mit dem API 20E) ließ sich die Verdachtsdiagnose (u.a. Koloniefarbe auf CVA) über die Multiplex-PCR absichern.

5.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass durch die Modifikation des herkömmlichen alkalischen Peptonwassers in Form von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) die Selektivität dieses Mediums bezüglich *V. parahaemolyticus* gesteigert werden kann. Selbst in Anwesenheit von *V. alginolyticus*, welcher *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW regelmäßig überwuchert, gelang der Nachweis des Zielbakteriums zuverlässig. Gleichzeitig wurde die sonstige typische marine Begleitflora in diesem Medium wie gewünscht unterdrückt.

Zum Nachweis geringer Mengen von *V. parahaemolyticus* in Miesmuscheln erwies sich das MPN-Verfahren als vorteilhaft. Die Kombination von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) und CVA war dabei günstig. Da sich *V. parahaemolyticus* auf diesem Festnährmedium im Gegensatz zum TCBS-Agar recht zuverlässig differenzieren lässt, konnte schon vor der biochemischen Identifikation eine recht verlässliche Verdachtsdiagnose gestellt werden.

Ebenso wurde durch die deutlich geringere Verwechslungsgefahr mit anderen *Vibrio* spp. der Umfang der zeit- und materialaufwändigen biochemischen Analyse erheblich reduziert. Möglicherweise ist die Zusammensetzung von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) noch weiter zu verbessern, so könnte der Zusatz eines Farbindikators in der Anreicherungsphase des MPN-Verfahrens zur Anzeige einer Ansäuerung es möglich machen eine Verdachtsdiagnose schneller zu erstellen.

Eventuell läßt sich auch der relativ teure Arabinoseanteil, der in der derzeitigen Rezeptur absichtlich im Übermaß zugesetzt wurde, zukünftig reduzieren.

Auch im Zeitalter molekularbiologischer Techniken bleibt der zuverlässige kulturelle Nachweis von *V. parahaemolyticus* unabdingbar. Zum einen ist diese Art der Detektion nach wie vor rechtlich vorgeschrieben und zum anderen entspricht sie den Möglichkeiten der meisten Laboratorien, die außerhalb der Forschung mit dem Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln beschäftigt sind.

Die hier vorgestellte Nachweismethode kann ohne großen zusätzlichen Aufwand in die Routinearbeit eines mikrobiologischen Labors integriert werden. Durch die Anwendung bekannter Methoden ist auch ein Umsetzen der Methodik durch das Laborpersonal problemlos möglich.

6 Zusammenfassung

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus* in Miesmuscheln (*Mytilus edulis*)

Ziel der vorliegenden Arbeit bildete die Optimierung der derzeit gebräuchlichen Methodik des qualitativen als auch quantitativen Nachweises von *V. parahaemolyticus* in zweischaligen Weichtieren.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Leistungsfähigkeit des in Deutschland noch wenig gebräuchlichen selektiven Festnährmediums CHROMagar™Vibrio beim Nachweis des Zielbakteriums überprüft. Weiterhin wurde das zur Anreicherung von *Vibrio* spp. übliche alkalische Peptonwasser (APW) modifiziert und damit speziell an die Anzucht von *V. parahaemolyticus* angepasst. Daneben wurden zwei quantitative Nachweisverfahren von Bakterien verglichen. Die erarbeitete APW-Modifikation und die sensiblere Quantifizierungsmethode wurden dann bei der Untersuchung kontaminierter Miesmuscheln angewendet.

Im Ergebnis konnte festgestellt werden, dass CHROMagar™Vibrio als selektives Festnährmedium dem herkömmlichen TCBS-Agar beim Nachweis von *V. parahaemolyticus* überlegen war. Mit ihrer charakteristischen lila Farbe und irisierenden Rändern liessen sich *V. parahaemolyticus*-Kolonien auf CHROMagar™Vibrio von anderen relevanten Bakterien deutlich besser abgrenzen, was die Verwechslungsgefahr erheblich reduzierte. Die Sensitivität verbessert sich deutlich, wenn der irisierende Rand als weiteres charakteristisches Merkmal herangezogen wird.

Bezüglich der verschiedenen Modifikationen des alkalischen Peptonwassers können die Ergebnisse folgendermaßen zusammengefasst werden:

1. Die Konzentration des zugesetzten Tris-Puffers (0,1; 0,05 und 0,01M) nahm keinen Einfluss auf das Keimwachstum.
2. Ein Zusammenhang zwischen Keimdichte und pH-Wert (pH 8,5; 8,0 und 7,5) bestand nicht.
3. In T-APW (0,01M; pH 8,5) mit einem Kochsalzgehalt von 5% waren signifikant höhere Keimdichten nachzuweisen als in herkömmlichem APW bzw. T-APW (0,01M; pH 8,5). Zudem wurde das Wachstum der Nicht-Vibrio-Begleitflora in diesem Medium deutlich gehemmt.
4. Eine Anhebung des Peptongehalts des Anreicherungsmediums führte zu keiner Steigerung der *V. parahaemolyticus*-Wachstumsrate in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5%).
5. Von allen Variationen überzeugte T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) als Anreicherungsmedium am meisten. Die Überlegenheit des derart modifizierten alkalischen Peptonwasser zeigte sich insbesondere bei gleichzeitiger Anwesenheit von *V. alginolyticus*, einem der Hauptkonkurrenten des Zielbakteriums. Während dieser *V. parahaemolyticus* in herkömmlichem APW regelmäßig überwucherte, gelang der Nachweis des Zielkeimes in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) deutlich zuverlässiger. Gleichzeitig wurde mit diesem Medium die sonstige typische, aber hier unerwünschte marine Begleitflora stark verdrängt.

Zusammenfassung

Zur Quantifizierung geringer Mengen von *V. parahaemolyticus* in Miesmuscheln erwies sich das MPN-Verfahren als vorteilhaft. Dabei bot sich eine Kombination von T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) und CHROMagar™Vibrio an. Weil *V. parahaemolyticus* auf diesem Festnährmedium im Gegensatz zum TCBS-Agar recht zuverlässig differenzierbar ist, konnte schon vor der biochemischen Identifikation eine Verdachtsdiagnose gestellt werden. Ebenso wurde durch die deutlich geringere Verwechslungsgefahr mit anderen *Vibrio* spp. der Umfang der zeit- und materialaufwändigen biochemischen Analyse erheblich reduziert.

Mit dieser optimierten Methode zum quantitativen und qualitativen Nachweis von *V. parahaemolyticus* in zweischaligen Weichtieren sollen die vorgestellten Untersuchungen einen Beitrag zur Lebensmittelsicherheit leisten.

7 Summary

About the qualitative and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in blue mussels (*Mytilus edulis*)

The work at hand intended to improve the present conventional methods of the qualitative and quantitative detection of *V. parahaemolyticus* in bivalve molluscs.

For these purposes the efficiency of the selective solid medium CHROMagar™Vibrio for the detection of the target bacterium was tested, which has rarely been used in Germany so far. Furthermore the broth generally used for the enrichment of *Vibrio* spp. was modified in several ways in order to adapt it selectively for the accumulation of *V. parahaemolyticus*. In addition, two enumeration procedures for bacteria were compared. The product of the APW-modification and the more sensitive enumeration method was applied to the examination of contaminated mussels.

As a result it could be observed that CHROMagar™Vibrio outclasses TCBS-agar as a selective solid medium detecting *V. parahaemolyticus*. With their characteristic violet colour and iridescent edges colonies of *V. parahaemolyticus* on CHROMagar™Vibrio were much easier distinguishable from other relevant bacteria and therefore reduced the likelihood of confusion. If the iridescent edge is also consulted as a further characteristic criterion the sensitivity is improved considerably.

As far as the different modifications of the alkaline peptonewater are concerned the results can be summarised as follows:

1. The concentration of the Tris-buffer which was added (0,1; 0,05 and 0,01) had no influence on the bacteria count.
2. A correlation between germ-number and pH-value (pH 8,5; 8,0 und 7,5) could not be detected.
3. Compared to the common APW as well as T-APW (0,01M; pH 8,5) significant higher germ-number could be observed in T-APW (0,01M; pH 8,5) with a NaCl-concentration of 5%. Furthermore the growth of accompanying bacterial flora was significantly inhibited.
4. Raising the peptone-concentration of the enrichment-broth however did not improve the bacterial count of *V. parahaemolyticus* in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl). Finally T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) produced the best results.
5. Out of those variations T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) was the most satisfying one. The superiority of APW modified that way became particularly apparent when *V. alginolyticus*, the most important competitor of the target bacterium, was also present. Whereas *V. alginolyticus* tended to overgrow *V. parahaemolyticus* in conventional APW the detection of the target bacterium in T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) was much more consistent. At the same time the accompanying bacterial flora was reliably suppressed at the same time.

To quantify small amounts of *V. parahaemolyticus* in mussels the MPN-procedure proved to be advantageous. When performing this enumeration method the combination of T-APW (0,01M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) and CHROMagar™Vibrio was favorable. Since

Summary

V. parahaemolyticus could be differentiated rather reliably, a tentative diagnosis could be given before the biochemical identification procedure. Due to the reduced likelihood of confusion the extent of the time- and material-consuming biochemical analysis was also minimized considerably.

By producing this optimized method for the qualitative and quantitative detection of *V. parahaemolyticus* in bivalve molluscs the work at hand shall make a contribution to food safety.

8 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, S.; SELI, L.S.; CATINO, M.jr.; HARTLEY, M.A. und JANDA, J.M. (1998)
Misidentification of unusual *Aeromonas* species as members of the genus *Vibrio*: a continuing problem
J. Clin. Microbiol. 36, 1103-1104
- AGASAN, A. (2002)
Vibrio parahaemolyticus, Shellfish - USA (New York)
Alert. 22. August 2002, ProMED
<http://www.promedmail.org>
- AISO, K. und FUJIWARA, K. (1968)
Feeding tests of the pathogenic halophilic bacteria
Ann. Res. Inst. Food Microbiol. Chiba Univ. 15, 34-38
- ALCAIDE, E.; AMARO, C.; TODOLI, R. und OLTRA, R. (1999)
Isolation and characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *Aphanius iberus*
Dis. Aquat. Org. 35, 77-80
- ALDEBARAN (1997)
Bild: Filtrierleistungsvermögen von Miesmuscheln
Aldebaran, Marine Research and Broadcast, Hamburg
<http://www.aldebaran.org/html/impressum.html>
- ALSINA, M. und BLANCH, A.R. (1994)
A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species
J. Appl. Bacteriol. 76, 79-85
- ANDERSEN, P.H. (2006)
Infections with seawater bacteria
EPI-NEWS 26-32, 1
http://www.ssi.dk/graphics/en/news/epinews/2006/PDF/2006-26_32-final-www_2.pdf
- ANDREWS, L.S.; JAHNCKE, M. und MILLIKARJUNAN, K. (2003)
Low-dose gamma irradiation to reduce pathogenic vibrios in live oysters (*Crassostrea virginica*)
J. Aquat. Food Prod. Tech 12, 71-82
- ANGULO, F. und EVANS, M. (1999)
Vibrio parahaemolyticus epidemiological data
Persönliche Mitteilung im Rahmen der FDA Risikobewertung für *V. parahaemolyticus* in rohen Austern (2005)
- ANN MA-LIN, C.F. und BEUCHAT, L.R. (1980)
Recovery of chill-stressed *Vibrio parahaemolyticus* from oysters with enrichment broths supplemented with magnesium and iron salts
Appl. Environment. Microbiology 39, 179-185

Literaturverzeichnis

ANONYM (1997) a

Schleswig-Holstein: Landesverordnung über die Qualität von Fisch- und Muschelgewässern (Fisch- und Muschelgewässerverordnung – FMGVO) vom 4. Juli 1997
GVOBl. S-H 1997, 361

ANONYM (1997) b

Mecklenburg-Vorpommern: Verordnung über die Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer (Muschelgewässerverordnung - MuGVO) vom 23. Oktober 1997
GVOBl. M-V 1997, 680

ANONYM (1996)

Resultados de las principales identificaciones bacterianas declaradas al sistema de información microbiológica en las semana 52 que terminó el 28 diciembre de 1996
Bol. Epidemiol. Semanal 4, 401

ANONYM (1998)

Resultados de las principales identificaciones bacterianas declaradas al sistema de información microbiológica en las semana 52 que terminó el 2 de enero de 1999
Bol. Epidemiol. Semanal 6, 306

ANONYM (1999)

Vibrio parahaemolyticus, Japan, 1996-1998
WER 43, 361-363

ANONYM (2004) a

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung vom zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs
Amtsblatt der Europäischen Union, L139 (Berichtigung vom 25.6.2004 Abl.226;
Berichtigung vom 4.8.2007 Abl. 204, 26)

ANONYM (2004)b

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs
Amtsblatt der Europäischen Union, L 139,55-205 (Berichtigung vom 25.6.2004 Abl.226, 22;
Berichtigung vom 4.8.2007 Abl. 204, 2)

ANONYM (2004) c

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene
Amtsblatt der Europäischen Union L 139/1

ANONYM (2005) a

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel
Amtsblatt der Europäischen Union, L338, 1-26

ANONYM (2005) b

Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen
In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFBG) vom 1. September 2005, § 64, 06.00-18

Literaturverzeichnis

ANONYM (2006)

Richtlinie 2006/113/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 12. Dezember 2006 über die Qualitätsanforderungen an Muschelgewässer
Amtsblatt der Europäischen Union, L 376, 14-20

ANONYM (2007) a

Verordnung über Qualitätsanforderungen an Fischgewässer und Muschelgewässern vom 15. Mai 2007 Nds GVBl. Nr. 14/2007 S.189; ber. Nds GVBl Nr. 26/2007, 434

ANONYM (2007) b

Verordnung zur Durchführung von Vorschriften des gemeinschaftlichen Lebensmittelhygienerechts vom 8. August 2007, Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007, Teil I Nr.39, ausgegeben am 14. August 2007

ANONYM (2007) c

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Überwachung und der Einhaltung von Hygienevorschriften und zum Verfahren zur Prüfung von Leitlinien für eine gute Verfahrenspraxis (AVV LmH) vom 12. September 2007, Bundesanzeiger, Jahrgang 59, Nummer 180a, ausgegeben am 25.09.2007

ARBEIT, R.D. (1995)

Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms
In: MURRAY, P.R., BARON; E. J., PFALLER, M.A. und TENOVER, F.C. (Hersg.): Manual of clinical microbiology
American Society for Microbiology, Washington, D. C., 190-208

ARTHI, K., APPALARAJU, B. und PARVATHI, S. (2003)

Vancomycin sensitivity and KOH stringtest as an alternative to gram staining of bacteria
J. Med. Microbiol. 21, 121-123

ATLAS, R.M. (1997)

Bacterial diversity
In: FISHBACK, J.E. (Hrsg.): Principles of microbiology (2. Aufl.)
Wm C. Brown Publishers, Boston, Massachusetts, USA, Chapter 17, 980 ff

AUSTIN, B.; GARGES, S.L.; CONRAD, B., HARDING E.E.; COLWELL, R.R.; SIMIDU, U. und TAGA, N. (1979)

Comparative study of the aerobic, heterotrophic bacterial flora of Chesapeake Bay and Tokyo Bay
Appl. Environ. Microbiol. 37, 704-714

AYPA, S.M. (1990)

Musselculture
In: Selected papers on mollusc culture
FAO Corporate Document Repository
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab737e/ab737e00.HTM>

Literaturverzeichnis

- AYRES, P.A. und BARROW, G.I. (1978)
The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in British coastal waters: report of a collaborative study 1975-1976
J. Hyg. (Cambridge) 80, 281-229
- BAFFONE, W.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; PIERFELICI, L. und DONELLI, G. (2005)
"In vivo" studies on the pathophysiological mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* TDH⁺ - induced secretion
Microbial Pathogenesis 38, 133-137
- BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.; FALZANO, L. und DONELLI, G. (2003)
Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp.
Int. J. Food Microbiol. 89, 31-39
- BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; PIANETTI, A.; CAMPANA, R. und BRUSCOLINI, R. (2001)
Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water
Food Microbiol. 18, 479-488
- BAIRD-PARKER, A.C. und DAVENPORT, E. (1965)
The effect of recovery medium on isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after storage of frozen dried cells
J. Appl. Bacteriol. 28, 390-402
- BARBIERI, E.; FALZANO, L.; FIORENTINI, C.; PIANETTI, A.; BAFFONE, W.; FABBRI, A.; MATARRESE, P.; CASIERE, A.; KATOULI, M.; KÜHN, I.; MÖLLBY, R.; BRUSCOLINI, F. und DONELLI, G. (1999)
Occurrence, diversity, and pathogenicity of halophilic *Vibrio* spp. and non-O1 *Vibrio cholerae* from estuarine waters along the Italian Adriatic coast
Appl. Environ. Microbiol. 65, 2748-2753
- BARER, M.R.; GRIBBON, L.T.; HARWOOD, C.R. und NWOGUH, C.E. (1993)
The viable but non-culturable hypothesis and medical microbiology
Rev. Med. Microbiol. 4, 183-191
- BARKER, N.H. und BROWN, M.R.W. (1994)
Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of the bacterial pathogens in the environment
Microbiology 140, 1253-1259
- BARKER, W.H. jr (1974)
Vibrio parahaemolyticus outbreaks in the United States
Lancet I, 551-554
- BAROSS, J. und LISTON, J. (1968)
Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from the Northwest Pacific
Nature 217, 1263-1264

Literaturverzeichnis

- BAROSS, J.A.; LISTON, J. und MORITA, R.Y. (1978)
Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages and other *Vibrio* bacteriophages in marine samples
Environ. Microbiol. 36, 492-499
- BARTELT, E. (2008)
Statuserhebung zur bakteriellen und viralen Belastung der Muschelerzeugungsgebiete. Vortrag anlässlich des Expertengesprächs des Nationalen Referenzlabors für virale und bakterielle Kontaminanten in zweischaligen Weichtieren vom 10.01.2008 am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin
- BARTLETT, D.H. (2006)
Extremophilic Vibrionaceae
In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 11, 156-171
- BAST, E. (2001)
Puffer
In: BAST, E (Hrsg.): Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken (2.Aufl.)
Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin, Deutschland, 74-78
- BAUER, A.; OSTENSVIK, O.; FLORVAG, M.; ORMEN, O. und RORVIK, L.M. (2006)
Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian blue mussels (*Mytilus edulis*)
Appl. Environ. Microbiol. 72, 3058-3061
- BAUMANN, P. und BAUMANN, L. (1977)
Biology of the marine enterobacteria *Benecka* and *Photobacterium*
Ann. Rev. Micro. 31, 39-61
- BAUMANN, P., FURNISS, A.L. und LEE, J.V. (1984)
Genus I. *Vibrio Pacini* 1853, 411^{AL}
In: KRIEG, N.R. und HOLT, J.G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology
Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, Bd. 1, 518-538
- BAUMGART, J., BOCKEMÜHL, J. und LEHMACHER, A. (2006)
Bestimmung der Keimzahl
In: BAUMGART, J. (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln
33. Ergänzung (Juli 2006), Behr Verlag, Hamburg, II 5. 11, 1-41
- BAUMGART, J., BOCKEMÜHL, J. und LEHMACHER, A. (2007)
Nachweis von pathogenen und toxinogenen Mikroorganismen
In: BAUMGART, J. (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln
33. Ergänzung, Behr Verlag, Hamburg, III 3.1.6., 35-44
- BAYNE, B.L. (1976)
The biology of mussel larvae
In: BAYNE, B.L. (Hrsg.): Marine mussels. their ecology and physiology
Cambridge University Press, Cambridge, 81-120

Literaturverzeichnis

- BEAN, N.H. und GRIFFIN, P.M. (1990)
Foodborne disease outbreaks in the United States 1973-1987: pathogens, vehicles, trends
J. Food Prot. 53, 804-817
- BEARD, T.W. und Mc GREGOR, D. (2004)
Storage and care of live lobsters
CEFAS, Laboratory leaflet 66, 26 ff
<http://www.cefes.co.uk/publications/lableaflets/lableaflet66rev.pdf>
- BEJ, A.K.; PATTERSON, D.P.; BRASHER, C.W.; VICKERY, M.C.; JONES, D.D. und KAYSNER, C.A. (1999)
Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiple PCR amplification of *tlh*, *tdh*, and *trh*
J. Microbiol. Methods 36, 215-225
- BENINGER, P.G.; LYNN, J.W.; DIETZ, T.H. und SILVERMAN, H. (1997)
Mucociliary transport in living tissue. The two-layer model confirmed in the mussel *Mytilus edulis* L.
Biol. Bull. 193, 4-7
- BEUCHAT, L.R. und WORTHINGTON, R.E. (1976)
Relationships between heat resistance and phospholipid fatty acid composition of *Vibrio parahaemolyticus*
Appl. and Environmental Microbiol. 31, 389-394
- BISGAARD, M. und DRISTENSEN, K.K. (1975)
Isolation, characterization and public health aspects for *Vibrio cholerae* NAG isolated from a Danish duck farm
Avian Pathol. 4, 271-276
- BLACKSTONE, G.M.; NORDSTROM, J.L.; VICKERY, M.C.; BOWEN, M.D.; MEYER, R.F. und DE PAOLA, A. (2003)
Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichments by real time PCR
J. Microbiol. Methods 53, 149-155
- BOCKEMÜHL, J. (1992)
Vibrionaceae
In: BURKHARDT, F. (Hrsg): Mikrobiologische Diagnostik
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 102-108
- BOGOSIAN, G.; MORRIS, P.J.L. und O'NEILL, J.P. (1998)
A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1736-1742
- BOGOSIAN, G.; SAMMONS, L.E.; MORRIS, P.J.L.; O'NEILL, J.P.; HEITKAMP, M.A. und WEBER, D.B. (1996)
Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W 3110 in soil and water
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4114-4120

Literaturverzeichnis

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LEBENSMITTEL UND
LANDWIRTSCHAFT (2007)

Ergebnisse und Auswertung der Viehbestandserhebung vom 3. Mai 2007

Vorausschätzung der Rinder- und Schweineproduktion für 2007/08

http://www.bmelv.de/nn_750578/DE/04-

Landwirtschaft/Agrarmaerkte/TierischeErzeugnisse/ErgebnisseAuswertungViehbestandserhebung

BUSCHBAUM, C. und NEHLS, G.

Effekte der Miesmuschel- und Garnelenfischerei.

In: LOZÁN, J., E. RACHOR, K. REISE, J. SÜNDERMANN und WESTERNHAGEN, H. v.

(Hrsg.):

Warnsignale aus Nord- & Wattenmeer. Wissenschaftliche Auswertungen

Hamburg, 250-255

<http://bioconsult-sh.de/pdf/warnsignale.pdf>

CALIK, H.; MORRISSEY, M.T.; RENO, P.W. und AN, H. (2002)

Effect of high-pressure processing on *Vibrio parahaemolyticus* strains in pure culture and Pacific oysters

J. Food Sci. 67, 1506-1510

CANESI, L.; BETTI, M.; CIACCI, C.; LORUSSO, L.C.; GALLO, G. und PRUZZO, C. (2005)

Interactions between mytilus haemocytes and different strains of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1: role of kinase-mediated signalling

Cell Microbiol. 7, 667-674

CANESI, L.; GAVIOLI, M.; PRUZZO, C. und GALLO, G. (2002)

Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves

Microsc. Res. Tech. 57, 469-476

CAVALLO, R.A. und STABILI, L. (2002)

Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea)

Water Res. 36, 3719-3726

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (1999)

Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus*-infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound- Connetcticut, New Jersey and New York, 1997

Morb. Mortal. Wkly. Rep. (MMWR) 48, 457-462

CDC (2005)

Vibrio illnesses after hurricane Katrina - Multiple States, August-September 2005

Morb. Mortal. Wkly. Rep. (MMWR) 54, 928-931

CDC (2006)

Vibrio parahaemolyticus infections associated with consumption of raw shellfish-three states, 2006

Morb. Mortal. Wkly. Rep. (MMWR) 55, 854-856

Literaturverzeichnis

- CDC (2009)
Cholera and other *Vibrio* illness surveillance system
http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera_vibrio_surveillance.htm
- CENTRE FOR ENVIRONMENT FISHERIES & AQUACULTURE SCIENCE (CEFAS) (2006)
Report on pilot *Vibrio parahaemolyticus* ring trial 2006 (RT14)
Annex B
CEFAS Weymouth Laboratory, Weymouth, Dorset, UK
www.nrlcefafas.org
- CHAN, K.Y.; WOO, M.L.; LAM, L.Y. und FRENCH, G.L. (1989)
Vibrio parahaemolyticus and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong
J. Appl. Bacteriol. 66, 57-64
- CHANG, C.M.; CHIANG, M.L. und CHOU, C.C. (2004)
Response of heat-shocked *Vibrio parahaemolyticus* to subsequent physical and chemical stresses
J. Food Prot. 67, 2183-2188
- CHATTERJEE, B.D.; DE, P.K. und SEN, T. (1977)
Sucrose teepol tellurite agar: A new selective indicator medium for isolation of *Vibrio* species
J. Infect. Dis. 135, 654-658
- CHOWDHURRY, N.R.; STINE, O.C.; MORRIS, J.G. und NAIR, G.B. (2004)
Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing
J. Clin. Microbiol. 42, 1280-1282
- CHUN, D.; CHUNG, J.K. und SEOL, S.Y. (1974)
Enrichment of *Vibrio parahaemolyticus* in a simple medium
Appl. Microbiol. 27, 1124-1126
- CIMOLAI, N. und TROMBLEY, C. (1997)
Verification of a PCR-based typing method for *Acinetobacter baumannii* in a pseudo-outbreak investigation
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 28, 61-64
- CLAUS, H.; CUNY, C.; PASEMANN, B. und WITTE, W. (1996)
Ein Datenbanksystem für Fragmentmuster der genomischen DNS von *Staphylococcus aureus*
Bundesgesundheitsblatt 2, 68-74
- COLLIER, D.N. (2002)
Cutaneous infections from coastal and marine bacteria
Dermatologic Therapy 15, 1-9
- COLWELL, R.R.; BRAYTON, P.R.; GRIMES, D.J.; ROSZAK, D.B.; HUQ, S.A. und PALMER, L.M. (1985)
Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release genetically engineered microorganisms
Bio/Technology 3, 817-820

Literaturverzeichnis

- COMEAU, A.M.; BUENAVENTURA, E. und SUTTLE, C.A. (2005)
A persistent, productive and seasonally dynamic vibriophage population within Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)
Appl. Environ. Microbiol. 71, 5324-5331
- COUTARD, F.; POMMEPUY, M.; LOAEC, S. und HERVIO-HEATH, D. (2005)
mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state
J. Appl. Microbiol. 98, 951-961
- COUTARD, F.; LOZACH, S.; POMMEPUY, M. und HERVIO-HEATH, D. (2007)
Real-time reverse transcription-PCR for transcriptional expression analysis of virulence and housekeeping genes in viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability
Appl. Environ. Microbiol. 73, 5183-5189
- CROCI, L.; SERRATORE, P.; COZZI, L.; STACCHINI, A.; MILANDRI, S. und SUFFREDINI, E. (2001)
Detection of vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area
Lett. Appl. Microbiol. 32, 57-61
- CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L. und TOTI, L. (2002)
Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*
J. Appl. Microbiol. 92, 460-465
- CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L.; OTTAVIANI, D.; PRUZZO, C.; SERRATORE, P.; FISCHETTI, R.; GOFFREDO, E.; LOFFREDO, G. und MIONI, R. and the *Vibrio parahaemolyticus* WORKING GROUP (2006)
Comparison of different biochemical and molecular methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Appl. Microbiol. 102, 229-237
- DADISMAN, T.A. Jr.; NELSON, R.; MOLENDI, J.R. und GARBER, H.J. (1972)
Vibrio parahaemolyticus gastroenteritis in Maryland. I. Clinical and epidemiologic aspects
Am. J. Epidemiol. 96, 414-418
- DANIELS, N.A.; MACKIMAN, L.; BISHOP, R.; ALTEKRUSE, S.; RAY, B.; HAMMOND, R.M.; THOMPSON, S.; WILSON, S.; BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M. und SLUTSKER, L. (2000) a
Vibrio parahaemolyticus infections in the United States, 1973-1998
J. Infect. Dis. 181, 1661-1666
- DANIELS, N.A.; EVANS, M.C. und GRIFFIN, P.M. (2000) b
Non-cholera vibrios
In: SCHELD, W.M., CRAIG, W.A., HUGHES, J.M. (Hrsg.): Emerging infections
ASM Press, Washington D. C., USA, 137-147
- DANIELS, N.A. und SHAFIIE, A. (2000)
A review of pathogenic vibrio infections for clinicians
Infections in Medicine 17, 665-685

Literaturverzeichnis

- DAVIS, C.R.; HELLER, L.C.; PEAK, K.K.; WINGFIELD, D.L.; GOLDSTEIN-HART, C.L.;
BODAGER, D.W.; CANNONS, A.C.; AMSO, P.T. und CATTANII, J.(2004)
Real-time PCR detection of the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin
genes in a *Vibrio parahaemolyticus* cultured from mussels and mussel homogenate associated
with a foodborne outbreak
J. Food. Prot. 67, 1005-1008
- DE KONING-WARD, T.F. und ROBINSON-BROWNE, R.M. (1995)
Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*
Infect. Immun. 63, 3790-3795
- DE MAN, J.C. (1975)
The probability of Most Probable Numbers
Europ. J. Appl. Microbiol. 1, 67-78
- DE PAOLA, A.; HOPKINS, L.H.; PEELER, J.T.; WENTZ, B. und MC PHEARSON R.M.
(1990)
Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. coastal waters and oysters
Appl. Environ. Microbiol. 56, 2299-2302
- DE PAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; BOWERS, J. und COOK, D.W.(2000)
Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in
Washington,
Texas, and New York (1997 and 1998)
Microbiol. 66, 4649-4654
- DE PAOLA, A.; MC LEROY, S. und MC MAGNUS, G. (1997)
Distribution of *Vibrio vulnificus* phage in oyster tissues and other estuarine habitats
Appl. Environ. Microbiol. 63, 2464-2467
- DE PAOLA, A.; ULAZEK, J.; KAYSNER, C.A.; TENGE, B.J.; NORDSTROM, J.L.;
WELLS, J.; PUHR, N. und GENDEL, S.M. (2003) a
Molecular, serological, and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from
environmental, food, and clinical sources in North America and Asia
Appl. Environ. Microbiol. 69, 3999-4005
- DE PAOLA, A.; NORDSTROM, J.; BOWERS, J.C.; WELLS, J.G. und COOK, D.W.(2003)b
Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters
Appl. Environ. Microbiol. 69, 1521-1526
- DEEPANJALI, A.; SANAT KUMAR, H.; KARUNASAGAR, I. und KARUNASAGAR, I.
(2005)
Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in
oysters along the Southwest coast of India
Appl. Environ. Microbiol. 71, 3576-3780
- DELMORE, R.P. Jr. und CHRISLEY, F.D. (1979)
Thermal resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in clam homogenate
J. Food. Prot 42, 131-134

Literaturverzeichnis

- DONOVAN, T.J. und VAN NETTEN, P. (1995)
Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples
Int. J. Food Microbiol. 26, 77-91
- DRAKE, S.L.; DE PAOLA, A. und JAYKUS, L.-A. (2007)
An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*
Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 6, 120-144
- DUAN, J. und SU, Y.-C. (2005)
Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Sci. 70, 125-128
- DUDEN (2003)
Stichwort: *Vibrio*
DUDEN-Das große Fremdwörterbuch: Herkunft und Bedeutung der Fremdwörter
Dudenverlag
- DUMONTET, S.; KROVACEK, K.; BALODA, S.B.; GROTTOLI, R.; PASQUALE, V. und VANUCCI, S. (1996)
Ecological relationship between *Aeromonas* and *Vibrio* spp. and planctonic copepods in the coastal marine environment in Southern Italy
Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 19, 245-254
- EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O. und AMMAN, R. (2000)
Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea
Appl. Environ. Microbiol. 66, 3044-3051
- ELLIOT, E.L.; KAYSNER, C.A.; JACKSON, L. und TAMPLIN, M.L. (1995)
Vibrio cholerae, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp.
In: FDA Bacteriological analytical Manual (8th ed.) AOAC International, Gaithersburg, MD, 9.01-9.27
- ENTIS, P. und BOLESZCZUK, P. (1983)
Overnight enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by hydrophobic grid membrane filtration
J. Food Prot. 46, 783-786
- ERMOLENKO, D.N. und MAKHATADZE, G.I. (2002)
Bacterial cold-shock proteins
Cell. Mol. Life Sci. 59, 1902- 1913
- EUROPÄISCHE KOMMISSION (2001)
Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood)
European Commission, Health & Consumer Protection Directorate-General
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out45_en.pdf
- EYLES, M.J. und DAVEY, G.R. (1984)
Microbiology of commercial depuration of the Sydney rock oyster, *Crassostrea commercialis*
J. Food Protect. 64, 682-686

Literaturverzeichnis

- FABBRI, A.; FALZANO, L.; FRANK, C.; DONELLI, G.; MATARESE, P. und RAIMONDI, F. et al. (1999)
Vibrio parahaemolyticus thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis
Infect. Immun. 67, 1139-1148
- FAO (2007)
Aquaculture production 1950-2005.
Fishstat Plus
Food and Agricultural Organization, United Nations, Rome
- FARMER, J.J.; JANDA, J.M. und BIRKHEAD, K. (2003)
Vibrio
In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. (Hrsg.): Manual of Clinical Microbiology (8.Aufl.)
ASM, Press, Washington, USA, 706-718
- FDA (1998)
FDA and EPA Guidance Levels: Appendix 5
In: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide, 2. Ausgabe, 245-248
Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC.
- FDA (2005)
Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters
FDA (Food and Drug Administration); CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition) der USA
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vpra-toc.html>
- FDA/CFSAN (2001)
Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: *V. parahaemolyticus*
Bad Bug Book, Chap. 9
<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap9.html>
- FEIL, E.J.; SMITH, J.M.; ENRIGHT, M.C. und SPRATT, B.G. (2000)
Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data
Genetics 154, 1439-1450
- FELDHUSEN, F. (1999)
Durch Meerestiere übertragene Erkrankungen
Dtsch.tierärztl.Wschr 106, 319-325
- FISCHINFORMATIONSZENTRUM (FIZ) (2008)
Daten und Fakten: Versorgung und Verbrauch
Fisch-Informationszentrum e.V., Hamburg
<http://www.fischinfo.de/index.php?l=1&page=versorgung&link=f1>

Literaturverzeichnis

- FISHER, L.H.; STRONG, D.H. und DUNCAN, C.L. (1970)
Resistance of *Clostridium perfringens* to varying degrees of acidity during growth and sporulation
J. Food Sci. 35, 91-94
- FOEGEDING, P.M. (1997)
Driving predictive modeling on a risk assessment path for enhanced food safety
Int. J. Food Microbiol. 36, 87-95
- FUJINO, T., OKUNO, Y.; NAKADA, D.; AOYAMA, A., FUKAI, K.; MUKAI, T. und UEHO, T. (1953)
On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning
Med. J. Osaka Univ. 4, 299-304
- GARG, P.; AYDANIAN, A., SMITH, D.; MORRIS, J.G.; NAIR, G.B. und STINE, O.C. (2003)
Molecular epidemiology O139 *Vibrio cholerae*: mutation and recombination during a founder flush event
Emerg. Infect. Dis. 9, 810-814
- GAUTHIER, M.J. (2000)
Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state
In: COLWELL, R. R. (Hrsg.): Nonculturable microorganisms in the environment
ASM Press, Washington DC, USA, Chap. 6, 87-112
- GENESTE, C.; DAB, W.; CABANES, P.A.; VAILLANT, V.; QUILICI, M.L. und FOURNIER, J.M. (2000)
Les vibrioses non-cholériques en France: cas identifiés de 1995-1998 par le Centre National de Référence
BEH 9, 38-40
- GEORGOPOULUS, A. und BURGMANN, H. (2007)
Vibrio spp.
Österreichische Gesellschaft für Antimikrobielle Chemotherapie, Wien
<http://www.infektionsnetz.at/BakterienVibrio.phtml>
- GERTEN, B. (1993)
Grundstoffe und biologische Extrakte
OXOID Handbuch, 5. Auflage, Wesel, Unipath, 323-343
- GILMOUR, A.; ALLAN, M.C. und MC CALLUM, M.F. (1976)
The unsuitability of high pH media for the selection of marine *Vibrio* species
Aquaculture 7, 81-87
- GIOVANNI, S. und RAPPÉ, M. (2000)
Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes
In: KIRCHMAN, D. (Hrsg.): Microbial ecology of the oceans
Wiley-Liss, Inc., New York, 47-84

Literaturverzeichnis

- GOATCHER, L.J. und WESTHOFF, D.C. (1975)
Repression of *Vibrio parahaemolyticus* by *Pseudomonas* species isolated from processed oysters
J. Food. Sci 40, 533-536
- GOMEZ-GIL, B. und ROQUE, A. (2006)
Isolation, enumeration, and preservation of the Vibrionaceae
In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 2, 15-28
- GOMEZ-GIL, B., THOMPSON, F.L., THOMPSON, C.C., GARCIA-GASCA, A., ROQUE, A. und SWINGS, J. (2004)
Vibrio hispanicus sp nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 261-265
- GONZALES-ESCALONA, N., BLACKSTONE, G.M. und DE PAOLA, A. (2006)
Characterization of a *Vibrio alginolyticus*-strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*
Appl. Environ. Microbiol. 72, 7925-7929
- GOPAL, S., OTTA, S.K.; KUMAR, S.; KARUNSAGAR, I.; NISHIBUCHI, M. und KARUNSAGAR, I. (2005)
The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety
Int. J. Food Microbiol. 102, 151-159
- GOSSLING, E. (2003) a
Morphology of bivalves
In: GOSSLING, E. (Hrsg.): Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture
Fishing News Books, division of Blackwell Publishing, Oxford, 7-43
- GOSSLING, E. (2003) b
How bivalves feed
In: GOSSLING, E. (Hrsg.): Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture
Fishing News Books, division of Blackwell Publishing, Oxford, 87-130
- GOSSLING, E. (2003) c
Reproduction, settlement and recruitment
In: GOSSLING, E. (Hrsg.): Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture
Fishing News Books, division of Blackwell Publishing, Oxford, 131-168
- GOSSLING, E. (2003) d
Bivalve culture
In: GOSSLING, E.: Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture
Fishing News Books, division of Blackwell Publishing, Oxford, 284-332
- GOSSLING, E. (2003) e
Circulation, respiration, excretion and osmoregulation
In: GOSSLING, E. (Hrsg.): Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture
Fishing News Books, division of Blackwell Publishing, Oxford, 201-224

Literaturverzeichnis

- GOULLETQUER, P. (2005)
Cultured aquatic species information-programme - *Mytilus edulis*
FAO Inland water resources and aquaculture service (FIRI)
http://www.fao.org:80//figis/servlet/static?dom=culturespecies&xml=Mytilus_edulis.xml
- GREENBERG, E.P. und DUBOIS, M. (1981)
Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi* in hard shell clams.
Abstracts of the 81st General Meeting of the American Society for Microbiology,
Abstract # Q93:216
- GREENBERG, E.P.; DUBOIS, M. und PALHOF, B. (1982)
The survival of *Mercenaria mercenaria*, the hardshell clam
J. Food Safety 4, 113-123
- GRUNDMANN, H. (2002)
Resistenzentwicklung und Populationsstrukturen Hospital-adaptierter Flora
Chemotherapie Journal 11, 125-129
- GUALERZI, C.O.; GIULIODORI, A.M. und PON, C.L. (2003)
Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes
J. Mol. Biol. 331, 527-539
- GUBERNATOR, M. (2007)
Muschelfischerei
Niedersächsische Muschelfischer
<http://www.muschelfischer.de>
- HACKNEY, C.R.; RAY, B. und SPECK, M.L. (1980)
Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in and the microbiological quality of seafood in North Carolina
J. Food. Prot. 43, 769-773
- HARA-KUDO, Y.; NISHINA, T.; NAKAGAWA, H.; KONUMA, H.; HASEGAWA, J. und KUMAGAI, S. (2001)
Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood
Appl. Environ. Microbiol. 67, 5819-5823
- HARDIES, S.; COMEAU A.M.; SEWER, P. und SUTTLE, C.A. (2003)
The complete sequence of marine bacteriophage VpV262 infecting *Vibrio parahaemolyticus* indicates that an ancestral component of a T7 viral supergroup is widespread in the marine environment
Virology 310, 359-371
- HARDY, S.P.; MASAYUKI, N. und IIDA, T. (2004)
Single channel evidence for innate pore-formation by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH) in phospholipid bilayers
FEMS Microbiol. Lett. 240, 81-85

Literaturverzeichnis

- HARRIS-YOUNG, L.; TAMPLIN, M.L.; MASON, W.J.; ALDRICH, H.C. und JACKSON, K. (1995)
Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*)
Appl. Environ. Microbiol. 61, 52-57
- HEIDELBERG, J.F.; HEIDELBERG, K.B. und COLWELL, R.R. (2002)
Seasonality of Chesapeake Bay bacterioplankton species
Appl. Environ. Microbiol. 68, 5488-5497
- HENKE, J.M. und BASSLER, B.L. (2004)
Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*
J. Bacteriol. 186, 3794-3805
- HILDEBRANDT, G. und ARNDT, G. (1982)
Die MPN-Schätzung in Theorie und Praxis
Fleischwirtschaft 62, 357-363
- HILDEBRANDT, H. (1998)
Stichwort: Entzündung
In: Pschyrembel - klinisches Wörterbuch 258. Aufl.
DeGruyter, Berlin, Deutschland, 1698, 434-435
- HILDEBRANDT, H. (1998)
Stichwort: Wundinfektion
In: Pschyrembel - klinisches Wörterbuch 258. Aufl.
DeGruyter, Berlin, Deutschland, 1698
- HILL, W. (2004)
RFLP-Definition
Food and Drug Administration, USA
<http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/rflp.html>
- HLADY, W.G. (1997)
Infections associated with raw oyster consumption in Florida, 1981-1994
J. Infect. Dis. 173, 1176-1183
- HLADY, W.G. und KLONTZ, K.C. (1996)
The epidemiology of vibrio Infections in Florida, 1981-1993
J. Infect. Dis. 173, 1176-1183
- HOLT, J.G. und KRIEG, N.R. (1994).
Enrichment and isolation
In: GERHARDT, P, MURRAY, R.G.E., WOOD, W.A., KRIEG, N.R. (Hrsg.): Methods for general and molecular bacteriology
ASM Press, Washington, USA, 179-215
- HONDA, T. und IIDA, T. (1993)
The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins
Rev. Med. Microbiol 4, 106-113

Literaturverzeichnis

- HONDA, T., NI, Y. und MIWATANI, T. (1988)
Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the hermostable direct hemolysin
Infect. Immun. 56, 961-965
- HONDA, T.; SORNCHAI, C.; TAKEDA, Y. und MIWATANI, T. (1982)
Immunological detection of the Kanagawa phenomenon of *Vibrio parahemolyticus* on modified selective media
J. Clin. Microbiol. 16, 734-736
- HONDA, T.; NI, Y.; MIWATANI, T.; ADACHI, T. und KIM, J. (1992)
The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin
Can. J. Microbiol. 38, 1175-1180
- HOOD, M.A. und WINTER, P.A. (1997)
Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected substrates
FEMS Microbiol. Ecol. 22, 215-223
- HOOVER, D.G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A.M.; FARKAS, D.F. und KNORR, D. (1989)
Biological effects oh high pressure on food microorganisms
Food Technol. 43, 99-107
- HORIE, S., SAHEKI, K. und OKUZUMI, M. (1967)
Quantitative enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in sea and estuarine water
Bull. Jpn. Soc. Sci Fish 33, 126-130
- HORIE, S., YAMADA, M., TANAKA, H., YAMASHITA, Y. und AIHARA, T. (1978)
Direct plating medium procedure for isolating and enumerating *Vibrio parahaemolyticus* in fish and shellfish
J. Food. Hyg. Soc. Jpn. 19, 383-391
- HORNSTRUP, M.K. und GAHRN-HANSEN, B. (1993)
Extraintestianl infections caused by *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* in a Danish county, 1987-1992
Scand. J. Infect. Dis. 25, 735-740
- HUQ, A., SMALL, E.B., WEST, P.A., HUQ, M.I., RAHMAN, R. und COLWELL, R.R. (1983)
Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods
Appl. Environ. Microbiol. 45, 275-283
- HSU, W.-Y., WEI, C.-I. und TAMPLIN, M.L.(1998):
Enhanced broth media for selective growth of *Vibrio vulnificus*
Appl. Environ. Microbiol. 64, 2701-2704
- ICMSF (1986)
Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications
Microorganisms in foods 2
University of Toronto Press, Toronto

Literaturverzeichnis

- IIDA, T. und YAMAMOTO, K. (1990)
Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanagawa Phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain
Gene 93, 9-15
- IIDA, T.; HATTORI, A.; TAGOMORI, K.; NASU, R.; NAIM, R. und HONDA, T. (2001)
Filamentous phage associated with recent pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*
Emerg. Infect. Dis. 7, 477-478
- IIDA, T.; PARK, K.-S. und HONDA, T. (2006)
Vibrio parahaemolyticus
In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM (American Society of Microbiology) Press, Washington D.C., USA, Chap. 24, 340-348
- INGRAHAM, J.L. und MARR, A.G. (1996)
Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth
In: NEIDTHARDT, F. C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B.;
MAGNASNIK, B.; RETZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTNER, M. und
UMBARGER, H. E. (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and
Molecular Biology (2. Aufl.)
ASM Press, Washington D.C., USA, 1570-1578
- ISCHII (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) (2009)
Microorganismos notificados al sistema de información microbiológica, año 2000-2006
Sistema de Información microbiológica
<http://www.isciii.es/jsp/centros/epidemiologia/informacionMicrobiologica.jsp>
- IDSC (INFECTIOUS DISEASE SURVEILLANCE CENTER) (1999)
Vibrio parahaemolyticus, Japan 1996-1998
Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 20, 1-2
- IDSC (INFECTIOUS DISEASE SURVEILLANCE CENTER) (2009)
Bacteria isolation from human sources, by year, 2000-2007: *Vibrio parahaemolyticus*
<http://idsc.nih.gov/iasr/virus/graph/pby20071.pdf>
- ISO (1990)
Microbiology: General guidance for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*
Method 8914
International Organization of Standardization, TC 34/SC 9
- ISO (2007)
Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of the
detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp.- Part 1: Detection of *Vibrio*
parahaemolyticus and *Vibrio cholerae*
International Organization of Standardization, TS 21872-1:2007
- JAKŠIĆ, S.; UHITIL, S.; PETRAK, T.; BAŽULIĆ, D. und KAROLI, L.G. (2002)
Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from the
Adriatic sea
Food Control 13, 491-493

Literaturverzeichnis

- JAMESON, J.E. und EMBERLEY, N.W. (1958)
Teepol in substitution for bile salts
J. Gen. Microbiol. 18, 238
- JOHNES, M.V.; HERD, T.M. und CHRISTIE, H.J. (1989)
Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides
Microbiol. 58, 49-61
- JOHNSTON, M.D. und BROWN, M.H. (2002)
An investigation into the changed physiological state of vibrio bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing
J. Appl. Microbiol. 92, 1066-1977
- JOLLEY, K.A.; FEIL, E.J.; CHAN, M.-S. und MAIDEN, M.C.J. (2001)
Sequence type analysis and recombinational tests (START)
Bioinformatics Applications note 17, 1230-1231
- JOLLEY, K.A.; CHAN, M.-S. und MAIDEN, M.C.J. (2004)
Primers and cycling conditions for *Vibrio parahaemolyticus*
In: mlstdbNet – distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases
BMC Bioinformatics 5, 86
<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>
- JOSEPH, S.W.; COLWELL, R.R. und KAPER, J.B. (1982)
Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios
Crit. Rev. Microbiol. 10, 77-124
- KANEKO, T. und COLWELL, R.R. (1975)
Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* on chitin and copepods
Appl. Microbiol. 29, 269-274
- KANEKO, T. und COLWELL, R.R. (1973)
Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay
J. Bacteriol. 112, 24-32
- KANEKO, T. und COLWELL, R.R. (1978)
The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay
Microb. Ecol. 4, 135-155
- KAPER, J.B.; CAMPEN, R.K.; SEIDLER, R.J.; BALDINI, M.M. und FALKOW, S. (1984)
Cloning of the thermostable direct or Kanagawa phenomenon-associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 45, 290-292
- KARAOLIS, D.K.; LAN, R. und REEVES, P.R. (1994)
Molecular evolution of the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholerae* isolates
J. Bacteriol. 176, 6199-6206

Literaturverzeichnis

- KASPAR, C.W. und TAMPLIN, M.L. (1993)
Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish
Appl. Environ. Microbiol. 59, 2425-2429
- KAUFMAN, G.E.; BEJ, A.K., BOWERS, J. und DE PAOLA, A. (2003)
Oyster-to-oyster variability in levels of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Prot. 66, 125-129
- KAUFMAN, G.E.; MYERS, M.L.; PASS, C.L.; BEJ, A.K. und KAYSNER, C.A.(2002)
Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from human patients and shellfish during Pacific north-west outbreaks
Lett. Appl. Microbiol. 34, 155-161
- KAYSER, F H. und BÖTTGER, E.C. (1998)
Labordiagnostik von Infektionen
In: KAYSER, F H.; BIENZ, K.A.; ECKERT, J. und ZINKERNAGEL, R.M. (Hrsg.):
Medizinische Mikrobiologie
Thieme Verlag, Stuttgart, 12-43
- KAYSNER, C.A.; BEYTA, C. Jr.; TROST, P.A.; WETHERINGTON, J.H.; JINNEMAN, K.C.; HILL, W.E. und WEKELL, M.M. (1994)
Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*-strains isolated in the Pacific Northwest
Appl. Environ. Microbiol. 60, 3020-3022
- KAYSNER, C.A. und DE PAOLA, A. (2004)
Vibrio
In: Bacteriological Analytical Manual Online
FDA, CFSAN, USA, Chap. 9
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>
- KELL, D.B.; KAPRELYANTS, A.S.; WEICHART, D.H.; HARWOOD, C.R. und BARE, M.R. (1998)
Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues
Antonie Leeuwenhoek 63, 333-341
- KELLOG, C.A.; ROSE, J.B.; JIANG, S.C.; THURMOND, J.M. und PAUL, J.H. (1995)
Genetic diversity of vibriophages isolated from marine environments around Florida and Hawaii, USA
Mar. Ecol. Prog. Ser. 120, 89-98
- KELLY, M.T. und STROH, E.M. (1988)
Temporal relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in patients and in the environment
J. Clin. Microbiol. 26, 1754-1756

Literaturverzeichnis

- KIM, Y.B.; OKUDA, J.; MATSUMOTO, C.; TAKAHASHI, N.; HASHIMOTO, S. und NISHBUCHI, M. (1999)
Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene
J. Clin. Microbiol. 37, 1173-1177
- KITA-TSUKAMOTO, K.; OYAIZU, H.; NANBA, K. und SHIMIDU, U. (1993)
Phylogenetic relationships of marine bacteria mainly members of the family Vibrionaceae determined on the basis of 16S rRNA sequences
Int. J. Syst. Bact. 43, 8-19
- KLEER, J. und SINELL, H.-J. (2007)
Vibrio spp.
In: FEHLHABER, K.; KLEER, J. und KLEY, F. (Hrsg.): Handbuch Lebensmittelhygiene
Behr's Verlag, Hamburg, Deutschland, 55-60
- KLONTZ, K.C. (1990)
Fatalities associated with *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* non-O1 infections in Florida (1981-1988)
South Med. J. 83, 500-502
- KLONTZ, K.C. (1997)
Estimated numbers of persons at increased risk for *Vibrio vulnificus* septicemia
Memorandum an das Office of Seafood /CFSAN/FDA der USA vom 21. November 1997
- KOGA, T.; SAKAMOTO, F.; YAMOTO, A. und TAKUMI, K. (1999)
Acid adaption induces cross-protection against some environmental stresses in *Vibrio parahaemolyticus*
J. Gen. Appl. Microbiol. 45, 155-161
- KOGA, T.; TOYOSIMA, S. und KAWATA, T. (1982)
Morphological varieties and host ranges of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seawater
Appl. Environ. Microbiol. 44, 466-470
- KOO, J.; JAHNCKE, M.L.; RENO, P.W.; HU, X. und MALLIKARJUNAN, P. (2006)
Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in phosphate-buffered saline and in inoculated whole oysters by high-pressure processing
J. Food Prot. 69, 596-601
- KORRINGA, P. (1976)
Economic aspects of mussel farming.
Proc. FAO Tech. Conf. on Aquaculture held in Kyoto, Japan, 26 May - 2 June 1976
- KOURANY, M. (1983)
Medium for isolation and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*
Appl. Environ. Microbiol. 45, 310-312
- KUMAZAWA, N.H.; FUKUMA, N. und KOMODA, Y. (1991)
Attachment of *Vibrio parahaemolyticus* strains to estuarine algae
J. Vet. Med. Sci. 53, 201-205

Literaturverzeichnis

- LAOHAPRERTTHISAN, V.; CHOWDHURRY, A.; KONGMUANG, U.; KALNAUWKUL, S.; ISHIBASHI, M.; MATSUMOTO, C. und NISHIBUCHI, M. (2003)
Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand
Epidemiol. Infect. 130, 395-406
- LART, W.J. und HUDSON, S.A. (1993)
Factors affecting *Escherichia coli* levels in shellfish with reference to E.E.C. Directive 91/492
Seafish Report No 419. Seafish Industrie Authority, St Andrews Dock, Hull, HU3 4QE, England
- LEE, J.V.; BASHFORD, D.J.; DONOVAN, T. J.; FURNISS, A.L. und WEST, P.A. (1981)
The incidence of *Vibrio cholerae* in water, animals and birds in Kent, England
J. Appl. Bacteriol. 52, 281-291
- LEE, K.-H. und RUBY, E.G. (1994)
Effect of the squid host on the abundance and distribution of symbiotic *Vibrio fisheri* in nature
Appl. Environ. Microbiol. 60, 1565-1571
- LEE, C. und PAN, S.F. (1993)
Rapid and specific detection of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction
J. Gen. Microbiol. 139, 3225-3231
- LEMOINE, T.; GERMANETTO, P. und GIRAUD, P. (1990)
Toxi-infection alimentaire collective à *Vibrio parahaemolyticus*
BEH 10, 37-38
- LENZ, W. (1991)
Die Staphylokokken-Lysotypie als epidemiologisches Werkzeug
Hyg. Med. 16, 197-214
- LEVINE, M.M.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L.; NALIN, D.R.; CISNEROS, L. und FINKELSTEIN, R. A. (1981)
Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: A review
In: HOLME, T.; HOLMGREN, J.; MERSON, M.H. und MÖLLBY, R. (Hrsg.): Acute enteric infections in children: new prospects for treatment and prevention
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 443-459
- LHAFI, S.K. (2006)
Untersuchungen zum bakteriellen und viralen Kontaminationsstatus von Miesmuscheln (*Mytilus edulis*) deutscher Herkunft
Inaugural-Dissertation aus dem Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Deutschland
- LIBINZON, A.E.; US, Z.I.; GAL'TSEVA, G.V.; DEGTIAREVA, B.M. und GOLKOVSKII, G.M. (1995)
Phages of halophilic vibrio
Zh. Mikrobiol. Epidmiol. Immunobiol. 1, 15-18

Literaturverzeichnis

- LIN, C.; YU, R.C. und CHOU, C.C. (2004)
Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment
Int. J. Food Microbiol. 92, 207-215
- LIN, Z.; KUMAGAI, K.; BABA, K.; MEKALANOS, J.J. und NISHIBUCHI, M. (1993)
Vibrio parahaemolyticus has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene
J. Bacteriol. 175, 3844-3855
- LINDQUIST, R.; ANDERSSON, Y.; DE JONG, B. und NORBERG, P. (2000)
A summary of foodborne disease incidents in Sweden, 1992-1997
J. Food Prot. 63, 1315-1320
- LITTLE, C.L.; MONSEY, H.A.; NICHOLS, G.I. und DE LOUVOIS, J. (1997)
The microbiological quality of cooked, ready to eat, out-of-shell molluscs - a report of the results of a study by the LACOTS/PHLS Co-ordinated Food Liaison Group, Microbiological Sampling Group
PHLS Microbiol. Dig. 14, 196-201
- LIU, C.; RUIYING, C. und SU, Y.C. (2006)
Bactericidal effects of wine on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters
J. Food Protect. 8, 1823-1828.
- LOWRY, P.W.; MC FARLAND, L.M.; PELTIER, B.H.; ROBERTS, N.C.; BRADFORD, H.B.; HERNDON, J.L.; STROUP, D.F.; MATHISON, J.B.; BLAKE, P.A. und GUNN, R.A. (1989)
Vibrio gastroenteritis in Louisiana: a prospective study among attendees of a scientific congress in New Orleans
J. Infect. Dis., 978-984
- LOZANO-LEON, A.; TORRES, J.; OSORIO, C.R. und MARTINEZ-URTAZA, J. (2003)
Vibrio parahaemolyticus from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain
FEMS Microbiol. Lett. 226, 281-284
- LUTZ, R.A. (1985)
Mussel aquaculture in the United States
In: HUNER, J.V. u. E.E, BROWN (Hrsg.): Crustacean and mollusc aquaculture in the United States.
The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 311-363.
- MAC DONELL, M.T.; SINGLETON, F.L. und HOOD, M.A. (1982)
Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria
Appl. Environ. Microbiol. 44, 423-427
- MACHLEIDT (2007)
Versuch 3: Quantitative Glucosebestimmung mit der HK/ G6PDH- Methode
Praktikumsunterlagen Biochemie, Leibniz Rechenzentrum München der Bayerischen Akademie der Wissenschaften
http://www.lrz-muenchen.de/~Biochemie_Machleidt/versuchIII_3.htm

Literaturverzeichnis

- MAGARIYAMA, Y.; SUGIYAMA, S.; MURAMOTO, K.; KAWAGISHI, I.; SUGIYAMA, A.S.; IMAE, Y. und KUDO, S. (1995)
Simultaneous measurement of bacterial flagellar rotation rate and swimming speed
Biophys. J. 69, 2154-2162
- MAIDEN, M.C.J.; BYGRAVES, J.A.; FEIL, E.; MORELLI, ;, RUSSELL, J.E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D.A.; FEAVERS, I.M.; ACHTMAN, M. und SPATT, B.G. (1998)
Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3140-3145
- MAKINO, K.; OSHIMA, K.; L KUROKAWA, K.; YOKOYAMA, K.; UDA, T.; TOGOMORI, K.; IJIMA, Y.; NAJIMA, M.; NAKANO, M.; YAMASHITA, A.; KUBOTA, Y.; KIMURA, S.; YASUNAGA, T.; HONDA, T.; SHINAGAWA, H.; HATTORI, M. und IIDA, T. (2003)
Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*
Lancet 361, 743-749
- MALLET, J.C.; BEGHIAN, L.E.; METCALF, T.G. und KAYLOR, J.D. (1991)
Potential of irradiation technology for improved shellfish sanitation
J. Food Saf. 11, 231-245
- MARSHALL, S.; CLARK, C.B.; WANG, G.; MULVEY, M.; KELLY, M.T. und JOHNSON, W.M. (1999)
Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*
J. Clin. Microbiol. 37, 2473-2478
- MARTINEZ-MANZARES, E.; MORNIGO, M.A.; CASTRO, D., BABELONA, M.C.; MUNOZ, M.A. und BORREGO, J.J. (1992)
Relationship between indicators of faecal pollution in shellfish-growing water and occurrence of human pathogenic microorganisms in shellfish
J. Food Prot. 55, 609-614
- MARTINEZ-URTAZA, J.; SIMENAI, L.; VELASCO, D.; DE PAOLA, A.; ISHIBASHI, M.; NAKAGCHI, Y.; NISHIBUCHI, M.; CARRERA-FIORES, D.; REY-ALXAREZ, C. und POUSA, A. (2005)
Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe
Emerg. Infect. Dis. 11, 1319-1320
- MAST DIAGNOSTICA (2006)
CHROMagar™Vibrio
Herstellerangaben auf Beipackzettel
- MATCHES, J.R. und LISTON, J. (1971)
Radiation destruction of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Sci. 36, 339-340

Literaturverzeichnis

- MATSUMOTO, C.M.; OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; IWANAGA, M.; GARG, P.; RAMMAMURTHY, T.; WONG; H.C.; DE PAOLA, A.; KIM, J.B.; ALBERT, M.J. und NISHIBUCHI, M.(2000)
Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses
J. Clin. Microbiol. 38, 578-585
- MATTE, G.R.; MATTE, M.H.; SATO, M.I.; SANCHEZ, P.S.; RIVERA, I.G. und MARTINS, M.T. (1994)
Potentially pathogenic vibrios associated with mussels from a tropical region on the Atlantic coast of Brazil
J. Appl. Bacteriol.77, 281-287
- MC CARTER, L.L. (1995)
Genetic and molecular characterization of the polar flagellum of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Bacteriol. 177, 1595-1609
- MC CARTER, L.L.(2006)
Motility and chemotaxis
In THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B. und SWINGS, J.: The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap.9, 115-132
- MC CARTHY, S.A.; DE PAOLA, A.; COOK, D.W.; KAYSNER, C.A. und HILL, W.E. (1999)
Evaluation of alkaline phosphatase- und digoxigenin labeled probes for the detection of the thermolabile hemolysin (*tlh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*
Lett. Appl. Microbiol. 28, 66-70
- MC CARTHY, S.A.; DE PAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; HILL, W.E. und COOK, D.W. (2000)
Evaluation of nonisotopic DNA hybridization methods for detection of the *tdh*-gene of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Prot. 63, 1660-1664
- MC DOUGALD, D. und KJELLBERG, S. (2006)
Adaptive responses of vibrios
In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 10, 133-155
- MC LAUGHLIN, J.C.; DE PAOLA, A.; BOPP, C.A.; MARTINEK, K.A.; NAPOLILLI, N.P., ALLISON, C.G.; MURRAY, S.L.; THOMPSON, E.C., DIRD, M.M. und MIDDAUGH, J.P. (2005)
Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters
New Eng. J. Med. 353, 1463-1470
- MC LAUGHLIN, J.C. (1995)
Vibrio
In: JOBARON, E.; PFALLER M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. und MURRAY, P.R. (Hrsg.): Manual of clinical microbiology
ASM (American Society of Microbiology) Press, Washington D.C., USA, Chap. 35, 465-476

Literaturverzeichnis

- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MC CAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M. und TAUXE, R.V. (1999)
Food-related illness and death in the United States
Emerging Infectious Diseases 5, 607-625
- MICELI, G.A.; WA;KIS, W.D. und RIPPEY, S.R. (1993)
Direct plating procedure for enumerating *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*)
Appl. Environ. Microbiol. 59, 3519-3524
- MIHALOVIĆ, L.; BOCKEMÜHL, J.; HEESEMANN, J. und LAUFS, R. (1982)
Importierte Muscheln als Ursache einer Gastroenteritis durch *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. 10, 285-286
- MING, X.; YAMAMOTO, K. und HONDA, T. (1994)
Construction and characterization of an isogenic mutant of *V. parahaemolyticus* having a deletion in the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (trh)
J. Bacteriol. 176, 4757-4760
- MIWA, N.; NISHIO, T. ARITA, Y. KAWAMORI, F. MASUDA, T. und AKIYAMA, M. (2003)
Evaluation of MPN method combined with PCR procedure for detection and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood
Shokuhin Eiseigaku Zasshi 44, 289-293.
- MIYAMOTO, T.; MIWA, H. und HATANO, S. (1990)
Improved fluorogenic assay for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods.
Appl. Environ. Microbiol. 56, 1480-1484
- MIYAMOTO, Y.; KATO, T.; OBARA, Y.; AKIYAMA, S.; TAKIZAWA, K. und YAMAI, S. (1969)
In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: Its close correlation with human pathogenicity
J. Bacteriol. 100, 1147-1149
- MIYAMOTO, Y.; OBARA, Y.; NIKKAWA, T.; YAMAI, S.; KATO, T.; YAMADA, Y. und OHASHI, M. (1980)
Simplified purification and biophysicochemical characteristics of Kanagawa phenomenon-associated of *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 28, 567-576
- MIYASAKA, J.; YAHIRO, S.; ARAHIRA, Y.; TOKUNAGA, H.; KATSUKI, K. und HARA-KUDO, Y. (2006)
Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic birds in Japan
Epidemiol. Infect. 134, 780-785
- MOEBUS, K. und NATTKEMPER, H. (1983)
Taxonomic investigations of bacteriophages sensitive bacteria isolated from marine waters
Helgol. Wiss. Meeresunters 36, 357-373
- MOLERO, X.; BARTOLOME, R.M.; VINUESA, T.; GUARNER, L.; ACCARINO, A.; CASELLAS, F. und GARCIA, R. (1989)
Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases
Med. Clin. (Barcelona) 92, 1-4

Literaturverzeichnis

- MONSUR, K.A. (1963)
Bacteriological diagnosis of cholera under field conditions
WHO Bull. 28, 387-389
- MONTANARI, M.P.; PRUZZO, C.; PANE, L. und COLWELL, R.R. (1999)
Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy)
FEMS Microbiol. Ecol. 29, 241-247
- MORIARTY, D.J.W. und BELL, R.T. (1993)
Bacterial growth and starvation in aquatic environments
In: KJELLEBERG, S. (Hrsg.): Starvation in Bacteria
Plenum Press, New York, USA, 25-53
- MOTES, M.L.; DE PAOLA, A.; COOK, D.W.; VEAZEY, J.E.; HUNSUCKER, J.C.;
GARTHRIGHT, W.E.; BLODGETT, R.J. und CHIRTEL, S.J. (1998)
Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in northern Gulf and Atlantic
Coast oysters (*Crassostrea virginica*)
Appl. Environ. Microbiol. 64, 1459-1465
- MULLIGAN, M.E.; KWOK, R.Y.; CITRON, D.M. und JOHN, J.F. Jr. et al. (1988)
Immunoblots, antimicrobial resistance, and bacteriophage typing of oxacillin-resistant
Staphylococcus aureus
J. Clin. Microbiol. 26, 2395-2401
- MURAKAMI, H.; JINBO, K.; KANZAKI, M.; KOKUBO, Y.; HARUTA, M. und
YAMADA, M. (1975)
Enumeration of presumptive *Vibrio parahaemolyticus* in edible sucked shellfish by the use of
most probable number technique
J. Food. Hyg. Soc. Jpn. 16, 247-252
- MUTANDA-GARRIGA, J.M.; RODRIGUEZ-JEREZ, J.J.; LOPEZ-SABATER, E.I. und
MORA-VENTURA, M.T. (1995)
Effect of chilling and freezing temperatures on survival of *V. parahaemolyticus* inoculated in
homogenate of oyster meat
Lett. Appl. Microbiol. 20, 225-227
- MYERS, M.L., PANICKER, G. und BEJ, A.K. (2003)
PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in
pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico
Appl. Environ. Microbiol. 69, 2194-2200
- NAIR, G.B.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S.K.; DUTTA, B., TAKEDA, Y.
und SACK, D.A. (2007)
Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants
Clin. Microbiol. Rev. 20, 39-48
- NAIR, S.; KITA-TSUKAMOTO, K. und SIMIDU, U. (1988)
Bacterial flora of healthy and abnormal chaetognaths
Nipp. Suis. Gakk. 54, 491-496

Literaturverzeichnis

- NAJIAH, M.; LEE, K.L.; HASSAN, M.D.; SHARIFF, M. und MOHD-AZMI, M.L. (2003)
Preliminary study on genetic distance of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from diseased fish and shrimp brackishwater ponds by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Malaysia
Asian Fisheries Science 16, 299-305
- NAKANISHI, H. und MURASE, M. (1973)
Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in raw fish meat
In: International Symposium on *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, Japan, 117-121
- NAKASONE, N.; IKEMA, M.; HIGA, N.; YAMASHIRO, T. und IWANAGA, M. (1999)
A filamentous phage of *Vibrio parahaemolyticus*, O3:K6 isolated in Laos
Microbiol. Immunol. 43, 385-388
- NAKASONE, N. und IWANAGA, M. (1990)
Pili of a *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor
Infect. Immun. 58, 61-69
- NASU, H.; IIDA, T.; SUGAHARA, T.; YAMAICHI, Y.; PARK, K.-S.; YOKOYAMA, K.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H. und HONDA, T. (2000)
A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6-strains
J. Clin. Microbiol. 38, 2156-2161
- NCBI (2007)
National Center for Biotechnology Information
8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894, USA
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=670&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock
- NEW JERSEY DEPT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION (2002)
Portions of Delaware Bay closed for shellfish harvest
New Jersey Department of Environmental Protection News Release, 29. Juli 2002
- NICHOLLS, K.M.; LEE, J.V. und DONOVAN, T.J. (1976)
An evaluation of commercial thiosulphate citrate bile salt sucrose agar (TCBS)
J. Appl. Bacteriol. 41, 265-269
- NISHIBUCHI, M. (2006)
Molecular Identification
In: THOMPSON, F.L.; AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 4, 44-64
- NISHIBUCHI, M. und KAPER, J.B. (1990)
Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*
J. Bacteriol. 162, 558-564
- NISHIBUCHI, M.; ISHIBASHI, M.; TAKEDA, Y. und KAPER, J.B. (1985)
Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences
Infect. Immun. 49, 481-486

Literaturverzeichnis

- NISHIBUCHI, M. und KAPER, J.B. (1995)
Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium
Infection and Immunity 63, 2093-2099
- NISHIBUCHI, M.; KHAEOMANEE-IAM, V.; HONDA, T., KAPER, J. und MIWATANI, T. (1990)
Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *V. mimicus*, and *V. hollisae* that are similar to the gene of *V. parahaemolyticus*
FEMS Microbiol. Lett. 67, 251-256
- NISHIBUCHI, M.; TANIGUCHI, T.; MISAWA, T.; KHAEOMANEE-IAM, V.; HONDA, T. und MIWATANI, T. (1989)
Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 57, 2691-2697
- NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS (NMKL) (1997)
Pathogenic *Vibrio* species. Detection and enumeration in foods
No.156, 2.edition (UDC 576.851) Annex Q.
- NORMANNO, G.; PARISI, A.; ADDANTE, N.; QUAGLIA, N.C.; DAMBROSIO, A., MONTAGNA, C. und CHIOCCO, D. (2006)
Vibrio parahaemolyticus, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy)
Int. J. Food Microbiol. 106, 219-222
- O'HARA, C.M.; SOWERS, E.G.; BOPP, C.A.; DUDA, S.B. und STROCKBINE, N.A. (2003)
Accuracy of six commercially available systems for identification of members of the family Vibrionaceae
J. Clin. Microbiol. 41, 5654-5659
- OKA, M. und TAKASAKA, K. (1976)
Food protection and microorganism
In AISO, K. (Hrsg): Food Microbiology
Ishiyaku Publishers, Inc., Tokio, 245-286
- OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; HAYAKAWA, E.; NISHINO, T., TAKEDA, Y.; MUKHOPADHYAY, A.K.; GARG, S.; BHATTACHARYA, S.K.; NAIR, G.B. und NISHIBUCHI, M. (1997)a
Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan
J. Clin. Microbiol. 35, 3150-3155
- OKUDA, J.; ISHIBASHI, M.; ABBOTT, S.L.; JANDA, J.M. und NISHIBUCHI, M. (1997)b
Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *trh*-related hemolysin (*trh*) gene in urease positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States
J. Clin. Microbiol. 35, 1965-1971

Literaturverzeichnis

- OKURA, M.; OSAWA, R.; IGUCHI, A.; ARAKAWA, E.; TERAJIMA, J. und WATANABE, H. (2003)
Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of pandemic group-specific multiplex PCR assay
J. Clin Microbiol. 41, 4676-4682
- OLIVE, D.M. und BEAN, P. (1999)
Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms
J. Clin. Microbiol. 37, 1661-1669
- OLIVER, J.D. (1993)
Formation of viable but nonculturable cells
In: KJELLEBERG, S: Starvation in bacteria
Plenum Press, New York, USA, 239-272
- OLIVER, J.D. (2003)
Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples
In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Hrsg.): Culture media for food microbiology (2. Aufl.)
Elsevier Science, Amsterdam, Niederlande, 249-270
- OLIVER, J.D. (2005)
The viable but nonculturable state in bacteria
J. Microbiol. 43, 93-100
- OLIVER, J.D. und BOCKIAN, R. (1995)
In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*
Appl. Environ. Microbiol. 61, 2620-2623
- OLIVER, J.D. und KAPER, J.B. (2001)
Vibrio Species
In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. und MONTVILLE, T.J. (ed): Food microbiology, fundamentals and frontiers (2nd ed)
ASM (American Society of Microbiology) Press, Washington D.C., USA, 263-300
- OSAWA, R.; OKITSU, R.; MOROZUMI, H. und YAMAI, S. (1996)
Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related hemolysin genes
Appl. Environ. Microbiol. 62, 725-727
- OTTAVIANI, D.; MASINI, L. und BACCHIOCCHI, S. (2003)
A biochemical protocol for the isolation and identification of current species of vibrio in seafood.
J. Appl. Microbiol. 95, 1277-1284

Literaturverzeichnis

- OVERMAN, T.L.; KESSLER, J.F. und SEABOLT, J.P. (1985)
Comparison of API 20E, API rapid E, and API rapid NFT for identification of members of the family Vibrionaceae
J. Clin. Microbiol. 22, 778-81
- PALLERONI, N.J. (1984)
Genus I. *Pseudomonas migula* 1984, 237 AL
In: KRIEG, N.R., HOLT, J.G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Bd. 1
Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, 141-199
- PARISI, A.; OTTAVIANI, D.; ADDANTE, N.; STEAL, A.; NORMANNO, G.;
MONTAGNA, C. O. und CHIOCCO, D. (2005)
Amplified Fluorescent Length Polymorphism fingerprinting characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafoods collected from Adriatic Sea, Italy
Poster des Instituto Zooprofilattico Sperimentaledella Puglia e della Basilicata, Sez.
diagnostica di Putignano (BA)
<http://www.fg.izs.it/izs/formazione/poster%20coli.pdf>
- PARK, T.S.; OH, S.H.; LEE, E.Y.; LEE, T.K.; PARK, K.H.; FIGUERAS, M.J. und CHANG, C.L., (2003)
Misidentification of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* as *Vibrio alginolyticus* by the Vitek system
Lett. Appl. Microbiol. 37, 349-353
- PARK, K.-S.; ONO, T.; ROKUDA, M.; JANG, M.-H.; IDA, T. und HONDA, T. (2004)a
Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*
Microbiol. Immunol. 48, 313-318
- PARK, K.-S.; ONO, T.; ROKUDA, M.; JANG, M.-H.; OKADA, K.; IIDA, T. und HONDA, T. (2004)b
Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 72, 6659-6665
- PARRY, H.E. und PIPE, R.K. (2004)
Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*)
Aquatic Toxicology 69, 311-325
- PAVIA, A.T.; BRYAN, J.A.; MAHLER, K.L.; HESTER, T.R. Jr.; FARMER, J.J. (1989)
Vibrio carchariae infection after a shark bite
Ann. Intern. Med. 11, 85-86
- PENLAND, R.L.; BONIUK, M. und WILHELMUS, K.R. (2000)
Vibrio ocular infections on the U.S. Golf Coast
Cornea 19, 26-29
- PHADTARE, S.; INOUE, M. und SEVERINOV, K. (2004)
The mechanism of nucleic acid melting by a Csp A family protein
J. Mol. Biol. 337, 147-155

Literaturverzeichnis

- PHELPS, E.B. (1908)
A method for calculating the of number of *B. coli* from the results of dilution tests
Amer. J. Pub. Hyg. 4, 141
- PHLS (PUBLIC HEALTH LEADERSHIP SOCIETY) (1996)
Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at the point of sale
PHLS Microbiol. Dig. 13, 41-43
- PICHARDT, K. (1998)
Techniken, Verfahren, Nährböden und Untersuchungsmethoden: *Vibrio parahaemolyticus*
In: PICHARDT, K. (Hrsg.): Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis (4.Aufl.)
Springerverlag, Berlin, 162-166
- PODA, G. (1997)
Vibrio
In: Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari
Dossier del Centro di documentazione per la salute della Regione Emilia-Romagna
- POPOFF, M. (1984)
Genus III *Aeromonas Kluyver and Van Niel* 1936, 398 AL
In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Hrsg.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Bd. 1
Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, 545-584
- POTEMPA, A. (2004)
Vibrio parahaemolyticus, oysters - USA (Alaska): bacterium sickens raw oysters eaters
Anchorage Daily News, 3. August 2004
- PRESEPI, D.; SERRATORE, P.; MILANDRI, S.; VIVIANI, R. und PAESANTI, F. (1997)
Valutazione del prosecco di decontaminazione microbiologica in molluschi bivalvi tabulati in
acque marine idonee
L'Igiene Moderna 107, 311-326
- PRIEUR, D.; MEVEL, G.; NICOLAS, J.L.; PLISQUELLEC, A. und VIGNEULLE, M.
(1990)
Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment
Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. 28, 277-352
- PRODUKTSCHAP VOOR VIS EN VISPRODUCTION; THE NETHERLANDS (1994)
Guides to good Practice
Annex V, Processing Molluscs/Crustaceans
- PUND, R.-P. (2008)
Bild: Kontaminationsanlage
In: Herstellung von Referenzmaterial
Vortrag anlässlich des Expertengesprächs des Nationalen Referenzlabors für virale und
bakterielle Kontaminanten in zweischaligen Weichtieren vom 10.01.2008 am Bundesinstitut
für Risikobewertung in Berlin
- PUND, R.-P. (2008)
persönliche Mitteilung

Literaturverzeichnis

- QUILICI, M.L.; ROBERT-PILLOT, A.; PICARD, J. und FOURNIER, J.M. (2005)
Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France
Emerg. Infect. Dis. 11, 1148-1149
- RAIMONDI, D.; KAO, J.P.Y.; KAPER, J.B.; GUANDALINI, S. und FASANO, A. (1995)
Calcium dependent intestinal chlorid secretion by *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in a rabbit model
Gastroenterology 109, 381-386
- RAIMONDI, F.; KAO, J.P.Y.; FIORENTINI, C.; FABBRI, A.; DONELLI, G. und GASPARINI, N. (2000)
Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in vitro systems
Infect. Immun. 68, 3180-3185
- RANDA, M.A.; POLZ, M.F. und LIM, E. (2004)
Effets of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR
Appl. Environ. Microbiol. 70, 5469-5476
- RAWLINGS, N.D.; FRASER, R.M.; KOK, C.Y. und BARRETT, A.J. (2007)
MEROPS the peptidase database
Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge CB10 1SA, UK
<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/speccards?sp=SP001107&type=P>
- RAYMAN, M.K.; ARIS, B. und EL DERE, H.B. (1978)
The effect of compounds which degrade hydrogen peroxide on the enumeration of heat-stressed cells of *Salmonella senftenberg*
Can. J. Microbiol. 24, 883-885
- REICH, K.A. und SCHOOLNIK, G.K. (1994)
The light organ symbiont *Vibrio fisheri* possesses a homolog of the *Vibrio cholerae* transmembrane transcriptional activator *toxR*
J. Bacteriol. 176, 3085-3088
- REMY, H.; PUND, R.-P.; BUHLER, C.; ALTER, T.; HILDEBRANDT, G. und ELLERBROEK, L. (2007)
Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus* in Fischereierzeugnissen. Erste Erfahrungen mit einem neuartigen Selektivnährboden
Arch. Lebensm. Hyg. 58, 121-123
- RICHARDS, G.P. (1998)
Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying
J. Food. Prot. 51, 218-251
- RIPABELLI, G.; SAMMARCO, M.L.; GRASSO, G.M.; FANELLI, I.; CAPRIOLI, A. und LUZZI, I. (1999)
Occurrence of vibrio and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from the Adriatic Sea, Italy
Int. J. Food Microbiol. 49, 43-48

Literaturverzeichnis

RKI (2002)

Einsatz immunologischer Untersuchungsverfahren in der Umweltmedizin - Eine Einführung
Empfehlungen des Robert-Koch-Institut
Umweltmed. Forsch. Prax. 7, 351-355

ROBERTS, N.C.; BRADFORD, H.B. Jr. und BARBY, J.R. (1984)

Ecology of *Vibrio cholerae* in Louisiana coastal areas
In: COLWELL, R.R. (ed): Vibrios in the environment
John Wiley and Sons, New York, USA, Chap. 22, 395

ROLLE, M. und MAYR, A. (2002)

Allgemeine Bakteriologie
In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre (7.Aufl.)
Enke Verlag, Stuttgart, 377-416

RUIMY, R.; BREITMAYER, V.; ELBAZE, P.; LAFAY, B.; BOUSSEMART, O.;
GAUTHIER, M. und CHRISTINE, R. (1994)

Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and
Plesiomonas deduced from small-subunit rRNA sequences
Int. J. Syst. Bact. 44, 416-426

RUPPERT, E.E. und BARNES, R.D. (1994)

Invertebrate Zoology (6th ed)
Saunders College, Fort Worth, 365-489

SAKAZAKI, R. (1965)

Vibrio parahaemolyticus, isolation and identification
Nihon Eiyo Kagaku Co. Press, Tokio, Japan

SAKAZAKI, R. (1972)

BTB teepol agar in media for bacteriological examination
Kindai Igaku Co., Tokio, Japan

SAKAZAKI, R.; TAMURA, K.; KATO, T.; OBARA, Y.; YAMAI, S. und HOBBO, K (1968)
Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus* III
enteropathogenicity

Jpn. J. Med. Sci Biol. 21, 325-331

SAKURAI, J.; MATSUZAKI, A. und MIWATANI, T. (1973)

Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio*
parahaemolyticus
Infect. Immun. 8, 775-780

SANYAL, S.C. und SEN, P.C. (1974)

Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*
In: FUJINO, T., SAKAGUCHI, G., SAKAZAKI, R. und TAKEDA, Y. (Hrsg.): International
symposium on *Vibrio parahaemolyticus*
Saikon Publishing Company, Tokio, 227-230

Literaturverzeichnis

- SCHMIDT, M.A.; RAUTENBERG, K.; CICHON, C. und GÄRTNER, J. (1998)
Molekular- und Zellbiologie von M-Zellen der Peyer'schen Plaques
Institut für Infektiologie, Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelm-Universität,
Münster
<http://www.uni-muenster.de/Rektorat/Forschungsberichte-1997-1998/fo05bma01.htm>
- SCHUBRING, R. und REHBEIN, H. (2007)
Fisch und Muscheln - Natürlich-funktionelle Lebensmittel
Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Forschungsbereich: Fischqualität
Forschungsreport 1/2007, 27-29
- SCHÜTTE, J. (2007)
Cholera
Medicalpictures, Bilderwelten für den Gesundheitsmarkt, Köln
http://www.medicalpicture.de/cont_196.cholera.php
- SCHUTZSTATION WATTENMEER (2007)
Naturschutzgesellschaft Wattenmeer e.V.
Grafenstraße 23, 24768 Rendsburg
<http://www.schutzstation-wattenmeer.de>
- SCIPIONI, A. (2000)
Persönliche Mitteilung. Extrakt aus einem Bericht des belgischen Veterinär-Instituts,
Risikobewertung der EU
- SEED, R. (1976)
Marine Molluscs: their ecology and physiology (ed. B.L. Bayne)
Cambridge University Press, Cambridge, 13-65
- SHIMIZU, U. (1976)
Microorganism and food
In AISO, K. (Hrsg.): Food microbiology
Ishiyaku Publishers, Inc., Tokio, 183-206
- SHYU, Y.C. und LIN, F.P. (1999)
Cloning and characterization of manganese superoxide dismutase gene from *Vibrio*
parahaemolyticus and application for preliminary identification of vibrio strains
IUBMB Life 48, 345-352
- SIDDALL, S.E. (1980)
A classification of the genus *Perna* (Mytilidae)
Bull. Mar. Sci. 30, 858-870
- SIEFFERT, M. (2003)
Nachweis und Differenzierung von *Vibrio* sp. in Krusten- und Schalentieren und
Erzeugnissen daraus unter besonderer Berücksichtigung der routinemäßigen Diagnostik
Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität, München
Deutschland

Literaturverzeichnis

- SIFIN (2006)
Salt Polymyxin Broth (Base), Rezeptur TN 1293
SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin, Deutschland
<http://www.sifin.de/english/produktinfo/salt-polymyxin-broth-base-spb-tn1293.pdf>
- SIMIDU, U.; ASHINO, K. und KANEKO, E. (1971)
Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan
Microbiol. 17, 1157-1160
- SIMIDU, U.; KANEKO, E. und TAGA, N. (1977)
Microbial studies of Tokyo Bay
Microb. Ecol. 3, 172-191
- SKARLOW, S.S.; COLWELL, R.R.; CHAPMAN, G.B. und ZANE, S.F. (1973)
Characteristics of a *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment
Can. J. Microbiol. 19, 1519-1520
- SOCHARD, M.R.; WILSON, D.F.; AUSTIN, B. und COLWELL, R.R. (1979)
Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods
Appl. Environ. Microbiol. 37, 750-759
- SOGAARD, H. (1982)
The pharmacodynamic of polymyxin antibiotics with special reference to drug resistance liability
J. Vet. Pharmacol. Ther. 5, 219-231
- SOMMER, U. (2006)
Biologische Meereskunde (2.Aufl.)
Springerverlag, Heidelberg, Deutschland
- SPIRA, W.M. (1984)
Tactics for detecting pathogenic vibrios in the environment
In: COLWELL, R. R. (Hrsg.): Vibrios in the environment
John Wiley & Sons, New York, USA, 251-268
- STENGEL, G. (2008)
Aussagen zum bakteriellen Status schleswig-holsteinischer Muschelerzeugungsgebiete
Diskussionsbeitrag anlässlich des Expertengesprächs des Nationalen Referenzlabors für virale und bakterielle Kontaminanten in zweischaligen Weichtieren vom 10.01.2008 am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin
- STORCH, V. und WELSCH, U.(2004)
Systematische Zoologie. (6.Aufl.)
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 191-196
- STROM, M.S. und PARANIPYE, R.N. (2000)
Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*
Microb. Inf. 73, 177-188

Literaturverzeichnis

- STUPPERICH, E.; HERZIG, J. und VOLZ, F.
Optische Dichte
Kurzinformation der NUGI, Netzwerk, Universität, Gymnasien, Industrie, Institut für
Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Ulm
<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Grundlagen/OptischeDichte/Zusatzinfo.html>
- STURMAN, P.; LENNOX, J. und WILLIAMS, D. (2007)
A biofilm primer
Centre for Biofilm Engineering, Montana State University, USA
http://www.biofilmsonline.com/cgi-bin/biofilmsonline/ed_intro_primer.html
- STYLES, M.F.; HOOVER, D.G. und FARKAS, D.F. (1991)
Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic
pressure.
J. Food Sci. 56, 1404-1407
- SU, Y.-C.; DUAN, J. und WU, W.-H. (2005)
Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Prot. 68, 1454-1456
- SUMIKI, Y. (1961)
Polymyxins
In SUMIKI, Y. (Hrsg.): Antibiotics, Bd. 2
Tokyo University Press, Tokio, 809-820
- SUNÉN, E.; ACEBES, M. und FERENANDEZ-ASTORGA, A. (1995)
Occurrence of potentially pathogenic vibrios in bivalve molluscs (mussels and clams) from
retail outlets in the North of Spain
J. Food Safety 15, 275-281
- SZEWZYK, U. und SZEWZYK, R. (2003)
Biofilme - die etwas andere Lebensweise
Biospektrum 9, 253-255
- TACKET, C.O.; BRENNER, F. und BLAKE, P.A. (1984)
Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections
J. Infect. Dis. 149, 558-561
- TADA, J.; OHASHI, T.; NISHIMURA, N.; SHIRASAKI, Y.; OZAKI, H., FUKUSHIMA, S.;
TAKANO, J. und NISHIBUCHI, M. (1992)
Detection of thermolabile direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-
related hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*
Mol. Cell. Probes 6, 477-487
- TAKIKAWA, I. (1958)
Studies on pathogenic halophilic bacteria
Yokohama Med. Bull. 9, 313-322
- TAMPLIN, M. L. und CAPERS, G. M. (1992)
Persistence of *Vibrio vulnificus* in tissues of gulf coast oysters, *Crassostrea virginica*, exposed
to seawater disinfected with UV-light
Appl. Environ. Microbiol. 58, 1506-1510

Literaturverzeichnis

- TANG, G.-Q.; IIDA, T.; YAMAMOTO, K. und HONDA, T. (1997)
A mutant cell line resistant to *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin (TDH): its potential in identification of putative receptor for TDH
Biochim. Biophys. Acta 1360, 277-282
- TANIGUCHI H.; HIRANO, H.; KUBOMURA, S.; HIGASHI, K. und MIZUGUCHI, Y. (1986)
Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*
Microb. Pathog. 1, 425-432
- TANIGUCHI, H.; KUBOMURA, S.; HIRANO, H.; MIZUE, K.; OGAWA, M. und MIZUGUCHI, Y. (1990)
Cloning and characterisation of a gene encoding a new thermostable hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus*
FEMS Microbiol. Lett. 6, 339-346
- TANTILLO, G.M.; FONTANAROSA, M.; DI PINTO, A. und MUSTI, M. (2004)
Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections
Lett. Appl. Microbiol. 39, 117-126
- TARR, C.L.; PATEL, J.S.; PUHR, N.D.; SOWERS, E.G.; BOPP, C.A. und STROCKBINE, N.A. (2007)
Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination
J. Clin. Microbiol. 45, 134-140
- TEMMYO, R. (1966)
Studies on the prevention of outbreaks of food poisoning by *Vibrio parahaemolyticus*
Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 13, 489-510
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D. und GOERING, R.V. (1997)
How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists
Infect. Control Hosp. Epidemiol. 18, 428-439
- TEPEDINO, A.A. (1982)
Vibrio parahaemolyticus in Long Island oysters
J. Food Prot. 45, 150-151
- THOMPSON, F.L. und SWINGS, J. (2006)
Taxonomy of Vibrios
In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B. und SWINGS, J. (Hrsg.): The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 3, 29-43
- THOMPSON, J. R.; PACOCHA, S.; PHARINO, C.; KLEPAC-CERAJ, V.; HUNT, D.; BENOIT, J.; SARMA-RUPAVTARM, R.; DISTEL, D. L. und POLZ, M. F. (2005)
Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population
Science 307, 1311-1313

Literaturverzeichnis

- THOMPSON, J.R.; RANDA, M.A.; MARCELINO, L.A.; TOMITA, A.; LIM, E.L. und POLZ, M.F. (2004)
Diversity and dynamic of a North Atlantic coastal vibrio community
Appl. Environ. Microbiol. 70, 4103-4110
- THRESH, J.C.; BEALE, J.F. und SUCKLING, E.V. (1933)
The examination of water and water supplies
J. und A. Churchill, London
- TILBURG, J.J.H.C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M., VAN DEN BERKMORTEL, D., ROMBOUT, J., JONKER, K.M. und DE BOER, E. (2000)
Presence of *Vibrio* species in shellfish
Report of the Inspectorate of Health Protection and Veterinary Public Health, de Stoven 22, 7206 AX, Zutphen, Niederlande
- TU-DARMSTADT (2004)
Bild: Aufbau von Weichtieren
Planzen und Tiere des Ökosystems Riff
http://www1.tu-darmstadt.de/schulen/lgg/riff/content/musch_au.html
- TURBETT, G.R.; HØJ, P.B.; HORNE, R. und MEE, B.J. (1992)
Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals
Infect. Immun. 60, 5259-5266
- TWEDT, R.M. (1989)
Vibrio parahaemolyticus
In: DOYLE, M.P. (Hrsg.): Foodborne bacterial pathogens
Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 543-568
- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D. und JOHNSON, W.M. (1997)
Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens
J. Clin.Microbiol. 35, 339-346
- URKAWA, H. und RIVERA, I.N.G. (2006)
Aquatic Environment
In: THOMPSON, F.L., AUSTIN, B., SWINGS, J.: The biology of vibrios
ASM Press, Washington D.C., Chap. 12, 175-189
- VANDERZANT, C. und NICKELSON, R. (1972)
Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions
Appl. Microbiol. 23, 34-37
- VANDERZANT, C.; NICKELSON, R. und PARKER, J.C. (1970)
Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Gulf Coast shrimp
J. Milk food Technol. 33, 161-162
- VELA, G.R. und ROSENTHAL, R.S. (1972)
Effect of peptone on *Azotobacter* morphology
J. Bact. 111, 260-266

Literaturverzeichnis

- VENKATESWARAN, K.; DOHMOTO, N. und HARAYAMA, S. (1998)
Cloning a nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimps
Appl. Environ. Microbiol. 64, 681-687
- VENKATESWARAN, K.; KURUSU, T.; SATAKE, M. und SHINODA, S. (1996)
Comparison of a fluorogenic assay with a conventional method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods
Appl. Environ. Microbiol. 62, 3516-3520
- WALTER, U. und DE LEEUW, D. (2007)
Miesmuschel-Langleinenkulturen - Vom wissenschaftlichen Experiment zur wirtschaftlichen Umsetzung
Inf. Fischereiforsch. 54, 34-39
- WARD, B.Q. (1968)
Isolations of organisms related to *Vibrio parahaemolyticus* from American estuarine sediments
Appl. Microbiol. 16, 543-546
- WARD, L. und BEJ, A. (2006)
Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes
Appl. Environ. Microbiol. 72, 2031-2042
- WATKINS, W.D. und CABELLI, V.J. (1985)
Effect of fecal pollution of *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment
Appl. Environ. Microbiol. 49, 1307-1313
- WEBER, S.; PFALLER, M.A. und HERWALDT, L.A. (1997)
Role of molecular epidemiology in infection control
Infect. Dis. Clin. North Am. 11, 257-278
- WEST, A. (1989)
The human pathogenic vibrios - a public health update with environmental perspectives
Epidemiology and Infection 103, 1-33
- WEST, J.B. (1985)
Control of the gastrointestinal system
In: WEST, J.B.(Hrsg.): Best and Taylor's physiological basis of a medical practice (11. Aufl.)
Williams and Wilkins, Baltimore, 636-641
- WEST, P.A.; RUSSEK, E.; BRAYTON, P.R. und COLWELL, R.R. (1982)
Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agars
J. Clin. Microbiol. 16, 1110-1116
- WICHELHAUS, T.A.; SCHÄFER, V. und BRADE, V. (2000)
Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie
Chemotherapie Journal 9, 93-98

Literaturverzeichnis

- WILLIAMS, P., (2000)
Heterotrophic bacteria and the dynamics of dissolved organic material
In: KIRCHMAN, D.L (Hrsg.): Microbial ecology of the oceans
Wiley-Liss, Inc., New York, USA, 153-200
- WILLIAMS, L.A. und LAROCK, P.A (1985)
Temporal occurrence of *Vibrio* species and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments
Appl. Environ. Microbiol. 50, 1490-1495
- WONG, H.C.; PENG, P.Y.; LAN, S.L.; CHEN, Y.C.; LU, K.H.; SHEN, C.T. und LAN, S.F. (2002)a
Effects of heat shock on the thermotolerance, protein, and toxin production of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Prot. 65, 499-507
- WONG, H.C.; CHUNG, Y.-C. und YU, J.-A. (2002)b
Attachment and inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface
Food Microbiol. 19, 341-350
- WONG, H.C. und LIN, C.-H. (2001)
Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR-methods using specific primers
J. Clin. Microbiol. 39, 4233-4240
- WONG, H.C. und WANG, P. (2004)
Induction of viable but non-culturable state of *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses
J. Appl. Microbiol. 96, 359-366
- WONG, H.C.; LU, K.-T.; PAN, T.-M.; LEE, C.-L. und SHIH, D.Y. (1996)
Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis
J. Clin. Microbiol. 34, 1535-1539
- WONG, H.C.; PENG, P.Y.; HAN, J.M.; CHANG, C.Y. und LAN, L.S. (1998)
Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 66, 3066-3071
- WONG, H.C.; SHEN, C.T.; CHANG, C.N.; LEE, Y.S. und OLIVER, J.D. (2004 a)
Biochemical and virulence characterization of viable but non-culturable cells of *Vibrio parahaemolyticus*
J. Food Prot. 67, 2430-2435
- WONG, H.C.; WANG, P.; CHEN, S.Y. und CHIU, S.W. (2004 b)
Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium
FEMS Microbiol. Lett. 233, 269-275
- XIA, B.; KE, H. und INOUE, M. (2001)
Acquirement of cold sensitivity by quadruple deletion of csp A family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. 40, 179-188

Literaturverzeichnis

- XU, H.S.; ROBERTS, N.; SINGLETON, F. L.; ATTWELL, R.W.; GRIMES, D.J. und COLWELL, R.R. (1982)
Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in estuarine and marine environment
Microb. Ecol. 8, 313-323
- XU, M.; IIDA, T.; YAMAMOTO, K.; TAKARADA, Y.; MIWATANI, T. und HONDA, T. (1994)
Demonstration and characterization of simultaneous production of a thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) by a clinically isolated *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3766
Infect Imm. 62, 166-171
- YAMAICHI, Y.; IIDA, T.; PARK, K.-S.; YAMAMOTO, K. und HONDA, T. (1999)
Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species
Mol. Microbiol. 31, 1513-1521
- YAMAMOTO, T. und YOKOTA, T. (1989),
Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines.
Infect. Immun. 57, 2410-2419
- YEUNG, P. S. und BOOR, K. J. (2004)
Effects of acid stress on *Vibrio parahaemolyticus* survival und cytotoxicity
J. Food Prot. 67, 1328-1334
- YEUNG, P.S.M.; HAYES M.C.; DE PAOLA, A.; KAYSNER, C.A.; KORNSTEIN, L. und BOOR, K. J. (2002)
Comparative phenotypic molecular, and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 Isolates
Appl. Environ. Microbiol. 68, 2901-2909
- YOH, M.; HONDA, T. und MIWATANI, T. (1986)a
Purification and partial characterization of a *Vibrio hollisae* hemolysin that relates to the thermostable direct hemolysine of *Vibrio parahaemolyticus*
Can. J. Microbiol. 32, 632-636
- YOH, M.; HONDA, T. und MIWATANI, T. (1986)b
Purification and partial characterization of a non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin that cross-reacts with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*
Infect. Immun. 52, 319-322
- YOUNGER, A.D.; LEE, R. J. und LEES, D. N. (2005)
Microbiological monitoring of bivalve mollusc harvesting areas in England and Wales - rationale and approach.
CRL/Cefas (Community Reference Laboratory/ Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science) UK
<http://www.crlcefas.org/InformationCentre/docs/Younger.pdf>

Literaturverzeichnis

- YU, P.; PUHR, N.; BOPP, C.; GERNER-SMIDT, P. und PAINTER, J. (2006)
Vibrio parahaemolyticus hemolysins associated with decreased hospitalization from shellfish-borne illness
Internationale Konferenz über Aufkommende Infektionskrankheiten 19. - 22. März 2006 in Atlanta, USA, Abstract 475
- ZHU, J. und MEKALANOS, J.J. (2003)
Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*
Dev. Cell: 5, 647-656
- ZOBELL, C.E. (1941)
Studies on marine bacteria. 1. The cultural requirements of heterotrophic aerobes
J. Mar. Res. 4, 42-75

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Humane Erkrankungsfälle durch <i>V. parahaemolyticus</i> der letzten 30 Jahre.....	46
Tabelle 2: Nährbodenvergleich - Koloniemorphologie von <i>Vibrio</i> spp. auf CVA (Quellen: GOMEZ-GIL und ROQUE, 2006; HARA-KUDO et al. 2001; MAST DIAGNOSTICA, 2006).....	62
Tabelle 3: Zum Nährbodenvergleich eingesetzte <i>Vibrio</i> spp. Stämme.....	63
Tabelle 4: Zum Nährbodenvergleich eingesetzte Nicht- <i>Vibrio</i> spp. Stämme.....	63
Tabelle 5: Nährbodenvergleich (qualitativ): Überblick über Art und Anzahl der eingesetzten <i>Vibrio</i> spp.- und Nicht- <i>Vibrio</i> spp.-Stämme.....	64
Tabelle 6: Nährbodenvergleich (quantitativ): Eingesetzte <i>Vibrio</i> spp.-Stämme und deren Kombinationen.....	65
Tabelle 7: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen - Überblick über die Art der Modifikationen.....	65
Tabelle 8: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen - Eingesetzte Bakterienspezies und -konzentrationen in Wachstumsuntersuchungen mit Begleitflora.....	69
Tabelle 9: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora - Spezieskombinationen und -konzentrationen.....	71
Tabelle 10: Wasserqualität der Halteanlage.....	75
Tabelle 11: Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> in kontaminierten Muscheln - Verwendete <i>Vibrio</i> spp. Stämme und deren Konzentration /ml Tankwasser.....	76
Tabelle 12: API 20 E: Tests/Reaktionen und Interpretationsanweisung.....	81
Tabelle 13: Molekularbiologischer Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> mittels PCR - Sequenzen der Primerpaare und Größe des PCR-Produkts (bp = basepairs) nach KIM et al. (1999) und TADA et al. (1992).....	82
Tabelle 14: Molekularbiologischer Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> mittels PCR - Art und Menge der PCR-Komponenten	83
Tabelle 15: Molekularbiologischer Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> mittels PCR - Thermocycler-Programm.....	84
Tabelle 16: Nährbodenvergleich - Koloniemorphologie der untersuchten Keime vergleichend auf CVA und TCBS-Agar.....	88
Tabelle 17: Nährbodenvergleich - Anteile (%) und Farben der koloniebildenden Einheiten (KbE) der verschiedenen <i>V. parahaemolyticus</i> -Mischungen vergleichend auf CVA und TCBS-Agar.....	89
Tabelle 18: Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> - Nährbodenvergleich: Überblick der Ergebnisse der Sensitivitäts- bzw. Spezifitätsprüfung von TCBS bzw CVA.....	91
Tabelle 19: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 48h ..	94

Anhang

Tabelle 20: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 6h...	95
Tabelle 21: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Parameter der Regressionsanalyse (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 48 Stunden.....	97
Tabelle 22: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Parameter der Regressionskurve (Keimzahl gegen optische Dichte) nach 6 Stunden.....	99
Tabelle 23: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve) nach 6 Stunden: Parameter der Regressionskurve (Keimzahl gegen optische Dichte).....	101
Tabelle 24: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW: Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration - Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter und Umrechnung der optischen Dichte nach 6 Stunden.....	107
Tabelle 25: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Statistische Parameter und Umrechnung der optischen Dichte nach 6 Stunden	109
Tabelle 26: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen; kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden.....	110
Tabelle 27: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen; Differenzen zwischen 6h- und 48-h- Keimdichten.....	111
Tabelle 28: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; kulturell bestimmte Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden	112
Tabelle 29: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat Differenzen zwischen 6h- und 48h-Keimdichten.....	112
Tabelle 30: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter der 6-Stunden Werte.....	114
Tabelle 31: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat Analyse der 6h Werte.....	115

Anhang

Tabelle 32: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen; Statistische Parameter der 6-Stunden Werte.....	116
Tabelle33: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw. 5% Pepton: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; statistische Parameter der 6-Stunden Werte.....	118
Tabelle 34: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Statistische Parameter der Wiederholungsuntersuchungen.....	119

9.2 Bildverzeichnis

Abbildung 1: Filtrationsleistungsvermögen von Miesmuscheln (ALDEBARAN, 1997).....	4
Abbildung 2: Aufbau einer Miesmuschel (TU-DARMSTADT, 2004).....	6
Abbildung 3: <i>V. parahaemolyticus</i> : Elektronenmikroskopische Aufnahme (verkleinertes Bild) (MAKINO et al., 2003).....	16
Abbildung 4: Optimierung der kulturellen Methoden zum Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> in Muscheln - Versuchsaufbau.....	53
Abbildung 5: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen - Keimzahlbestimmung mittels Photometrie (hier: Vorgehen bei Anfertigung der Eichkurve; bei den Messreihen entfiel mit Ausnahme der 48-Stunden-Messung die zusätzliche kulturelle Keimzahlbestimmung bei den einzelnen Messungen).....	67
Abbildung 6: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora: Herstellung eines Inokulums und Dotieren der Probe.....	71
Abbildung 7: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in verschiedenen APW-Modifikationen in Anwesenheit von Begleitflora: a) Wachstumsvergleich b) Ansetzen von MPN (Darstellung der im zweiten Schritt beimpften Platten fehlt) und OSV.....	73
Abbildung 8: Kontaminationanlage: links Kühlaggregat, rechts Kontaminationsbecken im Kühlbecken (PUND, 2008).....	76
Abbildung 9: Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> in kontaminierten Muscheln - Kontamination und Untersuchung der Tiere.....	77
Abbildung 10: Nährbodenvergleich - Reinkulturen von <i>V. parahaemolyticus</i> (links) und <i>V. vulnificus</i> (rechts) auf CVA im Hellfeld aufgenommen.....	87
Abbildung 11: Nährbodenvergleich - <i>V. alginolyticus</i> 42-179/06 M36/2 auf TCBS-Agar.....	89
Abbildung 12: Nährbodenvergleich - Mischungen von <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. vulnificus</i> auf CVA (links) und TCBS-Agar (rechts) im Dunkelfeld.....	90

Anhang

Abbildung 13: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden.....	93
Abbildung 14: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden.....	95
Abbildung 15: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) und Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden.....	97
Abbildung 16: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden.....	98
Abbildung 17: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm (Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 48 Stunden.....	100
Abbildung 18: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Proben mit <i>V. vulnificus</i> -Reinkulturen und Muschelhomogenat (Eichkurve): Streudiagramm(Keimzahl gegen optische Dichte) mit Regressionskurve, beobachtet über 6 Stunden.....	101
Abbildung 19: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variation des pH-Werts und verschiedene Tris-Konzentrationen: Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden).....	103
Abbildung 20: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - ungepuffertes APW und Tris-APW, pH 8,5 (verschiedene Tris-Konzentrationen): Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden).....	104
Abbildung 21: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Tris-APW, pH 8,0 (verschiedene Tris-Konzentrationen) Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden).....	105
Abbildung 22: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Tris-APW; pH 7,5 (verschiedene Tris-Konzentrationen): Wachstumsverlauf in Proben mit Reinkulturen (optische Dichte über 6 Stunden).....	106
Abbildung 23: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Variationen des pH-Werts und der Tris-Konzentration: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat; Streudiagramm mit Regressionskurve, Keimzahl in log 10 und optischer Dichte über 6 Stunden.....	108

Anhang

Abbildung 24: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5) und 5% NaCl: Proben mit Reinkulturen/ Reinkulturen und Muschelhomogenat; Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden.....	114
Abbildung 25: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw.5% Pepton: Proben mit Reinkulturen: Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden.....	116
Abbildung 26: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) und 3% bzw.5% Pepton: Proben mit Reinkulturen und Muschelhomogenat: Optische Dichte im Verlauf von 6 Stunden.....	117
Abbildung 27: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden.....	120
Abbildung 28: Photometrische Untersuchung des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in unterschiedlich modifiziertem APW - Vergleich von ungepuffertem APW, T-APW (0,01M, pH 8,5) und T-APW (0,01M, pH 8,5, 5% NaCl): Gesamtkeimzahl nach 48 Stunden aufgetrennt nach den eingesetzten Stämmen.....	121
Abbildung 29: Vergleich des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von <i>V. alginolyticus</i> und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimzahlen nach 24-stündiger Bebrütung.....	123
Abbildung 30: Vergleich des Wachstums von <i>V. parahaemolyticus</i> in herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl) in Anwesenheit von <i>V. alginolyticus</i> und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimzahlen von <i>V. parahaemolyticus</i> DSM 10027 und <i>V. alginolyticus</i> DSM 2171(links) bzw. <i>V. alginolyticus</i> 42-149/06 M36/2 (rechts) und Nicht-Vibrio-Begleitflora nach 24-stündiger Bebrütung.....	124
Abbildung 31: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Anwesenheit von <i>V. alginolyticus</i> und Begleitflora - Vergleich zu herkömmlichem APW und T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl): Boxplotdarstellung der Keimzahlen nach 24-stündiger Bebrütung.....	126
Abbildung 32: Wachstum von <i>V. parahaemolyticus</i> in T-APW (0,01 M; pH 8,5; 5% NaCl; 2% Arabinose) in Anwesenheit von <i>V. alginolyticus</i> und Begleitflora: Boxplotdarstellung der Keimdichten von <i>V. parahaemolyticus</i> DSM 10027 im Verhältnis zu <i>V. alginolyticus</i> DSM 2171 (links) bzw. <i>V. alginolyticus</i> 42-149/06 M36/2 (rechts).....	127
Abbildung 33: Gegenüberstellung von MPN und OSV-Verfahren: Boxplotdarstellung der ermittelten Keimzahlen von <i>V. parahaemolyticus</i> in T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose).....	129
Abbildung 34: Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> und <i>V. alginolyticus</i> in kontaminierten Muscheln mittels MPN-Methode und T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose): Balkendiagramm der Mittelwerte.....	132

Anhang

Abbildung 35: Nachweis von <i>V. parahaemolyticus</i> mittels MPN-Methode und T-APW (0,01 M, pH 8,5, 5% NaCl, 2% Arabinose): Differenzen zwischen theoretischer und praktischer Keimdichte.....	133
---	-----

Publikationsverzeichnis

Remy, H.; R.-P. Pund; C. Buhler, T. Alter; G. Hildebrandt und L. Ellerbroek
Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus* in Fischereierzeugnissen. Erste Erfahrungen mit
einem neuartigen Selektivnährboden
Arch. Lebensm. Hyg. 2007; 58, 121-123

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zunächst bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Goetz Hildebrandt (Leiter a.D. des Instituts für Lebensmittelhygiene der FU Berlin), für die stets gewährte freundliche wie konstruktive Unterstützung auch während seines Ruhestandes.

Herrn PD Dr. Lueppo Ellerbroek, Leiter der Fachgruppe 42 des Bundesinstituts für Risikobewertung, möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine fachliche Beratung, sowie für seinen Einsatz zur Beschaffung der benötigten materiellen und finanziellen Mittel danken.

Weiterer Dank gilt meinem Drittgutachter, Herrn Professor Dr. Jörg Oehlenschläger (wissenschaftlicher Direktor a.D. der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel am Standort Hamburg).

Für die wissenschaftliche Betreuung geht ein weiterer Dank an den wissenschaftlichen Mitarbeiter am NRL für bakterielle Muschelkontaminanten/Leiter der Muschelhaltung der Fachgruppe 3Z, Herrn Dr. Ralf-Peter Pund, der mir eine wichtige Hilfe beim Aufbau der Versuche war und den ich jederzeit mit Fragen löchern durfte.

Bezüglich der praktischen Arbeiten gilt mein Dank Frau Christiane Buhler, technische Assistentin am NRL für bakterielle Muschelkontaminanten, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich dem stellvertretenden Leiter des NRLs für bakterielle Muschelkontaminanten, Herrn Dr. Thomas Alter danken, der mir bei der Erstellung der Arbeit ein wichtiger Ansprechpartner war.

Der wissenschaftlichen Mitarbeiterin der Fachgruppe 33, Frau Annett Martin, danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Fachgruppe 42 (auch den temporären) des Bundesinstituts für Risikobewertung im allgemeinen und Frau Christiane Dittmar-Gabor im besonderen, die mich so freundlich in ihrer Abteilung aufgenommen haben.

Mein besonderer Dank geht an meinen Lebensgefährten Christian Zieme, der viel Verständnis aufbringen musste und mich jederzeit geistig, moralisch und computertechnisch unterstützt hat.

Abschließend möchte meiner Familie und dabei besonders meinen Eltern danken, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben und damit den Grundstein zu dieser Arbeit gelegt haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Helen Remy