

Entwicklung einer quantitativen Real-Time PCR Methode zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Trophologin Raha Vatanparast

2016

Referentin: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Brita Maria Watkinson

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Günter Klein

Tag der Promotion: 15. Juli 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
Zusammenfassung.....	XIII
Abstract.....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund und Problemstellung.....	1
1.2 Literaturübersicht.....	4
1.2.1 Mikrobiologische Qualität des Geflügelfleischs.....	4
1.2.1.1 Hintergrund.....	4
1.2.1.2 Haltbarkeitsdauer.....	6
1.2.1.3 Mikrobielle Assoziation.....	8
1.2.1.4 Mikrobieller Verderb.....	11
1.2.2 Gesamtkeimzahl.....	12
1.2.2.1 Gesamtkeimzahl als Indikator für die mikrobiologische Qualität.....	12
1.2.2.2 Methoden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln.....	12
1.2.2.3 Plattenkulturverfahren.....	14
1.2.2.4 Aspekte der Standardmethode.....	15
1.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
1.2.3.1 Hintergrund.....	17
1.2.3.2 Prinzip der Methode.....	18
1.2.3.3 Detektionssysteme.....	19
1.2.3.4 Quantitative Analyse.....	24
1.2.3.5 Grundsätzliche Aspekte der Real-Time PCR-Quantifizierung.....	25
1.2.4 Anwendung der qPCR in der Lebensmittelmikrobiologie.....	27
1.2.4.1 Hintergrund.....	27
1.2.4.2 Aspekte der Anwendung von qPCR in der Lebensmittelmikrobiologie.....	28

1.2.5	Überprüfung der verfügbaren Literatur	31
1.2.6	<i>rpoB</i> -Gen als Amplifikationsziel	33
1.2.7	Identifizierung von Bakterien mittels der 16S rDNA-Analyse	35
1.2.7.1	Hintergrund	35
1.2.7.2	Aspekte der 16S rRNA-Sequenzenanalyse	36
1.3	Zielsetzung und Aufbau der Versuche.....	37
2	Material	39
2.1	Chemikalien	39
2.2	Lösungen und Puffer	40
2.3	Kulturmedien	40
2.4	Oligonukleotide	43
2.5	PCR-Reagenzien	43
2.6	PCR-Kits	44
2.7	Geräte	44
2.8	Software	44
2.9	DNA-Extraktionsverfahren	45
2.9.1	DNA-Extraktionskit	45
2.9.2	Komponenten des Kits	45
2.9.3	Genereller Überblick über das Arbeitsprotokoll.....	45
2.9.4	Durchführung	46
2.10	DNA-Aufreinigungsverfahren.....	47
2.10.1	DNA Purification Kit.....	47
2.10.2	Prinzip der Methode	47
2.10.3	Komponenten des Kits	48
2.10.4	Durchführung	48
2.11	Bestimmung der DNA-Qualität und DNA-Ausbeute	48
2.11.1	Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer	48
2.11.2	Prinzip der Messung	49
2.11.3	Durchführung der Messung	49
2.12	Elektrophoretische Trennung der DNA	50

2.12.1	Prinzip der Methode	50
2.12.2	Material	50
2.12.3	Durchführung	51
2.13	Real-Time PCR	52
2.13.1	Real-Time PCR Gerät	52
2.13.2	Chromo4™ Real-Time PCR Detector	52
2.13.3	DNA Engine Opticon® 2 System, Version 3.1	53
3	Eigene Untersuchungen	54
3.1	Vorversuche mittels Real-Time PCR-Analyse	54
3.1.1	Ziel und Aufbau der Versuche	54
3.1.2	Methode	54
3.1.3	Ergebnisse	57
3.1.4	Diskussion.....	62
3.1.5	Schlussfolgerung.....	63
3.2	Identifizierung der Geflügelfleischflora mittels 16S rRNA-Sequenzenanalyse.....	65
3.2.1	Ziel und Aufbau der Versuche	65
3.2.2	Methode	66
3.2.2.1	Isolation der Bakterien aus den Geflügelfleischproben	66
3.2.2.2	Vordifferenzierung der Bakterienkolonien mittels Gramfärbung.....	74
3.2.2.3	DNA-Extraktion aus den ausgewählten Bakterienkolonien	74
3.2.2.4	Bestimmung der Qualität und Ausbeute der gewonnenen Nukleinsäuren	75
3.2.2.5	Real-Time PCR-Analyse	75
3.2.2.6	Aufreinigung und elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte	77
3.2.2.7	Sequenzierung der PCR-Produkte	77
3.2.2.8	BLAST-Analyse und Identifikation der Bakterienspezies	77
3.2.3	Ergebnisse	78
3.2.3.1	Auswertung der Kolonienidentitäten	78
3.2.3.2	Auswertung des DNA-Extraktionsverfahrens.....	80
3.2.3.3	Auswertung der Real-Time PCR Analyse.....	82
3.2.3.4	Auswertung der post-PCR-Analyse	83

3.2.3.5	Auswertung der BLAST-Analyse	85
3.2.4	Diskussion.....	87
3.2.4.1	Identifizierung der Bakterien in Geflügelfleisch	87
3.2.4.2	Qualität der 16S rRNA-Sequenzierung.....	89
3.2.4.3	BLAST-Analyse.....	90
3.2.5	Schlussfolgerung.....	91
3.3	Generieren der Primer.....	92
3.3.1	Ziel und Aufbau der Versuche	92
3.3.2	Methode	93
3.3.2.1	Auswahl des Zielgens für die Quantifizierung der Bakterien	93
3.3.2.2	Generieren der Primer.....	95
3.3.2.3	Durchführung der PCR-Analysen mit Hilfe von generierten Primern.....	98
3.3.3	Ergebnisse	102
3.3.3.1	Auswahl des Zielgens und <i>rpoB</i> -Gensequenzen	102
3.3.3.2	Sequenzalignment und Primergenerieren	103
3.3.3.3	Primerspezifität	103
3.3.3.4	Auswertung der Korrelationsanalysen	104
3.3.4	Diskussion.....	108
3.3.4.1	Auswahl des Zielgens	108
3.3.4.2	Sequenzalignment und Primer-Design	109
3.3.4.3	Einsatz der generierten Primer in der PCR-Analyse.....	113
3.3.5	Schlussfolgerung.....	114
3.4	Korrelationsanalyse.....	115
3.4.1	Ziel und Aufbau der Versuche	115
3.4.2	Methode	115
3.4.3	Ergebnisse	119
3.4.3.1	Bestimmung der Gesamtkeimzahl und Auswertung der PCR-Analysen	119
3.4.3.2	Spezifität des Primerpaares <i>rpoB</i> 15	122
3.4.3.3	Bestimmung der Annealing-Temperatur für <i>rpoB</i> 15	123
3.4.3.4	Korrelationsanalyse.....	127

3.4.4	Diskussion.....	128
3.4.4.1	Korrelationsanalyse.....	128
3.4.4.2	Schmelzkurvenanalyse	136
3.4.4.3	Bestimmung der Annealing-Temperatur für das Primerpaar rpoB 15	137
3.4.5	Schlussfolgerung.....	138
3.5	Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch mittels qPCR	139
3.5.1	Ziel und Aufbau der Versuche	139
3.5.2	Methode	140
3.5.2.1	Erstellung einer Standardkurve mit Hilfe einer Bakterienmischkultur	140
3.5.2.2	Absolute Quantifizierung mit Hilfe der Standardkurve	140
3.5.3	Ergebnisse	142
3.5.3.1	Erfassung der optischen Dichte der Bakterienmischkultur	142
3.5.3.2	Auswertung der qPCR-Analysen	142
3.5.3.3	Auswertung der ermittelten Keimzahlen	147
3.5.4	Diskussion.....	155
3.5.4.1	Erstellung einer geeigneten Kalibrationskurve für die qPCR-Analyse.....	155
3.5.4.2	Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR in Geflügelfleisch	158
3.5.5	Schlussfolgerung.....	165
4	Fazit	168
	Literaturverzeichnis	172
	Anhang.....	190
	Danksagung	220
	Lebenslauf.....	221
	Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen	222

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer PCR	19
Abbildung 2: Die Detektion der PCR-Produkte mit SYBR Green I	20
Abbildung 3: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte (eigene Untersuchung).	21
Abbildung 4: Detektion mit TaqMan [®] - oder 5'-Nuclease-Assays (Bustin et al., 2012).....	23
Abbildung 5: Detektion mit FRET-Sonden (links) und Molecular Beacons (rechts).....	23
Abbildung 6: Durchführung des DNA-Extraktionsverfahrens.	46
Abbildung 7: DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop [™] - Spektrophotometer	50
Abbildung 8: DNA-Marker.....	51
Abbildung 9: Amplifikationskurven aus der PCR-Analyse	58
Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte für Schweinefleischproben.....	59
Abbildung 11: Amplifikationskurven der PCR-Analyse von Geflügelfleischproben	60
Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte für Geflügelfleischproben	60
Abbildung 13: Korrelationsanalyse zwischen den Ct-Werten.....	61
Abbildung 14: Bakterienkolonien auf diversen Selektivagar.....	79
Abbildung 15: Zwei morphologisch unterschiedliche Kolonien auf GSP-Agar.....	80
Abbildung 16: Amplifikationsplots der DNA-Templates.....	83
Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte des ersten PCR Laufs.....	83
Abbildung 18: Sequenzierungsergebnisse.....	84
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse.....	90
Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse der PCR-Analysen Run 1 bis Run 14	107
Abbildung 21: Alignment des Primersets rpoB 15 und dem rpoB-Gen.....	111
Abbildung 22: Ct-Kurven (links) und Tm-Kurven (rechts) mit Hilfe des Primersets rpoB 15	121
Abbildung 23: Amplifikationskurven zur Bestimmung der Spezifität des rpoB 15.....	123
Abbildung 24: Amplifikationskurven resultierend aus der Gradienten-PCR.....	124
Abbildung 25: Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR.....	124
Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate.....	125
Abbildung 27: Ergebnisse der Gradienten-PCR	126
Abbildung 28: Korrelation der Ergebnisse der qPCR	127
Abbildung 29: Periodische Erfassung der Wachstumsrate der Bakterienmischung	142
Abbildung 30: Korrelation zwischen Ct-Werten und Keimkonzentration der Standards.....	143
Abbildung 31: PCR Ergebnisse der Standards	144
Abbildung 32: Standardkurven, erstellt durch die Software Opticon Monitor [™]	146
Abbildung 33: Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate der Standards.....	146
Abbildung 34: PCR-Kurven der Standards von 3 Analysen	147
Abbildung 35: Schmelzkurvenplots der qPCR-Analyse	149

Abbildung 36: Vergleich der Ergebnisse der qPCR-Analysen.....	150
Abbildung 37: Ergebnisse der Korrelationsanalysen.....	153
Abbildung 38: Ct-Kurven der Standards	154
Abbildung 39: Amplifikationsplots und Standardkurven	154
Abbildung 40: Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR	160
Abbildung 41: Die Standardkurven von qPCR-Analysen R7 (n = 29) und R8 (n = 30)	163

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Keimgehalte im Zusammenhang mit der Geflügelfleischgewinnung.....	2
Tabelle 2: Richt- und Warnwerte für rohes Geflügelfleisch ^{a)} (DGHM, 2014).....	5
Tabelle 3: Verfügbare Studien in der Literatur	32
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien	39
Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien.....	41
Tabelle 6: Verwendete Primer	43
Tabelle 7: Verwendete Reagenzien in der PCR-Mischung	43
Tabelle 8: Verwendete Kits.....	44
Tabelle 9: Verwendete Geräte.....	44
Tabelle 10: Verwendete Software.....	44
Tabelle 11: Inhalt des Gen JET PCR Purification Kits	48
Tabelle 12: PCR-Mischungsinhalt und die entsprechenden Konzentrationen.....	56
Tabelle 13: PCR-Bedingungen zur Bestimmung der Keimzahl in Fleischproben	56
Tabelle 14: Bakterielle Kolonienzahl.....	58
Tabelle 15: Bestimmung der Gesamtkeimzahl	59
Tabelle 16: Die Aufteilung der Proben und die Lagerungstemperaturen über Nacht.....	67
Tabelle 17: Auswertung der Kolonien auf MacConkey Agar nach ihrer Morphologie	69
Tabelle 18: Differenzierung zwischen Aeromonaden und Pseudomonaden	70
Tabelle 19: Ausgewählte Selektiv- und Nichtselektivnährmedien	73
Tabelle 20: Die Komponenten und Konzentrationen der PCR-Mischung.....	76
Tabelle 21: PCR-Protokoll für die Amplifikation	77
Tabelle 22: Keimanzahl auf den Selektivnährböden (KbE/g)	81
Tabelle 23: DNA-Konzentrationen und Reinheitsquotienten	82
Tabelle 24: Identifizierte Bakterienspezies mit Hilfe der BLAST-Analyse.....	86
Tabelle 25: Gene als potentielle Amplifizierungsziele ausgewählt	94
Tabelle 26: Barcode anhand der IUPAC ambiguity codes	96
Tabelle 27: Primer mittels BLAST Software der NCBI entworfen.....	97
Tabelle 28: Ausgewählte Primerpaare.....	98
Tabelle 29: Geflügelfleischproben, Lagerbedingungen und Keimbelastungen.....	98
Tabelle 30: Komponenten und Konzentrationen der PCR-Mischung	99
Tabelle 31: PCR-Protokoll für die Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares rpoB 1	100
Tabelle 32: Modifizierungen der PCR-Bedingungen	101
Tabelle 33: Ergebnisse der 14 PCR-Analysen.....	106
Tabelle 34: Bakterienstämme	112
Tabelle 35: Probenbeschreibung für weitere PCR-Analysen	116

Tabelle 36: PCR-Bedingungen der Real-Time PCR-Analysen.....	117
Tabelle 37: Gradienten-PCR-Bedingungen	118
Tabelle 38: Ergebnisse der PCR-Analysen.....	120
Tabelle 39: Ergebnisse der PCR-Analyse.....	122
Tabelle 40: Ergebnisse der Gradientenanalyse	124
Tabelle 41: Ergebnisse der Gradienten-PCR mit geringer Annealing-Temperatur-Spanne.	125
Tabelle 42: Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse der Standards S1 und S6.....	143
Tabelle 43: Ergebnisse der Standards.....	145
Tabelle 44: Ergebnisse der qPCR-Analysen der 30 Proben	148
Tabelle 45: Ergebnisse von qPCR-Analysen in zwei Probensets	151
Tabelle 46: Ct-Werte der Standards	153
Tabelle 47: PCR-Inhibitoren in verschiedenen Lebensmitteln.....	162
Tabelle 48: Einflussfaktoren auf die Effizienz der qPCR (Pfaffl, 2012).....	164
Tabelle 49: Regressionsanalysen und Amplifikationseffizienz von Standardkurven.....	164
Tabelle 50: Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzanalyse.....	191
Tabelle 51: Bakterienstämme und rpoB Gensequenzen.....	216

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
<i>A. salmonicida</i>	<i>Acinetobacter salmonicida</i>
aw-Wert	Wasseraktivität
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BPLS	Brillantgrün-Lactose-Saccharose
CFC	Cetrimide-Fucidin-Cephalosporin
Ct	cycle threshold
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNS-Antikörper
E	PCR-Effizienz
<i>E. albertii</i>	<i>Escherichia albertii</i>
<i>E. fergusonii</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	Ethidium-Monoazide
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GKZ	Gesamtkeimzahl
GE	Genome Equivalents
GSP	Glutaminat-Stärke-Phenolrot
HGT	horizontaler Gentransfer

HSP	high-scoring subjectpairs
Hz	Hertz
ISO	Internationale Organisation für Normung
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KbE	Koloniebildende Einheit
LCD	liquid crystal display
LED	Leuchtdiode
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
log	Logarithmus
MRS	DE MAN-ROGOSA- SHARPE
MSRV	Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optische Dichte
<i>P. chlororaphis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>
<i>P. lundensis</i>	<i>Pseudomonas ludensis</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PC Agar	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Propidium Monoazide
Ps-Agar	Pseudomonas-Agar
qPCR	quantitative real-time PCR
R	Korrelationskoeffizient
R ²	Determinationskoeffizient
RFLP	Restriction Fragment Länge Polymorphism
RIF-R	rifampicin Region
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
<i>S. fonticola</i>	<i>Serratia fonticola</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TSB	Tryptic Soy Bouillon
TVC	total viable count
UV	Ultraviolett
VBNC	viable-but-non-culturable
VCP	Vinylidenchlorid-Copolymer
VRBD	Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose

Zusammenfassung

Bei leichtverderblichen Lebensmitteln tierischer oder pflanzlicher Herkunft wird die mikrobiologische Qualität und somit auch die Haltbarkeit in erster Linie durch die Anzahl der vorhandenen lebenden und vermehrungsfähigen Mikroorganismen bestimmt. Die Gesamtkeimzahl wird seit vielen Jahren zur Überprüfung der hygienischen Qualität von Lebensmitteln verwendet. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleisch und Fleischerzeugnissen wird in der Lebensmittelindustrie in Anlehnung an die DIN 10161-1:1984-02 (Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C; Spatel- und Plattengussverfahren) das klassische Plattenkulturverfahren verwendet. Trotz der weitverbreiteten Anwendung dieser Methode und deren Vorteilen, wie der unkomplizierten Durchführung und des geringen Bedarfes an mikrobiologischem Equipment, ist diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig. Unter den molekularbiologischen Methoden wird die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) und insbesondere die quantitative Real-Time PCR als wichtigstes Verfahren zum schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung von Mikroorganismen betrachtet.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eine quantitative Real-Time PCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch zu entwickeln. Dabei sollten die Ergebnisse, resultierend aus dieser Analyse, mit denen, die mittels der klassischen Plattenkulturmethode ermittelt wurden, korrelieren. Hierfür wurde im Rahmen der Vorversuche die Eignung der PCR-Methode zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleischproben unter Anwendung eines Universalprimerpaares, das auf die konservierten Regionen des *16S rRNA*-Gens abzielt, ermittelt. Die Determinationskoeffizienten, die sich aus der Korrelation zwischen den Ct-Werten dieser Versuche und der klassisch ermittelten Gesamtkeimzahl der Fleischproben ergaben, stellten eine geeignete Grundlage für die Weiterentwicklung des Protokolls dar. So wurde, basierend auf den Korrelationsergebnissen, die Eignung der eingesetzten Prä-PCR-Schritte zur Aufbereitung der Proben, des DNA-Extraktionsverfahrens und der Anwendung von SYBR Green[®] I als Detektionssystem bestätigt. Zur Identifizierung der bakteriellen Kontaminanten in Geflügelfleisch wurde eine *16S rRNA*-Sequenzenanalyse vorgenommen. Basierend auf hohen Übereinstimmungen der erhaltenen Sequenzen in der BLAST-Analyse wurde eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterienspezies identifiziert. Dabei wurde hauptsächlich die Familie *Enterobacteriaceae* und das Genus *Pseudomonas* spp. in den Geflügelfleischproben vorgefunden. Somit wurde eine Bakterienreferenzliste für die Geflügelfleischproben erstellt, die zur Bestimmung der Spezifität und Detektionsspanne der im Anschluss zu generierenden Primer diente. Auf Basis der Konsensussequenzen des Einzelkopie-, proteinkodierenden *rpoB*-Gens in Bakterien, wurden zahlreiche Primer generiert. Anhand einer BLAST-Analyse

wurden die Primerpaare mit der breitesten Detektionsspanne für die Zielbakterienspezies ausgewählt. Diese Primerpaare wurden in mehreren Real-Time PCR-Analysen unter Anwendung von DNA-Templates, die aus den Geflügelfleischproben extrahiert wurden, eingesetzt. Die Eignung dieser Primerpaare wurde anhand von Korrelationsanalysen zwischen den Ct-Werten, die aus den PCR-Analysen resultierten und den Gesamtkeimzahlen, die durch das klassische Kulturverfahren ermittelt wurden, bestimmt. Außerdem wurde die Amplifikationsspezifität der PCR-Analysen unter Anwendung dieser Primerpaare mit Hilfe von Schmelzkurvenanalysen der PCR-Produkte ermittelt. Somit hat sich das Primerpaar rpoB 15 durch seine breite Detektionsspanne für die Zielbakterien und den hohen Determinationskoeffizienten ($0,82 \leq R^2 \leq 0,87$; $P < 0,005$) der Korrelationsanalysen durchgesetzt. Die Spezifität und Detektionsspanne des Primersets rpoB 15 wurden in einer PCR-Analyse, die unter Anwendung von DNA-Isolaten extrahiert wurden, aus den Geflügelfleischbakterienkolonien auf verschiedenen Selektivnährmedien analysiert. Die Amplifikation verlief bei fast allen eingesetzten DNA-Isolaten erfolgreich. Die Schmelzkurvenanalyse bei diesem Versuch wies ausschließlich amplifikationsspezifische PCR-Produkte auf. Im Rahmen der Weiterentwicklung des PCR-Protokolls zu einer quantitativen Analyse wurde eine Standardkurve mit Hilfe einer Bakterienmischkultur aus Geflügelfleisch zur Berechnung der Keimkonzentration erstellt. Die Standardkurve wies eine hohe Korrelation zwischen den mittels der qPCR errechneten Keimgehalten und den eingesetzten Keimkonzentrationen ($0,76 \leq R^2 \leq 0,78$; $P < 0,005$) auf. Zudem wurde eine hohe Amplifikationseffizienz von 99,7 % errechnet. In einem parallelen Versuch wurde der Einfluss eines zusätzlichen Prä-PCR Waschschrilles der Standards und der zugehörigen Verdünnungen auf die Amplifikationseffizienz und die Keimkonzentrationsbestimmung getestet. Dabei konnte keine Verbesserung dieser Parameter durch den Waschschrill festgestellt werden. Dieser Zusammenhang konnte mit dem Verlust an Probenzellmaterial im Laufe der Zentrifugation erklärt werden. Durch die hohe Korrelation zwischen den ermittelten Keimkonzentrationen anhand der Standardkurve und der Gesamtkeimzahl der Proben, ermittelt durch das klassische Plattenkulturverfahren, zeigte sich die entwickelte qPCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleischproben als eine vielversprechende Methode. Aufgrund der Limitierungen hinsichtlich der matrixbedingten PCR-Inhibition und der Erweiterung der Detektionsspanne des generierten Primerpaares wird eine Weiterentwicklung der Methode empfohlen.

Schlüsselwörter: Geflügelfleisch, qPCR, Gesamtkeimzahl (GKZ)

Abstract

The “total viable count” (TVC) reflects the hygienic status of food processing and the degree of decomposition. The “aerobic standard plate count” is recognized as the gold standard method for assessment of microbial numbers in food samples and is routinely applied worldwide. Despite being effective and also accepted nationally and internationally, this method has shown some deficiencies in practical use. Besides being labor-intensive and costly, the most important disadvantage of such culture-dependent techniques is the long time required for obtaining results. These pitfalls can be avoided by using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) which has the advantages of high specificity, enhanced assay speed, and absence of time-consuming Post-PCR analysis. The objective of this study was to develop a quantitative real-time PCR method to determine the total bacterial count in fresh poultry meat using newly designed universal primers that target *rpoB* gene for amplification. The results of the real-time PCR analysis (Ct-values) were compared with the results of TVC (\log_{10} CFU/g) obtained by standard plate count method. SYBR®Green I was chosen as the detection system. This has the advantage of performing a low cost assay with an easy design and set up, whereas, the subsequent melting curve analysis helps to confirm the amplification specificity of the primer set. An initial nucleotide sequence analysis based on 16S rRNA PCR fragment was performed to estimate the spoilage associated bacterial diversity in fresh poultry meat. A BLAST analysis was performed using forward and reverse sequences of the bacterial isolates. The results showing the highest “query coverage” (min. 90 %) and “max. identity” (min. 95 %) were included in analysis. These bacterial identities belonged to 16 different taxonomic genera. Among gram-negative bacteria the family *Enterobacteriaceae* and the genus *Pseudomonas* spp. were found to be predominant. Among gram-positive species *Lactobacillus* spp. and *Staphylococcus* spp. were found to be predominant. The majority of identified bacterial species were comparable to those mentioned previously in the literature to be associated with fresh poultry meat spoilage. Targeting conserved regions of single copy, protein-coding *rpoB* Gene of bacteria several universal primers were designed. The detection range for the target bacteria, the amplification specificity and the PCR product size resulting from amplification by using the primer sets were factors considered for the choice of primer. Subsequently, the primer pair rpoB 15 have shown a considerable potential for further application in the qPCR analysis by producing an amplification product size of 174 bp and detecting a large number of bacterial species associated with poultry meat spoilage. This primer was used in the PCR assays amplifying the target sequences of DNA-templates extracted from poultry meat samples. The optimal annealing temperature was determined using a gradient PCR. The specificity of this primer set was confirmed in a PCR assay using DNA extracts from bacterial colonies

obtained from poultry meat. Forty-nine templates out of 50 were amplified by using primer rpoB 15 in this assay. The suitability of this primer set for applying in the qPCR-Analysis for determination of the total viable counts was tested in correlation analyses. The Ct values of the PCR were compared with the total viable counts resulting from the classic cultural method. These analyses resulted in achieving high determination coefficients ($0,82 \leq R^2 \leq 0,87$; $P < 0,005$). Developing the PCR protocol further to a quantitative analysis, a standard curve was established using decimal dilutions from a mixed bacterial suspension with known bacterial concentration. The bacterial amounts calculated by the qPCR assay by using the standard curve have shown high correlations with the total viable counts resulting from the traditional culture method ($0,76 \leq R^2 \leq 0,78$; $P < 0,005$). Besides, the amplification efficiency of the assay was calculated by using the regression analysis of the standard curve. This analysis has shown an average amplification efficiency of 99.7 % for the qPCR assay. In a parallel PCR assay the effect of a pre-PCR wash step using centrifugation was tested for the standard samples. This assay has shown no specific positive effect of wash step on the PCR efficiency or the correlation between the Ct values and the total bacterial counts. This might be due to the loss of cell material during the centrifugation and washing. Considering the high correlations achieved from the analysis described above it seems that the developed qPCR assay is a promising method for determination of total bacterial counts in the poultry meat samples. Nevertheless, further developments are needed in order to overcome the limitations of the assay regarding the amplification inhibition by meat matrix substances and enhancing the primer detection range.

Keywords: Poultry Meat, qPCR, Total Viable Count (TVC)

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Problemstellung

Seit den Anfängen der modernen Geflügelindustrie vor über 50 Jahren expandiert die globale Produktion von Geflügelfleisch dynamisch (Mead, 2004a). Die Massenproduktion von Geflügel ist der sich am intensivsten entwickelnde Bereich in der industriellen globalen Viehwirtschaft (Fleischatlas, 2014). Heute kann Geflügelfleisch aufgrund der erheblichen wissenschaftlichen Fortschritte vor allem in den Produktionsmethoden hocheffektiv erzeugt werden. Das führt dazu, dass Geflügelfleisch kontinuierlich und saisonunabhängig das ganze Jahr über auf dem Markt angeboten werden kann (Mead, 2004a). Dadurch kann ein wachsender Trend beim Verbrauch von Geflügelfleisch im Vergleich zu anderen schlachtbaren Nutztieren beobachtet werden (Bilgili, 2002). Gemessen an der Dynamik der Verbrauchsentwicklung wird erwartet, dass dieser Trend in der Zukunft fortgesetzt wird (FAO, 2015). Nach Angaben der UN-Organisation für Ernährung und Landwirtschaft betrug die weltweite Produktion von Geflügelfleisch im Jahr 2014 ca. 110 Mio. Tonnen und ist im Vergleich zum Jahr 2000 (68 Mio. Tonnen) um 38,2 % angestiegen. Es ist zu erwarten, dass bis 2020 voraussichtlich 124 Mio. Tonnen Geflügelfleisch weltweit produziert werden (FAO, 2015).

Laut EU-VO (EG) Nr. 853/ 2004 wird unter dem Begriff „Geflügel“ Farmgeflügel, einschließlich der Tiere, die zwar nicht als Haustiere gelten, aber wie Haustiere aufgezogen werden, mit Ausnahme von Laufvögeln, verstanden (Fehlhaber, 2001). In Deutschland steigt der Geflügelfleischverzehr auch tendenziell an (Fleischatlas, 2014). Von den durchschnittlich 60,3 kg Fleisch, die 2014 pro Kopf in Deutschland verzehrt wurden, waren durchschnittlich 11,6 kg Geflügelfleisch. Diese Verbrauchsmenge erlebte im Zeitraum von 2000 (durchschnittlich 9,5 kg pro Kopf) bis 2014 eine Zuwachsrate von 17,4 % (BVDF, 2015). Die möglichen Gründe für die zunehmende Beliebtheit des Geflügelfleischs sind neben der relativ kostengünstigen Erzeugung im Vergleich zu anderen Fleischarten auch die ernährungsphysiologisch günstige Zusammensetzung sowie gut produzierbare Qualität, Vielfalt in der Produktart und kulturelle Unbedenklichkeit (Mead, 2005; Raj, 2004).

Die wachsende Nachfrage nach Geflügelfleischprodukten führte zur Entwicklung einer intensiven Produktion von Masthähnchen und einer mechanisierten Schlachtpraxis. Diese hatte eine große Auswirkung auf die Qualität des Fleisches, insbesondere im Bereich der Mikrobiologie von Rohprodukten (Ceverney et al., 2009). So führte die Schlacht- und Zerlegetechnik auch in modernen Schlachthanlagen zu einer deutlichen mikrobiellen Kontamination des Fleisches (Mead, 2004a; Garcia-Lopéz et al., 1998). Eine Ursache dafür ist z. B. die beträchtliche Wasseranwendung beim Schlachtprozess. Das dünnhäutige Geflügel

nimmt im Laufe der Schlachtung Wasser auf (Hinton et al., 2004). Das führt zu einem raschen und starken Aufquellen der Haut. Dadurch werden die Mikroorganismen regelrecht eingebettet und erlangen auf diese Weise eine höhere Resistenz gegenüber dem heißen Brühwasser (Fehlhaber, 2001). So sind selbst bei guter Schlachthygiene Hautkeimgehalte von 10^4 – 10^5 Kolonienbildende Einheiten pro Gramm (KbE/g) (engl. „colony forming units“, CFU) am Ende des Schlachtprozesses kaum zu unterbieten (Ceverney et al., 2009). Auch während der Zerlegung wird das Geflügelfleisch einerseits durch Kontakt mit Maschinenteilen und Händen sowie andererseits durch neue Schnittflächen und vergrößerte Oberflächen durch Mikroorganismen belastet. Das Schlachtgeflügel besitzt eine wesentlich größere Oberfläche im Verhältnis zum Fleischanteil. Aus diesem Grund und wegen der ständigen Kreuzkontamination wird Geflügelfleisch als ein mikrobiologisch besonders sensibles Produkt betrachtet (Fries und Graw, 1999; Thomas und McMeekin, 1980). Tabelle 1 beschreibt einige im Allgemeinen zu erwartende Keimgehalte beim Geflügel während der Fleischgewinnung.

Tabelle 1: Keimgehalte im Zusammenhang mit der Geflügelfleischgewinnung

Verarbeitungsschritt	Gesamtkeimzahl (log ₁₀ KbE/g)	Coliforme Bakterien	<i>Campylobacter</i> spp. * (log ₁₀ KbE/ml des Spülwassers)
Nach			
der Entblutung	6,8 ± 0,1 **	5,0 ± 0,2	4,7 ± 0,5
dem Brühen	5,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2	1,8 ± 0,3
dem Rupfen	5,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,7 ± 0,3
der Eviszeration	4,5 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,4 ± 0,3
dem Duschen	3,6 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,3
der Kühlung	2,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,4

* Mittelwerte aus den positiven Proben (30 Proben wurden untersucht)

** ±95 % Konfidenzintervall

(Modifiziert nach Berrang und Dickens, 2000)

Für Geflügelfleisch sind bisher keine rechtlich verbindlichen mikrobiologischen Grenzwerte im EU-Raum festgelegt worden. Es wird empfohlen, dass die Gesamtkeimzahl der Schlachtierkörper nach Kühlung 10^6 KbE/g bzw. die Anzahl an *Enterobacteriaceae* 10^5 KbE/g nicht überschritten werden (Fehlhaber, 2001). Für die Haltbarkeitsdauer des gekühlten Geflügels ist die mikrobiologische Belastung nach der Zerlegung entscheidend, da sich der Anteil an psychrotrophen Keimen trotz der Kühlung im Laufe der Zeit erhöhen kann (Mead 2004a; Cox et al., 1998; Weise, 1996).

Die hohen Keimbelastungen weisen oft auf kontaminiertes Rohmaterial, unzureichende Hygiene oder ungeeignete Zeit- und Temperaturbedingungen während der Bearbeitung oder Lagerung hin. Viele Bakterien, die in der Regel nicht als Lebensmittelpathogene bekannt sind, werden beim Vorkommen in hoher Anzahl als mögliche Ursache für den Ausbruch von

Lebensmittelvergiftungen betrachtet. Eine hohe Gesamtkeimzahl weist mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Verderb hin, da viele Lebensmittel etwa 10^6 - 10^8 KbE/g zur Zeit des Verderbs beinhalten. Mikrobieller Verderb kann aufgrund der generell hohen Kontamination sehr schnell einsetzen (Chipley, 1987). Ein Versagen der effektiven Kontrolle des Verderbs kann zu erheblichen wirtschaftlichen Konsequenzen führen. Deshalb arbeitet die Geflügelfleischproduktionsindustrie kontinuierlich an Methoden, die die Gesamtzahl der Mikroorganismen in Produkten reduziert (May, 1974).

Bei leichtverderblichen, aber auch haltbar gemachten Lebensmitteln tierischer oder pflanzlicher Herkunft wird die mikrobiologische Qualität und somit auch die Haltbarkeit, in erster Linie durch die Anzahl der vorhandenen lebenden und vermehrungsfähigen Mikroorganismen bestimmt (Chipley, 1987). Die Erfassung der Anzahl von Lebendkeimen ist somit von zentraler Bedeutung. Die Gesamtkeimzahl wird seit vielen Jahren zur Überprüfung der hygienischen Qualität von Lebensmitteln verwendet (Silliker, 1963). Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wird in der Fleischindustrie in Anlehnung an die DIN 10161-1:1984-02 (Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C; Spatel- und Plattengussverfahren – Referenzverfahren) das klassische Plattenkulturverfahren verwendet. Diese Methode wird als Goldstandard anerkannt und liefert in der Regel zuverlässige, reproduzierbare Ergebnisse (Dolan et al., 2009; Anon., 2003). Trotz weitverbreiteter Anwendung dieser Methode und deren Vorteilen, wie die unkomplizierte Durchführung und der geringe Bedarf an mikrobiologischem Equipment, ist diese Methode sehr zeit- und arbeitsaufwendig (Dolan et al., 2009; Lee und Levin, 2007a; Cox et al., 1998). Deshalb bestehen in der Forschung große Anstrengungen, schnellere und einfachere Methoden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl zu entwickeln, die alternativ im Bereich der Lebensmitteldiagnostik anwendbar sind (Gutiérrez et al., 1998; Cox et al., 1998; González et al., 1996; Errikson et al., 1995).

Die lebensmittelmikrobiologischen Untersuchungen erleben derzeit einen neuen Schwung aufgrund der Entwicklung von kulturunabhängigen analytischen Methoden, die nicht auf das Wachstum von Mikroorganismen angewiesen sind (Cocolin und Rantsiou, 2012). Unter den molekularbiologischen Methoden im Bereich der mikrobiologischen Lebensmittelanalyse wird die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) als wichtigstes Verfahren mit vielen Anwendungsmöglichkeiten betrachtet (Busch, 2010). Mit Hilfe der PCR können Nukleinsäuren nicht nur spezifisch, sondern auch sehr sensitiv nachgewiesen werden (Ibekwe et al., 2002; Lyon, 2001). Der Einsatz von neuen Reagenzien, Detektionschemikalien und Instrumenten modifizierte die konventionelle PCR, sodass eine Echtzeit-fluoreszenzbasierte, quantitative Technologie (Real-Time PCR oder qPCR) entwickelt wurde. Diese bedeutende Weiterentwicklung der PCR erlaubt eine quantitative

Analyse der DNA in Echtzeit (Bustin et al., 2009; Le Guillou-Guillemette und Lunel-Fabiani, 2009; Smith und Osborn, 2009; Zhang et al., 2009; Lu et al., 2008).

Seit Ende der 1990er Jahre wurde die qPCR-Methode in vielen Bereichen der Lebensmittelmikrobiologie eingesetzt (Cocolin und Rantsiou, 2012). Angesichts der Notwendigkeit schneller und spezifischer Nachweismethoden im Bereich der Lebensmittelsicherheit wurden viele Studien über die Anwendung von Real-Time PCR, insbesondere zum Nachweis der lebensmittelbedingten humanpathogenen Mikroorganismen durchgeführt (Momtaz et al., 2012, *Yersinia enterocolitica*; Wu et al., 2011, *Clostridium perfringens*; Chen et al., 2010, *Listeria monocytogenes*; Malkawi und Gharaibeh, 2003, *Salmonella enteritica*; Mateo et al., 2005, *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli*, etc). Eine Zusammenfassung dieser Studien zeigt, dass sich viele wichtige Krankheitserreger (in Bezug) auf Geflügelfleisch schnell und spezifisch mittels der Real-Time PCR nachweisen und quantifizieren lassen. Trotz ihres Potentials wurde die qPCR-Analyse im Bereich der Verderb-assoziierten Mikroorganismen und Untersuchungen über die Haltbarkeitsdauer von Lebensmitteln bisher nicht genutzt (Cocolin und Rantsiou, 2012). In der Fleischproduktionsindustrie wird stets nach neuen und schnellen Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Haltbarkeitsdauer von Fleisch und Fleischerzeugnissen gesucht (Gutiérrez et al., 1998; Cox et al., 1988). Hinsichtlich des großen Potentials der qPCR-Analyse besteht offensichtlich ein hoher Bedarf an der Weiterentwicklung und Anwendung dieser Methode im Bereich der Fleischqualität (Gutiérrez et al., 1998).

1.2 Literaturübersicht

1.2.1 Mikrobiologische Qualität des Geflügelfleischs

1.2.1.1 Hintergrund

Die Bedeutung der Anwesenheit von Mikroorganismen auf bzw. in Schlachtgeflügel resultiert daraus, dass die wesentlichen Verderbnisprozesse und die wichtigsten geflügelbedingten gesundheitlichen Risiken für den Verbraucher mikrobiell bedingt sind (Mead, 2004a; Russel et al., 1996). Für die Qualitätsminderung und den Verderb sind in erster Linie protease- und lipasebildende Bakterien verantwortlich. Diese Vorgänge lassen sich durch Minimierung der Kontaminationsintensität und weitgehendes Unterdrücken der Vermehrung der Keime verzögern (Mead, 2004a).

Geflügelfleisch wird als leicht verderbliches Lebensmittel bezeichnet, da abgesehen von unvermeidlicher, intensiver Kontamination im Laufe des Schlachtprozesses das Produkt selbst günstige Bedingungen für die Keimvermehrung bietet (Ceverney et al., 2009; Mead, 2004). Geflügelfleisch stellt aufgrund seiner chemischen Zusammensetzung (günstiger

Protein- und Fettanteil) und optimaler Wasseraktivität (aw) einen hervorragenden Nährboden für das Wachstum der Mikroorganismen dar (Ceverney et al., 2009; Gill, 1986).

Durch die Kontaminationsvorgänge können auch pathogene oder fakultativ pathogene Mikroorganismen auf bzw. in die Schlachtkörper gelangen (Mead, 2004; Fehlhaber, 2001). Deshalb ist das rohe Geflügelfleisch eine wichtige Quelle für die Übertragung solcher Erreger in die Nahrungskette des Menschen (Cunningham, 1987). Bei der Untersuchung der Mikroflora des Schlachtgeflügels besitzen die Bakterien in Bezug auf das Verderbnispotential sowie hinsichtlich des gesundheitlichen Verbraucherschutzes im Vergleich zu anderen Mikroorganismen (Schimmelpilzen, Hefen und Viren) eine größere Relevanz (Mead, 2004a). Die Mikroorganismenarten, die Erreger von Infektionskrankheiten des Geflügels sind, haben in der Regel keine Bedeutung hinsichtlich der Lebensmittelhygiene. Das Risikopotential erwächst vorwiegend aus dem Fleischverzehr, aus latent im Geflügel existierenden Keimen. In solchen Fällen kann diese Gefahr nicht allein durch makroskopische Fleischuntersuchungen erkannt werden, da die Tiere dabei klinisch normal aussehen. Die große Bedeutung der Mikroorganismen für die Produktion von hygienisch sicherem und qualitativ hochwertigem Geflügelfleisch lässt sich auch in den Rechtsvorschriften wiederfinden (Fehlhaber, 2001). Die Forderungen fokussieren sich dabei besonders auf die Kontaminationsvermeidung sowie die Einschränkung der Keimanreicherung bei jedem Schritt der Fleischerzeugung (Mead, 2004a). In diesem Sinne liefert die Erfassung von Keimgehalten in Geflügelfleisch ein wichtiges Kriterium für die Qualitätsbeurteilung des Fleisches (Elliot und Michener, 1960). Die Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene der „Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie“ (DGHM) hat im Rahmen einer objektivierten Grundlage zur Beurteilung des mikrobiologischen-hygienischen Status von Geflügelfleisch einige Warn- und Richtwerte empfohlen. Diese sind in Tabelle 2 zusammengestellt (Stand 2014).

Tabelle 2: Richt- und Warnwerte für rohes Geflügelfleisch^{a)} (DGHM, 2014)

	Richtwert (KbE*/g)	Warnwert (KbE*/g)
Aerobe mesophile Koloniezahl	5 x 10⁶	---
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵
<i>Escherichia coli</i>	1 x 10 ²	1 x 10 ³
Pseudomonaden	1 x 10 ⁶	---
Koagulase-positive Staphylokokken	1 x 10 ²	1 x 10 ³
<i>Salmonella</i>	---	n.n.** in 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	---	1 x 10 ²

*KbE: Kolonienbildende Einheiten

**n.n.: nicht nachweisbar

^{a)}nicht gewürzt, lose oder in Fertigverpackung

1.2.1.2 Haltbarkeitsdauer

Nach den gültigen Rechtsvorschriften darf Geflügelfleisch bei nicht mehr als +4 °C gelagert werden (Directive 71/118/EEC). Diese Vorschrift muss vor allem auch vom Handel eingehalten werden. Während die Tiefkühlagerung die Multiplikation der Mikroben im Fleisch verhindert, findet bei der Kühllagerung nur eine Verzögerung des Wachstums von kältetoleranten Mikroorganismen statt (Mead, 2004a; Cox et al., 1998). Es wird sogar empfohlen, Geflügelfleisch bei etwa 0 °C zu lagern, sodass die Vermehrung von psychrotrophen Verderbniskeimen weitgehend verlangsamt wird (Fehlhaber, 2001). Die Einhaltung einer geeigneten Kühlkette von der Produktion bis zum Verkauf stellt sicher, dass das Fleisch eine Haltbarkeitsdauer besitzt, die lang genug ist, um den Verbraucheransprüchen hinsichtlich der Unbedenklichkeit der mikrobiologischen Qualität des Fleisches gerecht zu werden. Sicher ist, dass Temperaturschwankungen während der Lagerung eine negative Auswirkung auf die Qualität des Fleisches haben (Mead, 2004a; Cox et al., 1998). Ein hoher Fettanteil im Gewebe, wie bei manchen Geflügeln wie z. B. Gänsen, Enten und Suppenhühnern, hat einen negativen Einfluss auf die Lagerfähigkeit. Diese sind daher nicht so lange haltbar, wie Hähnchen und Pute. Bei Überschreitung der maximalen Lagerungsfristen sind im Allgemeinen Qualitätsminderungen zu erwarten (Fehlhaber, 2001).

Die Haltbarkeit des gekühlten Geflügels wird von diversen Faktoren, wie dem Ausgangskeimgehalt zum Lagerungsbeginn, dem Grad der Abtrocknung der inneren und äußeren Oberflächen des Tierkörpers, der Art der Verpackung und der Lagerungstemperatur beeinflusst (Cunningham, 1987). Bei einer Lagerungstemperatur von +4 °C werden die hohen Keimgehalte (10^7 - 10^8 KbE/cm² Oberfläche) nach etwa 7 bis 8 Tagen erreicht. Diese hohen Keimgehalte haben hinsichtlich der beginnenden Verderbniserscheinungen eine große Relevanz. Somit darf eine realistische Verbrauchsfrist einen Zeitraum von 5 bis 6 Tagen nicht überschreiten. Diese darf bei Teilstücken ohne äußere Haut, aufgrund des geringeren Kontaminationsgrades ihrer Oberfläche, um 1-2 Tage verlängert werden. Demzufolge sind die Geflügelfleischproduzenten verpflichtet, die Haltbarkeitsfristen auf Grundlage von Haltbarkeitsuntersuchungen festzulegen (Fehlhaber, 2001).

Der wichtigste Faktor, der die Haltbarkeit von rohen Fleischprodukten beeinflusst, ist die Lagerungstemperatur (Hinton et al., 2004; Gallo et al., 1988). In der kommerziellen Praxis schwankt die Temperatur, zum Teil unvermeidlich, in verschiedenen Stadien der Kühlkette. Deshalb spiegelt die Haltbarkeitsdauer die kumulative Wirkung schwankender Temperaturen in der gesamten Lagerungsdauer des Produktes wider (Mead, 2004a). Die Temperatur übt eine dramatische Wirkung auf die Entwicklung der Verderbsmikroflora des rohen Geflügels aus. Die Wachstumsrate des mikrobiellen Verderbs der Schlachtkörper ist bei 10 °C doppelt so hoch und bei 15 °C dreimal so hoch wie bei 5 °C (Cox et al., 1998). Die Haltbarkeit der

ausgeweideten, zerkleinerten Schlachtkörper beträgt 2-3 Tage bei 10,6 °C, 6-8 Tage bei 4,4 °C und 15-18 Tage bei 0 °C (Cerveny et al., 2009; Ayres, 1950).

Ein entscheidendes Element für die Haltbarkeitsdauer stellt die mikrobiologische Beschaffenheit des frisch verarbeiteten Geflügels, insbesondere bezüglich des Kontaminationsgrades mit *Pseudomonas* dar (Mead, 2004a). Barnes et al. (1979) zeigten eine lineare Beziehung zwischen der Haltbarkeitsdauer und der initialen Anzahl von Pseudomonaden in Schlachtkörpern. Da die Kontamination von Schlachtkörpern mit Pseudomonaden während des Brühvorgangs virtuell eliminiert wird, findet die Hauptkontamination mit diesen Organismen in späteren Prozessschritten statt. Ab del Hady und Mead (nicht publiziert) haben gezeigt, dass Pseudomonaden in relativ hoher Anzahl von verschiedenen eingesetzten Werkzeugen beim Verarbeitungsequipment während der Arbeitszeit isoliert werden können. Die Entstehung und ein mögliches Wachstum von Verderbsmikroorganismen auf dem Verarbeitungsequipment betonen die Notwendigkeit von effektiven post-prozessualen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen (Mead, 2004a).

Geflügel besitzt sowohl rote als auch weiße Muskeln, welche sich in chemischer Zusammensetzung und pH-Wert voneinander unterscheiden (Mead, 2004a). Allerdings wurde von Barnes und Impey (1968) gezeigt, dass die pigmentierten und nicht pigmentierten Stämme von *Pseudomonas* spp. im Brust- (pH 5,7-5,9) und Hüftmuskel (pH 6,4-6,7) gleichmäßig wachsen können. Im Gegensatz dazu wachsen *Acinetobacter* und *Moraxella* (*Psychrobacter*) spp. in den Hüften, aber nicht im Brustmuskel, während Stämme von *Shewanella putrefaciens* schneller in den Hüften als in den Brüsten wachsen. Laut McMeekin (1977 und 1975) waren beim Verderb 80 % der psychrotrophen Isolate der Brüste in der Lage, Fehlgerüche zu produzieren, während nur 21 % dieser Isolate in den Hüften dazu in der Lage waren (McMeekin, 1977, 1975). Solche Verhaltensunterschiede zeigen in Bezug auf den Verderb besonderer Geflügelfleischabschnitte eine signifikante Relevanz (Mead, 2004a).

Im Laufe der Produktion und des Vertriebs erfordern die meisten verarbeiteten Geflügelprodukte heutzutage eine Verpackung. Während die Verpackung verschiedene Funktionsaspekte darstellt, liegt der Schwerpunkt in der Regel auf der Schutzfunktion zur Geringhaltung der mikrobiellen Probleme (Fehlhaber, 2001). Wie bereits beschrieben, sind Geflügelprodukte auf verschiedenen Niveaus mit diversen Bakterienarten kontaminiert (Tuncer und Sireli, 2008). Die Verarbeitungsschritte sind so gestaltet, dass die Zahl der Mikroorganismen auf und im Produkt am Ende des Prozesses minimiert wird. Danach sollen die Produkte vor Re- oder Kreuzkontamination geschützt werden (Dawson, 2004; Geornaras und von Holy, 2000). Wells et al. (1985) haben über die Wirkung des Verpackungsmaterials und -technik auf die Haltbarkeitsdauer des frischen Geflügelfleischs berichtet, dass z. B. Verpackungsmaterialien wie „Vinylidenchlorid Copolymer“ (VCP) und Zellophanfilme keine

bedeutende bakteriostatische Wirkung auf die Verderbsmikroorganismen von Geflügelfleisch ausgeübt haben. Außerdem wurde berichtet, dass die Eigenschaften des Verpackungsmaterials die Mikroflora beeinflussen und diese wiederum die Art der Fehlgerüche, die beim Verderb persistieren. Ist Fleisch in einer sauerstoffundurchlässigen Folie vakuumverpackt, wird der restliche Sauerstoff durch Geweberespiration und metabolische Aktivität der mikrobiellen Kontaminanten verbraucht. Je nach Foliendurchlässigkeit wird ein Eindringen von Sauerstoff in die Verpackung zum großen Teil verhindert, während die interne Kohlendioxidkonzentration stetig ansteigt (Dawson, 1987). Shrimpton und Barnes (1960) haben gezeigt, dass die Haltbarkeitsdauer auf etwa 4 Tage erhöht werden kann, wenn die Hähnchenmastkörper bei 1 °C in Vakuumverpackung und unter Anwendung von sauerstoffundurchlässigen Folien gelagert werden. Laut Gill et al. (1990) konnte durch die Lagerung unter einer Schutzgasatmosphäre (90 % CO₂, 10 % O₂) die Haltbarkeitsdauer auf das 2-fache bis 2,4-fache verlängert werden. Pseudomonaden herrschen in Portionen, verpackt in sauerstoffdurchlässiger Folie, beim Verderb vor. In Vakuumverpackungen bestehen die Hauptorganismen aus zwei Gruppen von atypischen *Lactobacilli*: eine typisch für Brustportionen, eine typisch für Hüftfleisch (Dawson, 1987).

1.2.1.3 Mikrobielle Assoziation

Frisches Geflügelfleisch besitzt eine diverse natürliche Mikroflora. Die meisten dieser Mikroorganismen sind für den Menschen nicht pathogen (Kotula und Pandya, 1995; Bailey et al., 1987; Grau, 1986). Eine große Herausforderung bei der Verarbeitung von Geflügelfleisch stellt die Entfernung von Kontaminanten sowie die Vorbeugung vor möglichen Kreuzkontaminationen durch potentielle Pathogene dar (May, 1974). Alle Arbeitsschritte im Verarbeitungsbetrieb können die mikrobiologische Qualität der Schlachtkörper beeinflussen (Fries und Grau, 1999; Bailey et al., 1987). Während des Transports, der Betäubung, der Schlachtung und weiteren Bearbeitung kommt der Muskel mit Bakterien und anderen Kontaminanten in Kontakt, während parallel dazu eine anaerobe Glykolyse erfolgt und somit die Umwandlung zu verzehrfähigem Fleisch stattfindet. Die sich ständig ändernde Oberfläche des Fleisches stellt eine geeignete Umgebung für das Wachstum von diversen Mikroorganismen dar (Mead, 2004a). Die Mikroorganismen im frischen Fleisch können pathogen sein und somit Lebensmittelintoxikationen verursachen. Sie sind somit hoch riskant für die menschliche Gesundheit. Andere Mikroorganismen im frischen Fleisch können Verderbsbakterien sein, welche Fehlgerüche und Schleimbildung auf der Fleischoberfläche verursachen (Mead, 2004b).

Der mikrobielle Zustand des frischen Fleisches wird neben den Hygiene- und Prozessbedingungen des Schlachthofs durch Tierhaltung, Transport, Schlachtung, Zerkleinern und Verpacken beeinflusst. Tierische Quellen, wie Haut, Hufe und Haare beinhalten nicht nur eine große Anzahl an Mikroorganismen aus der Erde, der Gülle, dem

Futter und dem Wasser, sondern auch viele wichtige Spezies von Verderbsmikroorganismen (Bailey et al., 1987). Die meisten Bakterien im frischen Fleisch stammen aus dem Darm des Tieres. Ein Teil der Kontaminanten sind fäkalen Ursprungs, begleitet durch normale Hautflora (*Staphylococci*, *Micrococci*, *Pseudomonas*, Hefen und Schimmelpilze) sowie durch eine Reihe von aus der Erde und dem Wasser stammenden Organismen verschiedener Art. Sobald das Fleisch jedoch gekühlt wird, ist nur noch ein kleiner Teil der vorhandenen Bakterien in der Lage, sich weiter zu vermehren. Faktoren wie Temperatur, Wassergehalt der Oberfläche und Gasatmosphäre bestimmen, wie schnell sich diese vermehren können (Grau, 1986). Durch Feuchtigkeit und aerobe Bedingungen steigt die bakterielle Population rasch an und wird hauptsächlich von Pseudomonaden dominiert. Fehlgerüche und schleimige Oberflächen sind klar erkennbar, wenn es sich um Pseudomonaden von mehr als 100 bis 500 Mio./cm² handelt. Ein Verderb besteht, wenn sich die Gesamtbakterienzahl den oben genannten Zahlen annähert. Allerdings bewirkt vakuumverpacktes Fleisch Veränderungen in der Bakterienflora. Die Haltbarkeitsdauer ist somit eher von der Natur dieser Flora abhängig, die sich während der Lagerung entwickelt, als von der Zahl der Gesamtbakterien, die nach den Verarbeitungsprozessen im Fleisch vorhanden sind (Mead, 2004a; Cox et al., 1998).

Geflügelschlachtkörper werden in der Regel weiterverarbeitet, z. B. durch Zerkleinerung zu Teilstücken, mechanische Entbeinung und Zerkleinerung zu kleineren Teilen (Fehlhaber, 2001). Die anschließende Behandlung der Schlachtkörper führt zu einer deutlichen Erhöhung der mikrobiellen Anzahl. Eine Studie hat gezeigt, dass sich die aerobe Plattenzahl der Hähnchenschlachtkörper um das 6-fache im Zerkleinerungsbereich des Verarbeitungsbetriebs und ums 8-fache im Einzelhandel erhöht hat (Cerveny et al., 2009). Jeder Schritt bei der Verarbeitung des rohen Geflügelfleisches beeinflusst den Gehalt der Verderbsmikroflora auf dem Produkt. Bei einigen Schritten erhöht sich die mikrobielle Belastung signifikant, während bei anderen diese erheblich abnimmt. Im Allgemeinen beinhalten rohe Geflügelfleischschlachtkörper eine niedrigere mikrobielle Population als zerkleinertes Geflügel. Es wurde berichtet, dass sich die durchschnittliche initiale Oberflächenanzahl von 3,3 log₁₀ KbE/cm² nach der Zerkleinerung auf 3,8 log₁₀ KbE/cm² und nach dem Verpacken auf 4,08 log₁₀ KbE/cm² erhöht hat (May, 1962).

Geflügelschlachtkörper erhalten mehrere Waschschriffe während des Schlachtungsprozesses. Mehr als 50 Stämme von Verderbsbakterien, die 25 Gattungen repräsentieren, wurden als Teil der initialen Mikroflora der rohen Hähnchen ermittelt (Cox et al., 1998). Eine aerobe Lagerung des Geflügelfleisches unter kühlen Bedingungen führt zur Entwicklung einer charakteristischen Mikroflora. Auf einem geeigneten Nährboden können sich diese sichtbaren Kolonien bei 1 °C innerhalb von 14 Tagen bilden. Beim Verderb sind die dominierenden Organismen grundsätzlich *Pseudomonas* spp., begleitet von einer

geringeren Anzahl an *Acinetobacter*, *Moraxella* und *Psychrobacter* spp., einschließlich von *Acinetobacter johnsonii* und *Psychrobacter immobilis*. Die Zellzahl der nichtpigmentierten Pseudomonaden steigt wesentlich während des Verderbs an. Die Lagerungsbedingungen beeinflussen dabei stark die Zellzahl der pigmentierten Pseudomonaden. Diese Bakterien zeigen unter gegebenen Bedingungen die schnellste Wachstumsrate und umfassen Stämme mit größtem Verderbspotential (Mead, 2004a). Eine numerische taxonomische Studie (Arnaut-Rollier et al., 1999) ergab vier Hauptcluster unter den Stämmen, isoliert aus frisch verarbeitetem und kühlgelagertem Geflügelfleisch: *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* Biovare und eine unidentifizierte Gruppe mit hoher Ähnlichkeit zu *P. fluorescens*. Andere gramnegative Bakterien, die manchmal aus dem verdorbenen Geflügelfleisch isoliert werden können, umfassen *Shewanella putrefaciens* und diverse kältetolerante Stämme von *Enterobacteriaceae*, wie *Enterobacter* und *Serratia* spp.. Es scheint, als dass die oben beschriebenen Organismen aus der Umgebung der lebenden Vögel stammen, da diese auch in der Erde und im Wasser gefunden werden. Da *Pseudomonas* spp. beim Verderb des aerob- und kühlgelagerten Geflügelfleisches vorherrschen, kann jede deutliche Unterbrechung der Kühlkette zur Entwicklung einer unterschiedlichen mikrobiellen Assoziation führen (Mead, 2004a; Cox et al., 1998).

Mit steigender Lagerungstemperatur geht der Anteil von Pseudomonaden an der Gesamtkeimzahl zurück und bei 20-22 °C umfassen diese Organismen nur noch bis zu einem Fünftel oder weniger der gesamten Flora. Parallel dazu wurde eine Steigerung bei Organismen von anderen Genera einschließlich Stämmen von *Enterobacteriaceae* beobachtet (Mead, 2004a). Bei 20 °C isolierten Pooni und Mead (1984) Bakterien verschiedener Art, einschließlich *Aeromonas* spp. und mesophilen *Escherichia coli*. Durch Lagerung bei 22 °C zeigte Ahmed (1979), dass *Proteus* spp. 70 % der Gesamtflora umfasste. In einer ähnlichen Studie berichteten Regez et al. (1988), dass die Pseudomonaden weniger als 2 % der Flora bei dieser Temperatur umfassten. Die Veränderung der Mikroflora, die durch Lagerung des Geflügelfleisches bei Temperaturen über dem Kühlbereich entsteht, kann die Zusammensetzung von mikrobiellen verderbsassoziierten Metaboliten beeinflussen. Die Zusammensetzung der Verderbsmikroflora verändert sich auch, wenn rohes Fleisch so behandelt wird, dass die Pseudomonadenpopulation und andere gramnegative psychrotrophe Mikroorganismen mit Hilfe von modifizierten Umgebungsbedingungen ihre Haltbarkeitsdauer verlängern. Im letzteren Fall besteht die vorherrschende Mikroflora beim Verderb aus *Lactobacillus* spp. (Mead, 2004a). Eine MAP-Lagerung („modified atmosphere packaging“) ändert dramatisch die dominierende Verderbsmikroflora der Masthähnchen im Vergleich zu einer aeroben Lagerung, da so das Wachstum von obligataeroben Mikroorganismen verhindert wird. Die Schimmelpilze spielen generell eine untergeordnete Rolle beim Verderb von Geflügelfleisch. Wenn zur Bekämpfung des bakteriellen Wachstums Antibiotika eingesetzt werden, können

jedoch Schimmelpilze als Hauptgrund des Verderbs betrachtet werden. Die Hauptverderbshefen, die auf dem rohen Geflügelfleisch gefunden werden, sind *Candida* spp., *Rhodotorula* spp. und *Torulopsis* spp. (Cervený et al., 2009; Jay et al., 2005; Cox et al., 1998).

1.2.1.4 Mikrobieller Verderb

Mikrobiologischer Verderb von gekühltem Geflügelfleisch erfolgt primär durch die proteolytische Aktivität von psychrotrophen Mikroben, die den Fehlgeruch und -geschmack, sowie das unerwünschte Erscheinungsbild bei kühlen Temperaturen verursachen. Pseudomonaden sind in der Lage sich bei 4 °C alle 7-8 Stunden und bei 2 °C alle 13-14 Stunden zu multiplizieren. Die Unterbrechung der Kühlkette hat eine drastische Auswirkung auf die Vermehrung der Verderbsflora, sodass bei Raumtemperatur innerhalb von 4-6 Stunden eine Oberflächenfäulnis deutlich sichtbar wird (Ludewig, 1998).

Am Anfang metabolisieren die Verderbsorganismen Glukose. Solange leicht abzubauen Kohlenhydrate verfügbar sind, wirken diese Organismen saccharolytisch. Dabei entstehen Stoffwechselprodukte, die von Mikroorganismen zur Energieverwertung für das weitere Wachstum benutzt werden. Der Vorrat an Kohlenhydraten ist in der Muskulatur nicht hoch. Deshalb wechseln sie zu Substraten wie Aminosäuren. Insbesondere trägt der Aminosäurenmetabolismus zur Produktion von Fehlgeruch bei. Die Schleimbildung erfolgt im Allgemeinen nach der Produktion von unerwünschten Gerüchen. Im Prinzip werden Fehlgerüche detektiert, wenn eine Keimzahl von 10^7 - 10^8 KbE/cm² auf der Gewebeoberfläche erreicht wird; die Schleimbildung findet ab $>10^8$ KbE/cm² statt (Cervený et al., 2009). Im Falle der kühlgelagerten Hähnchen berichten Ayres et al. (1950) von einem charakteristischen esterartigen Geruch. Kurz danach sind zahlreiche durchsichtige Kolonien auf der Haut sichtbar, die sich eventuell zu einer Schleimschicht entwickeln. In diesem Stadium wird der Geruch ammoniakalisch und die mikrobielle Population überschreitet $1,0 \times 10^8$ KbE/cm². Elliott und Michener (1961) stellten fest, dass Fehlgeruch mit aeroben Plattenzahlen zwischen $1,6 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^8$ KbE/cm² assoziiert ist, während Schleim eher bei Keimzahlen von $3,2 \times 10^7$ bis $1,0 \times 10^9$ KbE/cm² erscheint. Cox et al. (1975) haben die Fehlgerüche, die von verschiedenen Stämmen von *Pseudomonas* spp. produziert werden, erforscht, wobei die *Pseudomonas*-Stämme in diversen sterilen Hähnchenmedien inokuliert wurden. Die Autoren stellten fest, dass die intensivsten Gerüche von *Pseudomonas fragi* produziert wurden. Mit Hilfe von Hähnchenschlachtkörpern, inokuliert mit verschiedenen Verderbsorganismen, zeigten Viehweg et al. (1989), dass alle virtuell gebildeten Geruchsubstanzen dem mikrobiellen Metabolismus zugeschrieben werden können. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die autolytischen Veränderungen im Fleisch an sich keine direkte Rolle im Verderbsprozess spielten und die metabolischen Aktivitäten der Mikroflora hauptsächlich für die produzierten Fehlgerüche verantwortlich waren.

1.2.2 Gesamtkeimzahl

1.2.2.1 Gesamtkeimzahl als Indikator für die mikrobiologische Qualität

Es gibt Fälle, in denen Lebensmittel als ungesund betrachtet werden, wenn sie eine hohe Anzahl an Mikroorganismen beinhalten, obwohl diese Mikroorganismen nicht als Pathogen bekannt sind und diese den Charakter des Lebensmittels nicht deutlich verändert haben (Thatcher und Clark, 1973). Bei leicht verderblichen Lebensmitteln wie Geflügelfleisch, ist die Anzahl der vorhandenen lebenden und vermehrungsfähigen Mikroorganismen ein wichtiger Indikator der mikrobiologischen Qualität. Somit lässt sich mit Hilfe der Gesamtkeimzahl auf die Haltbarkeitsdauer des Produkts schließen (Elliot und Michener, 1960). Diese gibt Auskunft über die Anzahl aller aeroben lebensfähigen Mikroorganismen in einer bestimmten Menge an Probenmaterial. Bei dieser Methode wird allerdings die Zusammensetzung der einzelnen Genera und Spezies der Mikroorganismen nicht spezifiziert (National Academy of Science, 1985). Die Beurteilung der Lebensmittel mit Hilfe von Gesamtkeimzahlen erfolgt unter Berücksichtigung der Art und Erzeugungsprozesse des Lebensmittels (Chiple, 1987). Beim frischen Geflügelfleisch wird eine Gesamtkeimzahl zwischen 10^6 und 10^8 KbE/g als erhöhte mikrobielle Belastung angesehen und kann als Hinweis auf unzureichende Hygienepraxis in gesamten Produktionsprozess betrachtet werden (Fehlhaber, 1992).

1.2.2.2 Methoden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln

Hierzu stehen direkte und indirekte Keimzahlbestimmungsmethoden zur Verfügung:

Direkte mikroskopische Analyse

Die direkte mikroskopische Bestimmung der Keimzahl ist eine Methode zur Einschätzung der Mikroorganismenanzahl pro Gramm oder Milliliter eines Lebensmittels mittels der direkten mikroskopischen Untersuchung eines angefärbten Ausstrichs. Dieser wird aus einer wässrigen Suspension eines Lebensmittels oder einem flüssigen Lebensmittelprodukt gewonnen. Diese Methode wird eingesetzt, um die Bakterien-, Hefen- und Schimmelpilzanzahlen in Milch, fermentierten Lebensmitteln, Eierprodukten und verarbeitetem Obst und Gemüse zu bestimmen. Eine bestimmte Menge von einer Lebensmittelsuspension wird gleichmäßig auf einer vorgeschriebenen Fläche eines Objektträgers ausgestrichen. Der Ausstrich wird getrocknet, fixiert und angefärbt und die Mikroorganismen in einer gegebenen Zahl von Feldern ausgezählt. Mit Hilfe der Anzahl der ausgezählten Mikroorganismen in den Feldern kann die Anzahl der Mikroorganismen pro Gramm oder Milliliter bestimmt werden (Chiple, 1987). Pusch et al. (1976) haben mehrere Vor- und Nachteile der direkten mikroskopischen Methode aufgelistet. Die Vorteile sind die Geschwindigkeit, die Behaglichkeit und der minimale Bedarf an Equipment. Die Nachteile sind, dass sich die Methode nur für Lebensmittel mit hoher Mikroorganismenzahl (mindestens 10^5 /ml oder g) eignet, die Genauigkeit begrenzt ist (da nur geringe

Probenmengen (0,01 ml oder 0,001 ml) untersucht werden) und die Anwesenheit von Zellmaterial die mikrobielle Detektion erschweren kann. Außerdem ist es nicht möglich zwischen lebenden und nicht lebenden Zellen genau zu unterscheiden (Chiple, 1987).

Impedanz-Messung

Das Impedanzverfahren zählt zu den indirekten Methoden zur Bestimmung der Keimzahl in Lebensmitteln. Die Methode basiert auf der Fähigkeit der Mikroorganismen, in einem elektrolythaltigen Medium beim Wachstum und bei der Vermehrung hochmolekulare Inhaltsstoffe abzubauen, welche zur zunehmenden Entstehung von kleineren, geladenen Molekülen führt. Die sich bei der Vermehrung anreichernden Stoffwechselprodukte führen in einem flüssigen Medium zu einer Änderung des elektrischen Widerstandes (Impedanz). Die Leitfähigkeit des Mediums nimmt hierdurch zu bzw. der Widerstand nimmt ab. Die Impedanzänderung des Mediums wird als „M-Wert“ bezeichnet und zur Bestimmung der Keimzahl verwendet. Je höher die Ausgangskeimzahl einer Probe, desto schneller ändert sich der Widerstand. Durch die Auswahl des Nährmediums, in dem die Inkubation des Probenmaterials stattfindet, wird eine Selektion der Keime vorgenommen. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl können universelle Nährmedien eingesetzt werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, große Probenanzahlen in relativ kurzer Zeit (je nach Keimzahl) zu verarbeiten (Zschaler, 1995).

ATP-Biolumineszenztechnik

Die ATP-Biolumineszenztechnik ist ein indirektes Verfahren, bei dem der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP), das in lebenden Zellen in nahezu konstanter Menge verfügbar ist, gemessen wird. ATP wird durch einen Substrat-Enzym-Komplex (Luziferin-Luziferase) enzymatisch in Adenosinmonophosphat und Lichtenergie umgewandelt. Durch Biolumineszenz wird die Intensität des entstehenden Lichtes, das proportional zum ATP-Gehalt und dadurch zur Zellkonzentration ist, bestimmt. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass erst ab einer Keimkonzentration von 10^3 KbE/g die Bestimmung der Keimzahl möglich ist. Außerdem ist ATP nicht nur in bakteriellen Zellen, sondern auch in anderen lebenden Zellen vorhanden (Zschaler, 1995).

Spektrophotometrische Methoden

Spektrophotometrische Methoden wurden für mehrere Jahre zur Detektion des mikrobiellen Wachstums verwendet. Grundsätzlich bestehen diese Verfahren aus der Inokulation einer geeigneten Lösung des Wachstumsmediums, der Inkubation und der periodischen Determination des Absorptionsanstiegs der resultierenden mikrobiellen Suspension im Vergleich zu einer nichtinokulierten Kontrolle. In den Zeitintervallen, in denen die Absorption bestimmt wird, werden häufig Aliquote zur Erstellung der seriellen Verdünnungen aufbewahrt sowie die klassische Plattenzahl angewandt. So werden die Plattenzahlen und die

Veränderungen der Absorption aufgezeichnet und gegenübergestellt sowie auf eine lineare Beziehung während der logarithmischen Wachstumsphase geprüft. Die Absorption der mikrobiellen Suspension wird in der Regel bei 400 - 465 nm gemessen. Diese Methoden sind allerdings verschiedenen Fehlern hinsichtlich Variationen in der Zellenmorphologie, Anwesenheit von Klümpchen, Cluster oder Partikeln in den Medien und nicht-lebendigen Zellen oder Fragmenten ausgesetzt. Trotzdem gehören diese Methoden zu den schnellsten und einfachsten Detektionsverfahren und sind angemessen präzise (Chipley, 1987).

Membranfiltration

Um die Genauigkeit von quantitativen mikrobiellen Analysen für bestimmte Lebensmittel zu verbessern, ist es manchmal notwendig, größere Probenmengen zu verwenden. Große Volumen von flüssigen Lebensmitteln oder Suspensionen von trockenen Lebensmitteln, die durch bakteriologische Membranfilter (Porengröße 0,45 µm) gelangen, können zur Analyse der mikrobiologischen Belastung mittels der Membranfiltrationsmethode verwendet werden. Diese Methode ist allerdings nur geeignet für Proben mit einer geringen bakteriellen Anzahl (Chipley, 1987).

1.2.2.3 Plattenkulturverfahren

Das Plattenkulturverfahren gehört zu den anfänglichen Methoden, die von Mikrobiologen zur Detektion und Quantifizierung von Mikroorganismen entwickelt wurden (Chipley, 1987). Die Methoden der Lebendzellzahl- oder Keimzahlbestimmung erfassen nur die lebenden oder speziell die vermehrungsfähigen Zellen (= Keime). Das sind Zellen, die in der Lage sind, sich durch Teilung zu vermehren. Solche Zellen erkennt man gewöhnlich daran, dass sie unter günstigen Wachstumsbedingungen in oder auf einem festen Nährboden Kolonien ausbilden. Nach dem Bebrüten zählt man die entstandenen Kolonien und schließt aus der Kolonienzahl auf die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen. Beim klassischen „Koch’schen Plattengussverfahren“ (Robert Koch, 1881) vermischt man 0,1-1,0 ml Probensuspension mit 10-20 ml eines bei 45 °C flüssig gehaltenen Agarnährbodens, lässt das Gemisch in einer Petrischale erstarren und bebrütet (Bast, 2014).

Die Gesamtkeimzahl („aerobic plate counts“) detektiert nicht unbedingt die gesamte mikrobiologische Population in einer Lebensmittelprobe. Stattdessen wird nur jener Bruchteil einer Population in die Auswertung einbezogen, welcher in der Lage ist, sichtbare Kolonien auf dem verwendeten Nährmedium unter den Bedingungen, bei denen die Platten inkubiert wurden, zu bilden (National Academy of Science, 1985). Diese Methode ist seit Jahren national und international in der Lebensmittelindustrie zur Überprüfung der mikrobiellen Qualität von Lebensmitteln sowie zur Bestimmung ihrer Haltbarkeitsdauer etabliert und bietet im praktischen Sinne viele Vorteile. Sie ist einfach durchzuführen und liefert in der Regel zuverlässige Ergebnisse (Silliker, 1963). Im Bereich der mikrobiologischen Untersuchung

von Fleisch und Fleischerzeugnissen gilt die DIN 10161-1:1984-02 (internationale Übereinstimmung ISO 4833-1 und 2:2013; Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C; Spatel- und Plattengussverfahren-Referenzverfahren) als die Standardmethode zur Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl und wird routinemäßig u. a. in der Fleischindustrie eingesetzt (Dolan et al, 2009; Gutiérrez et al., 1998).

1.2.2.4 Aspekte der Standardmethode

Trotz weit verbreiteter Anwendung wurden oft einige Nachteile der klassischen Plattenkulturmethode diskutiert. Es wurde intensiv geforscht, um eine bessere Methode als Alternative für das Plattenverfahren zu finden. Primär, weil dieses sehr zeit- und kostenaufwendig ist (Gutiérrez et al., 1998). Laut DIN 10161-1:1984-02 sollen die Kulturplatten für 48 h (Spatelmethode) bis 72 h (Plattengussverfahren) bei 30 °C bebrütet werden. Diese lange Zeit, bis zur Lieferung der Ergebnisse, ist für leichtverderbliche Lebensmittel, wie frisches Geflügelfleisch, bei deren Vertrieb es nur eine begrenzte Zeitspanne zwischen Produktion und Verkauf gibt, aus wirtschaftlicher Sicht unpraktisch (Dolan et al., 2009).

Die Grundannahme der Plattenzahltechnik verfolgt zwei Ziele: (1) eine lebendige Zelle bildet eine makroskopisch sichtbare Kolonie, (2) alle Mikroorganismenarten aus einer Probe, die auf ihre Gesamtkeimzahl untersucht werden, wachsen auf einem einzigen Agarmedium und werden unter gleichen Bedingungen bebrütet. Diese Annahmen enthalten gravierende Defizite. Die mikrobiellen Zellen bilden in der Regel Kolonien in verschiedenen Formen wie Einzelzellen, paarweise und größere Zellverbände (clusters oder clumps) auf den Agarplatten. Dabei wird manchmal jeder Zellverband als eine Kolonie betrachtet, obwohl er aus mehreren vermehrungsfähigen Zellen besteht. Dadurch wird eine niedrigere Lebendzellzahl errechnet und man spricht beim Ergebnis von der Zahl der kolonienbildenden Einheiten.

Die speziellen Ansprüche der Mikroorganismen, wie z. B. Nährstoffe, atmosphärische Gase, Inkubationstemperaturen, geschädigte Zellen bedingen, dass die Proben auf Platten mit mehr als einem selektivem Nährmedium kultiviert und unter mehr als einer Bedingung inkubiert werden (Chipley, 1987). Auch die Bebrütungsdauer hat Einfluss auf die Zahl der Kolonien, da die Zellen nicht alle nach der gleichen Rate wachsen und sich teilen, ist bei zu kurzer Bebrütung ein Teil der Kolonien noch so klein, dass er bei der Zählung übersehen wird. Ein großer Teil der oligotrophen Boden- und Wasserbakterien bildet selbst bei sehr langer Bebrütung ausschließlich Mikrokolonien, die nur unter dem Mikroskop zu erkennen sind.

Außerdem ist die Auszählung der Kolonien nicht immer unproblematisch. In der dichten Suspension verklumpen die Zellen, die Kolonien hemmen sich gegenseitig in ihrer

Entwicklung, z. B. durch Konkurrenz um Nährstoffe oder durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten. Beim manuellen Auszählen stark bewachsener Platten kommt es häufig zu Zählfehlern. Je mehr Kolonien sich auf der Platte befinden und je größer der Durchmesser der einzelnen Kolonie ist, desto größer ist die Gefahr, dass dicht nebeneinanderliegende Kolonien miteinander verschmelzen und als eine einzige Kolonie gezählt werden (Überlappungs- oder Koinzidenzfehler) (Bast, 2014).

1.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

1.2.3.1 Hintergrund

Die molekularbiologischen Methoden spielen heute neben den klassischen kulturellen, biochemischen, zytologischen und immunologischen Verfahren eine wichtige Rolle in der Lebensmittelanalytik. Diese Verfahren besitzen den Vorteil, dass zum einen Nukleinsäuren in fast allen Untersuchungsmaterialien vorhanden sind und zum anderen molekularbiologische Analysen oft schneller und mit weniger Aufwand verbunden sind, als klassische Methoden. Die molekularbiologischen Methoden wurden Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelt und seitdem immer weiter verbessert (Busch, 2010). Ende der 1980er Jahre erfand Kary Mullis die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986), eine Methode, welche die traditionellen mikrobiologischen Analysen durch eine kulturunabhängige Detektion direkt aus Proben, wie Lebensmittel, ohne Notwendigkeit zur Identifikation und Isolation der Zielmikroorganismen ermöglichte (Cocolin und Rantsiou, 2012). Die PCR erlaubt einen hochsensitiven und spezifischen *in-vitro*-Nachweis von DNA. Im Zuge der Reaktion können Sequenzabschnitte gezielt vervielfältigt werden und nur innerhalb weniger Stunden können aus einem einzigen Zielmolekül 10^{12} identische Moleküle entstehen (Bustin et al., 2012; Konrad und Busch 2010; Lottspeich und Engels, 2006). Durch die Weiterentwicklung zur Real-Time PCR-Technologie wurde eine Echtzeitanalyse der PCR-Produkte durch Messung von Fluoreszenzsignalen ermöglicht (Bustin, 2008; Higuchi et al., 1993). Technologische Fortschritte trugen dazu bei, dass sich die konventionelle PCR, eine qualitative Endpunktanalyse, zu einer quantitativen Methode weiterentwickelte (qPCR) (Bustin et al., 2012). Ende der 1990er Jahre wurden Instrumente, die fähig waren, PCR-Produkte während ihrer Produktion zu detektieren, verfügbar. Es wurde daher ermöglicht, einen spezifischen Mikroorganismus in einem Lebensmittel zu quantifizieren und zudem auch sein Verhalten aufgrund der Umgebungbedingungen (z. B. Lebensmittelzusammensetzung, Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffgehalt) zu studieren (Cocolin und Rantsiou, 2012). Da der Prozess in Echtzeit beobachtet wird, gibt es außerdem keinen Bedarf an zeit- und arbeitsaufwendigen Post-Amplifikationsbehandlungen, wie z. B. einer Gelelektrophorese.

Die qPCR besitzt Eigenschaften, die sie für den Bereich der Lebensmittelmikrobiologie extrem nützlich macht:

1. Der Zielmikroorganismus wird unabhängig von seinem physiologischen Zustand detektiert und quantifiziert. Somit können auch die gestressten und geschädigten Zellen mittels dieser Methode erfasst und so die falsch-negativen Ergebnisse des traditionell mikrobiologischen Verfahrens vermieden werden;
2. Die erforderliche Analysezeit ist im Vergleich zu den kulturabhängigen Methoden deutlich kürzer. Ergebnisse bezüglich der Anwesenheit von spezifischen

Mikroorganismen können in drei bis zu maximal 24 Stunden (wenn ein Anreicherungsschritt durchgeführt werden soll) erzielt werden;

3. Die Methode ist hochspezifisch für den Zielmikroorganismus und somit können die falsch-positiven Ergebnisse hinsichtlich der Fehlidentifikation vermieden werden (Cocolin und Rantsiou, 2012).

1.2.3.2 Prinzip der Methode

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Imitation der *in vivo* DNA-Replikation in der Zelle. Das Enzym DNA-Polymerase ergänzt die einzelsträngige DNA mit komplementären Nukleotiden zu Doppelsträngen (Kronberg, 1998; Rolfs et al., 1992). Dazu synthetisiert die Polymerase ausgehend von Startmolekülen einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen DNA-Matrize. Die letztere wird als DNA-Template bezeichnet. Als Startmoleküle werden zwei synthetische, kurze Stücke einzelsträngiger DNA (20 bis 30 Basen) mit je einem freien 3'-OH-Ende (Primer), die gegenläufig orientiert sind, in der Reaktion eingesetzt. Zwischen diesen zwei Primern erfolgt eine gezielte Amplifizierung der DNA-Sequenz. Die einzelnen Reaktionsschritte werden in Zyklen wiederholt, wodurch eine exponentielle Amplifizierung der Ziel-DNA stattfindet (Hartmann, 2007; Bangsow et al., 2002).

Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, beginnend mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 90-95 °C, wodurch innerhalb von 0,1 s bis 15 s (bei der Real-Time PCR) die einzelsträngigen DNA-Moleküle als Vorlage zur Verfügung stehen (Jacobsen et al., 2005; Boyapalle et al., 2001; Jourdan et al., 2000). Im nächsten Schritt hybridisieren die Primer innerhalb von 5-10 s an komplementäre Sequenzen der einzelsträngigen DNA. Dieser Schritt (Annealing) erfolgt bei 45-65 °C je nach Schmelztemperatur der Primer (Wolffs et al., 2004, 2005). Im letzten Schritt (Extension/Elongation) erfolgt die Synthese der Ziel-Sequenzen bei 72 °C innerhalb von 15-30 s durch die Taq-Polymerase (Abb. 1) (Bangsow et al., 2002; Olsen et al., 1995). Die Taq-Polymerase ist die am häufigsten eingesetzte Polymerase und wird aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Eine sehr oft benutzte Variante sind Hotstart-Taq-Polymerasen, die durch einen initialen 5-15-minütigen Denaturierungsschritt aktiviert werden müssen. In der Regel werden 30-35 bis max. 45 Zyklen durchgeführt. Diese Anzahl hängt von der Menge an Template-DNA ab (Hartmann, 2007; Viljoen und Crowther, 2005; Dang und Jaysena, 1996).

Bei der konventionellen PCR mit Endpunktanalyse werden die PCR-Produkte elektrophoretisch der Fragmentenlänge nach aufgetrennt und nach der Behandlung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht (McKillip und Drake, 2004). Im Gegensatz dazu erlaubt die Real-Time PCR die Messung der entstandenen Amplifikate bereits während des PCR-Laufs (Sagner et al., 1999). Dazu dienen die fluoreszenzmarkierten

Oligonukleotide. Die Analyse wird dadurch viel schneller und mit weniger Aufwand durchgeführt und die Gefahr einer nachträglichen DNA-Kontamination (Vermeidung von „carry-over“) vermindert. Diese Vorteile führten dazu, dass die Real-Time PCR die konventionelle Variante in der Routineanalytik zum großen Teil ersetzt hat (Hartmann, 2007; Fenollere und Rault, 2004; Lantz et al., 2000).

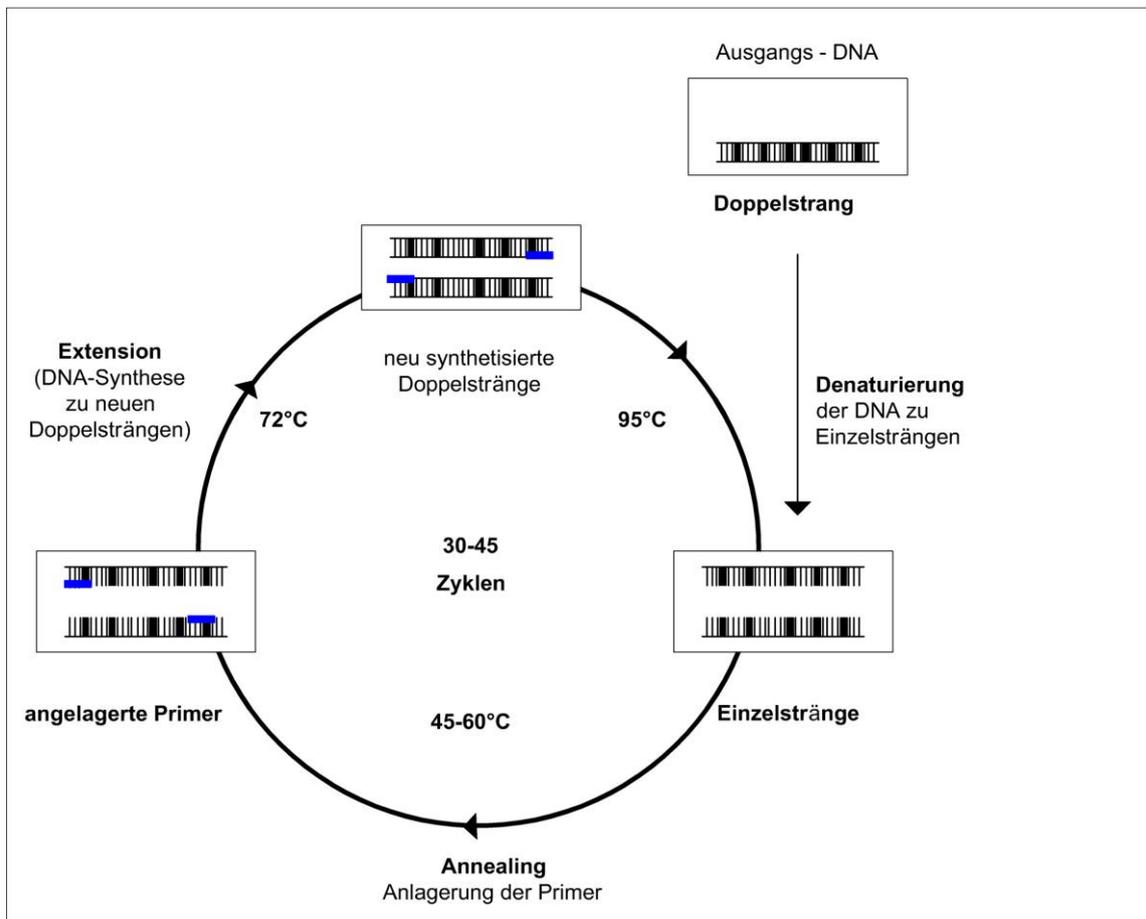


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer PCR (nach Von Haesler und Liebers, 2003; Hartmann, 2007).

1.2.3.3 Detektionssysteme

Zur Detektion der Amplifikate in der Real-Time PCR können entweder fluoreszierende Farbstoffe, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA anlagern eingesetzt werden, oder sequenzspezifische Fluorophor-markierte DNA-Stränge (Oligonukleotide, die sich spezifisch an eine Region innerhalb des Zielgens binden) (Bustin et al., 2012).

Bei den beiden Detektionssystemen kann die Probe innerhalb des Zyklus nur dann ein Fluoreszenz-Signal emittieren, wenn die Zielsequenz vorhanden ist, wobei die Intensität dieses Signals zur Menge des amplifizierten Produktes proportional ist. Als sichtbare Ergebnisse werden in einem typischen Diagramm die relativen Fluoreszenzeinheiten an der y-Achse gegenüber der Zyklenzahl auf der x-Achse aufgetragen (Hartmann, 2007; Fenollare und Raoult, 2004; Mackay, 2004).

DNA-bindende Farbstoffe

Das Prinzip der Anwendung von unspezifischen DNA-bindenden Farbstoffen (wie z. B. SYBR[®] Green oder Ethidiumbromid) basiert auf der Fähigkeit, dass sie sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagern und in gebundener Form Fluoreszenz emittieren (Abb. 2) (Morrison et al., 1998). Das in der DNA interkalierte SYBR[®] Green setzt ein Fluoreszenzsignal nach Anregung frei, das etwa 1000 mal stärker ist, als die nicht eingelagerte Variante. Die Detektion erfolgt, indem am Ende jedes Elongationsschrittes nach Hybridisierung des SYBR[®] Greens an der doppelsträngigen DNA gemessen wird. So kann die Produktion der Amplifikate kontinuierlich beobachtet werden (Bustin et al., 2012). Aufgrund der höheren Affinität des SYBR[®] Greens an der DNA (etwa 100-fach) hat sich dieser Farbstoff gegenüber Ethidiumbromid durchgesetzt und wird in der Real-Time PCR-Analyse häufiger verwendet (Morrison et al., 1998; Wittwer et al., 1997).

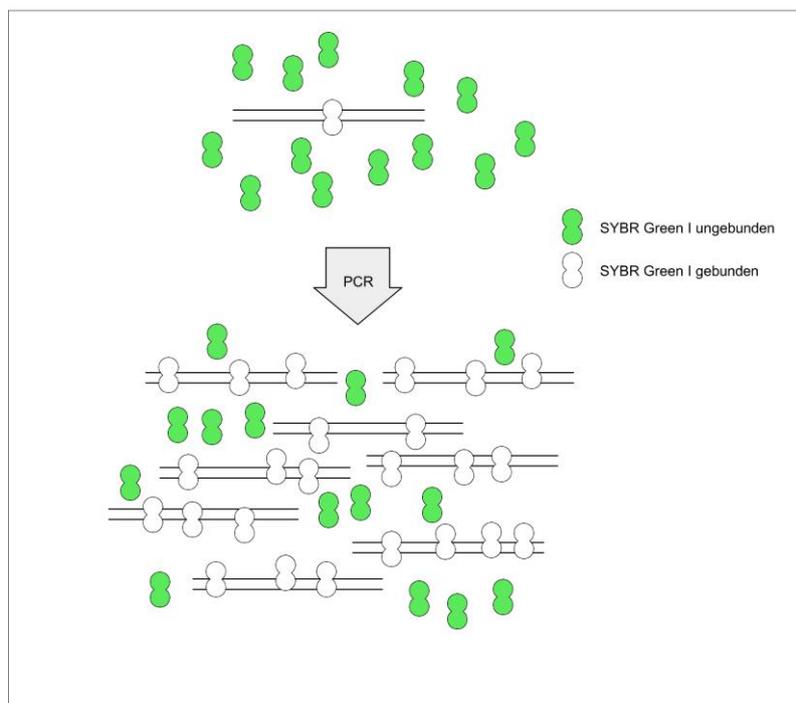


Abbildung 2: Die Detektion der PCR-Produkte mit SYBR Green I (iQ[™] SYBR[®] Green Supermix Bedienungshandbuch; Kat. Nr. 170-8880) [Bio-Rad Laboratories GmbH, D].

Im Vergleich zu Sonden basierten Methoden ist die Anwendung eines SYBR[®] Green-Systems relativ schnell, einfach und universell. Außer den üblichen PCR-Reagenzien wird lediglich SYBR[®] Green zur Reaktion zugegeben. Zudem wird die Synthese der kostenintensiven, zielspezifischen Oligonukleotide nicht benötigt. Nachteil dieses Detektionssystems ist, dass unspezifisch amplifizierte Fragmente oder Primer-Dimere ebenfalls messbare Signale liefern, wodurch sich eine geringe Spezifität ergibt (Bustin und Nolan, 2004). Da aber die PCR-Produkte aufgrund der unterschiedlichen Länge und des GC-Gehaltes bei verschiedenen Temperaturen schmelzen, gibt es die Möglichkeit, mit Hilfe einer Schmelzkurve zu differenzieren. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zur Gelanalyse, bei der die Produkte anhand der Größe identifiziert werden, mit Hilfe einer Schmelztemperatur kategorisiert wird (Wittwer et al., 2001; Mc Pherson und Moller, 2000). Dazu wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam schrittweise bis auf 95 °C erhöht, wodurch die DNA-Stränge denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Als Folge dieser Denaturierung dissoziiert das SYBR[®] Green von der DNA, das Fluoreszenzsignal sinkt und ist am niedrigsten am Schmelzpunkt. So kann durch Messung der Schmelztemperaturen die Spezifität der vervielfältigten Produkte bestimmt werden, da die nicht-spezifischen Amplifikate in der Regel bei einer niedrigeren Temperatur schmelzen (Bustin, 2000). So wird in einem typischen Diagramm die relative Fluoreszenzabnahme auf der y-Achse gegen die Temperatur auf der x-Achse aufgetragen. Bei der Temperatur mit dem stärksten Fluoreszenzabfall entsteht ein glockenförmiger „Peak“, anhand dessen sich die spezifischen Amplifikate von unspezifischen unterscheiden (Abb. 3). Dieses Detektionssystem ist für den Nachweis von sehr spezifischen DNA-Fragmenten, wie z. B. aus pathogenen Mikroorganismen, weniger geeignet, da die Schmelzkurven nicht als Bestätigungsreaktion für eine PCR gelten (Bustin et al., 2012).

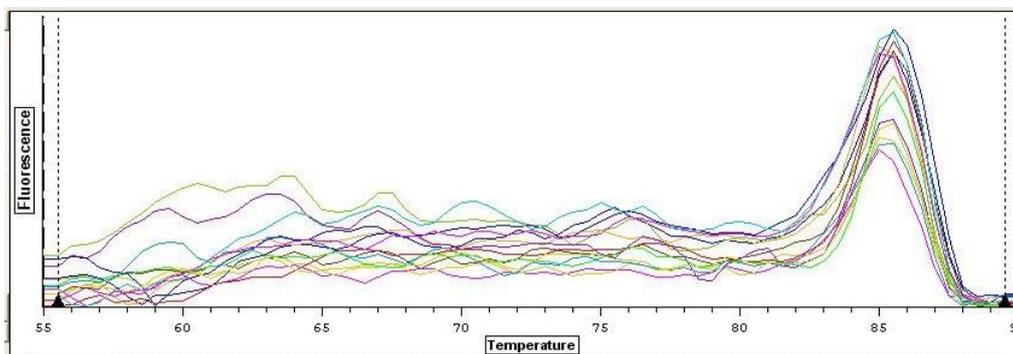


Abbildung 3: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte (eigene Untersuchung).

Sequenzspezifische Hybridisierungssonden

Um eine höhere Spezifität bei der Detektion der Ziel-DNA zu erreichen, wird eine interne Sonde, die innerhalb des PCR-Produktes bindet, zugegeben (Bustin et al., 2012). Es handelt sich dabei um Fluorophor markierte Oligonukleotide, die an Zielsequenzen anlagern. Je nach eingesetzter Sondenart erfolgt die Detektion innerhalb des Annealings- oder Elongationsschrittes. Die Amplifikation der Ziel-Sequenz hat eine Zunahme der Fluoreszenz zur Folge, sodass diese direkt proportional mit dem Zuwachs von PCR-Amplifikat ist. Das zentrale Prinzip des Detektionssystems mit Hybridisierungssonden basiert auf dem „Fluoreszenz-Resonanz Energietransfer“ (FRET), ein spektroskopischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Fluoreszenzmoleküls (Donor-Fluorophor oder Akzeptor-Molekül) strahlungsfrei auf ein zweites, sich in räumlicher Nähe befindliches (10-100 Å) Fluoreszenzmolekül (Akzeptor-Fluorophor oder Quencher) übertragen wird. Je ferner der Quencher ist, umso mehr nimmt FRET und dadurch das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das Signal des Donors zunimmt (Mackay et al., 2007). Diese Detektionsmethode hat im Vergleich zu DNA-bindenden Farbstoffen den Vorteil, dass gleichzeitig mehrere PCR-Targets unter Verwendung verschieden markierter Sonden detektiert werden können (Bustin et al., 2012).

Bei TaqMan[®] - oder auch 5'-Nuclease-Assays genannt, handelt es sich um eine doppelte Oligonukleotidsonde, die am 5'-Ende einen Reporterfluoreszenzfarbstoff trägt. Dabei unterdrückt ein in räumlicher Nähe liegender Quencher am 3'-Ende die Fluoreszenz des Reporters. Die Taq-Polymerase mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität baut die TaqMan-Sonde ab, wodurch Reporter und Quencher getrennt werden und die Fluoreszenz ansteigt. Die Spezifität des Assays besteht darin, dass nur dann, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt, eine Hydrolyse der Sonde erfolgt (Abb. 4) (Kreuzer et al., 2000; Vishnubhatla et al., 2000; Livac et al., 1995).

Die FRET-Sonde ist eine weitere Hybridisierungssonde, die aus zwei sequenzspezifischen Nukleotiden besteht. Diese bindet sich während des Annealing-Schrittes in kurzem Abstand aneinander an die Zielsequenz, wobei eine der Sequenzen einen Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende trägt und die andere einen anderen Farbstoff am 5'-Ende. Die Emission wird dann detektiert, wenn die Anregungsenergie des Farbstoffes der ersten Sonde auf den Farbstoff der zweiten Sonde übertragen und verstärkt wird. Bei räumlicher Nähe der zwei Sonden entsteht eine Energieübertragung und es werden messbare Signale freigesetzt, die einmal pro Zyklus während des Annealing-Schrittes gemessen werden (Abb. 5) (Bustin et al., 2012; Bangsow et al., 2002; Wittwer, 1997).

Bei den „Molecular Beacons“ handelt es sich um doppelt-markierte Nukleotide mit haarnadelartiger Molekülstruktur (hairpin structure) mit zueinander komplementären Enden, d. h. der Schleifenteil wird von einer „Stiel-Region“ mit einer Länge von 4-6 Basen flankiert.

An diesen Enden befinden sich gebräuchlich ein Quencher- (3'-Ende) und Reporterfarbstoff (5'-Ende). Bei der geschlossenen Haarnadelstruktur wird die Fluoreszenzemission unterdrückt. Die komplementäre Sequenz zu der Ziel-DNA befindet sich im Schleifenenteil der Sonde. Wenn die Sonde an die Ziel-Sequenz hybridisiert, wird die Haarnadelstruktur geöffnet, sodass Quencher und Reporter räumlich getrennt werden und das Fluoreszenzsignal freigesetzt wird (Abb. 4) (Bustin et al., 2012; Bustin, 2000; Tyagi und Kramer, 1996).

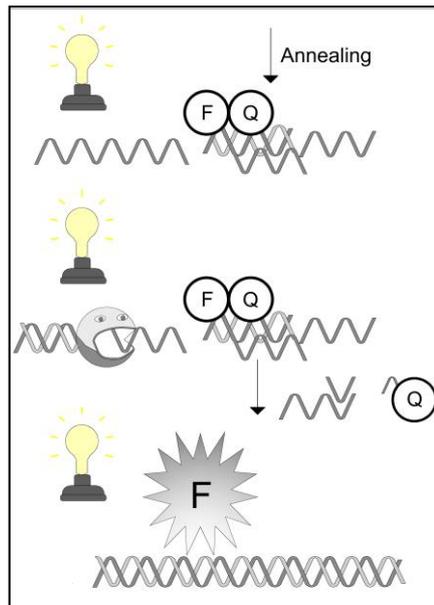


Abbildung 4: Detektion mit TaqMan[®] - oder 5'-Nuclease-Assays (Bustin et al., 2012).

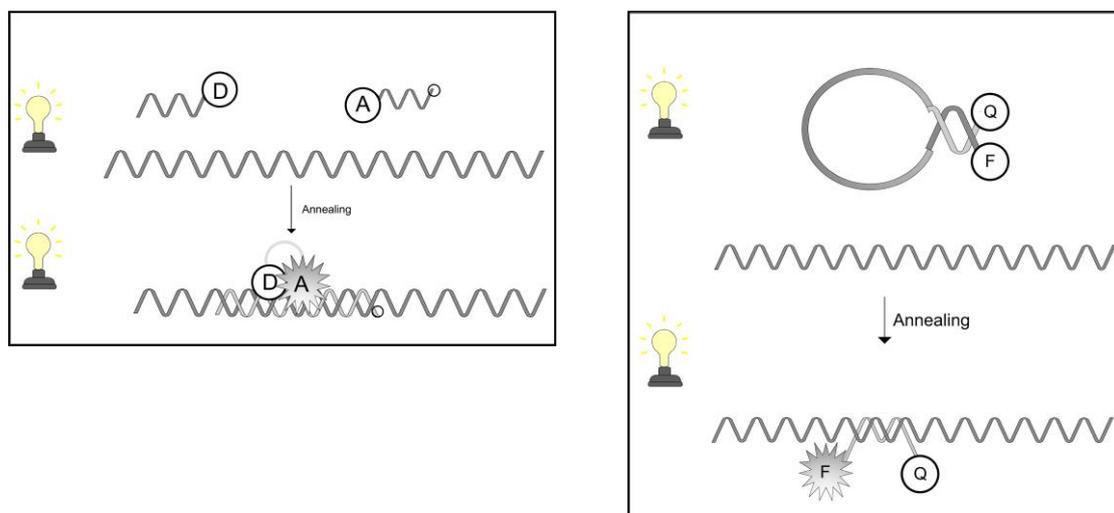


Abbildung 5: Detektion mit FRET-Sonden (links) und Molecular Beacons (rechts) (Bustin et al., 2012).

1.2.3.4 Quantitative Analyse

Ein bedeutender Fortschritt zur Quantifizierung von DNA wurde durch die Weiterentwicklung von konventioneller PCR zu quantitativer Real-Time fluoreszenzbasierter PCR (Real-Time qPCR) ermöglicht. Anders als die konventionelle PCR, die eine qualitative Endpunktmethode ist, erlaubt qPCR eine genaue Quantifizierung der amplifizierten DNA und das Monitoring des PCR-Ablaufs in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenz-Reportermolekülen (Bustin et al., 2009; Le Guillou-Guillemette und Lunel-Fabiani, 2009; Smith und Osborn, 2009; Zhang et al., 2009; Lu et al., 2008). Der Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge an Ziel-DNA und des während der exponentiellen Phase gebildeten PCR-Produktes, bietet die Grundlage für die Quantifizierung mittels der Real-Time PCR (Bustin und Nolan, 2004). Dieser Zusammenhang resultiert aus der Verdoppelung der DNA-Menge bei jedem Zyklus. Die Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal ein Anstieg des Fluoreszenzsignals über das Grundrauschen ermittelt wird, wird als Ct-Wert bezeichnet und dient zur Auswertung der Analyse (Mackay et al., 2007). Der Ct-Wert entspricht der Anzahl an Template-Kopien und ist von der Reaktionseffizienz und der Detektionssensitivität abhängig. Mit steigender Kopienzahl an Ziel-DNA im Ausgangsmaterial werden weniger Zyklen benötigt, um den Schwellenwert zu erreichen. Die wichtigsten Merkmale, die zur universellen Beliebtheit der qPCR beitragen, sind:

- **Geschwindigkeit:** Die Analysezeit der einzelnen Reaktionen beträgt in der Regel 10 Minuten oder weniger.
- **Komfort:** Es ist ein homogenes Assay und somit sind keine Post-Amplifikationsprozesse erforderlich.
- **Simplexität:** Die Analyse benötigt eine Ziel-Sequenz, Puffer, zwei Primer, einen Fluoreszenzreporter und ein einziges Enzym.
- **Sensitivität:** Die Einzelstrangkopien der Zielsequenz können detektiert, wenn auch nicht quantifiziert werden.
- **Spezifität:** Eine gut durchdachte Analyse ist spezifisch für ein einziges Ziel.
- **Robustheit:** Ein breites Spektrum von Reaktionsbedingungen können Ergebnisse erbringen.
- **Hohe Durchsatzleistung:** Viele Analysen können in einem einzigen Lauf durchgeführt werden.
- **Vertrautheit:** PCR gibt es seit 1985 und ihre Vor- und Nachteile sind hinreichend bekannt.
- **Kosten:** Alle verwendeten Reagenzien sind sehr teuer; jedoch werden angesichts der Tendenz zu immer kleiner werdenden Reaktionsvolumen die Kosten pro Analyse günstiger (Bustin et al., 2012).

1.2.3.5 Grundsätzliche Aspekte der Real-Time PCR-Quantifizierung

Durch die Echtzeit-Fluoreszenz-Detektion von PCR-Produkten lässt sich die initiale Quantität eines DNA-Templates aus verschiedenen biologischen Proben berechnen. Dies wird durch die Bestimmung der Zyklenanzahl, die zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenzniveaus (die sog. Threshold-Fluoreszenz) erforderlich ist, ermöglicht. Da die Fluoreszenzintensität die Produktmenge widerspiegelt, sind bei den Proben, die anfangs mehr Templates beinhalten, weniger PCR-Zyklen erforderlich, um den Threshold (Schwellenwert) zu erreichen, als bei den Proben, die weniger Templates enthalten. Diese starke Beziehung kann mathematisch definiert werden: die Zyklenanzahl, die benötigt wird, um den Threshold zu erreichen, ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Ausgangstemplatmenge. Deshalb können die Ct-Werte verwendet werden, um die Quantität des Ausgangstemplates zu berechnen (Bustin, 2004).

In der Real-Time PCR finden bei der Aufbereitung der Fluoreszenzwerte eine Reihe von Anpassungsschritten statt. Diese gleichen die Schwankungen zwischen den einzelnen Reaktionsplatten, einzelnen Reaktionsgefäßen sowie innerhalb eines Reaktionsgefäßes während einer Analyse aus. Dies ist die Basis für die sich anschließenden Quantifizierungen (Heid et al., 1996). Das Fluoreszenzsignal wird normalisiert, indem die Emissionsintensität des SYBR[®] Green Farbstoffs durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffs ROX, einen komplexes Farbstoffgemisch, welches hauptsächlich aus 6-Carboxy-X-rhodamin besteht, dividiert wird (Pfaffl et al., 2009; Keer, 2008). Die Real-Time PCR Software berechnet das angepasste Reporter-Signal (ΔR_n), welches die Größe des generierten Signals mittels der folgenden Gleichung angibt: $(\Delta R_n) = R_n (+) - R_n (-)$, wobei $R_n (+)$ der Emissionsintensität des SYBR[®] Green Farbstoffs zum Messzeitpunkt und $R_n (-)$ der Intensität vor der PCR-Amplifikation entspricht. Der Verlauf von R_n über die Zeit wird als Amplifikationsplot bezeichnet. Durch diese Anpassung werden die Fluoreszenzschwankungen von einem Reaktionsgefäß zum anderen ausgeglichen (Rutledge und Coté, 2003). Der Zeitpunkt (ausgedrückt in Zyklen), zu dem der Amplifikationsplot den Threshold (Schwellenwert) überschreitet, wird „Threshold Cycle“ (Ct) genannt, welcher als zentrale Größe in der Real-Time PCR betrachtet wird (Bustin et al., 2012). Um die anfängliche Menge des Templates in einer Probe zu berechnen, wird zunächst ein Fluoreszenz-Threshold definiert, anhand dessen verschiedene Proben und Referenzen verglichen werden. Der einfachste Weg, dies zu tun, ist die Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl zu plotten und dann die Thresholdlinie auf einem Niveau zu positionieren, bei welchem die Signale die Hintergrundwerte überschreiten und beginnen exponentiell anzusteigen. Der Ct-Wert für eine individuelle Probe ist dann definiert als der Zyklus, bei dem die Probenfluoreszenzkurve die Thresholdlinie kreuzt. Die erhaltenen Ct-Werte für

verschiedene Proben werden mit Ct-Werten von Referenzen verglichen, um entweder die absolute oder die relative Quantität des Templates zu berechnen (Pfaffl, 2012).

Im Allgemeinen können zwei Quantifizierungsstrategien zur Analyse der Expressionsdaten in der Real-Time PCR verwendet werden. Die Kopienzahl des Zielgens kann mittels „absoluter Quantifizierung“ anhand einer Standardkurve oder mittels „relativer Quantifizierung“ unter Anwendung von sogenannten validierten „Referenzgenen“ gemessen werden. Die absolute Quantifizierung bringt das PCR-Signal mit der Ausgangskopienzahl des zu vervielfältigenden Gens mit Hilfe einer synthetisch hergestellten Kalibrationskurve in Verbindung (Pfaffl, 2004). Die Standardprobe enthält die Sequenz des Amplikons mit bekannter Startkopienzahl und wird mit Hilfe verschiedener Verdünnungen in getrennten Reaktionen amplifiziert. Die daraus resultierenden Ct-Werte werden gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangskopienzahl aufgetragen, wodurch die Standardkurve erhalten wird (Pfaffl, 2012). Diese lässt sich in der halblogarithmischen Darstellung als Gerade mit Hilfe der folgenden Formel (Nr. 1) beschreiben.

$$C_T = -\frac{1}{\log(1+E)} \cdot \log(N_0) + \frac{\log\left(\frac{T}{K}\right)}{\log(1+E)}$$

T: Threshold
C_T: Zyklus, an dem T erreicht wird
E: PCR-Effizienz des Amplikons
N₍₀₎: Anzahl der Kopien eines Amplikons zu Beginn der PCR

Aus den empirisch gewonnenen Werten wird mit Hilfe einer linearen Regression die Steigung m und der Achsenabschnitt b errechnet. Daraus resultiert folgende vereinfachte Formel (Nr. 2) (Rutledge und Coté, 2003):

$$C_T = m \cdot \log(N_0) + b$$

m: Steigung
b: Achsenabschnitt

Somit assoziieren Kalibrationskurven der kolonienbildenden Einheiten pro g oder ml mit den Ct-Werten. Dadurch können die Ergebnisse der qPCR zu einem Wert übertragen werden, der mit den mikrobiologischen Kriterien in Verbindung tritt (Coccolin und Rantsiou, 2012). Die relative Quantifizierung misst stattdessen die Expressionsveränderungen zwischen zwei oder mehr untersuchten experimentellen Gruppen unter Anwendung von sogenannten „reference genes“ oder „house keeping genes“ (Pfaffl, 2012; Bustin et al., 2005; Souza et al., 1996). Obwohl die relative Quantifizierung angesichts der Handhabung einfacher durchzuführen ist als die absolute Quantifizierung (da keine Kalibrationskurve erforderlich ist), ist diese Methode mit weiteren Grundproblemen, wie Veränderungen in der Amplifikationseffizienz des analysierten Ziel- und Referenzgenes, behaftet (Pfaffl 2012; Vandesompele et al., 2009 und 2002).

1.2.4 Anwendung der qPCR in der Lebensmittelmikrobiologie

1.2.4.1 Hintergrund

Seit ihrer ersten Anwendung in der Lebensmittelmikrobiologie Ende der 90er Jahre weckte die qPCR das Interesse der Forscher überwiegend im Bereich der Lebensmittelsicherheit. Zudem gewinnt diese Methode in letzter Zeit insbesondere innerhalb des Lebensmittelverderbs an Bedeutung. Neben den Vorteilen, welche die konventionelle PCR in mikrobiologischen Untersuchungen bietet, wie z. B. Spezifität, verkürzte Analysezeit und Nachweis der „viable but non culturable“ Zellen, erlaubt die qPCR die Quantifizierung der Zielpopulation. Dieser Aspekt ist für die lebensmittelbedingten Pathogene, bei denen spezifische mikrobiologische Kriterien einzuhalten sind, besonders relevant. Darüber hinaus kann die Populationsgröße der verderbniserregenden Mikroorganismen und deren Kinetik in Lebensmitteln kontrolliert werden (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Trotz der Fortschritte in der Lebensmittelmikrobiologie wurde in ihrem Anwendungsbereich das gesamte Potential der qPCR nicht vollständig ausgenutzt. Der Quantifizierungsschritt, beispielsweise, wird selten eingesetzt und die qPCR wird häufig als eine Alternative zur konventionellen PCR verwendet (Cocolin und Rantsiou, 2012). Traditionell werden die Mikroben in Lebensmitteln mittels Bestimmung der Kolonienzahl auf den Platten quantifiziert. Diese Methode benötigt von der Analyse bis zum Erzielen der Ergebnisse mehrere Tage. Zudem basiert sie auf dem Wachstum der Mikroorganismen aus jeweils einer einzigen Zelle zu Kolonien. Dadurch wird wiederum die Auszählung vollständig von der Wachstumskapazität der Mikroorganismen von einem synthetischen Medium abhängig.

Durch vermehrte Applikation molekularbiologischer Techniken wurde gezeigt, dass die klassischen Verfahren dem Quantifizierungsschritt in der mikrobiologischen Lebensmittelsicherheit nicht einwandfrei begegnen können. Diese beziehen sich z. B. auf die Zellen, die sich in einem „viable but non culturable“-Zustand befinden. Diese besitzen eine metabolische Aktivität und können dadurch als Pathogene in der Lage sein, eine Krankheit hervorzurufen oder als Verderbniserreger einen Lebensmittelverderb zu verursachen, sind aber nicht fähig, eine Kolonie auf der Platte zu bilden (Rowan, 2004). Außerdem können Populationen mit limitierter Anzahl oder Mikroorganismen, die gestresst sind oder sich in einem sublethalen Zustand befinden, nicht wiederhergestellt werden und werden dadurch nicht erfasst. Ein weiterer Aspekt bezüglich der traditionellen Keimzahlbestimmung in Lebensmitteln stellt die begrenzte Selektivität der synthetischen mikrobiologischen Medien dar. Grundsätzlich ist die klassische Quantifizierung von spezifischen mikrobiologischen Populationen davon abhängig, dass diese Mikroorganismen die Fähigkeit besitzen, bei bestimmten Bedingungen bezüglich der Zusammensetzung des Nährmediums, der Temperatur, des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes zu wachsen (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Möglicherweise können diese Aspekte mit erhöhter PCR-Spezifität umgangen werden. Mit Hilfe von spezifischen Primern und Sonden wird es ermöglicht, spezifisch eine mikrobielle Population zu quantifizieren, ohne sie isolieren zu müssen und somit die Probleme bezüglich der Kultivierung zu vermeiden (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Pionierstudien im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie zur Quantifizierung von Mikroorganismen mittels molekularbiologischer Methoden stammen aus den 90er Jahren. Die verwendeten Methoden basierten hauptsächlich auf der Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe von Enzymimmuntests (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) (Wang und Hong, 1999; Gutiérrez et al., 1998; Manzano et al., 1998) und Elektrochemilumineszenz (Venkitanarayanan et al., 1997). Erst Anfang der 2000er Jahre erschienen Studien mit Echtzeitmonitoring einer PCR-Amplifikation mit Hilfe von Fluoreszenzsonden in der Lebensmittelmikrobiologie (McKillip und Drake, 2000). Inzwischen wurde ein wachsendes Interesse an der Anwendung dieser Methode von Wissenschaftlern manifestiert. Ein Überblick über diese Publikationen zeigt, dass der Großteil dieser Bemühungen der Analyse der lebensmittelbedingten Pathogenen gewidmet wurde, während nur wenige Beispiele für die Quantifizierung der verderbnisrelevanten Mikroorganismen existieren. Der Lebensmittelsicherheitsaspekt, der früher als ein Teil der Qualität betrachtet wurde, gilt momentan als Voraussetzung für Lebensmittel, damit sie überhaupt vermarktet werden können. Darüber hinaus trat am 01. Januar 2006 ein neues Lebensmittelgesetz (EU Regulation 2073/2005 zuletzt geändert durch 1441/2007) in der EU in Kraft, das zum ersten Mal spezifische mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel festlegte. Diesbezüglich stellt die qPCR ein Werkzeug dar, das verwendet werden kann, um Lebensmittelpathogene in kurzer Zeit zu quantifizieren und dadurch die Einhaltung des aktuellen Lebensmittelrechts zu gewährleisten (Cocolin und Rantsiou, 2012).

1.2.4.2 Aspekte der Anwendung von qPCR in der Lebensmittelmikrobiologie

Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion machen sie zu einer der wichtigsten und am häufigsten eingesetzten Methoden in der molekularbiologischen Forschung und Diagnostik (Busch, 2010). Auf der anderen Seite stellt die qPCR eine hochsensible Technik dar, deren Erfolg mit diversen Elementen einhergeht. Entscheidende Einflussfaktoren für die Durchführung der Reaktion stellen das Zyklusprofil der PCR, die Reaktionskomponenten sowie deren Konzentration, die Qualität der Ziel-DNA, die Beschaffenheit der Probenmatrix und die ausgewählten Primer dar. Um eine spezifische und sensitive PCR-Analyse durchzuführen, müssen alle oben genannten Komponenten möglichst optimiert werden (Wilson, 1997; Rossen et al., 1992).

Eine wichtige Voraussetzung für die Spezifität der Amplifikation ist eine stabile Bindung der Primer an die Ziel-DNA. Deshalb ist eine komplementäre Übereinstimmung mit der zu

amplifizierenden Vorlage sehr wichtig, damit keine unspezifische Bindung an andere DNA-Fragmente stattfindet (Bustin, 2004). Eine unspezifische Bindung der Primer kann zur Entstehung von Artefakten und falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Ein mangelhaftes Primer-Design kann die Ausbeute deutlich verringern. So ist es oft sinnvoller und schneller ähnliche Primer zu generieren als alle Reaktionsbedingungen zu optimieren (Newton und Graham, 1994; Kwok et al., 1990).

DNA, welche mittels PCR hauptsächlich amplifiziert wird, ist ein hochstabiles Molekül, auch nach dem Zelltod. Somit sagt ein positives Ergebnis mittels der PCR nicht notwendigerweise etwas über die Anwesenheit eines lebensfähigen Mikroorganismus aus. Dieser Aspekt ist sehr wichtig für das verarbeitete Lebensmittel, zum Beispiel für thermisch-bearbeitete Produkte. Hier beinhaltet die Produktion einen Schritt, bei der Lebensmittelpathogene abgetötet werden (Cocolin und Rantsiou, 2012). Aufgrund dieser Einschränkung der PCR wurden unterschiedliche alternative Methoden diskutiert: z. B. die RNA-Analyse zur Quantifizierung lebender Populationen (Rantsiou et al., 2008) oder die Anwendung von Ethidium Monoazide (EMA) für die selektive Quantifizierung lebender Populationen (Josefsen et al., 2004).

Die PCR-Inhibition durch verschiedene mögliche Faktoren, wie unzureichende Zellyse zur Extraktion der DNA, Nukleinsäure-Degradierung oder ein Blockieren der Polymerase Aktivität stellen einen wichtigen Meilenstein für den Erfolg der PCR-Analyse dar. Dass die Lebensmittel eine große Anzahl an Inhibitoren enthalten, welche die Leistung der PCR beeinträchtigen können, ist weithin bekannt. In den 1990ern haben Studien aufgezeigt, dass Fett, Eiweiß, Kulturmedienkomponenten und spezifische Gruppen von Komponenten bezüglich des Ursprungs der Lebensmittel (Polyphenole in Gemüse oder Blut in Fleisch und Fleischprodukten) drastisch die Effizienz der Amplifizierungsreaktion beeinflussen und somit die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen erhöhen (Rossen et al., 1992).

Außerdem kann die inhibitorische Aktivität durch Reagenzien der Nukleinsäuren-Extraktion ausgeübt werden (Rodriguez-Lazaro et al., 2007). Die Probleme hinsichtlich der Inhibitoren in Lebensmitteln werden relevanter, wenn die qPCR in Betracht gezogen wird. Die Anwesenheit von Komponenten, die in der Lage sind, die DNA-Polymerase-Aktivität zu stören, kann zu einem Amplifikationsmangel oder einer Unterschätzung der Anzahl der Zielmikroorganismen führen. Deshalb gibt es einen Bedarf an geeigneter (oft arbeitsaufwendiger) Probenaufbereitung, um die Zellen aus den Lebensmitteln zu gewinnen und DNA mit hoher Qualität für die Amplifikation zu erhalten (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Es wird empfohlen, dass zusätzliche Prozesskontrollen für die Überprüfung der Rückgewinnungsrate von Zielbakterien während des Extraktionsverfahrens in Betracht gezogen werden. Es wurde gezeigt, dass die Anwendung von komplizierten und aufwendigen Methoden nicht immer eine bessere Wiedergewinnung und Ausbeute ergeben

(Baert et al., 2008). Die Trennungs- und Aufkonzentrierungsmethoden sind mögliche Strategien, um inhibitorische Substanzen zu entfernen und die Zielmikroorganismen aufzukonzentrieren (Brehm-Stecher et al., 2009). Eine potentielle Gefahr bei der Anwendung von Konzentrierungsmethoden stellt die Konzentration von inhibitorischen Faktoren aus der Lebensmittelmatrix dar. Diese kann die wirksame Anwendung von qPCR-Reaktionen gefährden. Fukushima et al. (2007) berichten über eine Probenaufbereitungsmethode, bestehend aus Filtration, Zentrifugation mit niedriger und hoher Geschwindigkeit und „Buoyant Density“-Zentrifugation zur Aufkonzentrierung von lebensmittelbedingten Pathogenen bis zur 250-fachen Menge ohne Anreicherung. Diese Autoren detektierten weniger als 10 bis 10^3 KbE/g (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Die Auswahl einer geeigneten Probenaufbereitungsmethode ist zweifellos ein kritischer Aspekt der qPCR-Detektion. Diese Methoden sollten sorgfältig und in Abhängigkeit von der zu analysierenden Lebensmittelmatrix und der Analysensensitivität ausgewählt werden. Die Auswahl des besten Protokolls wird immer ein Kompromiss zwischen Kosten, Geschwindigkeit und universeller Anwendung hinsichtlich der Lebensmittelmatrix sein (Cocolin und Rantsiou, 2012). Die Menge an eingesetzter DNA kann auch eine entscheidende Wirkung auf das Ergebnis ausüben. Wenn z. B. zu viel DNA eingesetzt wird, kann die Reaktion inhibiert werden. In diesem Fall sollte die eingesetzte DNA-Menge verdünnt werden (Rossen et al., 1992; Abbott et al., 1988).

Die sensitive Natur der PCR-Reaktion zeigt eine große Anfälligkeit für Kontaminationen. Deshalb ist es wichtig, dass bei allen Arbeitsschritten effektive Maßnahmen zur Vermeidung der Kontaminationen mit externer DNA angewendet werden, sodass die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse minimiert wird. Es wird eine strikte räumliche Trennung bei der Durchführung aller Arbeitsschritte, wie Probenaufbereitung (Prä-PCR-Bereich), Handhabung der Reagenzien (Master-Mix) und Amplifikation sowie Nachweis der Nukleinsäuren (Post-PCR-Bereich) empfohlen. Pipettenspitzen mit Aerosolschutz und geeignete sterile, nukleasefreie Gefäße sind Standard in einem PCR-Labor (Apfalter, 2005).

Zur frühzeitigen Detektion von Kontaminationen ist es hilfreich, Negativkontrollen („no template control“ oder Master-Mixkontrolle) mitzuführen. Falsch-negative Ergebnisse resultieren in der Regel aus den inhibierenden Substanzen im Reaktionsansatz. Als Folge wird die Effektivität der PCR stark herabgesetzt und es wird kein Amplifikat mehr produziert. Dies kann durch Zugabe von Inhibitionskontrollen in jedem PCR-Ansatz überprüft werden. Von der CEN und ISO wird dieser Vorgang in einer allgemeinen Richtlinie für PCR-Tests im Lebensmittelbereich gefordert (EN ISO 22174:2004) (Hoorfar et al., 2004). Wenn die Ziel-DNA in sehr großen Mengen vorliegt, passiert es oft, dass die Ziel-DNA amplifiziert wird, aber nicht die IAC (interne Amplifikationskontrolle). Hier wird die Probe trotzdem als positiv

betrachtet. Von einer Inhibition wird dann ausgegangen, wenn weder die Ziel-DNA noch die IAC amplifiziert werden (Konrad und Busch, 2010).

Ein wichtiger Schritt für die Anwendung von qPCR zur Quantifizierung der Mikroorganismen in Lebensmitteln ist die Erstellung einer geeigneten Kalibrationskurve. Die Kalibrationskurve ordnet dem Parameter KbE/g oder ml einen Ct-Wert, den „threshold cycle“ in der qPCR zu. Somit können die Ergebnisse der qPCR zu einem Wert übersetzt werden, der mit den mikrobiologischen Kriterien in Verbindung steht. Bei der Anwendung im Bereich der Lebensmitteldiagnostik wird empfohlen, dass die Kalibrationskurve in der Lebensmittelmatrix erstellt wird, da auf diese Weise alle Schritte in der Probenaufbereitung und Amplifikation berücksichtigt werden. Es soll vermieden werden, Standardkurven zur Quantifizierung von Mikroorganismen in einem spezifischen Lebensmittel mittels Verdünnung einer Reinkultur und DNA-Extraktion aus jeder Verdünnung zu generieren und dannach eine qPCR-Analyse durchzuführen. So wird die Wirkung der Lebensmittelmatrix, die sowohl während der DNA-Extraktion als auch bei der Amplifikation ausgeübt wird, nicht in Betracht gezogen. Sie führt somit zu einer Unterschätzung der mikrobiologischen Belastung (Cocolin und Rantsiou, 2012).

In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die Erwartungen der qPCR-Analyse je nach Typ der Zielmikroorganismen sehr unterschiedlich sind. Während bei den Pathogenen eine niedrige Detektionsgrenze erforderlich ist, ist für die Quantifizierung der Verderbnisorganismen eine Anforderung an niedrige Quantifizierungsgrenzen weniger wichtig. Die Verderbsprozesse finden statt, wenn eine kritische Anzahl an Mikroorganismen erreicht wird. Diese liegt generell über 10^6 KbE/g oder ml. Somit bestehen weniger Bedenken hinsichtlich der Mängel an qPCR-Sensitivität aufgrund der lebensmittelmatrixbedingten Inhibition. Dieser Parameter darf jedoch nicht vernachlässigt werden, wenn eine korrekte Quantifizierung der Zielmikroorganismen erzielt werden soll (Cocolin und Rantsiou, 2012).

1.2.5 Überprüfung der verfügbaren Literatur

Die Anzahl der publizierten Studien über die qPCR ist in den letzten 10 Jahren enorm angestiegen. Allerdings setzt die große Mehrheit auf die Entwicklung von Protokollen zur Quantifizierung von lebensmittelbedingten Pathogenen. Somit ist die Lebensmittelsicherheit derzeit der größte Anwendungsbereich für qPCR. Mehrere bakterielle Pathogene sowie Viren wurden in verschiedenen Lebensmittelmatrizen untersucht. Sie stellen eine große Masse an Daten zur Verfügung, die sinnvoll zur Risikobewertungsanalyse verwendet werden können. Während die Anzahl der Studien bezüglich der lebensmittelbedingten Pathogene sehr hoch ist, existieren generell wenige Studien bezüglich Verderbsassoziierter Mikroorganismen. Es gibt nur wenige Beispiele von qPCR-Methoden zur Untersuchung der Anwesenheit und Dynamik von Mikroorganismen in Lebensmitteln, die für den Verderb

verantwortlich sind. Ein größeres Defizit zeigt sich in Studien zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln. Diese stellen ein wichtiges Kriterium zur Einschätzung der Haltbarkeitsdauer der Lebensmittel und zur Risikobewertung von Lebensmitteln hinsichtlich der pathogenen Keime dar. Eine qPCR-basierende Bestimmung der Gesamtkeimzahl trägt dazu bei, dass Nachteile hinsichtlich der kulturabhängigen Methoden umgangen werden und eine schnelle Einschätzung der Haltbarkeitsdauer der Lebensmittel ermöglicht wird (Cocolin und Rantsiou, 2012).

Die ersten Versuche bezüglich der Anwendung von PCR zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln wurden von Venkitanarayanan et al. (1997) und Gutiérrez et al. (1998) berichtet. Diese Autoren haben Protokolle mit Hilfe von konventioneller PCR und anschließenden Post-PCR-Prozessen (Chemilumineszenz und ELISA) sowie semi-quantitative Protokolle zur Bestimmung der Anzahl von Verderbsassoziierten Mikroorganismen in Schweinefleisch entwickelt. Allerdings sind die verwendeten Post-PCR Verfahren sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

Außerdem kann die Weiterverwendung der PCR-Produkte zur Kontamination und Produktion von falsch-positiven Ergebnissen führen. Die wenigen anderen in der Literatur berichteten Studien erzielten zwar meistens relativ hohe Korrelationsergebnisse mit der Kulturmethode, zeigten aber bezüglich der Methodik einige Defizite. Diese umfassten z. B. die Anwendung von Multiple-Kopie-Gen *16S rRNA* (Lee und Levin, 2007a), Auswahl von RNA statt DNA als Amplifikationsziel (um die Probleme hinsichtlich der toten Zellen zu vermeiden) (Dolan et al., 2009) und Verwendung von Kalibrationskurven, die unter Anwendung von bakteriellen Reinkulturen erstellt wurden (Takahashi et al., 2006). Diese Studien sind in Tabelle 3 aufgelistet. Über eine qPCR-basierende Methode zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch wurde bis jetzt nicht berichtet.

Tabelle 3: Verfügbare Studien in der Literatur, zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl mit Hilfe von qPCR

Lebensmittel-matrix	Amplifikationsziel (Gen)	Quantifizierungsgrenze	Methode	Literatur
Schweinefleisch	<i>16S rRNA</i>	10 ² KbE/g	konventionelle PCR/ELISA	Gutiérrez et al., 1998
Schweinefleisch	23S rRNA	10 ² KbE/g	konventionelle PCR/Elektrochemilumineszenz	Venkitanarayanan et al., 1996
Rinderfleisch	<i>rmp</i>	10 ³ KbE/g	RT-qPCR	Dolan et al., 2009
Fisch (Kabeljau)	<i>16S rRNA</i>	10 ⁵ KbE/g	Real-Time qPCR	Lee und Levin, 2007a/b
verzehrfertiges Obst und Gemüse	<i>rpoB</i>	10 ³ KbE/g	Real-Time qPCR	Takahashi et al., 2006

1.2.6 *rpoB*-Gen als Amplifikationsziel

Der erste Schritt beim Konzipieren einer PCR-Analyse stellt die Auswahl eines geeigneten Amplifikationszieles dar. Hierzu soll in erster Linie ein Gen selektiert werden, dessen phylogenetische Eigenschaften mit dem Ziel der Analyse einhergeht. Diese umfasst die Funktion des Gens im Genom der Bakterien, das Vorhandensein von je nach Ziel konservierten oder variablen Regionen und die Kopienzahl im Genom. Zudem ist es entscheidend, dass das Gen ausreichend erforscht ist und seine Sequenzen in Gendatenbanken zur Verfügung stehen.

In den letzten Jahren weckte das Gen *rpoB*, das die bakterielle RNA-Polymerase β -Subunit kodiert, wachsendes Interesse als Grundlage für die phylogenetischen Analysen in Archae (Klenk und Zillig, 1994; Pühler et al., 1989) und Bakterien (Rowland et al., 1993). RNA-Polymerase (RNAP) ist ein wichtiges Enzym im transkriptionalen Prozess und das Endziel für die regulatorischen Signalwege (regulatory pathways), die die Genexpression in allen lebenden Mikroorganismen kontrollieren (Borukhov und Nudler, 2003). In Bakterien ist RNAP für die Synthese der mRNA, rRNA und tRNA zuständig. Das 400 kDa RNAP-Core-Enzym besteht aus fünf Untereinheiten: α -Dimer (α_2), die β -Subunit, β' -Subunit und ω -Subunit. Diese werden in Folge der Bindung mit einer σ -Subunit zu einem Holoenzym umgewandelt, welches die Transkription bei den Promotoren in die Wege leitet. Der Großteil der katalytischen Funktion der RNAP erfolgt durch die β -Subunit, welche vom *rpoB*-Gen kodiert wird (Jin und Gross, 1989). Über die Universalität des *rpoB*-Gens wurde zum ersten Mal von Morse et al. (1996) berichtet. Der evolutionäre Ursprung dieses Gens weist darauf hin, dass das *rpoB*-Gen das Potential hat als starker Chronometer verwendet zu werden (Bocchetta et al., 2000).

Seit der Pionierarbeit von Rowland et al. (1993) wird die Sequenzierung des *rpoB*-Gens zum molekularen Nachweis von Bakterien in der Mikrobiologie eingesetzt. Das *rpoB*-Gen enthält unterschiedliche konservierte und variable Regionen (Boor et al., 1995). Breitband-Primer (broad-spectrum primers) können für die konservierten Regionen, die eine interne variable Region enthalten, generiert werden (Adékambi et al., 2006; Kim et al., 1999). Diverse *rpoB*-Genfragmente wurden zur Analyse der Bakterien innerhalb der gleichen Gruppe (Merhej et al., 2008; Hoffmann und Roggenkamp, 2003; Kwon et al., 2001; Mollet et al., 1997) oder eng verwandter Gruppen (Tarr et al., 2007; Kupfer et al., 2006; Korczak et al., 2004) verwendet. Adékambi et al. (2008b) schlagen die hypervariable Region auf dem *rpoB*-Gen (zwischen Position 2300 bis 3300) als geeignete Zielsequenz zur Identifizierung und zur phylogenetischen Diskriminierung auf Spezies- und Subspeziesebene vor (Adékambi et al., 2008b). Adékambi et al. (2008b) fassen die nützlichen Besonderheiten des *rpoB*-Gens für mikrobiologische Anwendungen wie folgt zusammen:

- Das *rpoB*-Gen erstreckt sich von 3411 bp (*Staphylococcus aureus*) bis 4185 bp (*Neisseria meningitidis*).
- Es ist ein Monokopie-Gen, mit Ausnahme des im RIF-R *Nocardia farcinica*-Stamm anwesenden Gens (Ishikawa et al., 2004).
- Die meisten *rpoB*-Gensequenzen in der Genbank[®] sind aktuell (10 Jahre im Vergleich zu 15 Jahren beim 16S *rRNA*-Gen) und wurden mittels Neu-Generationssequenzer (Next-Generation-Sequencing) erstellt und sind somit von einer guten Qualität.
- Die *rpoB*-basierte Genotypisierung weist darauf hin, dass Nukleotid-Substitutionen primär bei der dritten Kodonposition, die stille Regionen (silent) sind, entstehen.
- Das *rpoB*-Gen wurde dank seiner Haushaltsfunktion kaum vom horizontalen Gentransfer (HGT) betroffen und somit spiegeln seine Sequenzen die Phylogenie von bakteriellen Genera wider (Case et al., 2007; Korczak et al., 2004).

Es gibt keine kommerziell vorhandene *rpoB*-Sequenzen-Datenbank. *rpoB*-Gensequenzen sollen im Internet aus der Genbank[®] (www.ncbi.nlm.nih.gov/) bezogen werden können. Diese große Nukleotid-Sequenz-Datenbank enthält mehr als 30 Mio. Sequenzen und 30.000 *rpoB*-Gensequenzen inklusive sowohl vollständiger als auch Fragment-Sequenzen. Partielle *rpoB*-Gensequenzierung (300-750 bp) ist für eine präzise Identifizierung eines klinischen Isolates ausreichend. Partielle Sequenzen stellen vermutlich einen größeren Prozentsatz der Differenzierung unter den Isolaten als Sequenzen des gesamten Gens dar (Kim et al., 1999; Mollet et al., 1997).

Es gibt keinen Universalprimer, der auf einmal zur PCR-Amplifizierung und Sequenzierung von allen bakteriellen Spezies eingesetzt werden kann. Dennoch ist es möglich „broad spectrum“-Primer zu generieren, welche auf zahlreiche Gruppen innerhalb vom gleichen bakteriellen Phylum abzielen. Adékambi et al. (2008b) haben beispielsweise ein degeneriertes Konsensus-Primerpaar generiert, das ein 860-bp-Fragment amplifiziert sowie eine 820-bp-Sequenz in Organismen, die für fünf Gruppen von γ -Proteobacteria repräsentativ sind, hergeleitet (Adékambi et al., 2008b). Somit stellen die Konsensusregionen auf *rpoB*-Gen eine geeignete Grundlage dar, um als Amplifikationsziel zur Bestimmung der Gesamtzahl verwendet zu werden. Wie aus den Daten in Tabelle 3 zu entnehmen ist, haben bis auf Takahashi et al. (2006), die dieses Gen als Ziel-DNA zur Bestimmung der Keimzahl in verzehrfertigem Obst und Gemüse mittels der qPCR verwendet haben, keine weiteren Studien die Anwendung des *rpoB*-Gens zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln berichtet.

1.2.7 Identifizierung von Bakterien mittels der 16S rDNA-Analyse

1.2.7.1 Hintergrund

Die Sequenzanalyse bakterieller *16S rRNA*-Gene wird seit vielen Jahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in der klinischen Mikrobiologie und Lebensmittelanalytik eingesetzt (Clarridge, 2004; Corless et al., 2000; Cilia et al., 1996). Die wichtigsten Vorteile dieser Gene sind, dass sie universell verbreitet sind, d. h. sie sind in fast allen Bakterien oft als Multigenfamilie oder Operons anwesend und ihre Funktion wurde im Laufe der Zeit nicht geändert. Außerdem sind sie häufig in mehreren Kopien über das Genom verteilt. Somit ist die Sensitivität einer Identifizierung sehr hoch. Die rDNA besteht aus konservierten und (hoch) variablen Bereichen, die sich je nach gewünschter Spezifität als Basis zur Entwicklung von Primer und Sonden eignen. Das *16S rRNA*-Gen (1500 bp) ist groß genug, um für Bioinformatikzwecke verwendet zu werden (Patel, 2001). Mittels PCR können *16S rRNA*-Genfragmente selektiv aus gemischter DNA amplifiziert werden. In den frühen 1990er wurden die DNA-Sequencer hinsichtlich Kosten, Methodik und Technologie drastisch verbessert. Somit können sich derzeit viele Zentren ein solches Equipment leisten (Janda und Abbott, 2007).

Die prinzipiellen Schritte bei diesem Verfahren bestehen aus der Isolierung der genomischen DNA aus Bakterien, der Vervielfältigung der Ziel-Regionen mit Hilfe von *16S rDNA*-basierenden Primern mittels PCR, der Aufreinigung der PCR-Produkte, der Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte und der Auswertung der Sequenzen *in silico* unter Anwendung von vorhandenen Gendatenbanken, wie z. B. BLAST N. Als Ergebnis der Datenbankrecherche werden von BLAST N diejenigen Bakterienstämme gegeben, die die höchste Homologie zu der analysierten *16S-rDNA*-Sequenz haben. Bei einer Sequenzhomologie $\geq 98\%$ kann häufig eindeutig auf die Gattung und Spezies der analysierten Bakterienprobe geschlossen werden. Bei einigen genetisch nahe verwandten Bakterienstämmen sind die *16S rDNA*-Sequenzen so ähnlich (hohe Sequenzhomologie, identischer Score bei BLAST N-Auswertung), dass für eine eindeutige Spezieszuordnung zusätzliche, physiologische und/oder molekularbiologische Untersuchungen notwendig sind (Amann et al., 1995).

Diese Methode wurde von einigen Autoren vor der Bestimmung der Keimzahl mittels der qPCR zur Identifizierung der mikrobiellen Population verwendet. Dolan et al. (2009) haben nach der Kultivierung der Bakterien aus Rindfleischproben auf verschiedenen Selektivnährmedien und Extraktion der DNA aus den gewachsenen Kolonien eine *16S rRNA*-PCR durchgeführt und die Verderbsassoziierten Bakterien identifiziert. Takahashi et al. (2006) haben die gleiche Methode verwendet, um die Keimbelastung von verzehrfertigen Obst- und Gemüseproben zu identifizieren. Das Ziel dieses Verfahrens besteht hauptsächlich darin, dass die Primer, die bei der qPCR-Analyse eingesetzt werden,

mit Hilfe der identifizierten Bakterien auf Spezifität getestet werden können. Über eine 16S *rRNA*-basierende Methode zur Identifizierung der Verderbnis-assoziierten Mikroorganismen in Geflügelfleisch wurde bisher nicht berichtet.

1.2.7.2 Aspekte der 16S *rRNA*-Sequenzanalyse

Die Anwendung der 16S *rRNA*-Sequenzanalyse zur Identifikation der Mikroorganismen ist relativ einfach und schnell. Allerdings haben viele Studien einige Aspekte für den Einsatz dieser Methode beschrieben:

Bakterielle Nomenklatur bezüglich der 16S *rRNA*-Gensequenzierung

Einige Spezies existieren als „Phenospezies“ oder „Komplex“, d. h. es existieren mehr als ein Genomovar (DNA-Gruppe) unter dieser Spezies und sie können nicht phenotypisch getrennt werden. Beispiele solcher Situationen sind *Enterobacter cloacae* (mindestens 7 Genomovars ursprünglich), *Pseudomonas stutzeri* (18 Genomovars ursprünglich) und der Genus *Acinetobacter* (22 Genomovars ursprünglich) (Janda und Abbott, 2007).

Resolution der 16S *rRNA*-Gensequenzierung

Obwohl 16S *rRNA*-Gensequenzierung in Bezug auf bakterielle Klassifizierung sehr nützlich ist, besitzen deren Ergebnisse auf Speziesniveau nur eine begrenzte phylogenetische Aussagekraft und eine schwache Diskriminierung für einige Genera. So sind DNA-Verwandtschaftsstudien notwendig, um eine absolute Resolution zu erreichen. Janda und Abbott (2007) berichteten, dass obwohl die Typstämme von *Edwardsiella*-Spezies eine 99,35-99,81 %-ige Ähnlichkeit zueinander zeigen, jedoch biochemisch und mittels DNA-Homologie (28 bis 50 % Verwandtschaft) deutlich unterscheidbar sind. Solche Beispiele zeigen, dass die Sequenzhomologie nicht in allen Fällen auf eine Identität oder Genauigkeit in der mikrobiellen Identifizierung hinweisen. Viele Autoren haben von Resolutionsproblemen mit den 16S *rRNA*-Gensequenzierungsdaten auf der Genus- und/oder Speziesebene berichtet. Diese umfassen u. a. (nicht exklusiv) die Familie *Enterobacteriaceae* (insbesondere *Enterobacter* und *Pantoea*), die *Acinetobacter baumannii*-A, *Achromobacter* und *Acinetomyces*. In anderen Fällen beträgt die Divergenz zwischen benachbarten Stämmen und einem unbekanntem Stamm <0,5 % (d. h. >99,5 % Homologie). In solchen Situationen können kleine Unterschiede die Auswahl der nächsten Treffer als definitive Identifizierung nicht rechtfertigen (Fontana et al., 2005).

Definition von Spezies-Identifizierung mittels 16S *rRNA*- Gensequenzdaten

Leider ist keine universale Definition für Spezies-Identifizierung mittels der 16S *rRNA*-Gensequenzierung vorhanden und die Autoren unterscheiden sich bei der Anwendung akzeptabler Kriterien für die Bestimmung der Spezies-Übereinstimmungen stark. Kaum überschreitet die Definition Spezies-„Match“ über 99 % -Homologie. Selbst dieser Grenzwert

kann nicht in allen Fällen ausreichend sein, um eine genaue Identifizierung zu gewährleisten. Im Falle der *Aeromonas veronii* kann das Genom z. B. bis zu sechs Kopien des *16S rRNA*-Gens beinhalten, die eine bis zu 1,5 % große Variabilität aufweisen. Diese weist auf eine intergenomische Heterogenität unter Aeromonaden hin und kann die Anwendung dieses Verfahrens für die Spezies-Identifizierung ohne weitere biochemische Analysen beeinträchtigen.

Die Anwendung der *16S rRNA*-Gensequenzierung für eine definitive, mikrobielle Identifizierung fordert eine stimmige Reihe von Richtlinien für die Interpretation von Sequenzdaten, die implementiert werden sollen, sodass die Ergebnisse von Studien mit einander verglichen werden können. Da die Anpassung der *16S rRNA*-Gensequenzierung als ein Werkzeug für eine Spezies-Identifikation nach wie vor ein relativ neues Phänomen in vielen Mikrobiologielaboren ist, werden solche Standards vermutlich erst im Laufe der Zeit entwickelt (Janda und Abbott, 2007).

1.3 Zielsetzung und Aufbau der Versuche

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein molekularbiologisches Verfahren auf Basis der Real-Time qPCR zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch entwickelt werden. Die Ergebnisse dieser Methode sollen mit denen aus dem klassischen Kulturverfahren in Korrelationsanalysen verglichen werden.

Für die Durchführung sind folgende Arbeitsschritte geplant:

- Durchführung einer PCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleischproben mit Hilfe von Universal-Primern aus der Literatur im Rahmen der Vorversuche und Auswertung der Ergebnisse in Korrelation mit dem Plattenkulturverfahren. Hierfür soll eine taugliche Methode für die Aufbereitung der Fleischproben und Entfernung der PCR-Inhibitoren ermittelt werden. Außerdem soll ein geeignetes DNA-Extraktionsverfahren ausgewählt und verwendet werden.
- Identifizierung der Verderbsassoziierten Bakterien in Geflügelfleisch mittels der *16S rRNA*-Sequenzenanalyse. Nach Kultivierung der Bakterien von Geflügelfleisch auf verschiedenen Selektivnährmedien werden ihre DNA mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden sequenziert und mit Hilfe der BLAST N-Analyse ausgewertet.
- Auswahl eines geeigneten Amplifikationsziels und Generieren der Primer anhand der vorhandenen Gensequenzen in öffentlichen Datenbanken. Die Eignung der generierten Primer zum Einsatz in die Real-Time PCR soll ermittelt und die bestfunktionierenden Paare für weitere Analysen ausgewählt werden.

- Entwicklung eines Real-Time PCR-Systems unter Anwendung von generierten Primern. Hierfür werden die Ergebnisse der PCR-Analyse mit denen aus dem Kulturverfahren in Korrelationen verglichen. Der Primer mit dem besten Bestimmtheitsmaß wird für die Quantifizierungsanalyse eingesetzt.
- Weiterentwicklung der Real-Time PCR zu einer quantitativen Analyse. Hierfür wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus der bakteriellen DNA eine Kalibrationskurve erstellt und anhand dieser eine absolute Quantifizierung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch durchgeführt. In einem parallelen Versuch wird die Tauglichkeit eines Prä-PCR Schrittes zur Entfernung der Inhibitoren von Standards ermittelt. Die Wiederholbarkeit der entwickelten qPCR-Analyse wird durch DNA-Proben aus neuen Geflügelfleischproben überprüft.

Somit besteht die Arbeit aus fünf praktischen Abschnitten (Abschn. 3.1 bis 3.5). Jeder Abschnitt beginnt mit einer Einleitung, die das Ziel und den Aufbau der Versuche kurz beschreibt, gefolgt von der dazu gehörigen Durchführung der Versuche (Methode), den Ergebnissen, der Diskussion und der Schlussfolgerung. Die verwendeten Versuchsmaterialien werden vorab beschrieben (Abschn. 2). Ein Fazit für die gesamte Arbeit und ein Ausblick über mögliche Weiterentwicklungen werden im letzten Abschnitt (Abschn. 4) zusammengefasst.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die Tabelle 4 stellt die verwendeten Chemikalien in der vorliegenden Arbeit dar.

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Bindepuffer für DNA-Extraktion	Genetic ID (Europe GmbH), Augsburg, D.
Bindepuffer für DNA-Purifikation	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
D (+) Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Elutionspuffer (TE, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	Genetic ID (Europe GmbH), Augsburg, D.
Entfärber	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Ethanol, reinst $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Ethidiumbromid (10 ml, Konz. 0,625 mg/ml)	Dianova GmbH, Hamburg, D.
Immersionsöl	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D.
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Kristallviolett	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Lugol'sche Lösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Lysepuffer (Genomic Lyse buffer für DNA-Extraktion)	Genetic ID (Europe GmbH), Augsburg, D.
Magnesiumsulfat Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Molekularbiologisches (hoch reines) Wasser	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
Proteinase K	Genetic ID (Europe GmbH), Augsburg, D.
Safraninlösung	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D.
SeaKem®LE Agarosegel (1 %)	Lonza Group Ltd, Basel, CH.
TAE-Puffer (40 mM Tris-Puffer, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D.
TE-Puffer für DNA Purifikation	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-Puffer (1.0 M), pH 8,0 (Molecular Biology Grade)	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Tryptic Soy Bouillon (CASO-Bouillon)	Merck KGaA, Darmstadt, D.
Waschpuffer für DNA-Purifikation	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Waschpuffer für DNA-Extraktion	Genetic ID (Europe GmbH), Augsburg, D.

2.2 Lösungen und Puffer

- Ladepuffer (10X) (5 PRIME™, Thermo Fisher Scientific GmbH, D)

DNA-Gelladepuffer (0,21 % Bromophenol Blue, 0,21 % Xylene Cyanol FF, 0,2 M EDTA und 50 % Glycerol). 1 µl vom PCR Produkt wird in 9 µl Ladepuffer gelöst (1/10) und auf das Agarosegel aufgetragen.

- TAE-Lösung (1X) (AppliChem GmbH, Darmstadt, D.)

20 ml kommerziell vorbereiteter 50X TAE-Puffer (40 mM Tris-Puffer, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA) wurde in 980 ml destilliertem (dest.) Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

- Verdünnungslösung (Peptonsalz-Lösung) nach DIN EN ISO 6887-1:2014

1 g Pepton aus Casein wird mit 8,5 g NaCl in 1 l dest. Wasser suspendiert und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

- Verdünnungslösung (SMS)

1 mM MgSO₄ (120,37 mg/mmol) und 0,85 % (0,85 g) NaCl werden in 10 ml dest. Wasser suspendiert und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

- Verdünnungslösung (TSB⁺)

30 g Tryptic Soy Bouillon und 0,5 % (5 g) Dextrose werden in 1 Liter dest. Wasser suspendiert und für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

2.3 Kulturmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kulturmedien, die Zusammensetzung und die Zubereitung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien (Alle festen Nährböden beinhalten Agar-Agar. Die pH-Werte wurden entsprechend der Empfehlung des Herstellers eingestellt.)

Agars und Bouillons:	Hersteller/Kat.-Nr.	Zusammensetzung	Menge	Supplemente	Zubereitung
Plate Count Agar (PC)	VM646963425 1.05463.0500 Merck KGaA, Darmstadt, D	Pepton (Casein, tryptisch verdaut)	5,0 g/l		Die Nährbodenbestandteile werden in 1 l Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und in einem Kulturkolben für 20 min bei 121 ± 1 °C sterilisiert.
		Hefeextrakt	2,5 g/l		
		Glucose	1,0 g/l		
Kristallviolett-Galle- Glucose-Agar (VRBD)	VM656875438 1.10275.0500 Merck KGaA, Darmstadt, D	Hefeextrakt	3,0 g/l		Die Nährbodenbestandteile werden in 1 l Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt.
		Pepton	7,0 g/l		
		Natriumchlorid	5,0 g/l		
		Gallensalze Nr. 3	1,5 g/l		
		Glucose	10,0 g/l		
		Neutralrot	0,03 g/l		
Kristallviolett	0,002 g/l				
Lactobacillus-Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar)	1.10660.0500 Merck KGaA, Darmstadt, D	Pepton	10 g/l		Die Nährbodenbestandteile werden in 1 l Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und in einem Kulturkolben für 15 min bei 121 ± 1 °C sterilisiert.
		Fleischextrakt	8,0 g/l		
		Hefeextrakt	4,0 g/l		
		Glucose	20,0 g/l		
		Tween 80	1 ml		
		Dikaliumhydrogenphosphat	2,0 g/l		
		Natriumacetat	5,0 g/l		
		Triammoniumcitrat	2,0 g/l		
Magnesiumsulfat	0,2 g/l				
Mangan(II)-Sulfat	0,05 g/l				
Glutamate Starch Phenol- red (GSP) Agar (Pseudomonas-Aeromonas Selektiv-Agar)	1.10230.0500 Merck KGaA, Darmstadt, D	Sodium L(+)glutamat	10,0 g/l		Die Nährbodenbestandteile werden in 1 l Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und für 15 min bei 121 ± 1 sterilisiert. Danach Abkühlung 50-45 °C und Einmischung von Penicillin G.
		Stärke, soluble	20,0 g/l	Penicillin G (100,000 IU) 1722-0299	
		Kaliumdihydrogenphosphat	2,0 g/l	JenaPharm GmbH und CoKg, Jena, D	
		Magnesiumsulfat	0,5 g/l		
		Phenolrot	0,36 g/l		
MacConcey Agar	1.05465 Merck KGaA, Darmstadt, D	Pepton	20,0 g/l		Die Nährbodenbestandteile werden in 1 l Aqua dest. suspendiert, bis zum vollständigen Lösen erhitzt und in einem Kulturkolben für 15 min bei 121 ± 1 °C sterilisiert.
		Lactose	10 g/l		
		Gallensalze	5,0 g/l		
		Natriumchlorid	5,0 g/l		
		Neutralrot	0,075 g/l		

Agars und Bouillons:	Hersteller/Kat.-Nr.	Zusammensetzung	Menge	Supplemente	Zubereitung
Bolton-Anreicherungsbouillon-Basis	1.00068.0500 Merck KGaA, Darmstadt, D	Fleischpepton	10,0 g/l		fertige Lösungen kommerziell erhalten
		Hefeextrakt	5,0 g/l		
		Lactalbumin	5,0 g/l		
		Natriumchlorid	5,0 g/l		
		α-Ketoglutar säure	1,0 g/l		
		Natriumpyrovat	0,5 g/l		
		Natriummetabisulfit	0,5 g/l		
		Natriumcarbonat	0,6 g/l		
		Haemin	0,01 g/l		
MSRV (Salmonellen)-Agar	CM0910 Oxoid	Peptongemisch	8,59 g/l		fertig gegossene Platten kommerziell erhalten
		Hefeextrakt	0,92 g/l		
		Natriumchlorid	7,40 g/l		
		Kalium-dihydrogenphosphat	1,47 g/l		
		Magnesiumchlorid	12,53 g/l		
		Malachitgrün-Oxalat	0,037 g/l		
PALCAM-Agar	1.11755 Merck KGaA, Darmstadt, D	Columbia-Agar-Basis	39,0 g/l		35,5 g PALAM-Agar-Basis wurden in 500 ml Aqua dest. suspendiert und bis zum vollständigen Lösen erhitzt, für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und auf 50 °C abgekühlt. Inhalt eines Röhrchens PALCAM-Selektiv-Supplement wurde in 2 ml Aqua. dest. gelöst und aseptisch zu 500 ml abgekühlter PALCAM-Agar-Basis gegeben, gut gemischt und Platten gegossen.
		Hefeextrakt	3,0 g/l	PALCAM-Selektiv-Supplement (1 Röhrchen je 500 ml)	
		Glucose	0,5 g/l	SR0150E	
		Äsculin	0,8 g/l	Oxoid LTD.,	
		Eisen(III)-ammoniumcitrat	0,5 g/l	Hampshire, UK	
		Mannit	10,0 g/l		
		Phenolrot	0,08 g/l		
		Lithiumchlorid	15,0 g/l		
Pseudomonas-Agar-Basis	CM559 Merck KGaA, Darmstadt, D	Gelatinepepton	16,0 g/l	Pseudomonas-C-F-C Selektiv-Supplement (1 Röhrchen je 500 ml Nährboden)	24,2 g Pseudomonas-Agar-Basis wurden in 500 ml Aqua dest. suspendiert, 5 ml Glycerin wurde zugefügt und bis zum vollständigen Lösen erhitzt, 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert und auf 50 °C abgekühlt. Inhalt eines Röhrchens Pseudomonas-C-F-C-Selektiv-Supplement in 2 ml einer Mischung aus Ethanol und sterilem Aqua dest. (1:1) gelöst und zu 500 ml steriler, abgekühlter Pseudomonas-Agar-Basis gegeben. Gut gemischt und auf Platten gegossen.
		Casein-Hydrolysat	10,0 g/l	1.07627.0020	
		Kaliumsulfat	10,0 g/l	Merck	
		Magnesiumchlorid	1,4 g/l		

2.4 Oligonukleotide

Die synthetisierten Oligonukleotidprimer von TIB-MOLBIOL wurden in 1 ml hoch reinem Wasser und die von Eurofins MWG in verschiedenen Mengen TE-Puffer gelöst, sodass eine Endkonzentration von 100 pmol/µl erreicht wurde. Diese wurden in kleineren PCR-Gefäßen aliquotiert und für die langfristige Anwendung bei -20 °C aufbewahrt (Tab. 6).

Tabelle 6: Verwendete Primer (Primer ohne Literatur-Angabe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert.)

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Literatur	Synthese-Firma
Forward (F1)	TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA	Gutiérrez et. al, 1998	TIB-MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, D.
Reverse (F2)	AGTGCTTTACAATCCGAAGACCT		
Forward	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Dolan et. al, 2009	TIB- MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, D.
Reverse	AGTTTGATCCTGGCTCAG		
rpoB 15	TATCCGTTCCGTTGGCGAAA		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	TGGCTGGAACCGAAGAACTC		
rpoB 1	GAGTTCTTCGTTCCAGCCA		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	TTTCAATCGGGCAGACACGA		
rpoB 12	GAAGTCCGAGACGTACACCC		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	GCTTTCAGGAAGCCGTA		
rpoB 6	TGGTGTCTTCAGTACGTGG		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	ACACACGGCATCTGGTTGAT		
rpoB 1C	ATGGCNGGWCCTCACGGTAAC		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	CTGACCACCGAAYTGHGCTTA		
rpoB 2C	AGCGTAACGTAGNCTCGTG		Eurofins MWG Operon Ebersberg, D.
	GGTCAGTTGTAGATATCGACAC3		

2.5 PCR-Reagenzien

Tabelle 7: Verwendete Reagenzien in der PCR-Mischung

qPCR Reagenz	Hersteller
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München, D.
Molekularbiologisches Wasser (DNase-, RNase-, Proteasefrei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D.
Primer Forward	Siehe Tabelle 6
Primer Reverse	Siehe Tabelle 6

2.6 PCR-Kits

Tabelle 8: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Fast ID Genomic DNA Extraction	Genetic ID (Europe) GmbH, Augsburg, D.
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
IQ TM SYBR [®] Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH, München, D.

2.7 Geräte

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Gerätename	Hersteller
Agarklav	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, D.
Autoklav	Systemec GmbH, Linden, D.
Chromo4 TM Real-Time PCR Detector	BioRad Laboratories GmbH, München, D.
DNA Engine [®] , Peltier Thermal Cycler	BioRad Laboratories GmbH, München, D.
Elektrophoresekammer	Owl Scientific Inc., Woburn, USA
Elektrophorese Stromversorgung	Elvi, Mailand, Italien
Fotometer	WPA CO 80.000, Biowave; Harvard Bioscience, Inc, UK
Inkubator	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, D.
Kolonie Zähler	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG, Bremen, D.
Magnetrührer	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D.
NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Stomacher	Labor und Analysen-Technik GmbH, Garbsen, D.
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Hamburg, D.
UV-Licht Spektrophotometer	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D.
Vortex	VWR International GmbH, Darmstadt, D.
Waage	KERN & SOHN GmbH, Balingen, D.
Zentrifuge (Biofuge pico)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D.

2.8 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
Chromo TM 4 System	BioRad Laboratories GmbH, München, D.
ClustalX	http://www.clustal.org
DNA Engine Opticon [®] 2 System, Version 3.1	BioRad, München, D.
Microsoft Office Excel 2003/2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D.
Primer3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm

2.9 DNA-Extraktionsverfahren

2.9.1 DNA-Extraktionskit

In der vorliegenden Arbeit wurde ein universelles DNA-Extraktionskit (Fast ID Genomic DNA Extraction, Genetic ID Europe, D.) verwendet, das nach Angaben des Herstellers geeignet ist, bakterielle DNA aus verschiedenen Matrizen (Samen, Pflanzen, Lebensmitteln, Blut, etc.) zu isolieren.

2.9.2 Komponenten des Kits

- Proteinase K: ein Enzym (Proteinase), das Peptidbindungen, sowohl im Inneren als auch an den Enden der Proteine angreift und zum Abbau von Proteinen in Zelllysaten (z. B. bakterielle Zellwand) sowie zur Freisetzung von DNA, insbesondere für grampositive Bakterien, eingesetzt wird. Dieses Enzym gehört zur Familie der subtilisinähnlichen Serinproteinasen und wird aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* extrahiert.
- Lysepuffer (Genomic Lyse buffer)
- Bindungspuffer (Genomic Bind buffer)
- Waschpuffer (Genomic Wash buffer)
- DNA-Bindungssäulen (DNA Binding Columns)
- 1X TE (10 mM Tris-HCl, 1mM Na-EDTA pH 8.0)

Zusätzlich erforderliches Equipment und Materialien:

- 60-65 °C Inkubator
- Mikrozentrifuge (geeignet für 1,5 ml und 2 ml Zentrifugengefäße)
- 75 %iger Ethanol
- Hochreines Wasser (Molecular biology reagent grade water)

Alle Reagenzien des „Fast ID“-Kits sollten bei Raumtemperatur (20-25 °C) gelagert werden und waren 1 Jahr unter diesen Bedingungen haltbar. Die Proteinase K sollte, nachdem sie zur vorgegebenen Konzentration rekonstituiert wurde, bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

2.9.3 Genereller Überblick über das Arbeitsprotokoll

Eine sehr sorgfältige Homogenisierung der Probe vor der Durchführung des Protokolls wurde seitens des Herstellers empfohlen, um die Gefahr einer versehentlichen Kontamination der Probe auszuschließen. Eine Kontamination kann durch nicht angemessen gereinigtes Equipment oder durch eine schlechte Laborpraxis während der Homogenisierung, des Abwiegens oder der Beschriftung der Teilprobe stattfinden (Abb. 6).

- Die homogenisierte Probe wurde mit Lysepuffer inkubiert, der die Zelle der Teilprobe lysierte und Proteine, DNA und andere zelluläre Bestandteile auflöste. Die Proteinase K wird zugegeben, um die Proteine in der Probe zu verdauen.

- Der Bindungspuffer wird dem DNA-haltigen Überstand zugegeben und dann auf eine Säule gegeben, an der die DNA bindet.
- Die Kontaminanten werden durch die Säule mittels eines speziell formulierten Waschpuffers und einer Reihe von Waschschritten mit Ethanol entfernt.
- Die DNA wird von der Säule mittels 1xTE eluiert.

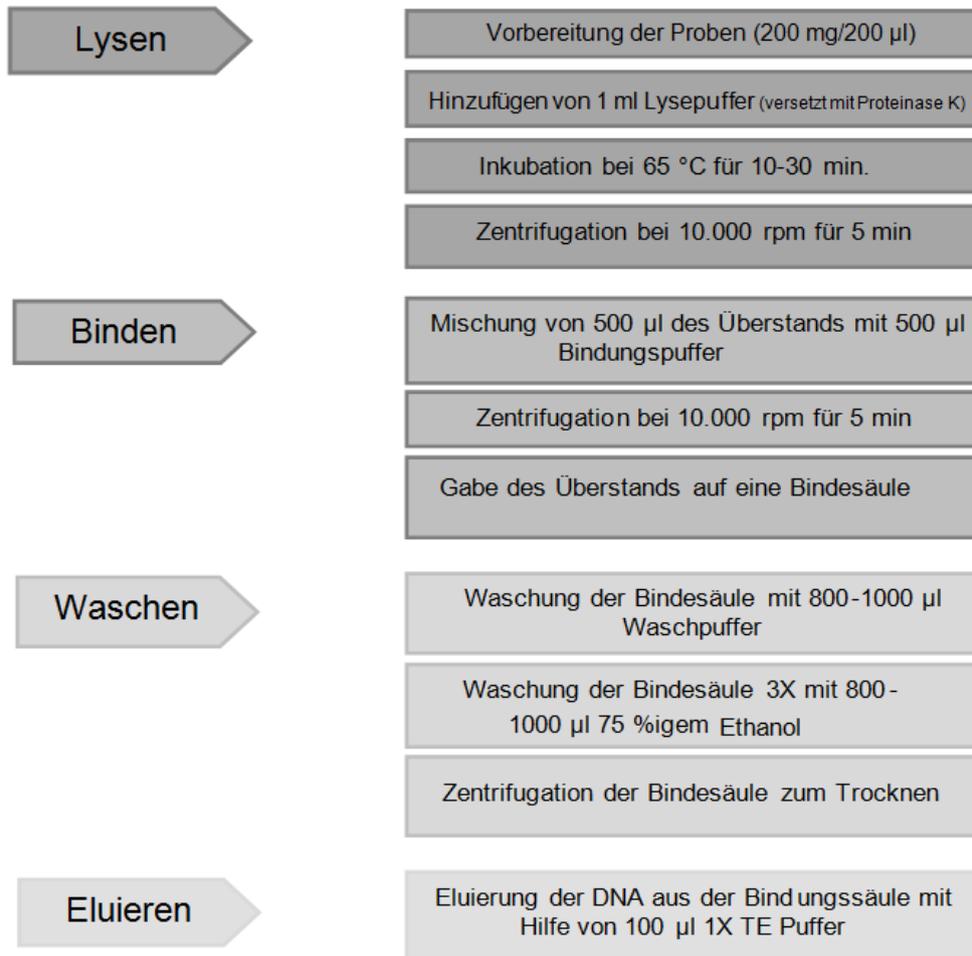


Abbildung 6: Durchführung des DNA-Extraktionsverfahrens.

2.9.4 Durchführung

Als erstes wurde die gesamte Menge an Proteinase K (10 µl) mit hochreinem Wasser (Molecular biology reagent grade water, Sigma, D) versetzt, sodass eine 10 mg/ml Proteinase K Lösung erhalten wird (500 µl Wasser für 50 Extraktionen).

Für jede Extraktion wurden 1000 µl „Genomic Lysepuffer“ mit 10 µl Proteinase K Lösung (10 mg/ml) vorgemischt. Zur Zellyse werden jeweils 200 µl (oder 200 mg) der homogenisierten Probe mit 1 ml des mit Proteinase K vorgemischten Lysepuffers versetzt. Nach der Homogenisierung wurde die Lösung für 25 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 9.500 g (10.000 rpm) zentrifugiert.

500 µl des Überstands wurden mit der gleichen Menge des „Genomic Bindungspuffer“ gemischt und homogenisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 9.500 g (10.000 rpm) wird der Überstand auf „DNA Bindsäulen“ übertagen und mittels Zentrifugation durch die Säulen befördert. Die DNA wurde anschließend einmal mit Waschpuffer und dreimal mit 75 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Danach wurden an das Säulenmaterial adsorbierte Nukleinsäuren mit 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM Na-EDTA pH 8.0) in 2 ml Reaktionsgefäße eluiert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.10 DNA-Aufreinigungsverfahren

2.10.1 DNA Purification Kit (Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit)

Nach Herstellerangaben wurde das „GeneJET PCR Purification“-Kit [Thermo Fisher Scientific Inc., D] für schnelle und effiziente Aufreinigung der DNA aus PCR und anderen enzymatischen Reaktionsmischungen entwickelt. Das Kit nutzt eine eigene Silica-basierte Membrantechnologie in Form einer geeigneten Spin-Säule, die den Bedarf an mühsamen Harzmanipulationen oder toxischen Phenol-Chloroform Extraktionen eliminiert. Das Purification-Kit soll Primer, dNTPs, überflüssige Nukleotide, Enzyme und Salze effizient aus den PCR- und anderen Reaktionsmischungen entfernen können. Dieses Kit kann für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten ab 25-20.000 bp verwendet werden. Die Wiedergewinnungsrate (recovery rate) soll 90-100 % in einem 100-10.000 bp DNA-Fragment-Größenspektrum sein. Jede „GeneJET-Aufreinigungssäule“ hat eine Gesamtkapazität von bis zu 25 µg an DNA und die gesamte Prozedur dauert nur 5 Min.

2.10.2 Prinzip der Methode

Bei jedem Reaktionsansatz wird die DNA mit dem Bindungspuffer gemischt und zur Aufreinigungssäule hinzugegeben. Der Bindungspuffer denaturiert die Proteine und fördert die effektive DNA-Bindung an die Silica-Membran der Säule. Durch einen Farbindikator im Bindepuffer wird eine einfache Überwachung des pH-Wertes der Lösung für eine optimale DNA-Bindung ermöglicht. Die fremden Bestandteile werden mittels eines Waschschriffs entfernt. Anschließend wird die gereinigte DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers von der Membransäule abgelöst. Die aufgereinigten PCR-Produkte sind geeignet, um zur DNA-Sequenzierung und Gel-Elektrophoreseanalyse eingesetzt zu werden.

2.10.3 Komponenten des Kits

Tabelle 11: Inhalt des Gen JET PCR Purification Kits (Thermo Fisher Scientific Inc., D)

GeneJET PCR Aufreinigungskit	für 50 Anwendungen
Bindepuffer	12 ml
Waschpuffer (konzentriert)	9 ml
Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)	15 ml
GeneJET Aufreinigungssäulen	50

2.10.4 Durchführung

Zunächst wurden 25 µl (1:1) des Bindepuffers zur PCR-Mischung gegeben und gründlich gemischt. An dieser Stelle wurde die Mischfarbe geprüft; bei „Orange“ oder „Violett“ wurden 10 µl Natriumacetatlösung (3 M, pH = 5,2) hinzugegeben und bei „Gelb“ erfolgten keine Zugabe weiterer Chemikalien.

Das Gesamtvolumen (ca. 50 µl) der oben erhaltenen Mischung wurde auf die Aufreinigungssäule aufgetragen und für 30-60 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

700 µl vom Waschpuffer wurden auf die Aufreinigungssäule gegeben und für 30-60 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Anschließend wurde die Aufreinigungssäule für 1 min zentrifugiert, sodass der restliche Waschpuffer vollständig entfernt wurde.

Die Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml großes Zentrifugengefäß übertragen. 50 µl vom Elutionspuffer wurden auf die Säule pipettiert und 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde entsorgt und die purifizierte DNA-Probe wurde bei -20 °C gelagert.

Zusätzlich notwendige Materialien und Equipment für die Durchführung des Versuchs:

- Ethanol 96-100 %
- Isopropanol
- 3 M sodium acetate, pH 5,2 (ggf. erforderlich)
- Mikrozentrifugerät
- 1,5 oder 2 ml Mikrozentrifuggefäße
- Hitzeblock oder Wasserbad (ggf. erforderlich)

2.11 Bestimmung der DNA-Qualität und DNA-Ausbeute

2.11.1 Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer

Das Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer von Thermo Fisher Scientific, (USA) wurde in dieser Arbeit für die Qualitäts- und Konzentrationsmessung der DNA-Proben, die aus Bakterienkolonien isoliert wurden, verwendet. Nach Angaben des Herstellers ist das

Gerät in der Lage die Konzentration von 1 μl Probe mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu messen. Das Konzentrationsmessungsspektrum beträgt bis zu 3700 ng/ μl doppelsträngiger (dsDNA) ohne Verdünnung.

2.11.2 Prinzip der Messung

Die Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht (UV-Licht) bei bestimmten Wellen-Längen ($\lambda=280$ nm). Je mehr Licht von einer Probe absorbiert wird, desto höher ist deren Nukleinsäurekonzentration. Mit Hilfe des „Lambert-Beer’schen“ Gesetzes ist es möglich, anhand der Menge des absorbierten Lichtes, auf die Konzentration des lichtabsorbierenden Moleküls zu schließen.

Reinheit der DNA-Probe (sample purity): Für Nukleinsäureproben ist es üblich, mit anderen Molekülen kontaminiert zu sein (z. B. mit Proteinen oder organischen Substanzen). Um die Reinheit der Probe einzuschätzen, wurde zusätzlich der Extinktionskoeffizient bei $\lambda=280$ nm (Absorptionmax. der Proteine) gemessen und der Quotient $A_{260/280}$ ermittelt. Für reine DNA-Proben beträgt $A_{260/280} \sim 1,8$. Werte darunter deuten auf Phenol- oder Proteinverunreinigen hin.

2.11.3 Durchführung der Messung

Die unverdünnte Probe wurde direkt auf die Messoberfläche pipettiert. Durch die Oberflächenspannung entsteht eine Flüssigkeitssäule zwischen den optischen Fasern des Spektrophotometers, das den Messweg darstellt. Nach der Messung wurde die Messoberfläche gereinigt. Mit dem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer gibt es zusätzlich die Möglichkeit einer graphischen Darstellung eines Absorptionsspektrums im Bereich von 220 nm bis 350 nm. Ein typisches DNA-Absorptionsspektrum wurde in Abbildung 7 dargestellt.

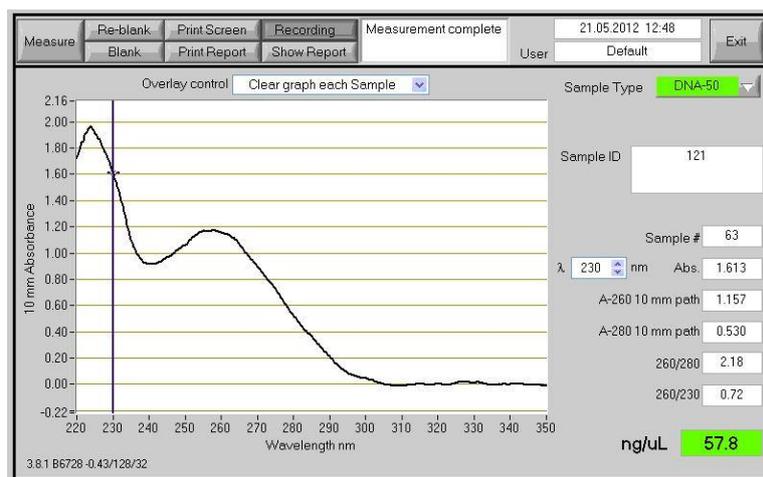


Abbildung 7: DNA-Konzentrationsmessung mittels NanoDrop™- Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA; eigene Untersuchung).

2.12 Elektrophoretische Trennung der DNA

2.12.1 Prinzip der Methode

Bei der klassischen PCR (ggf. auch bei der Real-Time PCR) erfolgt der Nachweis der gewonnenen Amplifikate nach Ablauf der PCR-Zyklen mit Hilfe einer Gelelektrophorese. Die Funktion der Gelelektrophorese entspricht einem Sieb für DNA-Moleküle. Die PCR-Produkte lassen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppe unter Spannung (elektrisches Feld) ihrer Größe nach durch die Gelmatrix auftrennen. Die PCR-Amplifikate werden mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff wie Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht visualisiert. Die Größe der Amplifikate wird durch einen Vergleich mit Banden bekannter Größe (DNA-Marker/Leiter; Abb. 8), der während der Elektrophorese neben den zu untersuchten Proben mitgeführt wird, abgeschätzt.

2.12.2 Material

- Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer: 50X Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer (AppliChem GmbH, Darmstadt, D). Dieser wird als Elektrophoresepuffer für Agarose-Gele verwendet und ist aus 40 mM Tris-Actate und 1 mM EDTA, pH 8,5 zusammengesetzt.
- 1,5 %iges Agarosegel (SeaKem[®] LE Agarose, Lonza Group Ltd., USA)
- Ladepuffer: DNA GEL Loading Buffer 10X (5 PRIME[™], Thermo Fisher Scientific GmbH, D). Das 10X Konzentrat besteht aus:
 - 0,21 % Bromophenol Blue
 - 0,21 % Xylene Cyanol FF
 - 0,2 M EDTA, pH 8.0

- 50 % Glycerol
- Ethidiumbromid (Merck KGaA, D)
- DNA-Marker: (GeneRuler™, 100 bp Plus DNA Ladder, Ready-to-use, 10 µl, 0,1 µg/µl; Thermo Fisher Scientific, D).

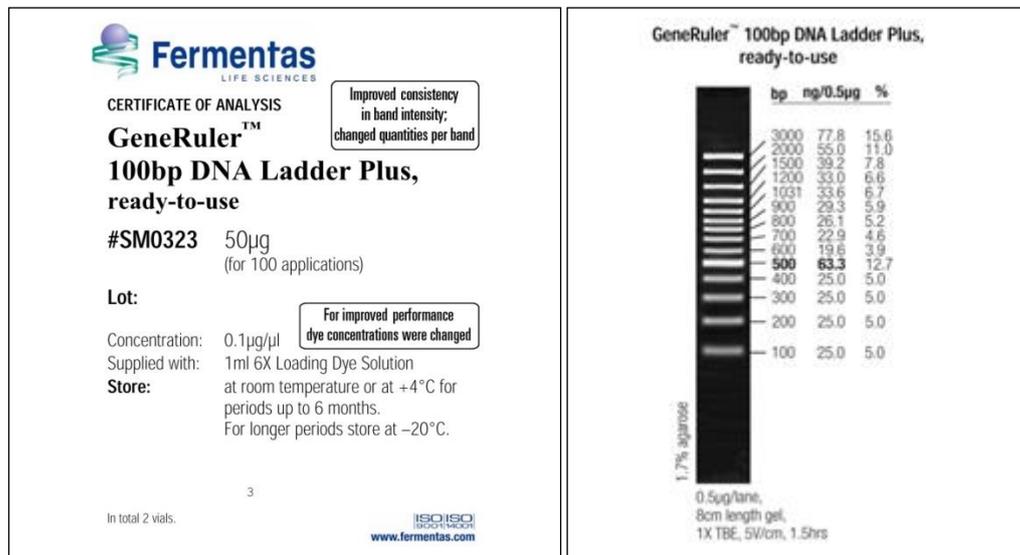


Abbildung 8: DNA-Marker, GeneRuler™, 100 bp Plus DNA Ladder, Ready-to-use, 10 µl, 0,1 µg/µl (Thermo Fisher Scientific, D).

- Elektrophoresekammer (EASY-CAST™ Electrophoresis System, Owl Scientific, Inc.).
- UV-Licht Spektrophotometer (Intas Gel Dokumentations, Intas Science Imaging Instruments GmbH).

2.12.3 Durchführung

Zur Herstellung von 1 l Elektrophoresepuffer (1X) wurden 20 ml Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung) 50X mit 980 ml dest. Wasser versetzt. 1,5 g Agarosepulver wurden in 100 ml TAE-Lösung gelöst und unter ständigem Rühren gekocht, bis das Gel eine klare Farbe aufwies. Das so hergestellte Gel wurde auf 60 °C abgekühlt und dann hauchdünn (2 bis 4 mm) in den Gießstand, in dem Kämme (DNA-Taschen) eingesetzt waren, gegossen. Nach 20 min wurde das Gel fest und der Kamm konnte rausgezogen werden. Nun wurde die Elektrophoresekammer mit Puffer aufgefüllt, sodass das Gel und die Taschen vollständig damit abgedeckt waren. Den zu trennenden PCR-Produkten inklusive der DNA-Leiter wurden zum Auftragen 1/10 (v/v) Ladepuffer zugegeben und danach wurden sie in je eine Vertiefung des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer innerhalb von 45 min bei 100 V. Die DNA-Banden wurden durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,0003 % in TAE-

Puffer, 500 µl Ethidiumbromid in 1000 ml TAE-Puffer) und Bestrahlung mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.13 Real-Time PCR

2.13.1 Real-Time PCR Gerät

Alle Real-Time PCR Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem DNA Engine®, Peltier Thermal Cycler (Kat. Nr. PTC-0200) durchgeführt, der mit dem Real-Time PCR Detektor „Chromo4™ System“ (Kat. Nr. CFB-3240) und der Detektionssoftware „Opticon Monitor™ Version 3.1“ (Kat. Nr. CFB-3220) [alle von BioRad, München, D.] ausgestattet ist. Der Thermocycler verfügt über folgende Vorteile:

- Austauschbare Probenblöcke
- Hot Bonnet® heated lid
- Intuitive Software mit leicht lesbarem Anschluss für ein schnelles Programmieren, Bearbeiten, File-Management und Passwortsicherung
- Sofortige Inkubationseinrichtung für Temperatur-kontinuierliche Inkubationen

Spezifikationen:

- Thermischer Anwendungsbereich: -5 °C bis 105 °C, aber nicht bei mehr als 30 °C unter Raumtemperatur
- Thermische Genauigkeit: ±0,3 °C vom programmierten Ziel bei 90 °C
- Thermische Uniformigkeit: ±0,4 °C Well-zu-Well innerhalb 30 s des Erreichens bei 90 °C
- Beschleunigungsgrad: bis zu 3 °C/s
- Probenkapazität: abweichend je nach installierter Alpha-Unit
- Leistung: 850 W max.

2.13.2 Chromo4™ Real-Time PCR Detector

Nach Angaben des Herstellers kann der Chromo4 Detektor die Bedürfnisse eines sensitiven, leicht einsetzbaren und kompakten Real-Time PCR Detektionssystems befriedigen. Einige dieser Eigenschaften sind:

- Auswechselbar mit jeder Alpha-Einheit
- Ein 96-Well Probenblock akzeptiert Standard Verbrauchsmaterialien (96-Well PCR Platten und 0,2 ml Röhrchen-Streifen)
- Ein integrierter Heizdeckel ermöglicht das ölfreie Cycling
- Langlebige LEDs stimulieren Fluoreszenzfarbstoffe
- Sensitive Photodioden detektieren Fluoreszenz

2.13.3 DNA Engine Opticon® 2 System, Version 3.1

Nach Angaben des Herstellers verfügt das Opticon™ 2 System über folgende Eigenschaften:

- Ein DNA Engine® Peltier Thermocycler liefert ausgezeichnete thermische Genauigkeit und Well-zu-Well thermische Uniförmigkeit.
- Sensitive Optiken detektieren Fluorophoren mit Emissionsspektren im Bereich von 523-543 nm (SYBR® Green I, FAM) im ersten Kanal und bei 540-700 nm im zweiten Kanal.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Vorversuche mittels Real-Time PCR-Analyse

3.1.1 Ziel und Aufbau der Versuche

Das Ziel des ersten Teils der Arbeit bestand darin, eine Real-Time PCR-Analyse zur Überprüfung der Eignung zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Lebensmitteln durchzuführen. Dazu wurde mit Hilfe eines universellen Primerpaares aus der Literatur (Gutiérrez et al., 1998) ein SYBR[®] Green I System-basierendes PCR-Protokoll zur Bestimmung der Keimzahl in Geflügel- und Schweinefleischproben entwickelt. Gleichzeitig wurde die Gesamtkeimzahl der Proben mittels des Kulturverfahrens in Anlehnung an die DIN 10161:1984-02 (Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen; Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C, Plattengussverfahren) bestimmt. Anschließend wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von beiden Methoden mittels Korrelationen analysiert. Neben der entwickelten Analyse wurde die Tauglichkeit des ausgewählten DNA-Extraktionskits für die Isolierung der bakteriellen DNA aus der Fleischmatrix überprüft. Vor jeder DNA-Isolierung aus Fleischproben wurden zwei Waschschriffe zur Entfernung der PCR-Inhibitoren mittels Zentrifugation eingesetzt.

3.1.2 Methode

Probenvorbereitung

Die frischen Fleischproben wurden im Januar und Februar 2012 aus den Selbstbedienungsregalen verschiedener Lebensmitteleinzelhandelsbetriebe gekauft. Die 11 Geflügel- und 5 Schweinefleischproben waren unter modifizierter Atmosphäre verpackt und wurden sofort nach dem Einkauf und dem Transport bei +7 °C ($\pm 0,5$ °C) in Kühlschränken im Technikum des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung der Leibniz Universität Hannover gelagert. Um ein möglichst weites Bakterienanzahlspektrum zu erreichen, wurden einige der Proben in Teilstücke aufgeteilt und über Nacht bei drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 20 °C und 30 °C) gelagert. Daraus resultierten insgesamt 27 Geflügel- und 10 Schweinefleischproben (Tab. 14 und 15).

Erster Waschschriff: Abtrennung der PCR-Inhibitoren mittels Zentrifugation und Waschen

Jede Fleischprobe (10 g) wurde mittels eines Labormischers [Stomacher 400, Labor & Analysen-Technik GmbH] mit 90 ml Verdünnungslösung (1 g Pepton aus Casein [Roth GmbH] und 8,5 g Natriumchlorid [Roth GmbH] in 1 l Wasser) in einem sterilen Filterbeutel bei mittlerer Geschwindigkeit für 1 min homogenisiert. Zur Sedimentation grober, nicht bakterieller Probenbestandteile wurden aus jeder homogenisierten Probe zwei Aliquote (je

1,5 ml) in zwei Reaktionsgefäße (2 ml) übertragen und bei 380 g (2.000 rpm) für 2 min zentrifugiert.

Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ) mittels Plattengussverfahren

Zur Anwendung des Plattengussverfahrens wurde 1 ml des Überstandes des einen Gefäßes in 9 ml Verdünnungslösung übertragen und dezimal verdünnt (10^{-1} bis 10^{-8}). Anschließend wurde 1 ml jeder Verdünnungsstufe auf Plate Count-Agar (PC-Agar) [Merck KGaA] kultiviert. Die PC-Platten wurden für 72 h bei 30 °C bebrütet (Durchführung in Anlehnung an DIN 10161-1:1984-02; Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen — Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C; Plattengussverfahren). Die Platten wurden ausgezählt. Die Gesamtkeimzahl wurde als \log_{10} KbE/g Fleischgewebe wiedergegeben (Tab. 14 und 15).

Zweiter Waschschrift

Um die bakteriellen Zellen zu sedimentieren, wurde der gesamte Überstand aus dem zweiten Reaktionsgefäß in ein anderes Gefäß (2 ml) überführt und bei 9.500 g (10.000 rpm) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml SMS (0,85 % NaCl plus 1 mM MgSO_4) resuspendiert.

DNA Extraktion

Aliquote (200 μl) aus den gewonnenen Zellsuspensionen wurden für die DNA-Extraktion eingesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem „Fast ID Genomic DNA Extraktionskit“ [Genetic ID (Europe) GmbH]. Die Beschreibung des Kits und die einzelnen Extraktionsschritte wurden im Abschnitt 2.9 ausführlich dargestellt. Zur Zellyse wurden jeweils 200 μl der Probe mit 1 ml „Genomic Lysepuffer“ vorgemischt, mit 10 μl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) versetzt, für 25 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 9.500 g zentrifugiert. 500 μl des Überstands wurden mit der gleichen Menge „Genomic Bindungspuffer“ gemischt und homogenisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 9500 g wurde der Überstand auf „DNA Bindesäulen“ übertragen und mittels Zentrifugation durch die Säulen befördert. Die DNA wurde anschließend einmal mit Waschpuffer und dreimal mit 75 % Ethanol [Roth GmbH] gewaschen und zentrifugiert. Danach wurden die an das Säulenmaterial adsorbierten Nukleinsäuren mit 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na-EDTA, pH 8.0) in 2 ml Reaktionsgefäße eluiert und direkt in die PCR eingesetzt.

Real-Time PCR

Alle Real-Time PCR Thermocycler Experimente wurden mit einem DNA Engine® Peltier Thermal Cycler durchgeführt, der mit dem Real-Time PCR Detektor „Chromo4™ System“ (Kat. Nr. CFB-3240) und der Detektionssoftware „Opticon Monitor™ Version 3.1“ [Bio-Rad Laboratories, GmbH] ausgestattet war. Das Universalprimerpaar F1: 5'-TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCA-3' (Forward Primer, Position 1051 bis 1073 in *Escherichia coli*) und F2: 5'-AGTGCTTTACAATCCGAAGACCT-3' (Reverse Primer, Position

1175 bis 1197 in *Escherichia coli*) (Gutiérrez et al., 1998) wurde zur Amplifikation einer 147 bp langen Sequenz des 16S rRNA-Gens verwendet, welches durch seine weitestgehende Homologität mit konservierten 16S rDNA-Sequenzen im bakteriellen Genom und dem Nichtvorhandensein im eukaryotischen Genom charakterisiert ist (Gutiérrez et al., 1998). Die Primer wurden von TIB MOLBIOL [TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH] synthetisiert. Jeder Real-Time PCR-Ansatz besaß ein Volumen von 25 µl, zusammengesetzt aus 1X iQ™ SYBR® Green Supermix [Bio-Rad Laboratories, GmbH], 0,2 µM Primer F1, 0,2 µM Primer F2, 2 µl DNA-Extrakt und 8,5 µl Wasser [DNase-, RNase- und Proteinase-freies molekularbiologisches Wasser; Sigma-Aldrich Chemie GmbH]. Jedes Probenet beinhalten eine negative Kontrolle in der hochreines Wasser [Sigma-Aldrich Chemie GmbH] die DNA-Probe substituierte. Der iQ™ SYBR® Green Supermix bestand aus dNTPs, antikörpervermittelter hot start iTaq DNA-Polymerase, MgCl₂, SYBR® Green I Farbstoff, Enhancer, Stabilisatoren und Fluorescein (Tab. 12).

Tabelle 12: PCR-Mischungsinhalt und die entsprechenden Konzentrationen

Komponente	Volumen	Endkonzentration
iQ™ SYBR® Green Supermix (iTaQ DNA-Polymerase, MgCl ₂ , SYBR® Green I und Fluorescein)	12,5 µl	1x
Primer Forward	1 µl	0,2 µM
Primer Reverse	1 µl	0,2 µM
H ₂ O	8,5 µl	
DNA-Extrakt	2 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

Die PCR-Analyse wurde durchgeführt, beginnend mit einer initialen Denaturierung für 3 min bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen, die jeweils eine Denaturierung für 25 s bei 95 °C, ein Primer-Annealing für 40 s bei 65 °C und eine Elongation für 1 min bei 72 °C beinhalteten (Tab. 13).

Tabelle 13: PCR-Bedingungen zur Bestimmung der Keimzahl in Fleischproben

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Amplifikation:			} 50 X
1. Denaturierung	95 °C	25 S	
2. Primer-Annealing	65 °C	40 S	
3. Elongation	75 °C	1 min	
Schmelzkurvenanalyse	0,5 °C/s (von 55 °C bis 90 °C)		
Kühlen	10 °C	∞	

Im Anschluss an die Amplifikation wurde für jeden PCR-Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu bestätigen. Da jedes doppelsträngige PCR-Produkt aufgrund der Länge, des GC-Gehaltes und des Vorhandenseins von Mismatch-Basenpaaren bei einer charakteristischen Temperatur in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen (denaturiert) wird, kann anhand einer Schmelzkurve zwischen verschiedenen PCR-Produkten differenziert werden (Wittwer et al., 2001; Mc Pherson und Moller, 2000). Hierzu wird am Ende des PCR-Laufes die Temperatur schrittweise (0,5 °C/s) von 55 °C bis auf ca. 95 °C erhöht, sodass die DNA-Stränge wieder denaturieren und als Einzelstränge vorliegen. Die Denaturierung hat den Abfall des Fluoreszenzsignals am Schmelzpunkt zur Folge. Durch die Messung des Schmelzpunktes kann auf das vervielfältigte Produkt geschlossen werden, da Amplifikationsartefakte in der Regel bei einer niedrigeren Temperatur denaturieren (Bustin et al., 2000).

Visualisierung der PCR Produkte

Im Anschluss an die Amplifikation wurde ein Aliquot (9 µl) jedes PCR-Produktes mit 1 µl Ladepuffer [5 PRIME™, Thermo Fisher Scientific GmbH] versetzt und in je eine Vertiefung eines 1,5 %igen Agarosegels [SeaKem®LE Agarose, Lonza Group Ltd] pipettiert. Die PCR-Fragmente wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer [EASY-CAST™ Electrophoresis System, Owl Scientific, Inc.] innerhalb von 45 min bei 100 V elektrophoretisch getrennt. 1X TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) [AppliChem GmbH] wurde als Elektrophoresepuffer und ein DNA-Marker (GeneRuler™, 100 bp Plus DNA Ladder) [Thermo Fisher Scientific] wurde zur Größenbestimmung verwendet. Die DNA-Banden wurden durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (0,0003 % in TAE-Puffer) [Merck KGaA] und Bestrahlung mit UV-Licht [Intas Gel Dokumentations, Intas Science Imaging Instruments GmbH] sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

3.1.3 Ergebnisse

Real-Time PCR-Analyse und Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels des Kulturverfahrens ergab ein Bakterienzahlspektrum zwischen $2,7 \times 10^2$ und $1,1 \times 10^7$ KbE/g für die Schweinefleischproben (Tab. 14) und zwischen $5,5 \times 10^3$ und $6,0 \times 10^8$ KbE/g für die Geflügelfleischproben (Tab. 15). Die Real-Time PCR-Analyse zeigte sigmoid steigende Amplifikationskurven für alle eingesetzten Templates (Abb. 8 und 10). Diese Kurven sind für PCR-Analysen typisch. Die Ct-Werte, resultierend aus der PCR-Analyse der Schweinefleischproben, lagen zwischen 24,41 und 31,51 (Tab. 14) und die der Geflügelfleischproben zwischen 15,68 und 28,64 (Tab. 15). Die untere Nachweisgrenze der Real-Time PCR bei den Schweinefleisch-DNA-Proben lag bei 10^2 KbE/g, die obere bei 10^7 KbE/g. Der Nachweisbereich der Geflügelfleischproben lag zwischen 10^3 und 10^8 KbE/g.

Auch in der negativen Kontrolle wurde DNA amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte aber bei den beiden Analysen erst nach dem 35. Zyklus.

Die Bestimmung der Amplifikationsspezifität erfolgte mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse. Diese zeigte Schmelztemperaturen von $T_m = 84-85\text{ °C}$ für die PCR-Produkte bei der Analyse der Geflügelfleischproben (Abb. 11), und von $83-86,5\text{ °C}$ für die Amplifikate bei der Analyse der Schweinefleischproben (Abb. 9). Die Schmelztemperaturen der Amplifikate der negativen Kontrollen lagen bei $76,5\text{ °C}$ für die Geflügelfleisch- und bei $75,5\text{ °C}$ für die Schweinefleischproben. Bei diesen Amplifikaten handelt es sich wahrscheinlich um Amplifikate der Primerdimere oder andere PCR-Artefakte. Bei der Visualisierung der elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Amplifikate der Proben waren die zu erwartenden PCR-Amplifikate mit 147 bp als deutliche Banden zu erkennen. Allerdings zeigte die Auswertung der Amplifikate bei den Schweinefleischproben zusätzlich wenige schwächere Banden neben denen der PCR-Produkte. Hierbei handelt es sich um nicht spezifische PCR-Artefakte.

Tabelle 14. Bakterielle Kolonienzahlermittelt mittels Kulturmethode und die Ct-Werte (resultierend aus der Real-Time PCR-Analyse für Schweinefleischproben (n = 10))

Fleischproben	Lager-temperatur	Gesamtkeimzahl KbE/g	\log_{10} KbE/g	Ct-Wert	T_m (°C)
Thüringer Schweinemett	30 °C	$2,0 \cdot 10^4$	4,301	29,93	86,50
	4 °C	$2,9 \cdot 10^2$	2,462	31,29	83,00
Schweinenackен Kotelett	20 °C	$1,0 \cdot 10^4$	4,000	30,93	86,25
	30 °C	$1,1 \cdot 10^7$	7,056	24,41	86,50
Schweineschnitzel	4 °C	$2,7 \cdot 10^2$	2,431	31,51	84,75
	30 °C	$1,1 \cdot 10^6$	6,041	28,05	83,75
Schweinebauchscheiben	4 °C	$5,3 \cdot 10^5$	5,724	30,09	84,50
	20 °C	$8,3 \cdot 10^6$	6,921	25,70	86,25
Schweineminutensteak	4 °C	$2,4 \cdot 10^3$	3,385	30,21	83,00
	20 °C	$2,6 \cdot 10^5$	5,421	30,51	83,50

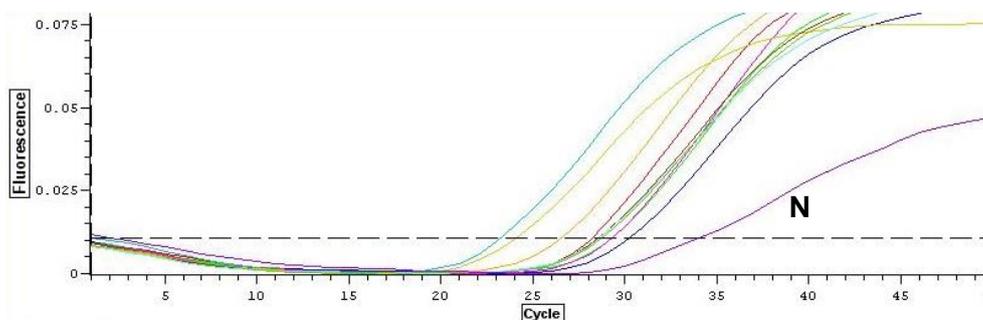


Abbildung 9: Amplifikationskurven aus der PCR-Analyse für Schweinefleischproben mit verschiedenen Keimbelastungen (N = negative Kontrolle).

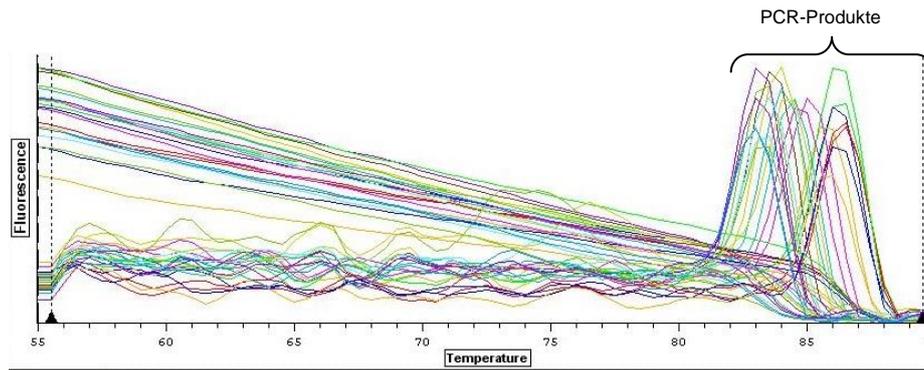


Abbildung 10: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte für Schweinefleischproben, T_m zwischen 83 °C und 86,5 °C.

Tabelle 15: Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels Kulturmethode (KbE/g) und PCR-Analyse (Ct-Werte) für Geflügelfleischproben (n = 27)

Probe	Lager-temperatur	Gesamtkeimzahl KbE/g	\log_{10} KbE/g	Ct-Wert	T_m (°C)
Hähnchen-Minutenschnitzel	4° C	$9,3 \cdot 10^4$	4,96	27,59	84,00
	20° C	$1,5 \cdot 10^5$	5,16	24,70	84,00
Putenbrustschnitzel	4° C	$4,0 \cdot 10^6$	6,60	20,86	84,50
	20° C	$2,5 \cdot 10^8$	8,40	17,17	84,50
	30° C	$2,4 \cdot 10^8$	8,37	18,91	84,50
Hähncheninnenbrustfilet	4° C	$1,0 \cdot 10^6$	6,01	22,44	84,50
	20° C	$8,2 \cdot 10^7$	7,91	18,26	84,00
	30° C	$8,1 \cdot 10^6$	6,90	22,39	85,00
Hähnchenbrustfilet	4° C	$7,9 \cdot 10^3$	3,90	28,64	84,25
	20° C	$1,8 \cdot 10^6$	6,25	24,83	84,50
	30° C	$2,9 \cdot 10^6$	6,45	25,32	84,50
Putenbrustinnenfilet	4° C	$2,0 \cdot 10^6$	6,29	21,89	84,25
	30° C	$3,1 \cdot 10^7$	7,49	15,68	84,50
Hähnchen-Minutenschnitzel	4° C	$4,8 \cdot 10^5$	5,68	21,04	84,50
	20° C	$1,7 \cdot 10^7$	7,22	16,03	84,50
	30° C	$6,0 \cdot 10^8$	6,77	16,68	85,00
Putenschnitzel	4° C	$2,7 \cdot 10^4$	4,43	24,91	84,50
	20° C	$3,7 \cdot 10^8$	8,57	16,29	84,50
	30° C	$2,8 \cdot 10^8$	8,44	19,04	85,00
Hähnchenbrustfilet-Teilstück	4° C	$1,8 \cdot 10^5$	5,26	21,21	85,00
	20° C	$2,3 \cdot 10^8$	8,35	15,81	85,00
	30° C	$4,6 \cdot 10^8$	8,66	16,79	85,00
Puten-Ministeads	20° C	$1,0 \cdot 10^7$	7,00	17,55	84,75
Hähncheninnenfilet	4° C	$5,5 \cdot 10^3$	3,74	26,90	84,50
	30° C	$2,4 \cdot 10^7$	7,37	19,15	84,75
Puten-Medaillons	4° C	$8,0 \cdot 10^6$	6,90	18,96	84,50
	20° C	$1,3 \cdot 10^8$	8,10	18,48	84,50

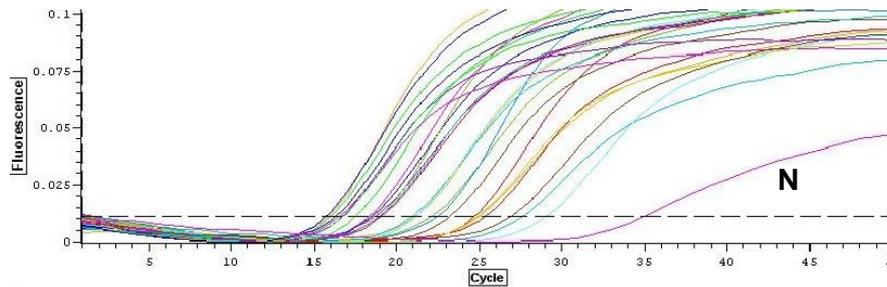


Abbildung 11: Amplifikationskurven der PCR-Analyse von Geflügelfleischproben mit verschiedener Gesamtbakterienzahl ($n = 27$; $N =$ negative Kontrolle).

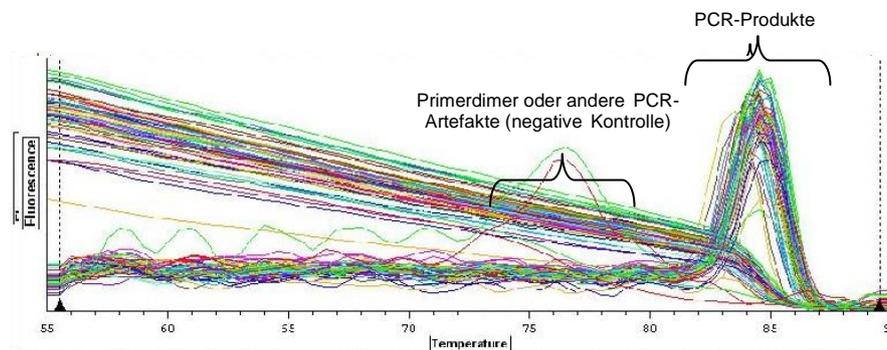


Abbildung 12: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte für Geflügelfleischproben. Die Schmelztemperaturen akkumulieren bei 85 °C. Die Amplifikate der Negativkontrollen zeigen eine mittlere Schmelztemperatur von 76,5 °C.

Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der beiden Methoden wurden die Ergebnisse von den zwei PCR-Analysen (Ct-Werte) mit denen aus dem Kulturverfahren (\log_{10} KbE/g) in Korrelation ausgewertet und die Determinationskoeffizienten ermittelt. Die beiden Korrelationsanalysen erzielten vergleichbare Ergebnisse ($R^2 = 0,71$ und $0,72$).

Abbildung 13 stellt die Korrelationsanalysen, die resultierenden Geradengleichungen und die Determinationskoeffizienten dar. Allerdings zeigte die PCR-Analyse mit Geflügelfleisch eine bessere Amplifikationseffizienz als die mit Schweinefleisch, da bei der Schweinefleisch-Analyse die Ct-Werte viel später angestiegen sind (Abb. 9) und die Steigung der Regressionsanalyse höher liegt ($2,30 > 1,20$). Außerdem zeigten die Schmelzkurvenanalysen dieser Proben eine höhere Amplifikationspezifität (Abb. 12). Allerdings ist bei der Auswertung darauf zu achten, dass die Geflügelfleischproben in einer höheren Anzahl ($n = 27$) vorhanden waren als die Schweinefleischproben ($n = 10$) und dadurch für die Geflügelfleischproben eine größere statistische Aussagekraft resultierte.

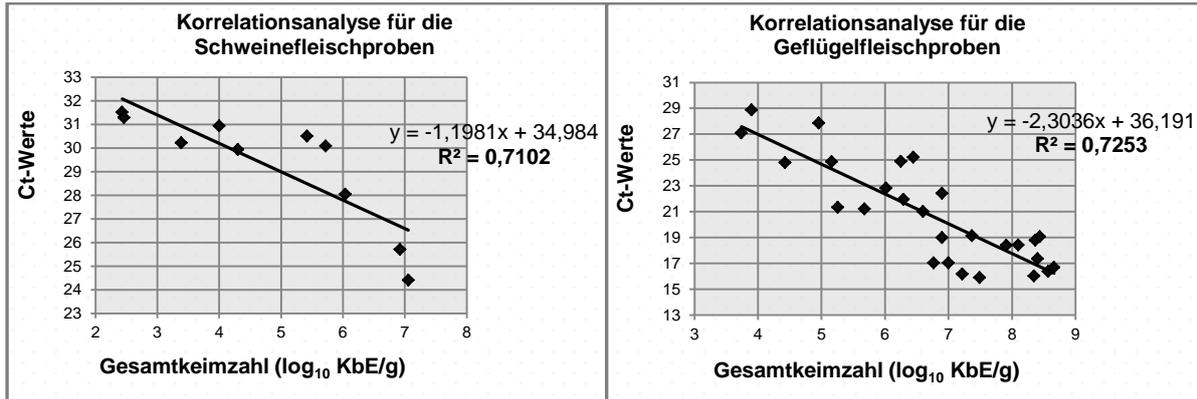


Abbildung 13: Korrelationsanalyse zwischen den Ct-Werten ermittelt aus den PCR-Analysen und der Gesamtkeimzahl aus dem Plattenkulturverfahren. Schweinefleischproben ($n = 10$) (links), Geflügelfleischproben ($n = 27$) (rechts).

3.1.4 Diskussion

Das Ziel der Vorversuche war in erster Linie, ein einfaches Real-Time PCR-Verfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleisch zu entwickeln, sodass die Tauglichkeit dieser DNA-basierenden Methode überprüft werden konnte. Dazu wurde ein Primerpaar aus der Literatur (Gutiérrez et al., 1998) ausgewählt, das Konsensusregionen des universellen 16S *rRNA*-Gens amplifizierte. Gutiérrez et al. (1998) haben diesen Primer bei einer konventionellen PCR-Analyse zur Quantifizierung der Verderbsflora von Schweinefleisch verwendet, wobei zur Detektion eine Hybridisierung während der PCR zwischen einem Digoxigenin-markierten Primer und einer biotinylierten Sonde benutzt wurde. Dieses Hybridisierungsprodukt wurde als Post-PCR mittels eines ELISA-Verfahrens (enzyme-linked immunosorbent assay) quantifiziert. Da die Autoren dieser Arbeit nach dem Vergleich der Ergebnisse des PCR-ELISA-Verfahrens (Absorptionswerte bei 450 nm) und des Plattenkulturverfahrens einem sehr hohen Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,95$; $\text{Absorption}_{450\text{nm}} = 0.22678 + 0.41232 \log_{10} \text{ der Keimzahl}$) erzielt haben, wurde das zur Amplifikation verwendete Primerpaar (Abschn. 3.2.1) für die PCR-Analyse in den Vorversuchen verwendet. Es wurde versucht, mit Hilfe einer einfachen Real-Time PCR-Analyse, ohne ein zeit- und arbeitsaufwendiges Post-Amplifikationsverfahren, die Gesamtkeimzahl der Fleischproben zu bestimmen. Da das Primerpaar von Gutiérrez et al. (1998) für die Bestimmung der Verderbsflora von Schweinefleisch eingesetzt wurde, war bei der Auswertung zu erwarten, dass bei diesen Proben eine effizientere Amplifikation und ein höherer Determinationskoeffizient erzielt würden. Interessanterweise ergaben sich aus den beiden Analysen mit Schweine- und Geflügelfleisch-DNA-Templates sehr ähnliche Determinationskoeffizienten. Außerdem zeigte die Analyse mit Schweinefleisch eine niedrigere Amplifikationseffizienz und -spezifität. So wurden die PCR-Produkte mit gleicher Keimanzahl an der unteren Detektionsgrenze (10^3 KbE/g) bei den Schweinefleischproben drei Zyklen später amplifiziert, als bei der Analyse von Geflügelfleischproben. Bei höherer Keimbelastung lag die Abweichung sogar bei sechs Zyklen Unterschied. Der Unterschied der Amplifikationseffizienz bei gleicher Keimanzahl in verschiedenen PCR-Analysen kann an der unterschiedlichen Matrix der beiden Fleischproben liegen. Es wurden zwar für beide Proben zwei Waschschrte zur Beseitigung der PCR-Inhibitoren vor der DNA-Extraktion eingesetzt, aber es kann sein, dass die Schweinefleischproben mehr PCR-Inhibitoren enthalten haben, als die Geflügelfleischproben oder, dass bei diesen Proben durch die Waschschrte ein Nukleinsäurenverlust verursacht wurde, wodurch niedrigere Ct-Werte erzielt wurden. Ebenso waren bei der Amplifikation von Proben mit gleichen Keimzahlen innerhalb einer Analyse unterschiedliche Ct-Werte zu erkennen. So lagen die Ct-Werte in der PCR-Analyse von Geflügelfleischproben mit einer Keimbelastung von ca. 10^6 KbE/g ($n = 6$) zwischen 18,96 und 25,32. Diese Abweichung kann im Zusammenhang mit unterschiedlichem PCR-Inhibitorgehalt in unterschiedlichen Geflügelfleischarten erklärt werden. Außerdem stellen

gleichmäßige Temperaturverteilungen in der Thermocycler-Platte und gleiche effektive DNA-Extraktionseffizienz bei allen Proben wichtige Faktoren dar, um möglichst ähnliche Ct-Werte bei gleicher Keimanzahl erzielen zu können. Interessanterweise wurden stets Amplifikate aus den negativen Kontrollproben erhalten, obwohl in diesen Reaktionen keine DNA zugegeben wurde. Die T_m -Werte dieser Amplifikate lagen bei 76,5 °C bei den Schweinefleischproben und bei 75,5 °C bei den Geflügelfleischproben. Bei diesen Amplifikaten handelte es sich vermutlich um Primerdimere (niedrigere Schmelztemperatur als die PCR-Produkte) oder anderen PCR-Artefakten, die durch Kontaminationen der PCR-Reagenzien mit externen Nukleinsäuren verursacht wurden. Bei der Auswertung der Ergebnisse von den zwei durchgeführten PCR-Analysen ist zu beachten, dass die zu amplifizierende Zielsequenz sich auf dem *16S rRNA*-Gen, das für sein Vorhandensein in mehreren Kopien im Genom zahlreicher Bakterien bekannt ist, befindet. In vielen Bakterienspezies sind bis zu 7 Kopien von diesem Gen vorhanden (Corless et al., 2000). So wird die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in einer Multispeziesgemeinschaft, wie der Verderbsflora von Fleisch, mittels PCR von der Anzahlvariation der *16S rRNA*-Gens in verschiedenen Bakterienspezies beeinflusst (Labrenz et al., 2004; Farrelly et al., 1995). Die Unklarheit über die Anzahlvariation dieses Gens in der erfassten Bakterienmischung stellt eine Einschränkung für die Auswertung der Gesamtbakterienzahl mittels PCR dar. Deshalb werden in der PCR-Analyse für Quantifizierungszwecke in der Regel die konservierten Regionen von Einzelkopiegenen als Amplifikationsziel bevorzugt (Takahashi et al., 2006).

3.1.5 Schlussfolgerung

Die Durchführung des in den Vorversuchen entwickelten Real-Time PCR-Verfahrens zur Bestimmung der Keimbelastung in Fleisch war unkompliziert und effektiv. Durch das SYBR[®] Green I Farbstoff-Detektionssystem wurde eine unmittelbar anschließende Schmelzkurvenanalyse an die Amplifikation ermöglicht. Dadurch war die Durchführung dieser Methode weniger zeit- und arbeitsaufwendig, als die von Gutiérrez et al. (1998) entwickelte Methode mit Post-PCR-Detektionssystem (ELISA-PCR). Allerdings wies die oben genannte Studie einen höheren Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0,95$, im Vergleich zu den in den durchgeführten Vorversuchen ermittelten ($R^2 = 0,71$ und $0,72$) auf. Diese Abweichungen können im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Fleischproben und deren variablen Keimbelastungen und Keimmischungen, die durch den verwendeten Primer unterschiedlich erfasst wurden sowie durch die unterschiedlichen PCR-Bedingungen in dieser Arbeit erklärt werden. Trotzdem stellte die Durchführung der Vorversuche eine geeignete Basis für die Entwicklung einer präzisen und funktionierenden Real-time PCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch dar. Durch diese Analyse wurden die Probenaufbereitungsschritte, das DNA-Extraktionsverfahren und die PCR-Analysenbestandteile und -bedingungen für weitere Versuche überprüft und modifiziert.

Somit wurde in den folgenden Experimenten angestrebt, eine Real-Time PCR-Methode zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl in Geflügelfleisch zu entwickeln, in der die folgenden Kriterien berücksichtigt werden:

- Die eingesetzten Primer sollen die konservierten Regionen eines Gens amplifizieren, welche nur als Einzelkopie im Genom von Bakterien vorkommen.
- Die Amplifikationsprodukte sollen in möglichst vielen Bakterien, die mit dem Verderb von Geflügelfleisch assoziiert sind, vorkommen.
- Aufgrund der einfachen und schnellen, aber auch effektiven Anwendung soll SYBR[®] Green I als Farbstoff für das Detektionssystem benutzt werden.
- Ein einfaches, schnelles und effektives Verfahren, das in der Lebensmittelanalyse einsetzbar ist, sollte entwickelt werden.

3.2 Identifizierung der Geflügelfleischflora mittels 16S rRNA-Sequenzanalyse

3.2.1 Ziel und Aufbau der Versuche

Das Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die bedeutenden Hauptbakterienspezies, die mit dem Verderb von Geflügelfleisch in Verbindung stehen, zu erfassen. So wurde eine Bakterienreferenzliste erstellt, die als Basis zur Detektion und Quantifizierung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch geeignet ist. Es wurde festgestellt, welche universellen Gene für die Detektion der meisten dieser Stämme in Frage kommen würden, sodass die Konsensussequenzen des ausgewählten Gens zur Quantifizierung der Bakterien verwendet werden konnten. Die Identifizierung der Bakterienspezies erfolgte mit Hilfe einer *16S rRNA*-Gen basierten Sequenzanalyse mittels PCR-Amplifizierung der bakteriellen DNA unter Anwendung von einem Universalprimerpaar. Dazu wurden die mikrobiologischen Belastungen verschiedener Geflügelfleischarten mit Hilfe einer Kultivierung auf Selektivnährmedien entsprechend der Methoden der EU- und DIN-Normen bestimmt.

Anhand einer Gramfärbungsanalyse erfolgte eine Vordifferenzierung der Bakterienstämme, die anschließend mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse verglichen wurden. Aus den auf verschiedenen Selektivnährmedien gewachsenen Bakterienkolonien wurde DNA extrahiert und nach der Qualitäts- und Konzentrationsmessung mittels UV-Spektrophotometrie in der Real-Time PCR-Analyse eingesetzt, die mit Hilfe des Universalprimersets ein 1462 bp-igen Sequenzenfragment des *16S rRNA* Gens amplifizierte. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Amplifikate kommerziell [Eurofins Genomics, D] sequenziert. Die sich ergebenden Sequenzen wurden mit Hilfe einer BLAST-Analyse (Basic Local Alignment Search Tool) der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Erfassung der Bakterienstämme verwendet. Die identifizierten Bakterienstämme wurden in den nächsten Abschnitten als Basis für das Generieren der Primer verwendet.

3.2.2 Methode

3.2.2.1 Isolation der Bakterien aus den Geflügelfleischproben

Sämtliche Kultivierungsverfahren für die Geflügelfleischproben erfolgten in Anlehnung an die „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB)“.

Vorbereitung der Geflügelfleischproben

Die frischen Geflügelfleischproben wurden im März und April 2012 aus den Selbstbedienungsregalen verschiedener Lebensmitteleinzelhandelsbetriebe in Hannover gekauft. Diese Proben waren unterschiedlich verpackt (Tab. 16) und wurden sofort nach dem Einkauf und dem Transport bei +7 °C ($\pm 0,5$ °C) in Kühlschränken im Technikum des Instituts für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung der Leibniz Universität Hannover gelagert. Um ein möglichst weites Bakterienanzahl- und Bakterienartenspektrum zu erreichen, wurden die Proben jeweils in fünf Teilstücke aufgeteilt. Zwei Teilstücke (je 25 g) wurden für den Salmonellen- und *Campylobacter*-Nachweis benutzt und über Nacht (18-24 h) bei 30 °C gelagert. Die drei weiteren Stücke wurden bei drei verschiedenen Temperaturen (4 °C, 20 °C und 30 °C) gelagert. Diese wurden für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl sowie für den Nachweis der *Enterobacteriaceae*, Coliformen Bakterien, *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Listeria* spp., und *Lactobacillus* spp. in Anlehnung an die entsprechenden Referenzmethoden verwendet. Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 10 Fleischproben verwendet. Durch die Aufteilung in fünf Teilstücke ergaben sich aus dem Fleisch insgesamt 50 Proben. Tabelle 16 fasst die Probenart und die Lagerbedingungen der Fleischteilstücke zusammen.

Kultivierung der Bakterien auf verschiedenen Selektivnährmedien

Bezugnehmend auf die Bakterienspezies, die potentiell mit dem Geflügelfleischverderb assoziiert sein können, wurden verschiedene Selektivnährmedien für die Identifizierung der Geflügelfleischflora ausgewählt. Zusätzlich wurden die Fleischproben auf pathogene Spezies, die typisch für Geflügelfleisch sind (Salmonellen, *Campylobacter* spp., Listerien und *Staphylococcus aureus*) untersucht. Die Nährmedien und deren Zubereitung, die Zielbakterien und die Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 19 beschrieben. Die Kultivierungsmethoden für die mikrobiologische Untersuchung der Geflügelfleischproben wurden, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 16: Die Aufteilung der Proben und die Lagerungstemperaturen über Nacht (18-24 h) (Die Probenreihen D und E wurden zum Nachweis der *Salmonella* spp. und *Campylobacter* spp. verwendet.)

Proben-Nr.	Probenart und -verpackung	Proben-aufteilung	Lagerungs-temperatur	Proben-Nr.	Probenart	Proben-aufteilung	Lagerungs-temperatur
1	Putenbrust-Innenfilet (MAP-Verpackung)	A	30 °C	6	Wachtel (Vakuum-Verpackung)	A	30 °C
		B	20 °C			B	20 °C
		C	4 °C			C	4 °C
		D	30 °C			D	30 °C
		E	30 °C			E	30 °C
2	Hähnchen-Innenfilet (MAP-Verpackung)	A	30 °C	7	Mais-hähnchen-schenkel (Vakuum-Verpackung)	A	30 °C
		B	20 °C			B	20 °C
		C	4 °C			C	4 °C
		D	30 °C			D	30 °C
		E	30 °C			E	30 °C
3	Putengulasch (MAP-Verpackung)	A	30 °C	8	Perlhuhn-brust mit Haut (Vakuum-Verpackung)	A	30 °C
		B	20 °C			B	20 °C
		C	4 °C			C	4 °C
		D	30 °C			D	30 °C
		E	30 °C			E	30 °C
4	Hähnchen-Unterschenkel (MAP-Verpackung)	A	30 °C	9	Enten-Innenfilet (Vakuum-Verpackung)	A	30 °C
		B	20 °C			B	20 °C
		C	4 °C			C	4 °C
		D	30 °C			D	30 °C
		E	30 °C			E	30 °C
5	Entenkeule (Vakuum-Verpackung)	A	30 °C	10	Putensteaks (MAP-Verpackung)	A	30 °C
		B	20 °C			B	20 °C
		C	4 °C			C	4 °C
		D	30 °C			D	30 °C
		E	30 °C			E	30 °C

Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ): (DIN 10161-1:1984-02, Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C, Spatel- und Plattengussverfahren)

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN 10161:1984-02. Gemäß dieser Norm ist das Plattengussverfahren geeignet, als Referenzverfahren zur Bestimmung der Anzahl vegetativer, aerober Mikroorganismen verwendet zu werden. Das Verfahren ist anwendbar bei Fleisch und Fleischerzeugnissen sowie Erzeugnissen mit einem Zusatz von Fleisch und Fleischerzeugnissen (DIN 10161:1984-02). Die Probenvorbereitung erfolgte in Anlehnung an die DIN 10162:1982-02 (neue Fassung: DIN EN ISO 6887-2:2014-01, Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen – Teil 1: Vorbereitung der Proben).

Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kolonien auf den Platten gezählt und die Gesamtkeimzahl wurde als gewichtetes arithmetisches Mittel anhand der unten beschriebenen Formel (Nr. 3) berechnet. Die Kolonienzahlen zwischen 20 und 300 wurden zur Berechnung herangezogen. Aus den Werten der niedrigsten und der nächst höheren auswertbaren Verdünnungsstufe wurde der gewichtete Mittelwert (c) errechnet:

Bestimmung der Keimzahl (gewichtetes arithmetisches Mittel):

$$c = \frac{\sum c}{n1 * 1 + n2 * 0.1} * d$$

c = gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen
 $\sum c$ = Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden
 $n1$ = Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
 $n2$ = Anzahl der Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe
 d = Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Bsp: errechneter Wert: $c = 1,00 \cdot 10^7$ KBE/100 μ l $\rightarrow c = 1,00 \cdot 10^8$ KBE/ ml = $1,00 \cdot 10^8$ KBE/g

Mikrobiologischer Nachweis der *Pseudomonas* spp. (DIN ISO 13720:2010-12, Zählung von präsumtiven *Pseudomonas* spp. - Fleisch und Fleischerzeugnisse)

Der Nachweis von *Pseudomonas* spp. in Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 13720:2010-12. Nach Angaben der Norm ist diese Methode für den Nachweis und die Zählung von *Pseudomonas* spp. in Fleisch und Fleischerzeugnissen, einschließlich Geflügel, geeignet. Als Nährmedium wird bei dieser Methode „Cetrimid-Fucidin-Cephalothin-Agar (CFC Agar: *Pseudomonas* Base Agar mit Zugabe von CFC-Selektivsupplement) verwendet. Die Probenvorbereitung und Herstellung dezimaler Verdünnungen erfolgten wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. In jede Petrischale wurden 15-20 ml des CFC-Agar gegeben und zum Erstarren stehengelassen. Im Doppelansatz wurde mit einer Pipette 100 μ l jeder Verdünnungsstufe auf Agarplatten überführt. Die Teilmengen wurden mit Einwegspateln auf der Oberfläche der Agarplatten gleichmäßig ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten 44 h bei 25 °C bebrütet. Zu dieser Norm gehört auch ein Oxidase-Test zur Bestätigung der Kolonien, bei denen angenommen wird, dass es sich um Pseudomonaden handelt. Da im Anschluss an die Kultivierungsversuche eine DNA- Fragmentenanalyse durchzuführen war, wurde auf den Oxidase-Test verzichtet. Die Kolonienmorphologie wurde nach 44 h Bebrütung auf typische Pseudomonadenkolonien überprüft. Nach Angaben des Herstellers lässt jegliches Wachstum auf *Pseudomonas*-Selektivnährboden auf *Pseudomonas* spp. schließen, wobei blaugrüne oder braune Pigmentierung und Fluoreszenz als Hinweise auf *Pseudomonas aeruginosa* gelten.

Mikrobiologischer Nachweis der *Enterobacteriaceae* (DIN 10164-1:1986-02, Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch)

Der Nachweis von *Enterobacteriaceae* in Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN 10164-1:1986-02, Bestimmung von *Enterobacteriaceae* in Fleisch. Als Nährmedium wird

bei dieser Methode „Kristallviolett-Galle-Glucose-Agar“ (VRBD-Agar) benutzt. Er dient in der Regel dem Nachweis und der Zählung von galletoleranten gramnegativen Bakterien. Die Probenaufbereitung, die Herstellung dezimaler Verdünnungsreihen und die Beimpfung erfolgten wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde. Die getrockneten Platten wurden für 48 h im Brutschrank bei 35 °C bebrütet. Die Zählung der Kolonien erfolgte wie im Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde. Die Kolonienmorphologie wurde nach 48 h Bebrütung auf typische *Enterobacteriaceae*-Kolonien überprüft. Die *Enterobacteriaceae* sind durch ihre runden, violetten Kolonien, Ø 1-2 mm, die von einem violetten Hof umgeben werden, zu erkennen, wobei die Identität dieser Kolonien bestätigt werden soll.

Mikrobiologischer Nachweis der coliformen Bakterien (Kultivierung auf MacConkey Agar)

Zum Nachweis von coliformen Bakterien in Geflügelfleisch wurde MacConkey Agar als Nährmedium verwendet. Nach Angaben des Herstellers ist MacConkey Agar ein mäßig selektiver Nährboden zum Nachweis von Salmonellen, Shigellen und coliformen Bakterien in Lebensmitteln und anderen Materialien. Der Nachweis von coliformen Bakterien in Geflügelfleischproben erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 (Nachweis der *Enterobacteriaceae*) beschrieben. Die Platten wurden für 18-24 h bei 35 °C bebrütet. Die Kolonienmorphologie wurde nach 24 h Bebrütung auf typische coliforme Kolonien überprüft, die vom Hersteller des Agars wie folgt beschrieben werden (Tab. 17).

Tabelle 17: Auswertung der Kolonien auf MacConkey Agar nach ihrer Morphologie

Kolonienmorphologie nach 24 h Bebrütung bei 35 °C		
Keim	Farbe	Anmerkung
<i>Escherichia coli</i>	rot	nicht schleimig
<i>Aerobacter aerogenes</i>	rosa	schleimig
<i>Enterococcus</i> spp.	rot	winzig, rund
<i>Staphylococcus</i> spp.	blassrosa	opak
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	grünbraun	fluoreszierend

Mikrobiologischer Nachweis der Milchsäurebakterien (DIN 10109:1991-09, Bestimmung von aerob wachsenden Milchsäurebakterien)

Der Nachweis der Milchsäurebakterien erfolgte in Anlehnung an die DIN 10109:1991-09 unter Verwendung von MRS-Agar. Diese Methode dient als Referenzverfahren zur Bestimmung der Anzahl aerob wachsender Milchsäurebakterien und ist anwendbar bei Fleisch und Fleischerzeugnissen. Aerob wachsende Milchsäurebakterien sind eine heterogene Gruppe grampositiver katalasenegativer Mikroorganismen. Diese umfassen folgende Genera: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc*. Die Probenaufbereitung, Herstellung dezimaler Verdünnungsreihen und die Beimpfung erfolgten unter Anwendung des Spatelverfahrens wie im Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben. Die Platten wurden für 3 Tage im Brutschrank aerob bei 25 °C bebrütet. Die Kolonienmorphologie wurde nach 48 h Bebrütung auf typische Milchsäurebakterienkolonien überprüft. Diese sind klein, opak und weiß.

Mikrobiologischer Nachweis der *Listeria* spp. (DIN EN ISO 11290-1:2004-01, Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* - Teil 1)

Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria* spp. erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 11290-1:2004-01. Dazu wurde PALCAM-Agar als Selektivnährboden verwendet. Es wurden PALCAM-Fertignährböden in Petrischalen [Merck KGaA] verwendet. Die Beimpfung der Platten erfolgte unter Anwendung des Spatelverfahrens. Die Bebrütung der Platten erfolgte unter mikroaerophilen Bedingungen unter Anwendung von CampyGen Päckchen [Oxoid, Art.-Nr. CM 862 + SR 141] in einem Anaerobiertopf. Die getrockneten Platten wurden für 48 h im Brutschrank bei 36 °C unter den oben beschriebenen mikroaerophilen Bedingungen bebrütet. Die Kolonienmorphologie wurde nach 48 h Bebrütung auf typische Listerienkolonien überprüft. Die Listerien sind durch graugrüne Kolonien, Ø ca. 2 mm, mit eingesunkenem, schwarzem Zentrum (Kraterbildung) zu erkennen. *Enterococcus* und *Staphylococcus* spp. sind durch graue Kolonien mit braungrünem Hof oder gelbe Kolonien mit gleichfarbigem Hof erkennbar.

Mikrobiologische Differenzierung zwischen den Aeromonaden und Pseudomonaden (DIN ISO 13720:2010-12, Zählung von *Pseudomonas* spp. in Fleisch)

Der Nachweis von *Aeromonas* spp. in Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN ISO 13720:2010-12, wobei statt CFC-Agar „Glutamate Starch Phenol-Red“ Nährboden (GSP-Agar) verwendet wurde. In diesem Fall werden Aeromonaden mit erfasst. Nach Angaben des Herstellers beinhaltet dieser Nährboden lediglich Stärke und Glutamat als Nährsubstanzen, die durch den größten Teil der Begleitflora nicht abgebaut werden können. Stärke wird durch Aeromonaden, nicht jedoch durch Pseudomonaden durch Säureproduktion degradiert, was die Umwandlung von Phenolrot zu einem gelben Abbauprodukt zur Folge hat. Gemäß der Empfehlung des Herstellers wurde Penicilin dem Nährboden als Selektivinhibitor zugesetzt. Die Beimpfung der Platten erfolgte unter Anwendung des Spatelverfahrens. Die Platten wurden für 3 Tage bei 28 °C bebrütet. Die Kolonienmorphologie wurde nach der Bebrütung auf *Aeromonas*- und *Pseudomonas*-Kolonien überprüft (Tab. 18).

Tabelle 18: Differenzierung zwischen Aeromonaden und Pseudomonaden nach ihren morphologischen Eigenschaften

Erscheinungsbild der Kolonien	Mikroorganismen
groß, Ø 2-3 mm, blau-violett, mit rot-violetter Hof	<i>Pseudomonas</i>
groß, Ø 2-3 mm, gelb, mit gelbem Hof	<i>Aeromonas</i>
klein, verzögertes Wachstum, manchmal mukoid	u. a. <i>Enterobacteriaceae</i>

Mikrobiologischer Nachweis der *Salmonella* spp. auf Selektiv-Nährboden (DIN EN ISO 6579-1:2014-08: Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp.)

Der Nachweis von *Salmonella* spp. in Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 6579-1:2014-08. Diese Methode beinhaltet eine Kultivierung der Bakterien auf

drei verschiedenen Nährböden: 1. Hauptanreicherung: Rappaport-Vassiliadis-Halbfest-Nährboden, modifiziert (MSRV-Nährboden) [Oxoid GmbH, Art.-Nr. CM 910], 2. Selektivnährboden: Rambach-Agar [Merck 1.07500], 3. Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Sacharose-Agar (BPLS) [Oxoid Art. Nr. PO5033A]. Eine Bebrütung in einer Anreicherungslösung geht der Kultivierung auf Platten voraus. Dazu diente gepuffertes Peptonwasser (Bolton-Anreicherungsbouillon-Basis, Art.-Nr. CM0983) [Oxoid GmbH]. Dies ermöglichte eine hohe Wiederbelebung von Zellen, die geschädigt wurden. Jede Fleischprobe (25 g, eingewogen in einen sterilen Filterbeutel) wurde mittels eines Labormischers [Stomacher 400, Labor & Analysen-Technik GmbH] mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser bei mittlerer Geschwindigkeit für 1 min gründlich vermischt. Das beimpfte gepufferte Wasser wurde bei 37 °C für 16–20 h inkubiert. Aus der Voranreicherung wurden 100 µl als Punkt zentral auf ein Viertel des kommerziell vorbereiteten MSRV-Fertignährbodens in einer Petrischale [Oxoid GmbH, Art. Nr. CM0910] aufgetropft. Die Platten wurden bei 42 °C für 24 h bebrütet. Auf allen bebrüteten Platten sind die beweglichen Salmonellen durch das Bilden einer opaken Migrationszone um die Auftragstelle herum zu erkennen. Dieses Phänomen trat bei keiner der Geflügelfleischproben auf, sodass kein Verdacht auf das Vorkommen von Salmonellen bestand. Es waren lediglich kleinere, wolkige Trübungen um die Auftragstelle zu erkennen. Diese weisen in der Regel auf coliforme Keime hin. Deshalb wurde auf weitere Bestätigungsschritte verzichtet.

Mikrobiologischer Nachweis der *Campylobacter* spp. (DIN EN ISO 10272-1:2006-04, Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 1)

Der Nachweis von *Campylobacter* spp. in Geflügelfleischproben erfolgte in Anlehnung an die DIN EN ISO 10272:2006-04 unter Anwendung von *Campylobacter* Selektivnährboden [Bolton, Oxoid, Art.-Nr. SR0183]. Nach Angaben des Herstellers enthält dieser Selektivnährboden nach Karmali einen Antibiotika-Cocktail, der grampositive Bakterien durch Vancomycin und gramnegative Bakterien durch Cycloheximid weitestgehend unterdrückt, während Haemin und Natriumpyruvat das Wachstum der *Campylobacter* spp. fördern. Gemäß der Norm wurde vor der Kultivierung auf den Platten eine Anreicherung durchgeführt. Jede Fleischprobe (25 g) wurde in 9-fachem Volumen (225 ml) Bolton-Bouillon mittels Labormischer bei mittlerer Geschwindigkeit für 1 min homogenisiert und bei 37 °C für 4 h inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 41,5 °C für 42-44 h mikroaerophil (unter Anwendung von GampyGen Päckchen) [Oxoid, Art.-Nr. CM 862 + SR 141] in einem Anaerobiertopf bebrütet. Aus der Voranreicherung wurden im Doppelansatz 100 µl auf *Campylobacter* Selektiv-Agar überführt und mit Hilfe eines sterilen Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Diese Platten wurden unter mikroaerophilen Bedingungen bei 42 °C für 24-48 h bebrütet. *Campylobacter jejuni/coli*-Kolonien sind in der Regel flach, grau bis leicht grün oder leicht rosafarben mit unregelmäßigem Saum, aber auch erhaben und rund mit mukoider

Erscheinung. Da bei den getesteten Geflügelfleischproben kein Wachstum der oben beschriebenen Kolonien auftrat, wurde auf weitere Bestätigungsschritte verzichtet.

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Kolonien anhand ihrer morphologischen Eigenschaften und Diversität zur Gramfärbung und DNA-Isolierung ausgewählt und fotografisch dokumentiert. Es wurde versucht, von jeder morphologisch unterschiedlichen Kolonie mindestens eine auszuwählen, um eine repräsentative Palette bezüglich des Keimspektrums von Geflügelfleisch zu erreichen.

Tabelle 19: Ausgewählte Selektiv- und Nichtselektivnährmedien für den Nachweis der Bakterien in Geflügelfleisch, Zielmikroorganismen und Kultivierungsbedingungen (Die Methoden wurden in Anlehnung an die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB ausgewählt.)

Methoden	Zielkeim	Nährmedium	Bebrütungs- temperatur (°C)	Bebrütungs- dauer (h)	Atmosphäre	Kolonienmorphologie
DIN 10161-01	mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	PC-Agar	30	72	aerob	alle
DIN10164-1	<i>Enterobacteriaceae</i>	VRBG-Agar	30	48	aerob	rote Kolonien mit rotvioletter Präzipitathof
DIN 10109	<i>Lactobacillaceae</i>	MRS -Agar	30	72	aerob	alle Kolonien
DIN ISO 13720	<i>Pseudomonas</i> spp.vs. <i>Aeromonas</i> spp.	GSP-Agar	25	24-72	aerob	blau-violette Kolonien auf rot-violettem Nährboden
In Anlehnung der DIN 10164-1	<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i>	MacConkey-Agar	35	18-24	aerob	rot-pink, rund, nicht-mukoid, farblos, transparent oder leicht pink; farblos, transparent oder bernsteinfarben
DIN EN ISO 10272-1	<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobacter Selektivagar	Vorinkubation 37 ± 1	4	mikroaerob	flache graue bis leicht grüne oder leicht rosafarbene Kolonien mit ungleichmäßigem Saum/mukoid
			Hauptinkubation 41.5	42-44		
DIN EN ISO 5479-1	<i>Salmonella</i> spp.	Peptonwasser	Vorinkubation 37	16-20	aerob	opake Migrationszone um die Auftragsstelle herum
		MSRV-Agar	Hauptinkubation 42	24		
		BPLS-Selektivagar	35	24		
		Rambach-Selektiveagar	35-37	24-48	-	
DIN EN ISO 11290-1	<i>Listeria</i> spp.	PALCAM-Agar + Supplement	30-36	48	mikroaerob	graugrüne Kolonien Ø ca. 2 mm mit eingesunkenem, schwarzem Zentrum (Kraterbildung)
DIN ISO 13720	<i>Pseudomonas</i> spp.	Pseudomonas Base-Agar Selektivsupplement C-F-C Agar	25	44	aerob	alle Kolonien

3.2.2.2 Vordifferenzierung der Bakterienkolonien mittels Gramfärbung

Eine Gramfärbung wurde für die repräsentativen Kolonien zur groben Einschätzung der Identität von auf Selektivagar gewachsenen Bakterienstämmen durchgeführt. Diese Kolonien wurden auch in das DNA-Extraktionsverfahren eingesetzt. Die Gramfärbung ist die wichtigste mikrobiologische Färbung, die zur Differenzierung von Bakterien angewendet wird. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem unterschiedlichen Aufbau der Zellwandstruktur der Bakterienzellen, die dadurch auf unterschiedliche Art angefärbt werden können. Mit der Gramfärbung lassen sich die Bakterien in zwei große Gruppen einteilen: die grampositiven und die gramnegativen Bakterien. Die grampositiven Bakterien behalten den zuerst aufgetragenen violetten Farbstoff (Kristallviolett) und sind daher violett gefärbt. Die gramnegativen Bakterien werden bei Behandlung mit Lugol'scher Lösung und Ethanol entfärbt. Durch eine Gegenfärbung mit Safranin können die gramnegativen Bakterien rot gefärbt werden (Bast, 2014). Das Färbungsverfahren erfolgte wie folgt: Ein Objektträger wurde mit 96 %igem Ethanol entfettet und trocken gerieben. Mit der Impföse wurde ein Bruchteil einer Bakterienkolonie auf den Objektträger in einem Tropfen NaCl-Lösung aufgetragen und zu einem dünnen Film ausgestrichen. Dann wurde das Präparat an der Luft getrocknet und mehrmals durch die Flamme gezogen. Das Präparat wurde mit Kristallviolettlösung bedeckt. Nach ca. 1,5 min wurde der Farbstoff abgegossen und mit destilliertem Wasser nachgespült. Die Lugol'sche Lösung wurde aufgetropft, ca. 3 min auf dem Präparat belassen und anschließend vorsichtig mit destilliertem Wasser entfernt (20 s). Der Ausstrich wurde so lange mit dem Entfärbemittel benetzt, bis kein Farbstoff mehr gelöst wurde (10 s) und mit destilliertem Wasser nachgespült (30 s). Das Präparat wurde für 1 min mit Safraninlösung überdeckt. Anschließend wurde es mit destilliertem Wasser gespült, bis keine Farbe mehr ausfloss (1 min) und für ca. 5 min luftgetrocknet. Die so erhaltenen Präparate wurden mit Ölimmersion mittels Mikroskopie [Carl Zeiss AG] im Hellfeld bei 1000 facher Vergrößerung visualisiert. Die grampositiven und gramnegativen Bakterienspezies wurden anhand ihrer Farbe vordifferenziert.

3.2.2.3 DNA-Extraktion aus den ausgewählten Bakterienkolonien

Um möglichst alle in Geflügelfleischproben existierenden Bakterien-DNA zu erfassen, sollte eine Extraktionsmethode verwendet werden, die für alle Bakterienstämme inklusive der grampositiven und gramnegativen Bakterien geeignet ist. Es stehen mittlerweile zahlreiche kommerzielle DNA-Extraktionskits zur Verfügung, die sich je nach Methodenprinzip für bestimmte Probenmatrizes eignen. In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen PCR-Analysen zur DNA-Isolierung das „Fast ID Genomic DNA Extraction Kit“ [Genetic ID (Europe) GmbH] verwendet. Nach Angaben des Herstellers ist das Kit geeignet, bakterielle DNA aus verschiedenen Matrizen (Samen, Pflanzen, Lebensmitteln, Blut, etc.) zu isolieren. Irwin et al.

(2014) haben im Rahmen einer semiquantitativen Studie zur genomischen DNA-Beprobung verschiedener in Lebensmitteln vorkommender Bakterien mehrere DNA-Extraktionskits, basierend auf verschiedenen Extraktionsmethoden, miteinander verglichen. Diese Autoren berichteten, dass das „Fast ID Genomic DNA Extraction Kit“ [Genetic ID, USA] geeignet ist, DNA aus einem breiten Spektrum von Bakterien (grampositiv und -negativ) aus verschiedenen Lebensmitteln zu isolieren. Das Isolierungsprinzip, die Bestandteile des Kits und die verwendete Methode wurden in Abschnitt 2.9 ausführlich beschrieben. Zur Aufbereitung wurde ein Bruchteil der repräsentativen Bakterienkolonien, die auch zur Gramfärbung verwendet wurden, zur Voranreicherung in 100 ml „Tryptic Soy Bouillon“ (TSB) übertragen und bei 30 °C 18 h lang bebrütet. Die angereicherten Bakteriensuspensionen wurden in 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen bei 6080 g (8.000 rpm) für 10 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml SMS-Lösung (0,85 % NaCl und 1 mM MgSO₄ in 100 ml Wasser) resuspendiert. 200 µl dieser präparierten Zellsuspensionen wurden zur DNA-Extraktion mit Hilfe des „Fast ID Genomic DNA Extraction Kits“ [Genetic ID (Europe) GmbH] verwendet. Die so erhaltenen Nukleinsäurelösungen wurden bei 4 °C gelagert.

3.2.2.4 Bestimmung der Qualität und Ausbeute der gewonnenen Nukleinsäuren

Nach Durchführung des DNA-Extraktionsverfahrens lagen zahlreiche DNA-Isolate vor, die aus vielen morphologisch ähnlichen Kolonien isoliert wurden. Deswegen wurden die Qualitäten und Konzentrationen der isolierten DNA mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers gemessen, sodass die DNA-Isolate mit geeigneter Qualität und Konzentration der PCR-Analyse eingesetzt werden konnten. Die Konzentrationsbestimmung der DNA-Proben erfolgte mit Hilfe des Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometers [Thermo Fisher Scientific]. Zur Ermittlung des ersten Leerwertes (Blank-Wert) wurde 1 µl TE-Lösung (10 mM Tris-HCl und 1 mM Na-EDTA, pH 8,0; die gleiche Lösung, in der die Nukleinsäuren gelöst wurden) verwendet. Zur Konzentrationsmessung der Nukleinsäureproben wurde 1 µl der Probe auf die Messoberfläche des Gerätes pipettiert und gemessen. Aus den analysierten DNA-Proben wurden 50 Proben anhand ihrer Konzentration (µg/ml) und Reinheit ($A_{260/280} \sim 1,8$) für den Einsatz in der PCR-Analyse selektiert. Die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen wurden in Tabelle 23 zusammengefasst. Es wurden zusätzlich einige der Nukleinsäureproben mit minderwertiger Qualität, die aus wichtigen repräsentativen Kolonien isoliert wurden, in die Auswahl einbezogen, um einen Verlust der Identitätsbestimmung bedeutsamer Stämme zu vermeiden.

3.2.2.5 Real-Time PCR-Analyse

Die PCR-Amplifikation der isolierten Nukleinsäuren aus den ausgewählten Kolonien erfolgte mit Hilfe eines Universalprimersets (Forward: 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' und Reverse:

5'-TACCTTGTTACGACTT-3') (Dolan et al., 2009; Kawashara et al., 2006; Paster et al., 2002 und Goldenberger et al., 1997). Diese Primer erzeugen ein 1462 bp langes Sequenzfragment des 16S rRNA-Gens der Bakterien (Paster et al., 2002) und wurden von TIB MOLBIOL [TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH] synthetisiert. Die PCR-Analyse wurde auf Basis eines „SYBR® Green I“ Detektionssystems unter Anwendung eines kommerziellen PCR-Supermixes (2X iQ™ SYBR® Green Supermix) [Bio-Rad Laboratories GmbH] durchgeführt. Die PCR-Mischungskomponenten, die Konzentrationen sowie das PCR-Protokoll sind in den Tabellen 20 und 21 beschrieben. Es wurden insgesamt 50 DNA-Templates in 2 PCR-Läufen, mit je 25 PCR-Ansätzen im Doppelansatz durchgeführt. Für jeden Lauf wurde eine negative Kontrolle (auch im Doppelansatz) verwendet, indem 2 µl reines Wasser das DNA-Template substituierten. Im Anschluss an die Amplifikation wurde für jeden PCR-Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu bestätigen.

Tabelle 20: Die Komponenten und Konzentrationen der PCR-Mischung

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		9,9 µl	
iQ SYBR® Green Supermix: SYBR® Green I Farbstoff	2X	12,5 µl	1X
iTaq™ DNA-Polymerase	50 U/ml		
je dATP, dCTP, dGTP und dTTP	0.4 mM		
MgCl ₂	6 mM		
Tris-HCl pH ≈ 8	40 mM		
KCl	100 mM		
Fluorescein und Stabilisatoren	20 nM		
Forward Primer		0,3 µl	0,6 mM
Reverse Primer		0,3 µl	0,6 mM
Summe		23 µl	
Template		2 µl	
Gesamtvolumen		25 µl	

Tabelle 21: PCR-Protokoll für die Amplifikation

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Amplifikation (40X)		
Denaturierung	95 °C	25 s
Primer-Annealing	58 °C	40 s
Elongation	72 °C	30 s
Annealing-Extension	72 °C	5 min
Schmelzkurvenanalyse	55 °C bis 90 °C	Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten
Kühlen	10 °C	∞

3.2.2.6 Aufreinigung und elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen PCR-Aufreinigungskits (Gene Jet PCR Purification Kit) [Thermo Fisher Scientific] entsprechend den Anweisungen des Herstellers, (Abschn. 2.10) mit dem Ziel, möglichst reine DNA für die Sequenzierung zu erhalten. Es folgte eine elektrophoretische Trennung der Amplifikate in einem 1,5 %igen Agarosegel. Das Gelelektrophoreseverfahren und die verwendeten Materialien wurden in Abschnitt 2.11 ausführlich beschrieben. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde ein DNA-Marker (GeneRuler™, 100 bp Plus DNA Ladder) [Thermo Fisher Scientific] mit Fragmentengrößen von 100 bp bis 3000 bp (Abb. 8) verwendet.

3.2.2.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte wurden die aufgereinigten Amplifikate nach den Vorgaben der Sequenzierungsfirma [Eurofin Genomics GmbH] vorbereitet. Die 50 PCR-Amplifikate wurden zur Sequenzierung an die Sequenzierungsfirma gesendet. Tabelle 23 stellt die Geflügelfleischproben, deren bakterielle DNA als Template für PCR-Amplifizierung verwendet und für die Sequenzierung ausgewählt wurde, dar. Die Aufbereitung der zu sequenzierenden Amplifikate erfolgte, indem ein Gesamtvolumen von 15 µl (je 10 ng/µl) der aufgereinigten PCR-Produkte in die 200 µl PCR-Gefäße überführt wurde. Zusätzlich wurde auch das Primerset, mit dem die DNA-Templates amplifiziert wurden, in einer Konzentration von 2 pmol/µl in einem Volumen von 15 µl (entspricht einer Menge von 30 pmol) zum Sequenzierungslabor geschickt.

3.2.2.8 BLAST-Analyse und Identifikation der Bakterienspezies

Nach Angaben der Sequenzierungsfirma wird bei längeren PCR-Produkten eine doppelsträngige DNA-Sequenzierung durchgeführt. Da die PCR-Produktlänge ca. 1462 bp

betrug, wurde je eine Forward- und Reverse-Sequenzierung vom Sequenzierungslabor durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Chromatogramme und „FASTA“-Dateien erhalten. Zur Einschätzung der Bakterienidentitäten wurden sowohl die Forward- als auch die Reverse-Sequenzierungen ausgewertet. Die Erfassung der Stammidentitäten erfolgte mit Hilfe der BLAST-Analyse der NCBI Datenbank (<https://blast.nlm.nih.gov>).

3.2.3 Ergebnisse

3.2.3.1 Auswertung der Kolonienidentitäten

Bei der Auswertung der auf den verschiedenen Selektivnährmedien gewachsenen Bakterienkolonien, nach der entsprechender Inkubationszeit erhielt die qualitative Analyse mehr Gewicht als die quantitative Auswertung. Das Ziel war es, möglichst verschiedene Bakterienspezies zu erfassen. Bei einigen der Proben wurde gezielt die Kühlkette abgebrochen, weshalb die Anzahl der jeweiligen Bakterienspezies auf den Platten nicht als repräsentative Keimzahl der Geflügelfleischproben betrachtet werden konnte. Selbst die Proben, die über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt wurden, konnten nicht als völlig intakt angesehen werden, da die Verpackungen zur Aufteilung des Fleisches geöffnet wurden. Allerdings erfolgte das Aufschneiden und die Aufteilung unter aseptischen Bedingungen mit Hilfe einer sterilen Fleischschere. Die Keimbelastung der Geflügelfleischproben (GKZ) und die Kolonienzahlen auf verschiedenen Selektivnährmedien sind als KbE/g in Tabelle 22 aufgelistet. Für eine spezifische Verifizierung und Differenzierung der morphologisch unterschiedlichen Kolonien wären weitere Bestätigungstests durchzuführen gewesen. Auf diese wurde aufgrund der 16S rRNA-Sequenzenanalyse verzichtet. Die Proben, die über Nacht im Kühlschrank gelagert wurden, wiesen eine Keimbelastung zwischen 10^3 und 10^7 KbE/g auf, wobei 60 % der Proben ca. 10^5 KbE/g Keime enthielten. Dieser quantitative Trend war ebenso bei den *Enterobacteriaceae* (Kolonienanzahl auf VRBD und MacConkey Agar) zu sehen. Anhand Tabelle 22 ist zu erkennen, dass die Familie *Enterobacteriaceae* aus quantitativer Sicht (10^3 bis 10^7 KbE/g bei der kühlgelagerten Proben) die dominierenden Mikroorganismen des Geflügelfleisches waren und sich exponentiell mit steigender Lagertemperatur vermehrt haben. Danach folgten die *Pseudomonas* spp., die auf CFC-Agar wuchsen, mit Keimzahlen zwischen 10^2 und 10^6 KbE/g. Mit steigender Lagertemperatur erhöhte sich die Anzahl der Pseudomonaden etwa um den Faktor 100. Die quantitative Auswertung der MRS-Platten ließ erkennen, dass die grampositiven Bakterien (Milchsäurebakterien) deutlich geringer als die gramnegativen (0 bis 10^4 KbE/g in kühlgelagerten Fleischproben) vertreten waren. Die Anzahl der *Lactobacillus* spp. erhöhte sich mit steigender Lagertemperatur deutlich (bis 10^7 KbE/g). Die Kolonien auf GSP-Agar gehören sowohl zu *Pseudomonas* spp. (blau-violette Kolonien), als auch zu *Aeromonas* spp. (gelbe Kolonien). Die quantitative Auswertung der Kolonien auf GSP-Agar

im Vergleich zur CFC-Plattenzahl zeigte, dass es sich bei den auf GSP-Platten gewachsenen Kolonien überwiegend um Pseudomonaden handelte und weniger Aeromonaden vorhanden waren. In Abbildung 14 sind einige der Selektivnährmedien mit den gewachsenen Kolonien dargestellt. Pathogene Keime (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., und Listerien) wurden in den Fleischproben nicht nachgewiesen. Allerdings wurden einige Kolonien aus diesen Platten, die nicht charakteristisch als Pathogen erkennbar waren, für die Sequenzierung und weitere Untersuchungen ausgewählt.

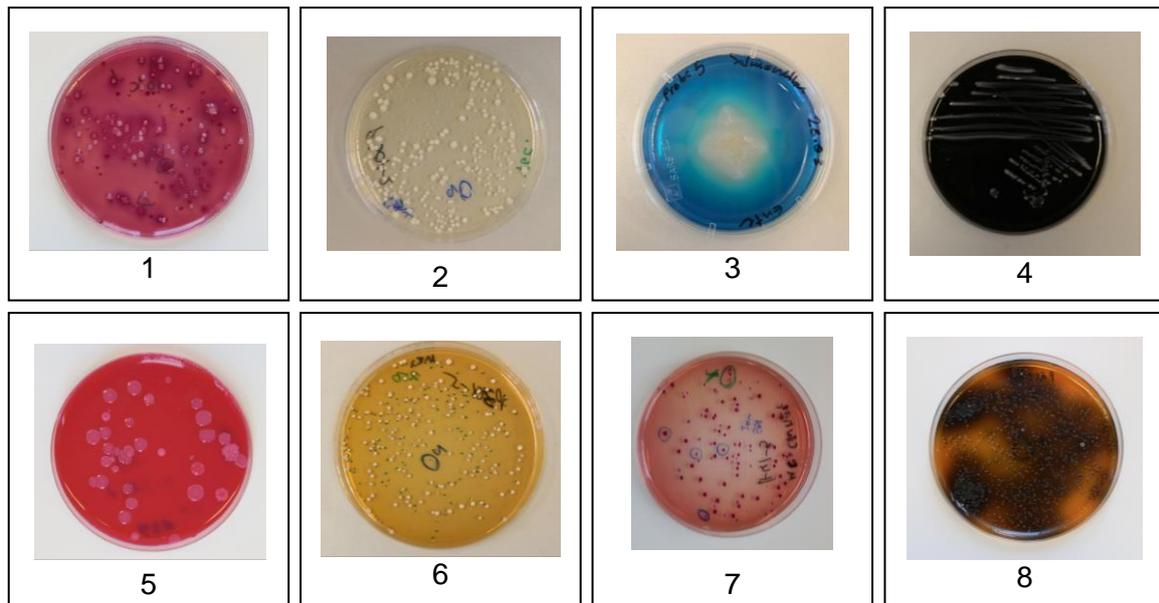


Abbildung 14: Bakterienkolonien auf diversen Selektivagar, die zur Bestimmung der Geflügelfleischflora verwendet wurden (1:VRBD, 2: CFC, 3: MSR, 4: Campylobacter-Agar 5: GSP, 6: MRS, 7: MacConkey, 8: PALCAM).

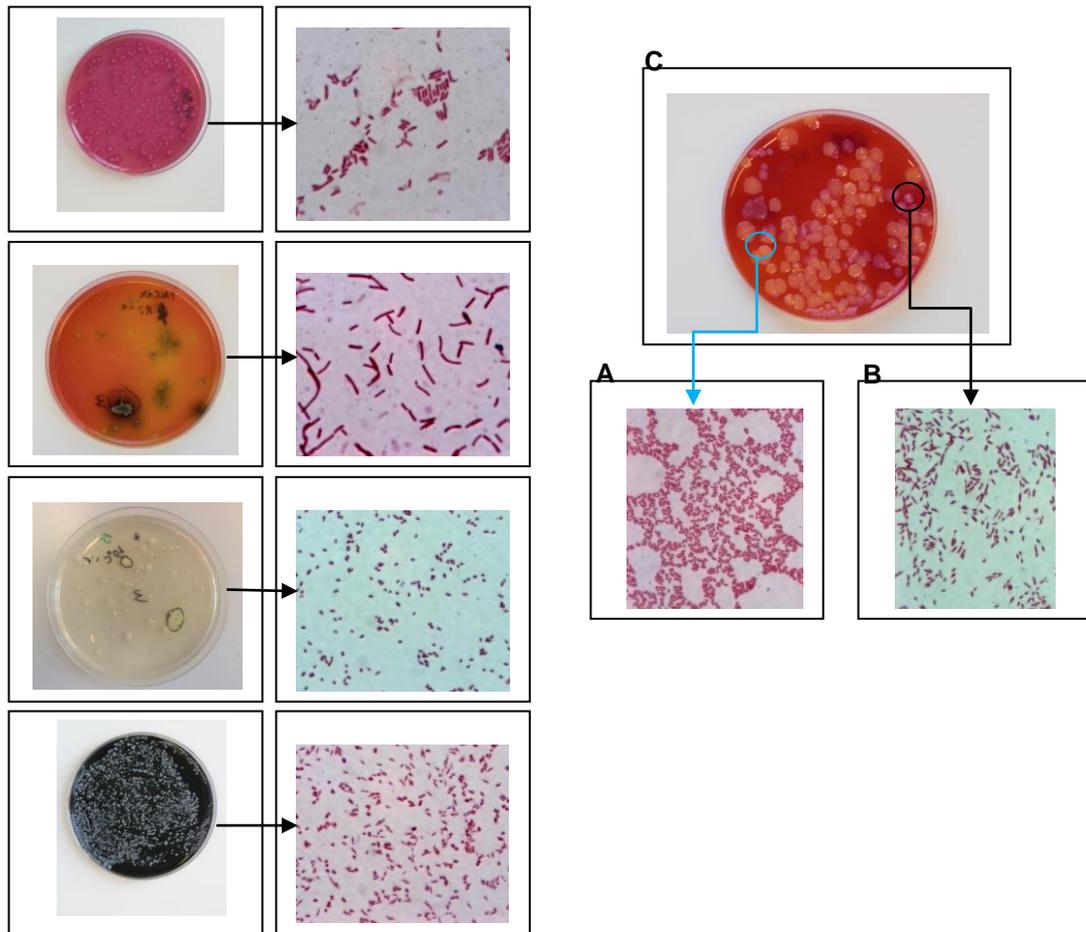


Abbildung 15: Zwei morphologisch unterschiedliche Kolonien auf GSP-Agar (C). Gramgefärbte Bakterienzellen aus gelben Kolonien: *Aeromonas* spp. (A) rosarote Kolonien: *Pseudomonas* spp. (B) (oben rechts). Links: Kolonien auf den Selektivnährböden mit den dazugehörigen Mikroskopiebildern nach der Gramfärbung.

Die Ergebnisse der Gramfärbung stimmten für alle Kolonien mit den grob vorgeschätzten Speziesidentitäten überein und dienten der Vordifferenzierung der Kolonien (Abb. 15), (Anhang Tab. 50).

3.2.3.2 Auswertung des DNA-Extraktionsverfahrens

Die Konzentrationsmessung der Nukleinsäuren, die aus den ausgewählten Kolonien isoliert wurden, wies keine gleichmäßig optimale DNA-Qualität für alle Kolonien auf. Bei der Auswahl der Kolonien anhand ihrer DNA-Konzentration wurde versucht, Proben zu selektieren, die eine höhere Konzentration und einen akzeptablen Reinheitsquotienten ($A_{260/280} \sim 1,8$) aufwiesen. Allerdings wurden auch Proben, die qualitativ nicht alle entsprechenden Kriterien erfüllten, aufgrund ihrer Bedeutung für die Identifikation der Geflügelfleischflora, in die Auswahl einbezogen (Tab. 23). Die niedrigste Nukleinsäurekonzentration betrug $0,58 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (isoliert aus einer Kolonie auf MRS Agar) und die höchste Konzentration $180,00 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (VRBD Agar).

Tabelle 22: Keimanzahl auf den Selektivnährböden (KbE/g) gezählt nach entsprechender Inkubationszeit, Lagerung der Fleischteilstücke vor Beprobung über Nacht (18-24 h) bei verschiedenen Temperaturen: 4 °C, 30 °C und 20 °C

Probe	Nr.	Lagertemperatur über Nacht	Keimzahl auf Selektivagar KbE/g						
			PC	GSP	MRS	CFC	VRBD	Mac Conkey	PALCAM
Putenbrustinnenfilet	P1	4 °C	4,9 · 10 ⁵	3,3 · 10 ⁵	7,0 · 10 ²	2,8 · 10 ⁵	4,1 · 10 ⁴	5,4 · 10 ⁴	4,1 · 10 ²
		30 °C	4,3 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁸	1,6 · 10 ⁵	1,0 · 10 ⁷	2,2 · 10 ⁸	1,4 · 10 ⁸	1,3 · 10 ³
		20 °C	7,3 · 10 ⁷	8,1 · 10 ⁶	6,7 · 10 ³	9,5 · 10 ⁶	1,1 · 10 ⁶	2,4 · 10 ⁶	n. v.
Hähncheninnenfilet	P2	4 °C	5,6 · 10 ⁵	2,3 · 10 ⁵	5,0 · 10 ³	5,5 · 10 ⁴	1,3 · 10 ⁵	8,3 · 10 ⁴	n. v.
		30 °C	3,1 · 10 ⁹	1,7 · 10 ⁸	2,7 · 10 ⁷	5,3 · 10 ⁸	6,7 · 10 ⁸	6,7 · 10 ⁸	1,0 · 10 ³
		20 °C	1,9 · 10 ⁹	1,8 · 10 ⁹	4,2 · 10 ⁵	5,5 · 10 ⁸	3,8 · 10 ⁷	3,8 · 10 ⁸	9,3 · 10 ²
Putengulasch	P3	4 °C	4,2 · 10 ⁵	9,1 · 10 ⁵	5,2 · 10 ⁴	1,2 · 10 ⁵	4,1 · 10 ⁵	6,3 · 10 ⁵	n. v.
		30 °C	1,7 · 10 ⁹	2,4 · 10 ⁹	2,9 · 10 ⁷	5,0 · 10 ⁶	2,4 · 10 ⁹	1,8 · 10 ⁹	1,0 · 10 ⁴
		20 °C	7,5 · 10 ⁷	1,2 · 10 ⁸	4,2 · 10 ⁵	2,5 · 10 ⁷	3,2 · 10 ⁶	2,3 · 10 ⁶	3,9 · 10 ²
Hähnchenunterschenkel	P4	4 °C	5,0 · 10 ³	8,5 · 10 ³	n. v.	6,0 · 10 ²	n. v.	n. v.	n. v.
		30 °C	6,6 · 10 ⁹	6,2 · 10 ⁸	2,6 · 10 ⁶	4,3 · 10 ⁷	5,4 · 10 ⁷	1,6 · 10 ⁷	1,0 · 10 ⁴
		20 °C	1,8 · 10 ⁷	1,5 · 10 ⁷	3,0 · 10 ⁴	7,0 · 10 ⁵	1,0 · 10 ⁵	1,4 · 10 ⁶	1,0 · 10 ³
Entenkeule	P5	4 °C	2,9 · 10 ⁷	5,9 · 10 ⁷	9,5 · 10 ³	2,7 · 10 ⁶	3,8 · 10 ⁷	1,7 · 10 ⁶	2,4 · 10 ³
		30 °C	2,8 · 10 ⁹	1,5 · 10 ⁹	2,2 · 10 ⁵	1,6 · 10 ⁸	1,5 · 10 ⁸	1,1 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁴
		20 °C	6,5 · 10 ⁹	6,4 · 10 ⁸	9,4 · 10 ⁵	3,3 · 10 ⁸	1,7 · 10 ⁸	9,1 · 10 ⁷	1,0 · 10 ³
Wachtel	P6	4 °C	1,2 · 10 ⁶	2,2 · 10 ⁶	2,4 · 10 ³	1,7 · 10 ⁶	2,5 · 10 ⁵	7,6 · 10 ⁴	1,8 · 10 ²
		30 °C	1,9 · 10 ⁹	1,4 · 10 ⁹	1,2 · 10 ⁷	1,0 · 10 ⁸	6,0 · 10 ⁷	1,3 · 10 ⁹	4,6 · 10 ⁴
		20 °C	1,7 · 10 ⁷	2,0 · 10 ⁷	1,6 · 10 ⁴	1,9 · 10 ⁸	3,0 · 10 ⁶	7,0 · 10 ⁶	3,8 · 10 ²
Maishähnchenschenkel	P7	4 °C	6,4 · 10 ⁵	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.	n. v.
		30 °C	3,0 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁸	1,3 · 10 ⁷	1,0 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁹	2,3 · 10 ⁹	1,0 · 10 ⁴
		20 °C	6,8 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁷	6,5 · 10 ⁵	5,4 · 10 ⁷	1,0 · 10 ⁸	2,0 · 10 ⁷	3,4 · 10 ⁴
Perlhuhnbrust mit Haut	P8	4 °C	3,9 · 10 ⁵	4,9 · 10 ⁶	3,4 · 10 ³	4,0 · 10 ⁵	3,6 · 10 ⁵	2,3 · 10 ⁵	n. v.
		30 °C	8,1 · 10 ⁸	4,8 · 10 ⁸	3,2 · 10 ⁷	2,6 · 10 ⁸	5,0 · 10 ⁶	3,3 · 10 ⁷	1,0 · 10 ²
		20 °C	1,2 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁸	8,1 · 10 ⁴	1,0 · 10 ⁸	2,00 · 10 ⁶	8,8 · 10 ⁶	1,0 · 10
Enteninnenfilet	P9	4 °C	1,1 · 10 ⁴	1,0 · 10 ⁴	n. v.	3,1 · 10 ⁴	3,9 · 10 ³	5,3 · 10 ³	n. v.
		30 °C	2,0 · 10 ⁸	1,2 · 10 ⁹	5,7 · 10 ⁶	1,2 · 10 ⁸	2,3 · 10 ⁹	1,9 · 10 ⁹	1,0 · 10 ³
		20 °C	4,3 · 10 ⁷	3,8 · 10 ⁷	4,5 · 10 ⁴	1,2 · 10 ⁷	1,0 · 10 ⁷	4,3 · 10 ⁷	2,4 · 10 ³
Putensteaks	P10	4 °C	2,0 · 10 ⁵	1,0 · 10 ⁴	n. v.	2,2 · 10 ⁵	n. v.	2,5 · 10 ⁴	n. v.
		30 °C	4,4 · 10 ⁸	3,9 · 10 ⁸	1,0 · 10 ⁴	3,0 · 10 ⁷	2,2 · 10 ⁸	2,2 · 10 ⁷	2,7 · 10 ³
		20 °C	1,2 · 10 ⁸	2,0 · 10 ⁷	5,0 · 10 ³	9,7 · 10 ⁷	1,6 · 10 ⁷	6,5 · 10 ⁶	8,7 · 10 ²

Tabelle 23: DNA-Konzentrationen und Reinheitsquotienten aus ausgewählten Kolonien (Die Ct-Werte (Mittelwerte) wurden dem gegenübergestellt.)

Proben	Nr.	Nähr- medium	DNA- Konz. (ng/μl)	260/280	Ct- Wert	Proben	Nr.	Nähr- medium	DNA- Konz. (ng/μl)	260/280	Ct- Wert	
P1 Puten- brust- Innenfilet	1	McConkey	34,44	2,15	15,23	P7 Mais- hähnchen- Schenkel	14	VRBD	39,73	2,04	14,43	
	8	VRBD	75,13	2,11	14,78		15	VRBD	20,80	2,09	15,29	
	9	VRBD	40,67	2,11	15,85		22	Ps. Agar	67,65	2,16	16,78	
	21	Ps. Agar	17,10	2,05	17,36		37	GSP	59,13	2,14	15,93	
	31	MRS agar	0,58	0,38	23,80		44	MRS	1,14	1,37	16,62	
	38	Campy	11,52	1,55	17,72		26	PALCAM	14,99	1,93	11,25	
	39	McConkey	24,73	2,22	17,01		P8 Perlhuhn- Brust mit Haut	4	McConkey	5,41	1,95	15,37
	47	Campy	24,50	2,21	19,58			23	Ps. Agar	19,91	1,87	17,54
P2 Hähnchen- Innenfilet	34	GSP	84,66	2,18	19,81	27		PALCAM	18,80	1,90	10,81	
	43	MRS	1,79	4,16	19,63	45	GSP	57,16	2,13	15,07		
	50	MRS	0,94	0,52	14,65	P9 Enten- Innenfilet	5	McConkey	9,74	2,00	17,21	
P3 Puten- gulasch	2	McConkey	2,00	10,74	18,42		16	VRBD	180,62	1,24	18,98	
	10	VRBD	12,47	2,10	19,04		17	VRBD	58,54	2,22	17,02	
	32	MRS	3,15	1,47	16,59		18	VRBD	36,66	2,06	15,17	
	40	Ps. Agar	25,65	2,22	19,13		24	Ps. Agar	70,09	1,99	14,77	
P4 Hähnchen- Unter- schenkel	11	VRBD	10,69	2,18	18,86		28	PALCAM	30,68	2,21	12,62	
	35	GSP	13,87	1,88	17,75		29	PALCAM	17,34	1,80	23,51	
	41	Ps. Agar	69,10	2,20	15,48	P10 Puten- Steaks	6	McConkey	22,60	2,15	16,88	
P5 Entenkeule	12	VRBD	19,49	2,06	18,09		7	McConkey	1,64	1,73	17,80	
	36	GSP	16,72	2,16	15,57		19	VRBD	101,00	2,15	17,17	
	42	Ps. Agar	53,78	2,12	15,85		20	VRBD	20,17	1,86	15,21	
P6 Wachtel	48	Campy	11,37	1,93	18,01		30	PALCAM	55,95	2,11	11,63	
	3	McConkey	24,70	2,21	15,37		33	MRS	4,47	1,02	19,87	
	13	VRBD	60,32	2,18	14,93		46	GSP	124,04	2,17	15,77	
	49	Campy	11,02	2,19	14,65	25	Ps. Agar	42,87	2,17	16,59		

3.2.3.3 Auswertung der Real-Time PCR Analyse

Die Amplifikationen mit Hilfe des Universalprimersets, basierend auf konservierten Regionen des *16S rRNA*-Gens, wiesen typische sigmoid-ansteigende PCR-Kurven auf (Abb. 16). Allerdings wurde ein relativ breites Ct-Wertspektrum, sowohl beim ersten (Ct zwischen 14 und 19, *M*: 16,5; *SD*: 1,4; *n* = 25), als auch beim zweiten PCR-Lauf (Ct zwischen 11 und 20, *M*: 16,8; *SD*: 3,3; *n* = 25) erhalten. Die große Standardabweichung der Ct-Werte ist aufgrund der unterschiedlichen Nukleinsäurenqualitäten und -konzentrationen der Proben zu erklären. Es wurde ebenfalls ein Reaktionsansatz zur negativen Kontrolle eingesetzt. Die Kurven sind allerdings erst nach dem 35. Zyklus angestiegen, was in der Regel auf die Bildung von Primerdimeren oder die Amplifikation von Kontaminanten in der PCR- Mischung hinweist.

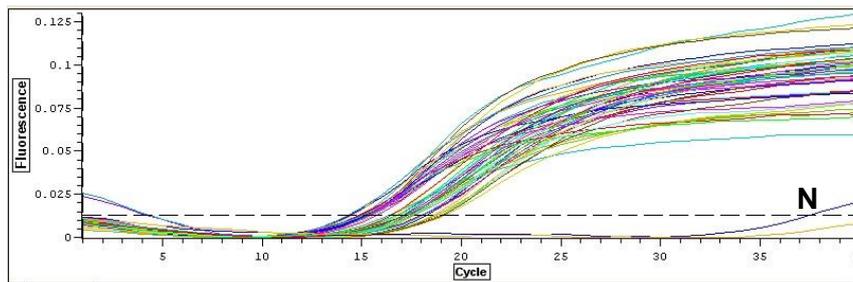


Abbildung 16: Amplifikationsplots der DNA-Templates extrahiert aus verschiedenen Kolonien, die auf Selektivnährmedien wuchsen. (1. PCR-Lauf; $n = 25$; Doppelbestimmung; $N =$ negative Kontrolle).

3.2.3.4 Auswertung der Post-PCR-Analyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient dazu, die Spezifität der Amplifikation, anders als z. B. bei der Gelelektrophorese, schon während der Analyse zu erfassen. Da die Primerdimere und andere PCR-Artefakte in der Regel niedrigere Schmelztemperaturen haben, können die Hauptprodukte durch ihre höheren Schmelztemperaturen (meist zwischen 80 bis 85 °C) erkannt werden (Busch, 2010). Die PCR-Produkte bei der 16S rRNA-Amplifikation zeigten homogene Schmelztemperaturen (Mittelwert des 1. Laufes: 87,12 °C; $SD: 0,53$; Mittelwert des 2. Laufes: 86,49 °C; $SD: 0,76$). Diese weisen auf eine zielspezifische Amplifikation hin (Abb. 17). Die Gelelektrophoresetrennung der Amplifikate zeigte, dass die amplifizierten Produkte größer als erwartet waren. Fast alle DNA Banden wurden zwischen der 1500 bp und der 2000 bp Bande des DNA-Markers visualisiert (Abb. 17), obwohl die angegebene Größe der PCR-Produkte in der Literatur bei 1462 bp lag. Dies kann mit der schwächeren Qualität der extrahierten DNA aus manchen Kolonien erklärt werden.

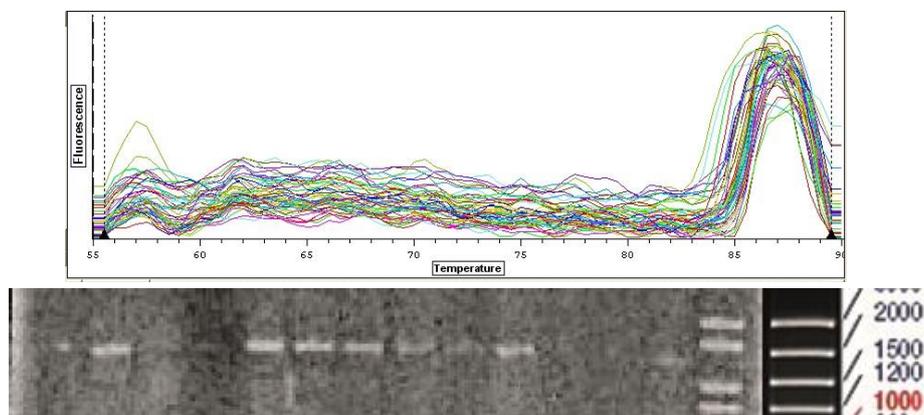


Abbildung 17: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte des ersten PCR Laufs; $n = 25$. Die T_m -Werte der Amplifikate lagen zwischen 85,5 und 87,5 °C (oben). Entsprechende elektrophoretisch getrennte DNA-Banden ($n = 12$) (unten).

Alle 50 PCR-Produkte wurden nach dem Aufreinigungsprozess zur Sequenzierfirma gesendet. Die Qualität der Sequenzierung der PCR-Produkte war nicht für alle Amplifikate gleich, was u. a. mit der unterschiedlichen Qualität der DNA-Isolate erklärbar ist. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden als Chromatogramme und auch als FASTA-Formate erhalten. Die Länge der erfolgreich sequenzierten Fragmente war unterschiedlich (auch bei Forward und Reverse Sequenzierung des gleichen Amplifikates). Zur Auswertung wurden die Chromatogramme analysiert. Dabei war es wichtig zu beachten, dass die vorhersehbaren Fehler meistens am Beginn und wieder am Ende des Sequenzierlaufs geschehen. Diese Fragmente wurden von der BLAST-Analyse ausgeschlossen. Ein Beispiel eines Chromatogrammes und des entsprechenden FASTA-Formates sind in Abbildung 18 dargestellt. Die erhaltenen Fasta-Sequenzen wurden mittels BLAST-Analyse ausgewertet. Tabelle 50 (Anhang) stellt die Ergebnisse der Sequenzierungen und der BLAST-Analyse sowie die dazugehörigen Platten und Mikroskopiebildern dar.



Abbildung 18: Sequenzierungsergebnisse in Form eines Chromatogrammes (oben) und eines FASTA-Formats (unten) anhand einer Forwardsequenzierung des PCR-Produktes aus Probe 8 (Kolonie auf VRBD Agar, Nr. 19 auf der Tabelle 23).

3.2.3.5 Auswertung der BLAST-Analyse

Die Ergebnisse der BLAST-Analyse wurden anhand der Parameter „max. score“, „query coverage“ und „max. identity“ analysiert. BLAST kalkuliert den Anteil der Identität zwischen der Anfrage und dem Treffer in einem Nukleotid zu Nukleotid-Alignment (Agostino, 2012). Die Bakterienstämme mit den höchsten „max. score“, „query coverage“ und „max. ident.“ wurden als Treffer angenommen. Die BLAST-Analyse der 50 FASTA-Sequenzen führte zur Identifizierung von 73 Bakterienstämmen (Tab. 24). Die größere Anzahl der Sequenzierungsergebnisse als die Ausgangssequenzenanzahl (50 PCR-Produkte) lässt sich durch Analyseverfahren erklären: der Sequenzierungsprozess führte nicht zur Identifikation der gesamten Nukleotide in einzelnen Proben. Bei manchen DNA-Proben wurde nur die Hälfte oder noch weniger als die Hälfte der Basenpaare entschlüsselt. Dadurch ergab sich bei der BLAST-Analyse von vielen Proben mehr als ein Stamm mit gleicher „max. Ident“ und gleichem „max. score“. Da das Ziel der Sequenzierungsanalyse ein Nachweis der Gesamtflora von Geflügelfleisch war, wurden bis zu drei Stämme mit identischen Analysenwerten als Treffer angenommen. Beispielsweise haben die Bakterienspezies *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia (E.) coli*, *E. fergusonii* und *E. albertii* in einer BLAST-Suche als Treffer stets fast gleiche Werte erhalten, obwohl sie aus verschiedenen Kolonien von verschiedenen Nährböden stammten. Diese wurden alle, als Treffer angenommen, sodass bei Quantifizierung mittels der PCR alle detektiert werden konnten. Die 16S rRNA-Fragmentenanalyse führte zum Nachweis von 16 taxonomischen Bakteriengattungen bestehend aus verschiedenen grampositiven und gramnegativen Spezies. Es dominierten die Familie *Enterobacteriaceae*. So gehörten 9 der 16 identifizierten Genera zur Familie *Enterobacteriaceae*: *Shigella* spp., *Escherichia* spp., *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., *Rahnella aquatilis*, *Obesumbacterium proteus*, *Pantoea* spp., *Citrobacter youngae*, und *Hafnia alvei*. Des Weiteren traten die Pseudomonaden in großer Vielfalt auf. Insgesamt wurden 22 Spezies nachgewiesen, darunter: *Pseudomonas (P.) fragi*, *P. psychrophila*, *P. fulva*, und *P. putida*. Neben diversen gramnegativen Spezies wie Aeromonaden, Shewanellen und *Acinetobacter* spp. wurden auch grampositive Bakterien wie *Staphylococcus* spp. und *Lactobacillus* spp. nachgewiesen. Die Kolonien, die aus Campylobacter-Agar stammten, wurden nicht als *Campylobacter* spp., sondern als *Acinetobacter*, *Escherichia* und *Shigella* identifiziert. Diese Bakterienspezies wurden als Grundlage für das Primergenerieren im folgenden Abschnitt verwendet.

Tabelle 24: Identifizierte Bakterienspezies mit Hilfe der BLAST-Analyse

Nr.	Taxon	Nr.	Taxon	Nr.	Taxon
1	<i>Shigella flexneri</i>	30	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	59	<i>Aeromonas bestiarum</i>
2	<i>Shigella dysenteriae</i>	31	<i>Pseudomonas putida</i>	60	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>
3	<i>Escherichia coli</i>	32	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	61	<i>Aeromonas salmonicida</i>
4	<i>Escherichia fergusonii</i>	33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>
5	<i>Escherichia albertii</i>	34	<i>Klebsiella variicola</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	63	<i>Aeromonas molluscorum</i>
6	<i>Serratia liquefaciens</i>	35	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	64	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i>
7	<i>Serratia proteamaculans</i>	36	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	65	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i>
8	<i>Serratia grimesii</i>	37	<i>Rahnella aquatilis</i>	66	<i>Shewanella hafniensis</i>
9	<i>Serratia fonticola</i>	38	<i>Obesumbacterium proteus</i>	67	<i>Shewanella putrefaciens</i>
10	<i>Serratia plymuthica</i>	39	<i>Pantoea agglomerans</i>	68	<i>Shewanella baltica</i>
11	<i>Pseudomonas lundensis</i>	40	<i>Pantoea ananatis</i>	69	<i>Acinetobacter junii</i>
12	<i>Pseudomonas fragi</i>	41	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	70	<i>Acinetobacter baumannii</i>
13	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	42	<i>Citrobacter youngae</i>	71	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
14	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	43	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	72	<i>Acinetobacter towneri</i>
15	<i>Pseudomonas koreensis</i>	44	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73	<i>Acinetobacter soli</i>
16	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	45	<i>Hafnia alvei</i>		
17	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	46	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>		
18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	47	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>		
19	<i>Pseudomonas japonica</i>	48	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>		
20	<i>Pseudomonas pohangensis</i>	49	<i>Staphylococcus lentus</i>		
21	<i>Pseudomonas vranovensis</i>	50	<i>Staphylococcus vitulinus</i>		
22	<i>Pseudomonas fulva</i>	51	<i>Staphylococcus fleurettii</i>		
23	<i>Pseudomonas migulae</i>	52	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>		
24	<i>Pseudomonas reinekei</i>	53	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
25	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	54	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>		
26	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>Chlororaphis</i>	55	<i>Lactobacillus sakei</i>		
27	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	56	<i>Lactobacillus frumenti</i>		
28	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	57	<i>Lactobacillus reuteri</i>		
29	<i>Pseudomonas monteillii</i>	58	<i>Lactobacillus vaginalis</i>		

3.2.4 Diskussion

3.2.4.1 Identifizierung der Bakterien in Geflügelfleisch

In diesem Teil der Arbeit wurden die häufig vorkommenden Bakterien in Geflügelfleisch mit Hilfe einer 16S rRNA-Sequenzenanalyse identifiziert. Die ergebenden Bakterienspezies wurden mit den in der Literatur erwähnten Spezies verglichen. Die Fleischflora wurde ausgiebig in Bezug auf verderbsassoziiierende Bakterien (Tuncer und Sireli, 2008; Rindhe et al., 2008; Hinton et al., 2004; Mead, 2004a; Russel et al., 1996) und pathogene Keime erforscht (Sakaridis et al., 2012; Mead, 2004a). Allerdings basiert ein großer Teil dieser Studien auf traditionellen Methoden, die auf der Kultivierung von Bakterien beruhen. Diese Methoden sind zwar in den meisten Fällen zuverlässig und liefern aussagekräftige Ergebnisse, sind aber einerseits sehr zeit- und arbeitsaufwendig und andererseits brauchen sie zum Teil zahlreiche Zusatzsschritte, die zur Bestätigung der Ergebnisse notwendig sind. Die meisten durchgeführten Studien zur Identifizierung der Fleischflora, besonders der von Geflügelfleisch, basieren auf traditionellen Methoden und sind nicht mehr aktuell (Cox et al., 1998). In den letzten Jahren haben sich die Methoden zur Identifizierung von Bakterien von morphologisch-physiologischen hin zu den schnelleren und effektiveren molekularbiologischen Methoden entwickelt (Busch, 2010). Diese Tendenz ist derzeit besonders bei der 16S rRNA-Sequenzenanalyse zur molekularen phylogenetischen Analyse und taxonomischen Charakterisierung von bakteriellen Gruppen deutlich erkennbar (Janda und Abbott, 2007; Clarridge, 2004). Die hohe Reproduzierbarkeit, die optimierte und vereinfachte Sequenzierungstechnik (Stackebrandt und Goebel, 1994) und wachsenden Datenbanken (Stoesser et al., 1998) sind wichtige Vorteile dieser Methode. Die rasche Entwicklung und ständig steigende Verwendung dieses Verfahrens erklärt sich mit dem vorteilhaften phylogenetischen Charakter des 16S rRNA-Gens. Dieses Gen kommt in allen Bakterien als unerlässliche Komponente der Proteinbiosynthese vor und hat eine konservierte Molekülstruktur und -funktion (Patel, 2001). Laut Janda und Abbott (2007) deutet der Ähnlichkeitsgrad dieses Gens zwischen verschiedenen Bakterien auf ihre phylogenetische Verwandtschaft hin. Es gibt offensichtlich Signatursequenzen auf dem Gen, die für eine Art oder eine Familie charakteristisch sind. Somit stellen die 16S rRNA-Sequenzen eine geeignete Basis für eine kultivierungsunabhängige Identifizierung der Mikroorganismen dar (Nadkarni et al., 2002).

Die molekularbiologisch basierten Methoden wurden bis jetzt kaum zur Identifizierung der Geflügelfleischmikroorganismen verwendet. Die durchgeführten relevanten Studien fokussierten überwiegend auf die in Geflügelfleisch vorkommenden Krankheitserreger, die für die Gesundheit der Menschen von großer Bedeutung sind. Marshall et al. (1999) identifizierten mit Hilfe einer „PCR-Restriction Fragment Länge Polymorphism (PCR-RFLP)“-Analyse des 16S rRNA-Gens etwa 158 Isolate von *Campylobacter*, *Arcobacter* und

Helicobacter Spezies. Die Autoren berichteten, dass alle Organismen in der entsprechenden Studie erfolgreich bis zum Genusgrad mit Hilfe einer einfachen PCR-RFLP Analyse und unter Anwendung eines einzigen Restriktionsenzym identifiziert werden konnten. Die Anwendung der gleichen Methode hat Scheidegger et al. (2009) geholfen, 21 verschiedene *Enterococcus* Spezies in Geflügelfleischproben zu identifizieren. Dolan et al. (2009) identifizierten mit Hilfe einer 16S rRNA-Fragmentenanalyse eine Reihe von Bakterienspezies, die mit dem Verderb von Rindfleisch assoziiert sind. Takahashi et al. (2006) berichteten unter Anwendung der gleichen Methode, einen großen Teil der verderbsassoziierten Bakterien in verzehrfertigen Obst- und -Gemüseproben identifiziert zu haben. Über die Anwendung der 16S rRNA-Sequenzenanalyse zur Identifizierung der Verderbsflora in Geflügelfleischproben wurde bis jetzt noch nicht berichtet. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte 16S rRNA Sequenzenanalyse der DNA-Isolate aus den Geflügelfleischproben führte zur Identifizierung von 73 Bakterienspezies. Diese gehören überwiegend zur Familie *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter*. Russel et al. (1996) analysierten die Bakterien, die für den Verderb von frischem Geflügelfleisch verantwortlich sind und berichteten, dass sie in bereits verdorbenen Geflügelfleischproben *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens* und *P. fragi* als Ursache für den entstandenen Fehlgeruch identifizierten. Außerdem stellten diese Autoren *Acinetobacter lwoffii*, *A. calcoaceticus*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia liquefaciens* und *S. fonticola* als Verderbsverursacher in Geflügelfleisch dar. Die oben unterstrichenen Spezies wurden auch durch die 16S rRNA-Sequenzanalyse in dieser Arbeit identifiziert. Nach Tuncer und Sireli (2008) beeinflusst auch das Verpackungsmaterial die Zusammensetzung der Verderbsflora in Geflügelfleisch erheblich. Während in sauerstoffdurchlässigen Folien verpackte Schlachtkörper häufig *Pseudomonas* spp. (wie *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. fragi*) die primären Verderbsauslöser sind, scheinen bei mit sauerstoffundurchlässigen Folien verpackte Produkte *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* und *Aeromonas* spp. eine größere Rolle beim Verderb zu spielen. Die unterschiedlich verpackten Geflügelfleischproben (MAP- und Vakuumverpackungen) in diesem Teil der Arbeit stellten u. a. eine geeignete Grundlage für die Identifizierung artenreicher Spezies mittels 16S rRNA-Sequenzanalyse dar. Hinton et al. (2004) berichteten in ihrer Studie über den Einfluss der kommerziellen Bearbeitung und Tiefkühlagerung von Geflügelschlachtkörpern auf die psychrotrophe Verderbsflora verschiedener Stämme von *Acinetobacter*, *Aeromonas* und *Pseudomonas* spp.. Außerdem berichteten diese Autoren darüber, *Brochothrix thermosphacta* und *Shewanella putrefaciens* in kühlgelagerten Proben identifiziert zu haben. Die meisten Spezies wurden auch hier mittels 16S rRNA-Sequenzenanalyse identifiziert (z. B. *Acinetobacter* (A.) *baumannii*, *A. radioresistens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. putida*, *Aeromonas salmonicida* und *Shewanella putrefaciens*). Arnaut-Rollier et al. (1999) stellten in einer numerisch-

taxonomischen Studie fest, dass beim Verderb von Geflügelfleisch vor allem vier Hauptgruppen von *Pseudomonas* spp.: *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* und eine undefinierte Gruppe sehr ähnlich wie *Pseudomonas fluorescens* vorkommen. Mead (2004b) berichtet ebenfalls, dass für den Verderb des Geflügelfleisches die Pseudomonaden, je nach Verpackungsart begleitet von *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* spp. (aerobe Verpackung) *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, *Shewanella* spp. und psychotrophe Spezies von *Enterobacteriaceae* (MAP-Verpackungen) verantwortlich sind. Diese Stämme wurden größtenteils ebenfalls in der vorliegenden Arbeit detektiert (Tab. 24).

3.2.4.2 Qualität der 16S rRNA-Sequenzierung

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Identifizierung von Bakterien mittels PCR-Produktanalyse ist eine genaue 16S rRNA-Sequenzierung. Angesichts der Anzahl der involvierten Schritte bei der rDNA-Sequenzenabfrage ist zu beachten, dass dieser Prozess nicht als unproblematisch betrachtet werden kann. Vor allem ist die Effizienz der initialen Arbeitsschritte, wie die DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation, mit dem Erfolg der Identifizierung der Mikroorganismen mittels Sequenzanalyse unmittelbar verbunden. Darüber hinaus stellen die Effizienz und die Spezifität der PCR-Analyse eine wichtige Grundlage für zuverlässige Ergebnisse bei der Sequenzanalyse dar (Janda und Abbott, 2007). Bei der Nukleinsäurekonzentrationsmessung mittels UV-Spektrophotometrie wurden Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Konzentration und Qualitäten detektiert. Einige Isolate wiesen zwar keine ausreichende Qualität auf (z. B. die Proben-Nr. 31, 43 und 50, Tab.23), wurden aber dennoch aufgrund ihrer Kolonienmorphologie für die PCR-Amplifizierung und DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die suboptimale Nukleinsäurequalität und -konzentrationen übten vermutlich einen negativen Einfluss auf die Amplifizierungseffizienz aus. Die PCR-Amplifizierung dieser Nukleinsäureproben führte zum Erzielen von Ct-Werten zwischen 14,65 und 19,87, außer bei den Proben 29 und 31, die relativ niedrige DNA-Konzentrationen aufwiesen (Ct-Werte von 23,51 und 23,80). Die Kolonien, aus denen die Nukleinsäuren extrahiert wurden, waren sehr variabel hinsichtlich ihrer Farbe, Größe und Morphologie. Angesichts der unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der Isolate, wurden unterschiedliche Templatemengen in den Reaktionen eingesetzt, was vermutlich zur Variabilität der Ct-Werte in der PCR-Analyse führte. Außerdem sind die Zielsequenzen auf dem 16S rRNA-Gen, die durch die Primer detektiert werden sollten, sehr lang. Daher war zu erwarten, dass die Amplifizierungseffizienz dadurch beeinträchtigt wurden. Gemäß den Sequenzierungsergebnissen (Chromatogramme und FASTA-Sequenzen) betrug die Länge der 50 PCR-Produkte 14 bis 1030 bp bei der Forward-Sequenzierung und 24 bis 1015 bp bei der Reverse-Sequenzierung, während die Sequenzlänge der gesamten amplifizierten PCR-Produkte anhand der Literatur (Paster et al., 2002; Goldenberger et al., 1997) bei 1462 bp liegt. Die Sequenzierung eines großen Teils der PCR-Produkte (48 % der Proben bei der

Forward- und 78 % bei der Reverse-Sequenzierung) ergab mehr als 800 bp lange Sequenzen. Abbildung 19 stellt einen Vergleich der Forward- und Reverse-Sequenzierung dar. Es ist davon auszugehen, dass die unvollständige Sequenzierung der PCR-Produkte keinen großen negativen Einfluss auf die Identifizierung der Bakterienspezies mittels BLAST-Suche verursachte. Es wurde berichtet, dass in vielen Fällen eine partielle Analyse der 16S rRNA-Sequenzen fast gleiche Ergebnisse, wie die Analyse des gesamten Gens lieferte (Amann et al., 1995).

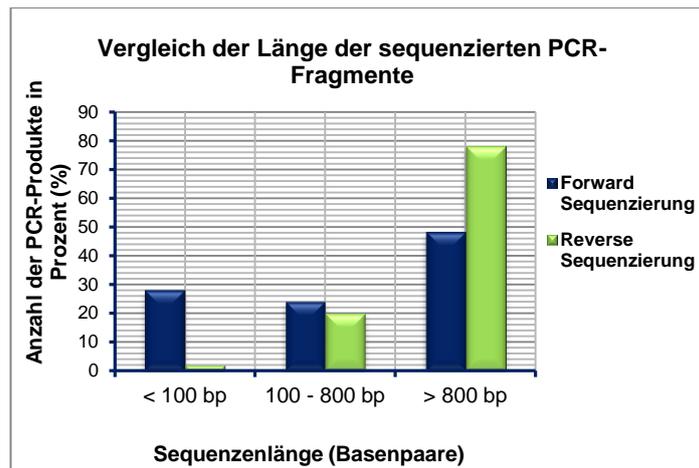


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse.

3.2.4.3 BLAST-Analyse

Die BLAST-Analyse wurde spezifisch zur Nukleotid- und Protein-Datenbankensuche entwickelt und gibt mit Hilfe der Statistik das Ergebnis aus, geordnet in abnehmender Signifikanzreihenfolge, welches in Form von Grafiken, Tabellen und Alignments dargestellt wird. Beginnend mit lokaler Ähnlichkeit versucht BLAST die Ähnlichkeit in beide Richtungen zu erweitern. Unter Anwendung von unmittelbar vor- und nachgelagerten Sequenzen eines 11 bp langen angefragten Sequenzabschnittes verfolgt BLAST die Folge der Alignmententwicklung zwischen der Anfrage und den Sequenzen in der Datenbank. Anschließend werden alle Alignments zwischen der Anfrage und den Datenbanksequenzen (high-scoring subjectpairs: HSPs), basierend auf der Länge und Signifikanz, eingeordnet (Agostino, 2012). Bei der BLAST-Analyse der erhaltenen 16S rRNA-Sequenzen wurden für jedes PCR-Produkt die Sequenzen von Forward- und Reverse-Sequenzierung eingegeben und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Anfragen mit Sequenzlängen unter 30 wurden von der Suche ausgeschlossen. Bei der Mehrzahl der Produkte, bei denen die Forward oder Reverse-Sequenzierung eine zu geringe Sequenzlänge ergeben hat, wies jedoch die jeweils andersseitige Sequenzierung eine ausreichende Sequenzlänge für die BLAST-Analyse auf. Bei der BLAST-Suche der Sequenzen, bezugnehmend auf die Spezies

Shigella flexneri, *Escherichia fergusonii* und *Shigella dysenteriae*, erhielten alle drei Stämme stets identische Gleichheitspunkte. Es handelte sich dabei vermutlich um große 16S rRNA Sequenzenähnlichkeiten dieser drei Spezies. Bei der Identifizierung der Bakterienstämme mit Hilfe der 16S rRNA-Sequenzierung spielt die Vollständigkeit der Referenzdatenbanken eine wichtige Rolle. Die GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ist eine umfassende Datenbank, die öffentlich verfügbare Nukleotidsequenzen, gehörend zu über 300.000 offiziell beschriebenen Spezies, besitzt (Benson et al., 2014). Die Referenzfunktion der Online-Datenbanken, wie die der GenBank® ist dadurch eingeschränkt, dass ihre Genauigkeit sehr von der Intensität der Charakterisierung der Bakterienstämme abhängig ist (Amann et al., 1995; Jurtshuk et al., 1992; DeLong et al., 1989). Die Datenbank-Sequenzen entstammen aus unterschiedlichen Regionen der rDNA und weisen keine einheitlichen Qualitätsstandards auf (Amann et al., 1995). Das macht die Vergleichbarkeit der Sequenzen kompliziert. Dazu kommen noch die Spezies, deren Herkunft nicht ausreichend dokumentiert wurde. Diese sind auch aufgrund ihrer ungültigen Nomenklatur als Referenz ungeeignet.

3.2.5 Schlussfolgerung

In diesem Teil der Arbeit wurde angestrebt, die wichtigste Keimflora, die mit dem Verderb von Geflügelfleisch assoziiert ist, mittels einer DNA-basierten Methode zu identifizieren und die Ergebnisse mit der Literatur zu vergleichen. Hierbei wurde bezweckt, eine Grundlage für das Generieren eines Primerpaares, welches hauptsächlich diese Keime detektiert, zu erstellen. Da über die Identifizierung des Keimspektrums in Geflügelfleisch mittels 16S rRNA-Sequenzierung bis jetzt nicht berichtet wurde und angesichts des relativ geringen Arbeits- und Zeitsaufwandes dieser Methode, wurde dieses Verfahren zur Identifizierung der Keimflora in Geflügelfleisch verwendet. Jedoch war das Ziel nicht, jeden einzelnen Mikroorganismus in Geflügelfleisch zu detektieren oder unbekannte Stämme zu identifizieren, sondern eine repräsentative Referenzliste von verderbsassoziierten Bakterien zu ermitteln, anhand derer die Spezifität und die Detektionsspanne der entwickelten Primer überprüft werden konnte. Durch diese Methode wurden Bakterien identifiziert, die auf Selektivnährmedien kultivierbar und für Fleisch typisch sind, da die Nukleinsäureproben aus den auf Agarplatten gewachsenen Kolonien isoliert wurden und nicht direkt aus den Fleischproben kamen. Die identifizierten Bakterienspezies stellten ein repräsentatives Bakterienspektrum für Geflügelfleisch dar. Diese Bakterien wurden im anschließenden Abschnitt der Arbeit als Vorlage für das Generieren der Primer zur Bestimmung der Keimzahl in Geflügelfleisch mittels PCR verwendet.

3.3 Generieren der Primer

3.3.1 Ziel und Aufbau der Versuche

Das Ziel dieses Teils der Arbeit bestand darin, Primer zu generieren, die einen Großteil der Geflügelfleischflora erfassen. Hierzu sollte ein Gen als Amplifikationsziel ausgewählt werden, das sich für die Quantifizierung der Gesamtbakterien in Geflügelfleisch eignet. Dabei war wichtig, dass dieses Gen die Nachteile des *16S rRNA*-Gens für die Anwendung bei Quantifizierungen, wie z. B. die Variabilität der Kopienzahl, nicht aufweist (Sunagawa et al., 2013). In Betracht gezogen wurden die Gene, die in der Literatur als phylogenetische Marker bezeichnet werden. Diese wurden nach verschiedenen phylogenetischen Eigenschaften, wie:

- dem ubiquitären Vorkommen im Genom der Mehrheit der Bakterien,
- der Kopienzahl im Genom
- dem Grad des Vorhandenseins konservierter Regionen
- der Funktion im Genom der Bakterien

miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde auch die Verfügbarkeit der Sequenzen dieser Gene in öffentlichen Datenbanken, wie z. B. in der GenBank[®], überprüft. Angesichts der oben genannten Kriterien wurde das *rpoB*-Gen als Amplifikationsziel ausgewählt. Nach der Auswahl des Zielgens erfolgte die Erfassung der Sequenzen dieses Gens für Bakterien, die in Abschnitt 3.2 in Geflügelfleisch mittels 16S rRNA-Sequenzanalyse identifiziert wurden (Tab. 24) aus den Datenbanken. Die erfassten Sequenzen wurden in ClustalX (<http://www.clustal.org>) eingegeben und nach Sequenzenübereinstimmungen gesucht. Die ermittelten Konsensusregionen eigneten sich als Amplifikationsziel und konnten zum Generieren der Primer verwendet werden. Auf dieser Basis ließen sich verschiedene Primer generieren, die diese Regionen erfassten.

Die neu entworfenen Primer wurden in der PCR-Analyse eingesetzt. Die PCR-Bedingungen wurden für die verwendeten Primer optimiert. Eine Schmelzkurvenanalyse wurde am Ende der Amplifikation an die PCR angeschlossen, um die Amplifikationsspezifität der PCR-Analyse zu überprüfen. Als Template wurden die Nukleinsäuren, die aus verschiedenen Geflügelfleischproben (Tab. 29) isoliert wurden, verwendet. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der Gesamtkeimzahl dieser Proben mittels des Kulturverfahrens. Verglichen wurden die PCR-Ergebnisse für jedes verwendete Primerpaar mit der Gesamtkeimzahl, resultierend aus dem klassischen Kulturverfahren mittels Korrelationsanalyse. Die Primer, bei deren Verwendung die besten Determinationskoeffizienten erzielt wurden, wurden für weitere PCR-Versuche ausgewählt.

3.3.2 Methode

3.3.2.1 Auswahl des Zielgens für die Quantifizierung der Bakterien

Zur Quantifizierung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR sollte ein Gen als Amplifizierungsziel ausgewählt werden, das vor allem die Eigenschaften eines universell konservierten Gens aufweist. Das bedeutet, dass dieses im Genom der meisten Bakterienspezies vorkommt und selten vom „horizontalen Gentransfer“ (HGT: Übertragung von Genen bzw. Erbmaterial, die nicht entlang der Abstammungslinie erfolgt) (Harris et al., 2003) betroffen ist. Außerdem war die Präsenz als Einzelkopie im Genom der Bakterien ein ausschlaggebender Faktor, da somit bei der PCR-Quantifizierung eine Kopie des Gens als eine KbE auf den Kulturplatten betrachtet werden kann. Eine Korrelation ist problematisch, wenn in verschiedenen Genomen variable Anzahlen eines Gens existieren und besonders dann, wenn die Kopiezahlen unklar sind. Berücksichtigt wurde auch der bisherige Einsatz des Gens zur Identifikation von Mikroorganismen mittels PCR, insbesondere bei der Lebensmittelanalyse. Tabelle 25 fasst die Gene, die in die Auswahl einbezogen wurden, zusammen.

Diese Gene wurden anhand der oben genannten Kriterien miteinander verglichen (Tab. 25). Darauf basierend, wurde das *rpoB*-Gen als Amplifikationsziel zur Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl mittels PCR ausgewählt. Dies ist ein universelles Gen, welches für die β -Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase kodiert und sowohl variable, als auch konservierte Regionen enthält (Adékambi et al., 2008b; Qi et al., 2001; Lisitsyn et al., 1988). Die DNA-abhängige Synthese aller RNA-Typen in Bakterien wird durch RNA-Polymerase katalysiert, ein oligomeres Enzym mit der Untereinheitenstruktur $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Die Studien, die zur Struktur und zum Mechanismus der RNA-Polymeraseaktivität durchgeführt wurden (Ovchinnikov et al., 1977, 1981 und 1982; Burton et al., 1981) ergaben, dass die β -Untereinheit der RNA-Polymerase eine wichtige Rolle bei allen Stufen der RNA-Synthese spielt (Lisitsyn et al., 1988). Über das Vorhandensein mehrerer Kopien des *rpoB*-Gens wurde bis dato nicht berichtet (Santos und Ochman, 2004; Dahllöf et al., 2000). Vos et al. (2012) fassen die phylogenetischen Vorteile des *rpoB*-Gens wie folgt zusammen: (i) Vorhandensein als Einzelkopiegen, (ii) Möglichkeit der genaueren taxonomischen Einordnung im Vergleich zum *16S rRNA*-Gen, (iii) genetische Variation des *rpoB*-Gens im Vergleich zu *16S rRNA*-Gen, (iv) ein proteinkodierendes Gen.

Tabelle 25: Gene als potentielle Amplifizierungsziele ausgewählt

Gen	<i>tuf</i>	<i>rplB</i>	<i>recA</i>	<i>pyrG</i>	<i>leuS</i>	<i>lepA</i>	<i>gyrB</i>	<i>fusA</i>	<i>rpoA</i>	<i>rpoB</i>
vollständige Bezeichnung (engl. Bezeichnung)	Elongation factor Tu	Ribosomal protein (large)	Recombination	Pyrimidine	Leucyl-tRNA synthetase	Leader peptidase	DNA gyrase, subunit B	Fusidic acid	RNA polymerase alpha subunit	RNA polymerase, beta subunit
Funktion in bakteriellen Zellen	<i>tuf</i> liefert Aminoacyl tRNA (aa-tRNA) an die A-Seite des Ribosoms während der Biosynthese	Bestandteil der 50S ribosomalen Untereinheit (Protein-kodierend)	Reparatur und Aufrechthaltung der DNA, homologe Rekombination, Austausch von DNA-Srang, DNA Reparatur und Koproteaseaktivität als Antwort auf DNA Beschädigung, SOS	kodiert für CTP Synthetase, Pyrimidin-Biosynthese	Leucin-tRNA Ligase, Leucyl-tRNA Synthetase	GTP-Bindung Membran-Protein, Elongation Faktor 4	Bestandteil der DNA Gyrase	Elongationsfaktor G, erforderlich für die Translokation von der A-Seite zur P-Seite im Ribosom; Fusidinsäure-resistenz	RNA Polymerase, Alpha-untereinheit	Bestandteil der RNA Polymerase, Kernenzym
Konservativität	konservierte Regionen vorhanden	unbekannt	konservierte Regionen vorhanden	konservierte Regionen vorhanden in grampositiven Bakterien	konservierte Regionen vorhanden im D-Loop	hoch konservierte Regionen vorhanden in Eubakterien	konservierte Regionen vorhanden	unbekannt	unbekannt	konservierte Regionen vorhanden
Genkopienzahl im bakteriellen Genom	variabel	1	1	1	1	unbekannt	1	1	unbekannt	1

3.3.2.2 Generieren der Primer

Die Erfassung der *rpoB*-Gensequenzen erfolgte durch eine BLAST-Suche in der GenBank®. Zusätzlich wurden auch *rpoB*-Sequenzen von diversen pathogenen Bakterien, die mit Geflügelfleisch assoziiert sind (z. B. Listerien, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* und *Clostridium perfringens*) sowie die *rpoB*-Sequenzen von weiteren Bakterienspezies, die typischerweise eine Rolle beim Verderb von Geflügelfleisch spielen (und in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurden) mit erfasst. Diese Sequenzen wurden in ClustalX miteinander verglichen. Es wurde nach Konsensusregionen gesucht. Wie zu erwarten, waren im Alignment kaum konservierte Regionen zu finden, die tatsächlich unter den Sequenzen der gesamten einbezogenen Bakterienspezies identisch waren. Trotzdem wurde versucht, anhand der vorhandenen Konsensusregionen Primer zu generieren, die möglichst viele Spezies erfassen können. Diese wiesen meistens eine geringe Detektionsspanne bei der BLAST-Analyse auf. Deshalb wurden komplette *rpoB*-Gensequenzen verschiedener Bakterien (Tab. 24) als Vorlage verwendet und mit Hilfe des Primer-BLAST-Programms von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) Primer mit definierten Eigenschaften generiert. Dann wurde diese in BLAST hinsichtlich des Umfangs der detektierten Spezies überprüft. Dieses Verfahren wurde für das *rpoB*-Gen verschiedener Spezies wiederholt und verglichen. Die Primer, die durch die BLAST-Analyse der *Shigella dysenteriae* (Sd 197) generiert wurden, setzten sich durch eine höhere Detektionsspanne gegen andere Primer durch und wurden für die PCR-Analyse ausgewählt. Für das Generieren der Primer wurden folgende Faktoren als wichtige Kriterien berücksichtigt:

- Primer-Länge: zwischen 15 bis 22 bp
- GC-Gehalt: 50-60 %
- Schmelztemperatur: 50-65 °C
- Möglichst keine Bildung sekundärer Strukturen wie „Haarnadel“-Strukturen (Hairpin)
- Möglichst keine G- oder C-Wiederholungen über mehr als 3 Basen
- Möglichst keine komplementären Sequenzen am 3' Ende (Gefahr der Bildung von Primerdimeren)
- PCR-Produkt: 100-200 bp

Optimal für die Quantifizierung mittels Real-Time PCR sind meistens kürzere Produkte, die typischerweise mit höherer Effizienz amplifiziert werden. Allerdings sollte ein PCR-Produkt mindestens 75 bp lang sein, damit es von Primerdimeren, die potentiell gebildet werden können, sicher unterschieden werden kann (Bio-Rad.com, Primer design for a PCR Assay). Angesichts der oben beschriebenen Voraussetzungen wurden verschiedene Primer, basierend auf Konsensussequenzen des Alignments entworfen. Diese wurden nach GC-Gehalt, T_m, Möglichkeit zur Bildung von Primerdimeren und Hairpin-Strukturen mit Hilfe der

Primer 3 Primer-Design Software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm>) geprüft. Die Primer, bei denen die oben genannten Kriterien im akzeptablen Bereich lagen, wurden für die PCR-Analyse ausgewählt (Tab. 27). Die Firma Eurofins MWG Operons [Ebersberg, D] wurde mit der Synthese beauftragt.

Beim Primer-Design unterscheidet man zwischen exakten Primern und degenerierten Primern. Eine Nukleotidsequenz wird als degeneriert bezeichnet, wenn mindestens eine ihrer Stellen durch eines von mehreren möglichen Nukleotiden besetzt werden kann. Degenerierte Primer werden meistens dann eingesetzt, wenn die zu amplifizierenden DNA-Regionen nicht bekannt sind und ihre Sequenzen nur aus einem multiplen Alignment bekannter homologer Sequenzen abgeleitet werden können (Hansen, 2004). So ist beispielsweise „AYGCNY“ eine Sequenz, laut „IUPAC ambiguity codes“ (IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry) (Tab. 26), bei der Y für C oder T und N für A, C, G oder T steht. Das bedeutet, dass beispielsweise bei der Verwendung des Wobbles „Y“ 50 % mit C und 50 % mit T synthetisiert werden.

Tabelle 26: Barcode anhand der IUPAC ambiguity codes

Code	M	R	W	S	Y	K	V	H	D	B	N
Beschreibung	AC	AG	AT	CG	CT	GT	ACG	ACT	AGT	CGT	ACGT

Der Degenerationsgrad (degeneracy) einer Sequenz wird als Anzahl der verschiedenen Sequenzen, die sie repräsentiert, bezeichnet. So ist der Degenerationsgrad von AYGCNY 16, sie beinhaltet zwei Y und ein N. Da in der vorliegenden Arbeit viele verschiedene Bakterienspezies mittels eines einzigen Primerpaares detektiert werden sollten (damit die Ergebnisse die Gesamtkeimzahl widerspiegeln) wurden auch degenerierte Primer entworfen (rpoB 1C und rpoB 2C). Dazu wurden im Alignment in den ausgewählten Konsensusregionen die abweichenden Nukleotide mit dem entsprechenden Degenerationscode ersetzt (Tab. 28). Diese Primer sollten dazu dienen, dass eine breitere Detektionsspanne erreicht wird. Der Primer rpoB 1C beinhaltet fünf degenerierte (drei Forward und zwei Reverse) Nukleotide und rpoB 2C ein degeneriertes Nukleotid.

Tabelle 27: Primer mittels BLAST Software der NCBI entworfen

Nr.	Richtung	sequenzen	Länge	Start	Stop	Tm	GC %	Primer-Dimere	Produktlänge
1	Forward	GAGTTCTTCGGTTCCAGCCA	20	1525	1544	59,97	55,00	2,00	178 bp
1	Reverse	TTTCAATCGGGCAGACACGA	20	1702	1683	59,97	50,00	3,00	
2	Forward	CATCGTCGCGGTACTIONGAAGA	20	1287	1306	59,90	55,00	4,00	258 bp
2	Reverse	TGGCTGGAACCGAAGAACTC	20	1544	1525	59,97	55,00	2,00	
3	Forward	GGGTGCGAATATGCAACGTC	20	2043	2177	59,97	55,00	4,00	135 bp
3	Reverse	TACTGAACGACACCACCACG	20	2177	2158	59,97	55,00	2,00	
4	Forward	CTGCGCGAAGAAATCGAAGG	20	1228	1247	59,97	55,00	6,00	148 bp
4	Reverse	TTTCGCCAACGGAACGGATA	20	1375	1356	60,04	50,00	4,00	
5	Forward	CTCTGCTGCGCGAAGAAATC	20	1223	1242	59,97	55,00	6,00	218 bp
5	Reverse	AGACAGACGCTCTTTCACCG	20	1440	1421	60,04	55,00	6,00	
6	Forward	TGGTGTCTGTTTACGTACGTGG	20	2163	2182	59,97	55,00	5,00	150 bp
6	Reverse	ACACACGGCATCTGGTTGAT	20	2312	2293	59,96	50,00	3,00	
7	Forward	CCTGGTAACCTGCCGTAGCA	20	1896	1915	60,04	55,00	5,00	284 bp
7	Reverse	CGTACTGAACGACACCACCA	20	2179	2160	59,97	55,00	5,00	
8	Forward	CTAGAGGCCGCTTCCCGTAG	20	256	275	59,97	60,00	6,00	242 bp
8	Reverse	AGCGGAATTTCCGCCATGTA	20	497	478	60,11	50,00	8,00	
9	Forward	GAACAGCTGGCTGAGCAGTA	20	3034	3053	60,04	55,00	6,00	189 bp
9	Reverse	ACCCTTGTTACCGTGACGAC	20	3222	3203	59,97	55,00	5,00	
10	Forward	GGAAGATCGCTTACCACCA	20	2472	2491	60,04	55,00	4,00	194 bp
10	Reverse	GCGTACCTTACCAACCAGA	20	2665	2646	59,97	55,00	3,00	
11	Forward	CGAAGTCCGAGACGTACACC	20	210	229	60,18	60,00	4,00	162 bp
11	Reverse	CAACGCCTTCCCTCACAACG	20	371	352	60,04	55,00	4,00	
12	Forward	GAAGTCCGAGACGTACACCC	20	211	230	59,83	60,00	4,00	133 bp
12	Reverse	GCTTCCAGGAAGCCGTACTION	20	343	324	60,04	55,00	7,00	
13	Forward	CCTGGAAACCCCTTACCGTC	20	1758	1777	60,04	60,00	3,00	118 bp
13	Reverse	TTCGTCCAGGTTGGAGTTCCG	20	1875	1856	59,97	55,00	5,00	
14	Forward	TTGACTCCGGTGTACTGCC	20	2129	2148	59,97	55,00	6,00	196 bp
14	Reverse	TCACCCAGATTACACACCGG	20	2324	2305	59,97	55,00	3,00	
15	Forward	TATCCGTTCCGTTGGCGAAA	20	1356	1375	60,04	50,00	4,00	174 bp
15	Reverse	TGGCTGGAACCGAAGAACTC	20	1529	1510	59,97	55,00	2,00	
16	Forward	GAACAGCTGGCTGAGCAGTA	20	3034	3053	60,04	55,00	6,00	189 bp
16	Reverse	ACCCTTGTTACCGTGACGAC	20	3222	3203	59,97	55,00	5,00	
17	Forward	CTGCGCGAAGAAATCGAAGG	20	1228	1247	59,97	55,00	6,00	148 bp
17	Reverse	TTTCGCCAACGGAACGGATA	20	1375	1356	60,04	50,00	4,00	
18	Forward	GAACAGCTGGCTGAGCAGTA	20	3034	3053	60,04	55,00	6,00	189 bp
18	Reverse	ACCCTTGTTACCGTGACGAC	20	3222	3203	59,97	55,00	5,00	
19	Forward	ATCGTTTTCTGTCCGCCAT	20	391	410	60,04	50,00	3,00	185 bp
19	Reverse	GCAACCGAAACAACCTGCTT	20	575	556	59,90	50,00	3,00	

Tabelle 28: Ausgewählte Primerpaare (wiesen laut BLAST-Analyse eine breitere Detektionsspanne auf)

Primer	Sequenzen	Länge	Start	Stop	Tm °C	GC %	Produkt-länge	Tm °C
rpoB 1	F1 5'GAGTTCTTCGGTTCAGCCA3'	20	1525	1544	59,4	55	178 bp	52,3
	R1 5'TTCAATCGGGCAGACACGA3'	20	1702	1683	57,3	50		
rpoB 12	F12 5'GAAGTCCGAGACGTACACCC3'	20	211	230	61,4	60	133 bp	54,4
	R12 5'GCTTCCAGGAAGCCGTA3'	20	343	324	59,4	55		
rpoB 15	F15 5'TATCCGTTCCGTTGGCGAAA3'	20	1356	1375	57,3	50	174 bp	52,3
	R15 5'TGGCTGGAACCGAAGAAGCTC3'	20	1529	1510	59,4	55		
rpoB 6	F6 5'TGGTGTCTTCAGTACGTGG3'	20	2163	2182	57,3	55	150 bp	52,3
	R6 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'	20	2312	2293	59,4	50		
rpoB 1C	F1C 5'ATGGCNGGWCGTCACGGTAAC3'	21	3414	3435	62,8	59,5	610 bp	55,9
	R1C 5'CTGACCACCGAAYTGHGCYT3'	22	4037	4015	60,9	51,5		
rpoB 2C	F2C 5'AGCGTAACGTAGNCTCGTG3'	19	16291	16309	57,7	55,3	170 bp	52,7
	R2C 5'GGTCAGTTGTAGATATCGACAC3'	23	16482	16459	60,6	47,8		

3.3.2.3 Durchführung der PCR-Analysen mit Hilfe von generierten Primern

Vorbereitung der Geflügelfleischproben für die Plattenkultivierung und DNA-Isolierung

Die frischen Fleischproben, entnommen aus den Selbstbedienungsregalen, wurden bei verschiedenen Einzelhandelsmärkten in Hannover im Zeitraum vom 09. bis 15.11.2012 gekauft. Diese Proben waren unter modifizierter Atmosphäre verpackt und wurden sofort nach dem Transport bei +7 °C ($\pm 0,5$ °C) in Kühlschränken gelagert. Die Lagerung, Aufteilung und Homogenisierung der Fleischproben sowie die Abtrennung der PCR-Inhibitoren erfolgte wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Tabelle 29 stellt die Probenarten, deren Lagerbedingungen und deren mittels Plattenkultivierung ermittelte Keimbelastungen dar.

Tabelle 29: Geflügelfleischproben, Lagerbedingungen und Keimbelastungen (deren bakterielle DNA wurde in die PCR-Analyse eingesetzt)

Nr.	Probenart	Lagertemperatur	GKZ KbE/g	log ₁₀ KbE/g
2	Hähnchenbrustinnenfilet	4 °C (18-24 h)	1,55 · 10 ⁴	4,19
5	Hähnchen-Geschnetzeltes	4 °C (18-24 h)	3,09 · 10 ⁵	5,48
1	Putenbrustinnenfilet	20 °C (18-24 h)	1,06 · 10 ⁶	6,02
8	Maishähnchenbrust	20 °C (18-24 h)	3,57 · 10 ⁶	6,55
10	Perlhuhnkeule	4 °C (18-24 h)	3,59 · 10 ⁶	6,55
4	Hähnchen-Minutenschnitzel	20 °C (18-24 h)	1,97 · 10 ⁷	7,29
7	Barbarie-Enten-Klein	4 °C (18-24 h)	2,53 · 10 ⁷	7,40
3	Puten-Ministacks	30 °C (18-24 h)	5,04 · 10 ⁷	7,70
9	Enteninnenfilet	30 °C (18-24 h)	8,90 · 10 ⁷	7,94
6	Bio-Putengulasch	30 °C (18-24 h)	4,30 · 10 ⁸	8,63

Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleischproben

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben erfolgte anhand der DIN 10161:1984-02, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Die PC-Platten wurden für 72 h bei 30 °C bebrütet. Die Gesamtbakterienzahl wurde anhand der entsprechenden Formel (Nr. 3) berechnet und als \log_{10} KbE/g Fleischgewebe wiedergegeben (Tab. 29).

DNA-Extraktion

Aliquote aus der erhaltenen Zellsuspension (200 μ l) (Abschn. 3.1.2.) wurden im DNA-Extraktionsverfahren eingesetzt. Der Isolierungsprozess wurde mit Hilfe des bereits beschriebenen DNA-Extraktionskits durchgeführt (Abschn. 3.2.1).

Real-Time PCR-Analyse

Die Bestimmung der Eignung der generierten Primer und die anschließende Auswahl des geeignetsten Paares für weitere Analysen erfolgte, indem die Primer in mehreren PCR-Analysen eingesetzt wurden. Die extrahierten Nukleinsäuren aus den Geflügelfleischproben wurden als Templates für die Amplifikationen verwendet. Die Annealing-Temperatur, die Primer-Konzentration und die Zyklenanzahl wurden als variable Elemente zur Optimierung der PCR-Analyse eingestellt (Tab. 31 Run 1 und Tab 32 Run 2 bis 14). Es wurden insgesamt 14 PCR-Läufe durchgeführt. Für jede PCR-Analyse wurden 2 μ l DNA-Template verwendet. Jeder PCR-Lauf bestand aus 10 PCR-Reaktionen im Doppelansatz. Jedes Probenet beinhaltet eine negative Kontrolle in der hochreines Wasser die DNA-Probe substituierte (Tab 30).

Tabelle 30: Komponenten und Konzentrationen der PCR-Mischung

Substanz	Konzentration	Menge	Endkonzentration
H ₂ O		9,9 μ l	
iQ SYBR [®] Green Supermix: SYBR [®] Green I Farbstoff	2X	12,5 μ l	1X
iTaq [™] DNA-Polymerase	50 U/ml		
je dATP, dCTP, dGTP und dTTP	0.4 mM		
MgCl ₂	6 mM		
Tris-HCl pH \approx 8	40 mM		
KCl	100 mM		
Fluorescein und Stabilisatoren	20 nM		
Primer Forward		0,3 μl	0,6 mM
Primer Reverse		0,3 μl	0,6 mM
Summe		23 μ l	
Template		2 μ l	
Gesamtvolumen		25 μ l	

Im Anschluss an die Amplifikation wurde für jeden PCR-Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Amplifikation durch die eingesetzten Primer zu bestimmen. Die geeignete Annealing-Temperatur für jedes Primerpaar wurde grob anhand der Formel (Nr. 4) und in Anbetracht der Schmelztemperaturen (T_m) der Oligonukleotide für jedes Primerpaar eingesetzt (Tab. 32). Die Ct-Werte, resultierend aus jeder PCR-Analyse, wurden in verschiedenen Korrelationen mit der Gesamtkeimzahl (\log_{10} KbE/g) der Geflügelfleischproben verglichen und die Determinationskoeffizienten der Korrelationen ermittelt. Die Primer, deren PCR-Analysen die besseren Determinationskoeffizienten im Vergleich zur klassisch ermittelten Gesamtkeimzahl aufgewiesen haben, wurden für weitere Analysen und Modifizierungen ausgewählt. Außerdem wurden die erstellten Schmelzkurven für jeden PCR-Lauf analysiert und die Amplifikationspezifität der Primer überprüft. In Anbetracht der ermittelten Determinationskoeffizienten und der Spezifität der Schmelzkurven wurden drei Primer für weitere PCR-Analysen ausgewählt.

Tabelle 31: PCR-Protokoll für die Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares rpoB 1

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Amplifikation (40X)		
Denaturierung	95 °C	25 s
Primer-Annealing	62 °C	40 s
Elongation	72 °C	30 s
Annealing-Extension	72 °C	5 min
Schmelzkurvenanalyse	55 °C bis 90 °C	Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten
Kühlen	10 °C	∞

Tabelle 32: Modifizierungen der PCR-Bedingungen und PCR-Mischungsverhältnisse zur Optimierung der Amplifikation sowie Überprüfung der Primer-Eignung für den PCR-Einsatz (Run 2 bis 14)

PCR Run	Primer-Name	Primerset	Variable PCR-Mischungs-komponente	adjustierte Angabe	Variable PCR-Bedingung	adjustierte Annealing-Temperatur
2	rpoB 1	F1: 5'GAGTTCTTCGGTTCAGCCA3' R1: 5'TTTCAATCGGGCAGACACGA3'			Annealing-Temperatur	54 °C
3	rpoB 12	F12: 5'GAAGTCCGAGACGTACACCC3' R12: 5'GCTTCCAGGAAGCCGTA3'			Annealing-Temperatur	60 °C
4	rpoB 15	F15: 5'TATCCGTTCCGTTGGCGAAA3', R15: 5'TGGCTGGAACCGAAGAACTC3'			Annealing-Temperatur	54 °C
5	rpoB 15	F15: 5'TATCCGTTCCGTTGGCGAAA3' R15: 5'TGGCTGGAACCGAAGAACTC3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	54 °C
6	rpoB 6	F6: 5'TGGTGTTCGTTTCAGTACGTGG3' R6: 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	54 °C
7	rpoB 1C	F1C: 5'ATGGCNGGWCGTACGGTAAC3' R1C: 5'CTGACCACCGAAYTGHGCTTA3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	56 °C
8	rpoB 2C	F2C: 5'AGCGTAACGTAGNCTCGTG3' R2C: 5'GGTCAGGTTGTAGATATCGACAC3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	53 °C
9	rpoB 1C	F1C: 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3' R1C: 5'CTGACCACCGAAYTGHGCTTA3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	60 °C
10	rpoB 2C	F2C: 5'AGCGTAACGTAGNCTCGTG3' R2C: 5'GGTCAGGTTGTAGATATCGACAC3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	57 °C
11	rpoB 6	F6: 5'TGGTGTTCGTTTCAGTACGTGG3' R6: 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	57 °C
12	rpoB 12	F12: 5'GAAGTCCGAGACGTACACCC3' R12: 5'GCTTCCAGGAAGCCGTA3'	Primer Konzentration	1 mM; 0,5 µl	Annealing-Temperatur	57 °C
13	rpoB 6	F6: 5'TGGTGTTCGTTTCAGTACGTGG3' R6: 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'	Primer Konzentration	0,2 mM; 0,1 µl	Annealing-Temperatur	57 °C
14	rpoB 6	F6: 5'TGGTGTTCGTTTCAGTACGTGG3' R6: 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'	Primer Konzentration	0,2 mM; 0,1 µl	Annealing-Temperatur	54 °C

3.3.3 Ergebnisse

3.3.3.1 Auswahl des Zielgens und *rpoB*-Gensequenzen

Zur Auswahl des Zielgens für die Amplifikation wurden verschiedene in der Literatur erwähnte Gene anhand bestimmter Kriterien miteinander verglichen (Abschn. 3.3.1). Bezugnehmend auf diese Informationen schien *rpoB* ein geeignetes Zielgen für das Generieren der Primer zur Quantifizierung der Mikroorganismen im Vergleich zu anderen bereits erwähnten Genen (Tab. 25) zu sein. Unter den bekannten Einzelkopiegenen *rpIB*, *recA*, *pyrG*, *gyrB*, *fusA* und *rpoB* verfügten nur *recA* (Karin und Brocchieri, 1996), *gyrB* (Soren und Christiansen, 1994) und *rpoB* (Adékambi et al., 2008b) über konservierte Regionen. Das Gen *leuS* besitzt Konsensussequenzen nur im „D-Loop“ (Vander Horn und Zahler, 1992) und beim *pyrG*-Gen sind die konservierten Regionen nur in grampositiven Bakterien vorhanden (Meng und Switzer, 2001). Die drei Gene, *recA*, *gyrB* und *rpoB* wurden dann in Datenbanken auf das Vorhandensein der Sequenzen von nachgewiesenen Bakterien in Geflügelfleisch überprüft. Bezugnehmend auf diese Bakterien wurden für *recA* und *gyrB* wesentlich weniger Sequenzen in Datenbanken gefunden als für *rpoB*. Aus diesen Gründen wurde sich für das *rpoB*-Gen als Amplifikationsziel zum Generieren der Primer entschieden. Die Studie von Takahashi et al. (2009) unterstützte das Argument zur Auswahl des Gens. Diese Autoren haben das *rpoB*-Gen als Amplifikationsziel zur Quantifizierung der Bakterien in verzehrfertigen Obst- und Gemüseprodukten mittels PCR verwendet und dabei vergleichbare Ergebnisse mit denen aus der Kulturmethode erzielt. Aus den 73 Bakterienspezies, die in Abschnitt 3.2 mittels 16S rRNA-Sequenzenanalyse identifiziert wurden, wurden *rpoB*-Sequenzen von 53 Spezies und Subspezies (103 Stämme) in der öffentlichen online Datenbanken gefunden. Davon standen die kompletten *rpoB* Sequenzen des Genoms von 16 Spezies zur Verfügung. Für die restlichen Spezies standen nur Informationen über eine Sequenz von maximal 1000 bp zur Verfügung, davon für acht Spezies maximal 500 bp. Hinzugefügt wurden zudem die *rpoB*-Sequenzen der Bakterien, die oft in Bezug auf Pathogenität bzw. Verderb mit Geflügelfleisch in Verbindung gebracht werden: *Campylobacter jejuni* (Altekruse et al., 1999), *Clostridium perfringens* (Van Immerseel et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (Akbar und Anal, 2013; Waters et al., 2011), *Yersinia enterocolitica* (Mumtaz et al., 2013), *Acinetobacter johnsonii* (Narasimha et al., 1998; Shaw und Latty, 1988), *Aeromonas hydrophila* (Palumbo et al., 1989), *Pseudomonas fluorescens* (Mead, 2004a; Arnaut-Rollier et al., 1999), *Pseudomonas psychrophila* (García-López et al., 1998) und *Pediococcus pentosaceus* (Holzapfel, 1998). Insgesamt wurden *rpoB*-Sequenzen von 67 Bakterienspezies (108 Stämme) als FASTA-Formate in ein Alignment einbezogen. Diese sind in Tabelle 51 im Anhang zusammen mit ihrer Online-Datenbank-Nr., Position auf dem Gen und Sequenzlänge aufgelistet.

3.3.3.2 Sequenzalignment und Primergenerieren

Das Alignment der erworbenen rpoB-Sequenzen erfolgte automatisch in ClustalX. Die Clustal Programmserien werden sehr häufig in der Molekularbiologie und in der Bioinformatik zum multiplen Alignment von Nukleinsäuresequenzen und zum Erstellen phylogenetischer Bäume verwendet. ClustalX wurde in der Programmiersprache C++ geschrieben und erstellt ein Alignment durch eine paarweise progressive Sequenzalignmentmethode (Larkin et al., 2007). Beim Alignment werden die Elemente einer untersuchten Sequenz so zugeordnet, dass die Reihenfolge der Basen erhalten bleibt und jedes Element einem anderen Element oder einer Lücke in jeder Sequenz zugeordnet ist. Durch den Vergleich der rpoB-Sequenzen im Alignment wurden verschiedene Konsensusregionen gefunden, die theoretisch als Vorlage zum Generieren der Primer hätten verwendet werden können. Allerdings waren keine von diesen Regionen in allen betrachteten Bakterien vorhanden. Die Primer, die durch das ClustalX Alignment generiert wurden, wurden in BLAST überprüft, in welchem Umfang sie geeignet waren, die Bakterienspezies zu detektieren. So ließ sich erkennen, dass diese Primer theoretisch wenige Bakterienspezies detektieren konnten. Die Primer, die durch Primer-BLAST der NCBI generiert wurden, haben die Detektion eines weiteren Spektrums der Bakterienspezies ermöglicht. Die Primer rpoB 1, rpoB 6, rpoB 12, rpoB 15, rpoB 1C und rpoB 2C erwiesen bei der BLAST-Analyse eine breitere Detektionsspanne für die entsprechenden Bakterienspezies. Deshalb wurden diese für den Einsatz in den PCR-Analysen ausgewählt und zur Synthese bestellt (Tab. 28).

3.3.3.3 Primerspezifität

Im Prinzip werden Primer mit dem Ziel entworfen, sich an spezifischer Stelle des DNA-Templates zu binden und somit eine Amplifikation bestimmter Sequenzfragmente (PCR-Produkte) zu ermöglichen. In diesem Sinne geht der Amplifikationserfolg sehr stark mit der Spezifität und weiteren relevanten Eigenschaften der Primer einher. Die Spezifität der Primer ist besonders dann wichtig, wenn eine definierte Spezies nachgewiesen werden soll. Da die Gesamtkeimzahl im Sinne der Kulturmethode sämtliche wachsenden Keime als Ziel hat, wird die Spezifität der Primer anders interpretiert. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl ist daher vornehmlich die „Detektionsspanne“ der Primer von Bedeutung im Gegensatz zur Spezifität, das heißt der Umfang der Bakterienspezies, der mittels der Primer erfasst werden soll. Je mehr Bakterien detektiert werden, desto besser korreliert die PCR-Methode mit der Gesamtkeimzahl, resultierend aus der Kulturmethode. Allerdings ist selbst bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl wichtig, dass die Bakterien detektiert werden, die mit dem Verderb der zu untersuchenden Probe assoziiert sind und soweit wie möglich ausgeschlossen wird, dass externe Kontaminanten die PCR-Bestandteile verunreinigt haben. Deshalb sollten die generierten Primer die Gesamtheit der Verderbsflora des

Geflügelfleisches detektieren. Um die bestfunktionierenden Primer aus den entworfenen Primern auszuwählen, wurden sie in Primer-BLAST von NCBI auf ihre Eignung überprüft.

3.3.3.4 Auswertung der Korrelationsanalysen

Die Keimbelastung der Geflügelfleischproben schwankte zwischen 10^4 (Probe 1) und 10^8 (Probe 10) KbE/g (Tab. 29). Die relativ hohe Keimbelastung der Proben wirkte sich negativ auf die Bestimmung der unteren Detektionssgrenze der Primer aus. So konnte nicht festgestellt werden, ob die generierten Primer für die Amplifikation der Nukleinsäuren beim unteren Konzentrationsbereich geeignet waren. Allerdings konnte durch die Korrelationsanalyse eingeschätzt werden, ob die durch jedes Primerpaar erfassten Bakterien mit den klassisch ermittelten vergleichbar sind.

Die generierten Primer, die bei der BLAST-Analyse eine ausreichende Spezifität erwiesen haben (rpoB 1, rpoB 6, rpoB 12, rpoB 15, rpoB 1C und rpoB 2C) wurden in der PCR-Analyse eingesetzt. Für jeden Primer wurden mindestens zwei Analysen durchgeführt. Dabei wurden je nach eingesetztem Primer die Annealing-Temperatur und die Primer-Konzentration modifiziert. Zur Auswertung wurden die Ct-Wertspanne, der Korrelationskoeffizient aus der Korrelation mit der Gesamtkeimzahl und die Ct-Werte der negativen Kontrolle berücksichtigt. Abbildung 20 stellt die Korrelationsergebnisse, resultierend aus dem Vergleich der Ct-Werte der PCR-Analysen unter Anwendung der generierten Primer und die Gesamtkeimzahlen, ermittelt mittels des Plattenkulturverfahrens exemplarisch dar. Bei der ersten Analyse unter Anwendung vom Primerset rpoB 1 erschienen die Ct-Kurven relativ spät (zwischen dem 26. und dem 35. Zyklus). Die meisten Kurven (80 %) erschienen erst nach dem 30. Zyklus. Auch bei den Negativkontrollen wurde DNA amplifiziert und die Ct-Kurven erschienen nach dem 40. Zyklus. Nach der Modifizierung der Annealing-Temperatur (3. PCR Run, 54 °C) erschienen die Kurven früher (zwischen dem 21. und dem 31. Zyklus) und bei den Negativkontrollen fand keine Amplifikation der DNA statt. Trotzdem wies keine der PCR Analysen, die mit Hilfe vom Primer rpoB 1 durchgeführt wurden, vergleichbare Ergebnisse mit denen aus der Kulturmethode auf (1. PCR Run: $R^2 = 0,32$ und 3. PCR Run: $R^2 = 0,36$). Ebenso wiesen die PCR-Analysen unter Anwendung von rpoB 12 (2. PCR Run und 12. PCR Run) relativ hohe Ct-Werte auf (3. Run: zwischen dem 25. und dem 35. Zyklus und 12. Run nach der Reduzierung der Annealing-Temperatur: zwischen dem 26. und dem 35. Zyklus). Die Ct-Kurve der negativen Kontrolle verschwand nach der Verringerung der Annealing-Temperatur (12. Run). Dennoch reichten die Determinationskoeffizienten für das Paar rpoB 12 nicht aus, um für weitere PCR-Analysen eingesetzt zu werden (2. PCR-Run: $R^2 = 0,39$ und 12. PCR-Run: $R^2 = 0,34$). Auch die PCR-Analysen mit Hilfe vom Primerpaar rpoB 2C wiesen keine akzeptable Korrelation auf (8. Run: $R^2 = 0,01$ und 10. Run: nach der Modifizierung der Annealing-Temperatur $R^2 = 0,32$). Die PCR-Analyse unter Anwendung der Primerpaare rpoB 15, rpoB 6 und rpoB 1C ergaben vergleichbare Ergebnisse mit denen aus

dem Kulturverfahren (R^2 zwischen 0,60 und 0,63). Bei der Amplifikation mit Hilfe vom Primer rpoB 6 wurde außer der Annealing-Temperatur auch die Primer-Konzentration modifiziert. So schien die Primer-Konzentration eine stärkere Wirkung auf die Ct-Wertspanne und die Korrelationen auszuüben als die Annealing-Temperatur. Die Modifizierung der Primerkonzentration führte zur Verminderung der PCR-Sensitivität, sodass die Proben mit Keimbelastung unter 10^6 KbE/g nicht detektiert werden konnten und der Determinationskoeffizient nur noch bei 0,36 lag. Bei der Erhöhung der Annealing-Temperatur veränderte sich die Ct-Wertspanne nur geringfügig. Allerdings erschien bei einer Probe mit Keimbelastung von 10^4 KbE/g keine Ct-Kurve (Tab. 33).

Anhand der Ergebnisse der Korrelationsanalysen (Abb. 20) und der beschriebenen Auswertung der Ct-Werte war zu erkennen, dass die drei Primer rpoB 1C, rpoB 6 und rpoB 15 das beste Potential zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleischproben hatten.

Tabelle 33: Ergebnisse der 14 PCR-Analysen (Mittelwert der Ct-Werte) (n=10) unter Anwendung der generierten Primer (Gesamtkeimzahlen, aus den klassischen Plattenverfahren als log₁₀ KbE/g: gewichteter Mittelwert)

Primer:		rpoB 1	rpoB 12	rpoB 1	rpoB 15	rpoB 15	rpoB 6	rpoB 1C	
Annealing-Temperatur:		62 °C	60 °C	54 °C	53 °C	57 °C	54 °C	56 °C	
PCR Run:		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Nr.	Probe	GKZ (log ₁₀ KbE/g)	Ct-Werte						
2	Hähnchenbrust-Innenfilet	4,19	34,40	34,47	29,09	40,02	42,07	38,18	30,11
5	Hähnchen-Geschnetzeltes	5,48	35,27	35,72	31,01	43,44	37,57	33,94	30,32
1	Putenbrust-Innenfilet	6,02	34,91	32,82	26,62	39,67	35,63	36,17	28,64
8	Maishähnchenbrust	6,50	34,23	34,55	30,13	28,89	28,80	28,67	27,63
10	Perlhuhnkeule	6,55	31,92	30,43	24,11	39,67	37,17	34,82	26,63
4	Hähnchen-Minutenschnitzel	7,29	33,02	34,96	28,17	36,91	37,86	34,19	29,72
7	Barbarie-Enten-Klein	7,40	29,23	29,32	22,32	32,72	33,38	32,00	23,97
3	Puten-Ministeaks	7,70	32,61	34,38	27,51	24,34	24,24	24,31	23,46
9	Entenininnenfilet	7,94	26,74	25,94	21,38	26,48	25,82	25,93	22,74
6	Bio-Putengulasch	8,63	33,12	27,35	24,57	25,23	25,83	26,24	24,17
	Blank	---	42,86	40,22	n. v.	40,24	39,65	n. v.	35,13

Primer:		rpoB 2C	rpoB 1C	rpoB 2C	rpoB 6	rpoB 12	rpoB 6	rpoB 6	
Annealing-Temperatur:		53 °C	60 °C	57 °C	57 °C	57 °C	57 °C	54 °C	
PCR Run:		R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	
Nr.	Probe	GKZ (log ₁₀ KbE/g)	Ct-Werte						
2	Hähnchenbrust-Innenfilet	4,19	28,91	29,91	28,145	n. v.	34,50	n. v.	39,12
5	Hähnchen-Geschnetzeltes	5,48	29,24	30,31	29,85	36,69	33,80	n. v.	35,17
1	Putenbrust-Innenfilet	6,05	29,31	29,06	28,90	38,92	32,56	n. v.	38,95
8	Maishähnchenbrust	6,55	32,11	27,43	29,56	28,74	35,03	29,35	29,46
10	Perlhuhnkeule	6,55	29,29	26,48	28,76	36,60	30,54	39,68	35,56
4	Hähnchen-Minutenschnitzel	7,29	29,00	30,02	28,82	34,94	35,43	36,63	35,22
7	Barbarie-Enten-Klein	7,40	26,37	24,05	24,96	32,88	27,81	33,60	33,06
3	Puten-Ministeaks	7,70	29,01	23,68	29,08	24,36	33,68	25,14	24,97
9	Entenininnenfilet	7,94	28,05	22,58	27,18	26,27	26,36	27,34	26,65
6	Bio-Putengulasch	8,63	29,85	24,01	29,27	26,67	28,08	27,59	26,54
	Blank	---	29,00	33,41	28,42	44,04	n. v.	38,78	n. v.

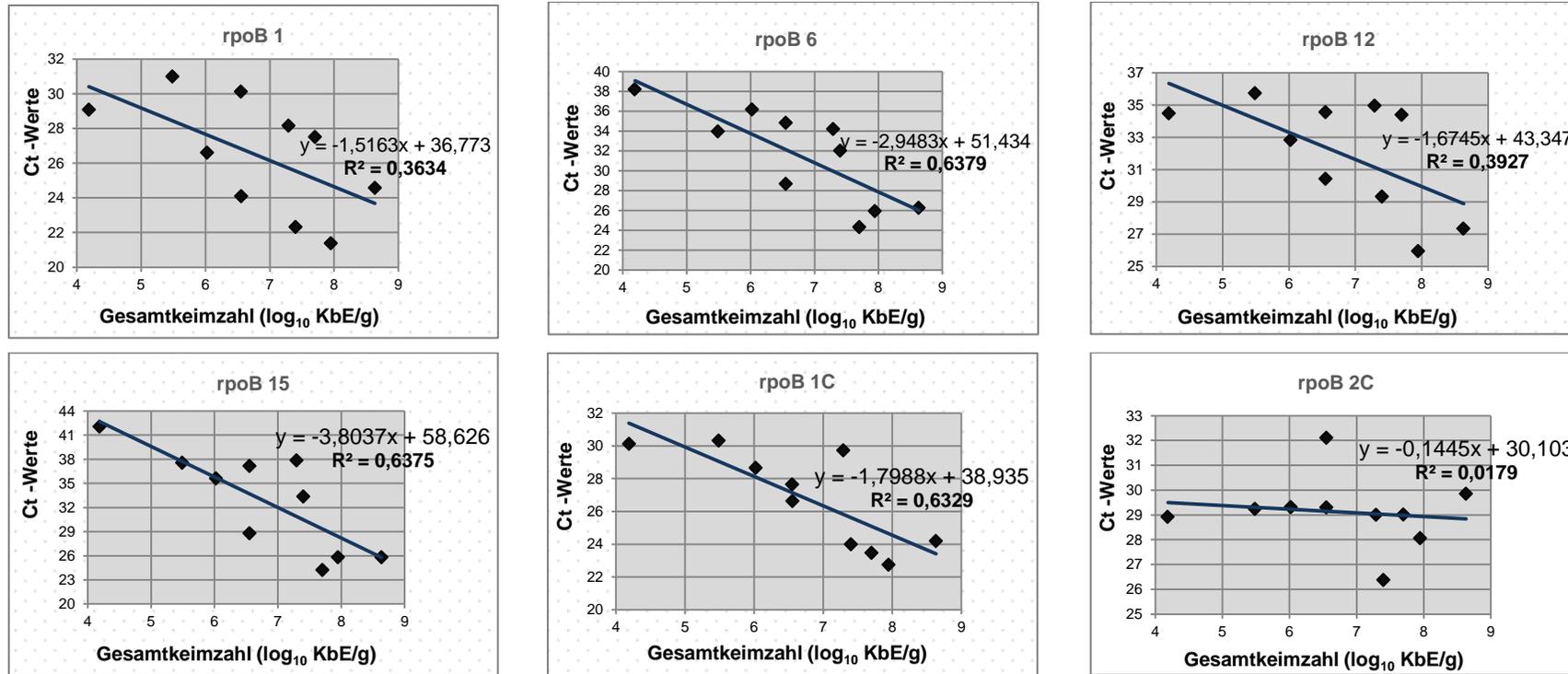


Abbildung 20: Vergleich der Ergebnisse der PCR-Analysen Run 1 bis Run 14 (Mittelwert der Ct-Werte) unter Anwendung der generierten Primer (rpoB 1, 1C, 2C, 15, 6 und 12) und des Kulturverfahrens (Gesamtkeimzahl als log₁₀ KbE/g; gewichteter Mittelwert) mit Hilfe der Korrelationsanalysen. Für jeden Primer wurde exemplarisch eine Analyse (mit dem jeweils höchsten Determinationskoeffizienten) grafisch dargestellt.

3.3.4 Diskussion

3.3.4.1 Auswahl des Zielgens

Die Auswahl des Amplifikationsziels erfolgte durch Vergleichen der phylogenetischen Eigenschaften verschiedener laut Literatur universeller Gene. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaften eigneten sich theoretisch die Gene *gyrB*, *recA* und *rpoB* zur Quantifizierung mittels PCR. Die DNA-Gyrase ist eine Typ II Topoisomerase, die die Umwandlung entspannter doppelsträngiger DNA zu einer superhelikalen Struktur katalysiert. In der DNA-Replikation fördert sie die Transkription und ist in DNA-Rekombination und -Reparatur involviert. Dieses tetrametrische Molekül besteht aus zwei A und zwei B Untereinheiten (Subunits), die durch die Gene *gyrA* und *gyrB* kodiert werden (Ladefoged und Christiansen, 1994; Reece und Maxwell, 1991). Ladefoged und Christiansen (1994) stellten *gyrB* in ihrer Studie „einzigartige Genorganisation in der *gyrB*-Region von *Mykoplasma hominis*“ als ein ubiquitäres Gen dar. Nach Ladefoged und Christiansen (1994) eignet sich das Gen, aufgrund von mehreren zur Verfügung stehenden, hochkonservierten Regionen und der Präsenz in zahlreichen Bakterienspezies als Ziel zum Einsatz von antimikrobiellen Substanzen. Laut Delétoile et al. (2009) ist *gyrB* ein Einzelkopiegen. *recA* ist ein Proteinkodierendes Gen, das eine essentielle Rolle bei der homologen Rekombination, beim DNA-Strang austausch, bei der DNA-Reparatur und bei weiteren Prozessen spielt (Clark und Sandler, 1994; Kowalczykowski et al., 1994; Roca und Cox, 1990). Nach Karlin und Brocchieri (1996) ist *recA* in Bakterien ubiquitär konserviert und kommt als Einzelkopie im bakteriellen Genom vor (Masco et al., 2007).

Somit stellten theoretisch *gyrB* und *recA* neben *rpoB* geeignete Zielgene zur Quantifizierung der Bakterien dar. Allerdings ließ sich durch Suche in den Gendatenbanken und in der Literatur erkennen, dass, im Gegensatz zu *rpoB*, nur wenige Bakterien *-recA-* und *-gyrB-*Gene vollständig oder teilweise sequenziert wurden oder zumindest in den öffentlichen Datenbanken zur Verfügung standen. Dieser Informationsmangel beeinträchtigte das Alignment von Sequenzen, wodurch das Generieren gut funktionierender Primer erschwert war. Adékambe et al. (2008b) zufolge stehen Sequenzen von *rpoB* für viele Bakterienspezies zur Verfügung. Nach Adékambi et al. (2008b) enthält die Genbank[®] über 25.000 Sequenzen, vorliegend als teilweise oder vollständige *rpoB*-Sequenzen. Diese umfasst vollständige *rpoB* Gensequenzen (~3000 Sequenzen) von 3411 bp (*Staphylococcus aureus*) bis zu 4185 bp (*Neisseria meningitidis*) Länge. Die Qualität dieser vorhandenen Gensequenzen ist nach Angaben dieser Autoren zuverlässig, denn große Teile dieser Sequenzen sind in der GenBank[®] aktuell, das heißt, dass sie in den letzten zehn Jahren hinterlegt wurden. Derzeit werden zur Analyse von Mikrobenpopulationen meist PCR-Methoden eingesetzt. Sequenzen des 16S *rRNA*-Gens fungieren als Zielsequenz (Dahllof et al., 2000). Die Vorzüge dieser Moleküle liegen in ihrer ubiquitären Verbreitung und ihren hochkonservierten Domänen, die

als Vorlage für das Generieren der Amplifikationsprimer fungieren (Santos und Ochman, 2004). Allerdings wiesen mehrere Autoren auf Unzulänglichkeiten bei der Verwendung dieser 16S rRNA-Sequenzen für mikrobielle Quantifizierungszwecke hin. Ein großes Hindernis stellt beispielsweise die Diversität in der Genkopienzahl dar, die sich nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch innerhalb einzelner Spezies (Acinas et al., 2004) unterscheidet. Diese Eigenschaft erschwert die Quantifizierung der Mikroorganismen mittels PCR. In dieser Arbeit wurde nach Vergleich von verschiedenen Einzelkopie (Proteinkodierenden) Genen *rpoB* als Amplifikationsziel ausgewählt, damit dieses Problem vermieden wird. Ein großer Pluspunkt für diese Entscheidung lag in der Verfügbarkeit der Sequenzen dieses Gens von vielen Bakterienstämmen in den Datenbanken. Das *rpoB*-Gen wurde sehr oft als Alternative für die Identifikation und zum Vergleich der Diversität von Bakterienspezies in Evolutionsstudien verwendet (Drancourt et al., 2004; Dahllöf et al., 2000). Über die Verwendung dieses Gens zur Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl wurde jedoch nur von Takahashi et al. (2009) in verzehrsfertigem Obst und Gemüse berichtet. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das *rpoB*-Gen zur Quantifizierung der Gesamtbakterienzahl in Geflügelfleisch mittels PCR ausgewählt.

3.3.4.2 Sequenzalignment und Primer-Design

Das Alignment der *rpoB*-Sequenzen in ClustalX, die aus Sequenzdatenbanken stammten, zeigte keine Konsensusregionen, die bei sämtlichen relevanten Bakterien vorkommen. So war es kaum möglich, Primer zu generieren, die ausreichend viele Spezies in Geflügelfleisch detektieren können. Deshalb wurden neue Primer mit Hilfe der Software BLAST-Primer generiert. Des Weiteren wurden Alignments aus den FASTA-Sequenzen dieser Primer und den *rpoB*-Gensequenzen der Referenzspezies erstellt, um die PCR-Produktsequenzen zu ermitteln. Für die erhaltenen Zielsequenzen wurde mit Hilfe von „BLAST n“ nach Alignments gesucht. So konnte bestimmt werden, welche Spezies durch den jeweils entworfenen Primer theoretisch erfasst würden und die ungefähre Detektionsspanne und die Spezifität des Primers konnten eingeschätzt werden. Bei der Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares *rpoB* 15 handelte es sich um ein 174 bp-langes PCR-Produkt auf dem *rpoB*-Gen von *Shigella dysenteriae* Sd197 auf Position 3478789–3478963 (NCBI: >gij82775382) des Gens (Abb. 21). Tabelle 34 stellt die Bakterienspezies, die auf diese Art durch *rpoB* 15 Primer erfasst werden können, dar. Ein Blick auf diese Tabelle zeigt, dass neben einigen Pseudomonaden die Mehrheit der Spezies aus der Familie *Enterobacteriaceae* stammt und es sich dabei fast nur um gramnegative Bakterien handelt. Vergleicht man diese Spezies mit denen, die in Abschnitt 3.2 identifiziert wurden und mit denen, die in der Literatur in Bezug auf Geflügelfleisch angegeben wurden (Abschn. 3.3.3.1), zeigt sich eine relativ hohe Detektionsspanne für das Primerpaar *rpoB* 15. Allerdings stellt die fehlende Erfassung von grampositiven Bakterien ein Hindernis für die Spezifität des Primerpaares dar. Betrachtet

man die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Geflügelfleischflora in Abschnitt 3.2.3 (Tab. 22), so ist die Anzahl der grampositiven Laktobazillen beispielsweise deutlich niedriger als die der *Enterobacteriaceae* oder der Pseudomonaden. Außerdem erfolgte die Identifizierung der Bakterien in Geflügelfleisch unter Anwendung von Selektivagar und optimalen Wachstumsbedingungen der Bakterien (Abschn. 3.2.1), sodass das Wachstum dieser Mikroorganismen extrem gefördert wurde. Auf den PC-Platten unter einheitlichen Bedingungen sind hingegen nicht alle oben beschriebenen Spezies in der Lage sich zu vermehren und zu wachsen. So können beispielsweise die grampositiven mikroaerophilen Milchsäurebakterien wahrscheinlich nicht in großer Anzahl auf den PC-Platten unter aeroben Bedingungen wachsen, was die Korrelation zwischen den beiden Methoden nicht beeinträchtigt, da das Primerpaar rpoB 15 die mikroaerophilen Milchsäurebakterien ebenso nicht erfasst.

Das degenerierte Primerpaar rpoB 1C, das in Korrelationsanalysen akzeptable Ergebnisse lieferte, konnte in der BLAST-Analyse des Amplifikationsziels (Position 329814–330437 auf rpoB-Sequenzen von *Acinetobacter baumannii* ACICU, Abb. 21) mehr relevante Spezies erfassen als Primer rpoB 15. So konnte eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien, die mit dem Verderb von Geflügelfleisch assoziiert sind, erfasst werden. Allerdings wies dieses Primerpaar einige praktische Nachteile, wie einen hohen Degenerationsgrad und damit verbunden eine hohe Standardabweichung der Schmelztemperaturen auf. Außerdem wurde mit Hilfe dieses Primersets ein PCR-Produkt mit mehr als 600 bp (Abb. 21) amplifiziert, was für Quantifizierungszwecke ungeeignet ist. Aus diesen Gründen wurde das Primerset rpo B 1C trotz sehr breiter Detektionsspanne und hohem Determinationskoeffizienten, resultierend aus der Korrelation mit dem Ergebnissen des Plattenkulturverfahrens, aus den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Shigella dysenteriae 1617, complete genome
 Sequence ID: [gb|CP006736.1](#) Length: 4302517 Number of Matches: 1

Range 1: 3425436 to 3425609 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
322 bits(174)	1e-84	174/174(100%)	0/174(0%)	Plus/Minus

Features: [DNA-directed RNA polymerase beta chain](#)

Forward →

```

Query 1      TAATCCGTTCCGTTGGCGAAATGGCGGAAAACCAGTTCGCGGTTGGCCTGGTACGTGTAGA 60
              |||
Sbjct 3425609 TAATCCGTTCCGTTGGCGAAATGGCGGAAAACCAGTTCGCGGTTGGCCTGGTACGTGTAGA 3425550

Query 61     GCGTGCGGTGAAAGAGCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCCTGATGCCTCAGGATAT 120
              |||
Sbjct 3425549 GCGTGCGGTGAAAGAGCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCCTGATGCCTCAGGATAT 3425490

Query 121    GATCAACGCCAAGCCGATTCCGCAGCAGTGAAAAGATTCTTCGGTTCAGCCCA 174
              |||
Sbjct 3425489 GATCAACGCCAAGCCGATTCCGCAGCAGTGAAAAGATTCTTCGGTTCAGCCCA 3425436
    
```

← **Reverse**

```

File Edit Format View Help
>g|82775382:c3477434-3473406 shigella dysenteriae sd197, complete genome
ATGGTTTACTCCTATACCGAGAAAAAGGTATTCGTAAGGATTTGGTAAACGTCACAACTTCGGATG
TACCTTATCTCCCTTATCCAGCTTGACTCGTTTCAGAAATTTATCGAGCAAGATCTGAAGGGCAGTA
TGGCTGGAGAGCGCTTTCGGTTCGGTATTCGGGATTCAGAGCTACAGCTGTAATTCGAGCTGCATAC
GTCAGCTACCCTTGGCGAACCGGTGTTGACGTCCAGGAATGCAAACTCGGCGTGAACCTATCCG
CACCCTGCCTGTTAACTGCGTCTGGTGTCTATGAGCGCGAAGCGCCGGAAGCGACCTAAAAGACAT
TAAAGAACAGAGAGCTACATGGGCGAAATTCGGCTATGACAGACAAAGGATACCTTTGTTATCAACGGT
ACTGAGCGGTGTTATCGTTCCGAGCTGCACCGTAGTCCGGCGTCTCTTTGACTCCGCAAGGTAATA
CCCACTTCTGGTAAAGTGTATAAACGGCGCATCTCCCTTACCCTGGTCTTCGGTGGACTTCA
ATTGATCCGAAGGCAACTGTTCTGACGTATCGACCTGCGCGTAAACGCTCGGACCATCTTCG
CGCGCTGAACTACACACAGAGAGATCTCGACTGTCTTTGAAAAAGTTATCTTTGAAATCCGGT
ATAACAACTGCAGATGGAACGGTGGCGGAAAGCCCTGGTGTGAAACGCATCTTTTACATCGAAGC
TAACGGTAAAGTGTACAGAAAAAGCCGCGTATCATCGCGCCACATTCGCCAGCTGGAAAAAGAC
GACGCAACCTGATCGAAGTCCCGTGGTGTGATCATCGAGGTAAAGTGGTTCGTAAGACATATATTGATG
AGTCTACCGCGAGCTGATCTGCGCAAGCAATGAGGCTGAGCTGTGGAGCTGGCTAAAGTGAAGCA
ATCTGGTCAACAAGGTATCGAAACGCTGTTACCAACGATCTGGATCACGGCCATATATCTTGAACC
TTACGTGTCGACCAACTAACGACCTGTCGAGCGACCTGGTAGAAATCTACCGCATGATGCGCCCTGGCC
AGCCGCGGACTGTGAAGCAGCGAAAGCCCTGTTGAGAACCCTGTTCTTCGGAAGCCGCTATGACCT
GTCGCGGTGGTGTGATGAAGTCAACGCTCTGCTGCGCGAAGAAATCGAAGGTTCCGGTATCTG
AGCAAGACGACATCATGATGTTAAGAAAAGCTATCGATATCCGTAACGGTAAAGGCGAAGTCTGAT
ATATGACCACTCGCAACCGTCTATCGTTCCGTTGGCGAAATGGCGAAAAACAGTTCGCGGTTGG
CTGGTACGTTAGAGCTGCGGTGAAAGAGCGTCTGCTCTGGCGATCTGGATACCTGATTCGCTGAG
GATATGATGAAAGCGCAAGCGGTTCCCGAGAGTGAAGAGTTCCTGGGCTCAGCGACGCTGCTGAG
TTATGGACAGAACACCCGCTGCTGAGATTACGCAAAAGCTGATATCTCCGACTGGCCAGGCGG
TCTGACCCGTGAACGTGCGAGGCTCGAAGTTCGAGAGTACACCCGACTACCTGGTGGTATGTTCA
ATCGAAACCCCTGAAGGTCGCAACATCGGCTGATCAACTCTGTCGCTGACGACAGACTAACGAAT
ACGGCTTCTTGAAGCTCGTATCTGAAAGTGAAGCGGCTGATGAAAGTCAACTACCTGCTGCTG
TGTATCGAAGAGGCAACTACGTTATCGCCAGGCGAATCCAACTGGATGAAGAGGCCACTTCGTA
    
```

```

...TTCTGCAATTTTGGTGAGAAAGCAGCTGACGTTAAAGACTCATCTTACGTTTCCATCTGGTACTA
VAGGTACAGTATTGACGTTCAAGTCTCCACTCGTATGGCTTAGAGAAAGATGACCGTCTTTAGCAAT
TGAAGAAAGCAGAGCTTGATCTTATCGTAAAGACTTGAAGAAAGAAATCAAGATCTTGAAGAAAGCGGCT
GTGAGCGTGAATTCGTTTCTTAAAGCCCAAGAGCTAAAGGCGGTGTTCAACTAAACGTGTGATA
VACTTCTGAAAGATTTATTATCTGGTGTAGAGCTTGTGACTTACTTGAATTAACAGCAGATGAAGC
VATCGCTGAGCGTTAACTCAAATTCAGTGTCTTGAAGAGAAAGAGCGCAAGAAATCGATGAGAAATTC
CTGAGAGAAACGTAAAGCTTCAACAGGTGATGAAATTAACAACCTGGTGTATTGAAAGTGTGAAAGTGT
ACTTACGCTGTTAAAGCTGATTCAGCTGATGAAAGTGAAGGCTGATGAAAGTGAAGGCTGATGAAAGTGT
NCTAACATCTTACCCTGTTGAAGAGATGCCACATGATGCTAACGGTGTCCCGTGAATATCTGATTGAAC
CCCTGGGTGACCACTCTGATGAAGCTGGGTGAGATTTAGAGACTCACTGGGTATGGCGGCTAAAG
GGCTGGTGACAAAATCAAAAAATGTTGAAAGAACAGGTACAGTTTTGAAGCTGCGGAAATCTTAGA
AAGATTTATACAAAGCTCGCGGTGAGCAAGAGATCTTGAAGCTTACTGATGATGAAAGAAATCTAGCG
TTTCAAGGTAACTTGGCTGCGGGTGTCCCTTTAGCTACTCTGATTTGATGCTGCTGAAAGAAAGTCAA
TTAAAGACTTACTTGAATTTGGCTGACATTTCACTACTGGTCAACAGTATTGTTGACGGAGCTACAGG
TGAAGCTTGGACGTCAGTAACTGTTGTTACATGATGATGCTTAAATGAAGCACTTGGTGTGATGAC
VAGATGCTGCGCGTCAACTGGTCTTACTCACTGTTTACCAACAAACCCGTTGGTGGTAAAGCAACT
TCGGTGGTCAAGCTTTCGGTGGTGAAGATGAGGCACTTGAAGCATCGGTGACGATATACACTCA
VGAATGCTTACAGTGAAGCTCGGATGACCTTGAAGGCGTACTCGACTATGAAGAAATTTGATGATGGT
VACATTTATGGATCCGGTATGCTGAACTGTTCAAGCTATTGACCAAGAGATCCGTTCTTTAGGTA
TCACATTTGAATAAAAATGGTACTAA
    
```

Abbildung 21: Alignment des Primersets *rpoB* 15 und dem *rpoB*-Gen von *Shigella dysenteriae* in NCBI-BLAST. Die Pfeile oben und unten zeigen die Vorlage für den Forward- und Reverse-Primer (oben). Das Amplifikationsziel des Primersets *rpoB*15 (Mitte) und des Primersets *rpoB* 1C im *rpoB*-Gen im FASTA-Format (unten).

Tabelle 34: Bakterienstämme, mit Hilfe von BLAST unter Anwendung der Zielsequenzen auf *rpoB* identifiziert

Nr.	Bakterienspezies (und Subspezies)	Stamm
1	<i>Shigella flexneri</i> 1a	0228
	<i>Shigella boydii</i>	CDC 3083-94
	<i>Shigella sonnei</i>	FDAARGOS_90
	<i>Shigella dysenteriae</i>	1617
2	<i>Escherichia coli</i>	268-78-1
	<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469
	<i>Escherichia albertii</i>	KF1
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumonia</i>	RJF999
	<i>Klebsiella variicola</i>	HKUOPLA
	<i>Klebsiella</i> sp.	G5
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	JKo3
4	<i>Enterobacter asburiae</i>	35734
	<i>Enterobacter cloacae</i>	34978
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	G7
	<i>Enterobacter lignolyticus</i>	SCF1
	<i>Enterobacter kobei</i>	R-47368
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	R-49023
5	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Schleissheim</i>	B24
	<i>Salmonella bongori</i> serovar	RKS3044
6	<i>Citrobacter freundii</i>	CAV1741
	<i>Citrobacter</i> sp.	FDAARGOS_156
7	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Yangling I2
8	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i>	LMG 23823
	<i>Cronobacter universalis</i>	NCTC 9529
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	ATCC 29544
9	<i>Erwinia</i> sp.	Ejp617
10	<i>Pantoea</i> sp.	At-9b
11	<i>Dickeya dadantii</i>	3937
	<i>Dickeya</i> sp.	FZ-2012
12	<i>Serratia marcescens</i>	B3R3
	<i>Serratia</i> sp.	FS14
	<i>Serratia grimesii</i>	LMG 7883
	<i>Serratia glossinae</i>	CCUG 57457
	<i>Serratia fonticola</i>	CCM 3408
13	<i>Edwardsiella piscicida</i>	C07-087
	<i>Edwardsiella tarda</i>	FL6-60
14	<i>Yersinia enterocolitica</i>	WA
	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i>	CCUG 12369
15	<i>Pseudomonas poae</i>	RE*1-1-14
	<i>Pseudomonas</i> sp.	St29
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2-79
	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	S4
	<i>Pseudomonas protegens</i>	Cab57
	<i>Pseudomonas reactans</i>	ippbc pra2
	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	CIP 108031T
16	<i>Proteus myxofaciens</i>	ATCC 19692
17	<i>Rahnella</i> sp. 'woolbedingensis'	FRB 227

3.3.4.3 Einsatz der generierten Primer in der PCR-Analyse

Die praktische Einsatzbarkeit der ausgewählten, generierten Primerpaare (rpoB 1, rpoB 6, rpoB 12, rpoB 15, rpoB 1C und rpoB 2C) zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch wurde in mehreren PCR-Analysen überprüft. Das Primerpaar rpoB 1, welches in der BLAST-Analyse eine hohe Sequenzenübereinstimmung mit mehreren *Pseudomonas*-spezies (100 %) und geringere mit der Familie *Enterobacteriaceae* (50 %) zeigte, wies praktisch keine ausreichende Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Plattenverfahrens auf ($R^2 = 0,31$ und $R^2 = 0,36$). Dies zeigt, dass die Geflügelfleischproben weniger von Pseudomonadenstämmen und wahrscheinlich mehr von *Enterobacteriaceae* oder anderen Stämmen belastet waren. Das Primerpaar rpoB 12 zeigte ebenfalls hohe Sequenzenähnlichkeiten mit vielen *Pseudomonas*-spezies (bis zu 100 %) aber auch mit einigen *Aeromonas* spp., *E. coli*, *Salmonella* und bis zu 60 % Sequenzenhomologie mit den Spezies von der Familie *Enterobacteriaceae*. Trotzdem wies auch dieses Primerpaar keine ausreichende Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Plattenverfahrens ($R^2 = 0,39$ und $0,33$) auf. Hingegen wies rpoB 15 einen höheren Determinationskoeffizienten mit den Ergebnissen der Kulturmethode ($R^2 = 0,62$ und $0,63$) auf. Dieses Primerpaar zeigte, wie bereits beschrieben, eine hohe Sequenzenähnlichkeit mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen (100 %), Pseudomonaden und einigen *Enterobacteriaceae*-Spezies in der BLAST-Analyse. Ebenfalls zeigte das Primerpaar rpoB 6 vergleichbare Ergebnisse mit denen aus dem Kulturverfahren ($R^2 = 0,62, 0,58, 0,62$), wenn eine geeignete Annealing-Temperatur und Primerkonzentration ausgewählt wurden. Dieses Primerpaar zeigte eine hohe Detektionsspanne für *E. coli*, *Salmonella enterica* und Stämmen von *Enterobacteriaceae*.

Die degenerierten Primerpaare (rpoB 1C und rpoB 2C) wurden ebenfalls in der BLAST-Analyse nach Sequenzenähnlichkeiten überprüft. Das Primerset rpoB 1C, das einen höheren Degenerationsgrad aufwies (zwei Nukleotide in Forward und drei in Reverse), zeigte, wie erwartet, eine höhere Sequenzenähnlichkeit als das Primerset rpoB 2C, das nur eine degenerierte Sequenz beinhaltete. Dieses Primerpaar wies eine hohe Detektionsspanne für eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Stämmen auf und dem zu Folge eine hohe Korrelation mit dem Plattenverfahren ($R^2 = 0,63$). Im Gegensatz dazu, zeigte das Primerpaar rpoB 2C eine hohe Sequenzenähnlichkeit mit den *Pseudomonas* spp. und wenigen Stämmen von *Enterobacteriaceae*. So zeigte dieses Primerpaar keine ausreichende Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Plattenverfahrens ($R^2 = 0,01$ und $0,03$). Bei der Messung der negativen Kontrollen in der PCR-Amplifikation bei Verwendung dieser Primer wurden entweder keine Amplifikationen aufgewiesen oder die Amplifikationskurven erschienen erst nach dem 35. Zyklus. Die Amplifikationskurve bei der negativen Kontrolle war wahrscheinlich auf die Bildung der Primerdimere zurückzuführen. Bei der Amplifikation unter Anwendung von Primerpaar rpoB 15 erschienen die Ct-Kurven der negativen

Kontrollen erst nach dem 40. Zyklus. Deshalb wurde auch für weitere PCR-Analysen die Zyklenanzahl auf 40 Zyklen limitiert. Bei der Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares rpoB 6 erschienen keine Amplifikationskurven für die negativen Kontrollen, wenn die Annealing-Temperatur 54 °C betrug.

3.3.5 Schlussfolgerung

Die Determinationskoeffizienten, die aus dem Vergleich der Ct-Werte der PCR-Analysen unter Anwendung der generierten Primer mit den Gesamtkeimzahlen resultierten, lagen nicht im idealen Bereich für den direkten Einsatz in der quantitativen PCR. Allerdings wurden die optimalen PCR-Bedingungen in diesem Teil der Arbeit noch nicht erreicht. Die Annealing-Temperatur der Primer wurde beispielsweise nur theoretisch nach ihren Schmelztemperaturen und der entsprechenden Formel (Nr. 4) kalkuliert. In späteren Untersuchungen wurde versucht, die PCR-Bedingungen zu optimieren, um eine bessere Korrelation zu erzielen.

Die in diesem Abschnitt verwendeten Geflügelfleischproben, die zur Extraktion der DNA verwendet wurden, waren artgemäß sehr heterogen (Tab. 29). Die Proben waren zwar alle Geflügelfleisch, stammten jedoch von verschiedenen Geflügelarten. Daher waren wahrscheinlich ihre Keimbelastungsspektren und ihr Gehalt an PCR-Inhibitoren relativ variabel. Dies kann dazu führen, dass die generierten Primer, je nach Detektionsspanne und Spezifität, in einer Fleischprobe bestimmte Gruppen von Bakterien detektieren, die in der anderen Geflügelfleischprobe nicht existieren oder teilweise auf den Agarplatten nicht kultivierbar sind. Diese Abweichungen in der Keimbelastung verschiedener Proben einerseits und die Detektionsspanne der Primer auf der anderen Seite kann zum Erzielen nicht optimaler Korrelationen mit den Ergebnissen aus dem Kulturverfahren führen. Angesichts der resultierenden Determinationskoeffizienten, die aus dem Vergleich der zwei Methoden erzielt wurden, wurden die Primer rpoB 6, rpoB 15 und rpoB 1C für weitere PCR-Analysen und zur Verbesserung der PCR-Bedingungen ausgewählt.

3.4 Korrelationsanalyse

3.4.1 Ziel und Aufbau der Versuche

Aus den Korrelationsergebnissen der PCR-Analysen im letzten Abschnitt wurden drei Primerpaare (rpoB 1C, rpoB 6, und rpoB 15) (Tab. 28) ausgewählt, die zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch mittels qPCR potenziell geeignet waren. Zur weiteren Selektion der Primer wurden weitere PCR-Analysen mit paralleler Bestimmung der Gesamtkeimzahl unter Anwendung des Plattengussverfahrens durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander verglichen. Für die PCR-Versuche wurden neue Geflügelfleischproben gekauft und vorbereitet. Somit konnten die generierten Primer mit neuen DNA-Templates getestet werden. Ein DNA-Extraktionsverfahren für diese Proben wurde durchgeführt. Die Fleischproben wurden so ausgewählt, dass sie von der Art und Beschaffenheit her ähnlich waren (Hähnchenbrustfilet). Dies trug dazu bei, dass eine ähnliche Bakterienflora auf den Fleischproben vorhanden war. Die resultierenden Ct-Werte wurden mit den klassisch ermittelten \log_{10} KbE/g korreliert. Anschließend wurden auch die Schmelzkurven der PCR-Produkte ausgewertet. Das Primerpaar, mit den besten PCR-Ergebnissen und Determinationskoeffizienten sowie Schmelzkurven im zu erwartenden Bereich, sollte als endgültiges Primerpaar ausgewählt werden. Um die Spezifität und die Detektionsspanne der ausgewählten Primer für die Geflügelfleischflora zu bestimmen, wurden in einer zusätzlichen PCR-Analyse die Nukleinsäuren, die direkt aus den Kolonien der Geflügelfleischproben, die auf diversen Selektivnährböden wuchsen (Abschn. 3.2), als Template eingesetzt. Es wurde getestet, in welcher Detektionsspanne die Primer diese erfolgreich amplifizieren können. Mit dem Ziel, die PCR-Bedingungen für weitere Quantifizierungsanalysen zu optimieren, wurde eine Gradienten-PCR-Analyse durchgeführt. Hierdurch wurde die optimale Annealing-Temperatur für das Primerpaar ermittelt.

3.4.2 Methode

Probenvorbereitung, Bestimmung der Gesamtkeimzahl und DNA-Isolierung

Die frischen Geflügelfleischproben wurden aus den Selbstbedienungsregalen verschiedener Lebensmitteleinzelhandelsbetriebe in Hannover im Zeitraum vom 10. bis 20.01.2013 gekauft. Diese Proben waren unter modifizierter Atmosphäre verpackt und wurden sofort nach dem Einkauf und dem Transport bei $+7\text{ °C}$ ($\pm 0,5\text{ °C}$) in Kühlschränken gelagert. Die Lagerung, Aufteilung und Homogenisierung der Proben sowie die Abtrennung der PCR-Inhibitoren erfolgte wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Tabelle 35 stellt die Probenart, deren Lagerbedingungen und Keimbelastungen dar. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben erfolgte anhand der DIN 10161-1:1984-02, die in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde. Die PC-Platten wurden für 72 h bei 30 °C bebrütet. Die

Gesamtbakterienzahl wurde berechnet und als \log_{10} KbE/g Fleischgewebe wiedergegeben. Das DNA-Extraktionsverfahren erfolgte wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben.

Tabelle 35: Probenbeschreibung für weitere PCR-Analysen

Nr.	Probenbeschreibung	Probennr.	Lagerungstemperatur	\log_{10} KbE/g
1	Hähncheninnenfilet	P1H1	30 °C	9,86
		P1H2	20 °C	8,33
		P1H3	4 °C	3,59
2	Hähncheninnenbrustfilet	P2H4	30 °C	8,37
		P2H5	20 °C	6,81
		P2H6	4 °C	3,83
3	Hähnchenbrustfilet	P3H7	30 °C	8,41
		P3H8	20 °C	6,50
		P3H9	4 °C	3,93
4	Hähncheninnenfilet	P4H10	30 °C	8,80
		P4H11	20 °C	7,75
		P4H12	4 °C	5,18
5	Bio-Hähnchenbrustfilet	P5H13	30 °C	8,86
		P5H14	20 °C	7,58
		P5H15	4 °C	3,89
6	Hähnchenbrustfilet (Teilstück)	P6H16	30 °C	9,26
		P6H17	20 °C	8,49
		P6H18	4 °C	6,00
7	Hähncheninnenbrustfilet	P7H19	30 °C	9,15
		P7H20	20 °C	7,73
		P7H21	4 °C	4,88
8	Hähncheninnenbrustfilet	P8H22	30 °C	8,61
		P8H23	20 °C	7,46
		P8H24	4 °C	4,71
9	Hähncheninnenbrustfilet	P9H25	30 °C	9,49
		P9H26	20 °C	9,04
		P9H27	4 °C	7,16
10	Hähncheninnenbrustfilet	P10H28	30 °C	9,40
		P10H29	20 °C	8,57
		P10H30	4 °C	7,57

Durchführung der Real-Time PCR-Analyse mit Hilfe der ausgewählten Primer

Es wurden drei PCR-Analysen mit drei ausgewählten Primerpaaren (Tab. 28) durchgeführt:

- **F15-rpoB:** 5'TATCCGTTCCGTTGGCGAAA3'
- R15-rpoB:** 5'TGGCTGGAACCGAAGAACTC3'
- **F6-rpoB:** 5'TGGTGTCGTTTCAGTACGTGG3'
- R6-rpoB:** 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'
- **F1C-rpoB:** 5'ACACACGGCATCTGGTTGAT3'
- R1C-rpoB:** 5'CTGACCACCGAAYTGHGCTTA3'

Die PCR-Bedingungen wurden entsprechend der Eigenschaften der eingesetzten Primer adjustiert. Die Konzentrationen der PCR-Mischungen und die PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 30 und 36 beschrieben. Für jede PCR-Analyse wurden 2 μ l DNA-Template verwendet. Jeder PCR-Lauf bestand aus 30 PCR-Reaktionen im Doppelansatz. Jedes Probenet beinhaltet eine Negativkontrolle, in der hochreines Wasser die DNA-Probe substituierte.

Tabelle 36: PCR-Bedingungen der Real-Time PCR-Analysen unter Anwendung der Primerpaare rpoB 15, rpoB 6 und rpoB 1C

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Amplifikation (40X)		
Denaturierung	95 °C	25 s
Primer-Annealing	57 °C rpoB 15/54 °C rpoB 6/56 °C rpoB 1C	40 s
Elongation	72 °C	30 s
Annealing-Extension	72 °C	5 min
Schmelzkurvenanalyse	55 °C bis 90 °C	Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten
Kühlen	10 °C	∞

Korrelationsanalyse für jedes Primerpaar

Um endgültig einen Primer für die Quantifizierung der Gesamtbakterien mittels PCR auszuwählen, wurden die Ct-Werte, resultierend aus den drei PCR-Analysen mit der Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben (\log_{10} KbE/g) korreliert und die Determinationskoeffizienten ermittelt. Für das Primerpaar mit dem besten Determinationskoeffizienten wurde zusätzlich der P-Wert berechnet.

Aufreinigung der PCR-Produkte (nur für rpoB 15)

Die PCR-Produkte, resultierend aus der Amplifikation der DNA-Templates (beschrieben in Tabelle 35) mit Hilfe des Primerpaares rpoB 15, wurden zur Verbesserung der Effizienz des anschließenden Gelelektrophoreseverfahrens mit Hilfe eines kommerziellen PCR-Aufreinigungskits (GeneJET PCR Aufreinigungskit) [Thermo Fischer Scientific, D] purifiziert. Der Aufreinigungsprozess wurde in Abschnitt 2.10.4 ausführlich beschrieben.

Gelelektrophoreseanalyse zur Bestätigung der Spezifität der PCR-Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares rpoB 15

Ein Gelelektrophoreseverfahren erfolgte für die PCR-Analyse unter Einsatz von rpoB 15 im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Amplifikate. Zur Größenbestimmung der DNA-Banden wurde ein DNA-Marker (GeneRuler™, 100 bp Plus DNA Ladder) [Thermo Fisher Scientific, D] mit Fragmentengrößen von 100 bp bis 3000 bp (Abb. 8) verwendet. Das elektrophoretische Trennverfahren wurde in Abschnitt 2.12 beschrieben.

Gradienten-PCR

Um einen hohen Aufwand zu vermeiden, erfolgte die Bestimmung der Annealing-Temperatur für die entworfenen Primer (Abschn. 3.3) zunächst durch die einfache Einschätzung der T_m der Primer (GC-Gehalt-Formel, Nr. 4). Nach Auswahl des endgültigen Primerpaares (rpoB 15) wurde die optimale Annealing-Temperatur mit Hilfe einer Gradienten-PCR

ermittelt. Der Temperaturbereich der ersten Gradientenanalyse erstreckte sich zwischen 52-67 °C (steilerer Gradient) (Tab 37). Da bei der Gelelektrophoreseanalyse der PCR-Produkte die DNA-Banden für den Temperaturbereich von 56,2 bis 61 °C am ausgeprägtesten zu visualisieren waren, wurde für die zweite Analyse eine schmalere Spanne von 55 bis 67 °C (flacherer Gradient) gewählt, damit eine genauere Temperatur ermittelt werden konnte. Als Template wurde die isolierte DNA aus einer Fleischprobe (P3H8, log₁₀ KbE/g 6,50; Tab. 38) ausgewählt und je 2 µl in jede PCR-Reaktion eingesetzt. Im Anschluss an die Amplifikation wurde für jeden PCR-Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse für die PCR-Produkte durchgeführt, um die Amplifikationsspezifität der PCR zu bestätigen.

Tabelle 37: Gradienten-PCR-Bedingungen, zur Bestimmung der Annealing-Temperatur für das Primerpaar rpoB 15

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Amplifikation (40X)		
Denaturierung	95 °C	25 s
Primer-Annealing	von 52 °C bis 67 °C (Gradient)	15 s
Elongation	72 °C	30 s
Annealing-Extension	72 °C	5 min
Schmelzkurvenanalyse	55 °C bis 90 °C	Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten
Kühlen	10 °C	∞

Gel-Elektrophoreseanalyse

Eine elektrophoretische Trennung der DNA-Banden wurde durchgeführt, um zu visualisieren, bei welcher/n Temperatur/en die angestrebten PCR-Produkte am stärksten Banden amplifiziert wurden. Das Elektrophoreseverfahren wurde in Abschnitt 2.12 beschrieben. Für die Gradienten-PCR wurde zur Amplifizierung als DNA-Template die Probe P4H22 mit log₁₀ KbE/g 8,61 (Tab. 38) ausgewählt. Die Gradientenspanne betrug 55-67 °C.

Bestimmung der Spezifität des Primerpaares rpoB 15

Zur Bestimmung der Spezifität und Detektionsspanne des ausgewählten Primerpaares rpoB 15 für die Geflügelfleischflora erfolgte eine qualitative PCR-Analyse. Hierzu wurden als Templates die Nukleinsäuren, die in Abschnitt 3.2.2 aus den gewachsenen Kolonien extrahiert wurden, eingesetzt. Diese Kolonien wurden aus vielen verschiedenen Geflügelfleischproben (Tab. 16) auf verschiedenen Selektivnährmedien kultiviert, um die Identität der Fleischflora zu bestimmen. Diese Kolonien waren zwar nicht dieselben Kolonien, deren Nukleinsäuren zur Identifikation der Keime sequenziert wurden, jedoch wurden sie aus den gleichen Fleischproben und von den gleichen Nährböden erworben und waren damit repräsentativ für die Geflügelfleischflora. Deshalb wurde die Detektionsspanne des Primerpaares bei der Erfassung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch aus dem Erfolg

der Amplifikation (Detektion) dieser Nukleinsäuren durch das Primerpaar rpoB 15 eingeschätzt. Hierzu wurde eine PCR-Analyse unter vergleichbaren Bedingungen wie in Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Insgesamt wurden 50 Nukleinsäure-Isolate in die PCR eingesetzt, die in Tabelle 23 mit den entsprechenden Nährmedien beschrieben wurden.

3.4.3 Ergebnisse

3.4.3.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl und Auswertung der PCR-Analysen

Die Lagerung der Geflügelfleischproben bei verschiedenen Temperaturen über Nacht (18-24 h) trug dazu bei, ein relativ großes Keimzahlspektrum zu erreichen. So lagen die Keimzahlen nach 72 h Inkubation bei 30 °C zwischen $3,90 \times 10^3$ KbE/g und $3,14 \times 10^9$ KbE/g (Tab. 38). Die PCR-Analysen erfolgten mit Hilfe der drei entworfenen Primersets rpoB 1C, rpoB 6 und rpoB 15. Die resultierenden Ct-Werte und Keimzahlen der Geflügelfleischproben sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Ein Überblick über die Ct-Werte der drei PCR-Analysen zeigt, dass bei der Amplifikation mit Hilfe des Primerpaares rpoB 1C wesentlich niedrigere Ct-Werte erzielt wurden (zwischen 18,22 und 31,68) als bei den Amplifikationen unter Anwendung des Primerpaares rpoB 6 (zwischen 20,98 und 35,33) und rpoB 15 (zwischen 20,29 und 38,74). Die Ct-Werte des Primerpaares rpoB 6 und rpoB 15 lagen sehr nah beieinander. Allerdings wurde nur bei der PCR-Analyse unter Anwendung vom Primerset rpoB 15 für den Blindwert keine Amplifikation detektiert. Diese wurde bei rpoB 1C relativ früh (32. Zyklus) und bei rpoB 6 erst nach dem 37. Zyklus detektiert. Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte für jedes Primerpaar eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestimmung der Amplifikationsspezifität. Die resultierenden Schmelzkurven aus den jeweiligen Analysen sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Schmelzkurven bei den Analysen mit dem Primerpaar rpoB 15 waren homogener verteilt als bei den Analysen mit den anderen beiden Primersets (rpoB 1C und rpoB 6), wobei bei Primerset rpoB 1C die Kurven sehr unterschiedlich verteilt waren und teilweise von typisch spezifischen Amplifikationskurven abwichen (Abb. 22). Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte lagen zwischen 83 °C und 87 °C bei der Analyse mit Primerset rpoB 15, zwischen 80 °C und 85 °C bei rpoB 6 und zwischen 82 °C und 89 °C bei rpoB 1C. Die abweichende Schmelzkurve, die bei der rpoB 6-Analyse zu sehen ist, gehörte zur Negativkontrolle. Diese weist möglicherweise auf die Bildung von Primerdimeren oder anderen PCR-Artefakte hin.

Tabelle 38: Ergebnisse der PCR-Analysen (Mittelwerte der Ct-Werte) unter Anwendung der Primersets rpoB 15, rpoB 6 und rpoB 1C (n = 30)

Primer:			rpoB 15	rpoB 6	rpoB 1C	
Annealing-Temperatur:			57 °C	54 °C	56 °C	
GKZ			Run 1	Run 2	Run 3	
Nr.	Probenbeschreibung	Proben	log ₁₀ KbE/g	Ct-Werte		
1	Hähncheninnenfilet	P1H1	9,86	22,44	22,89	18,22
		P1H2	8,33	29,60	30,32	23,31
		P1H3	3,59	38,06	34,14	29,56
2	Hähncheninnenbrustfilet	P2H4	8,37	23,00	23,68	19,98
		P2H5	6,81	27,90	28,05	23,58
		P2H6	3,83	38,74	32,82	29,44
3	Hähnchenbrustfilet	P3H7	8,41	20,29	20,98	19,77
		P3H8	6,50	26,99	27,72	25,22
		P3H9	3,93	35,66	32,60	30,70
4	Hähncheninnenfilet	P4H10	8,80	21,96	22,65	19,78
		P4H11	7,75	23,32	24,45	21,95
		P4H12	5,18	33,70	33,36	30,74
5	Bio-Hähnchenbrustfilet	P5H13	8,86	26,09	26,33	25,70
		P5H14	7,58	31,80	31,57	25,50
		P5H15	3,89	36,54	32,10	31,44
6	Hähnchenbrustfilet (Teilstück)	P6H16	9,26	24,28	27,49	23,60
		P6H17	8,49	25,58	26,88	24,31
		P6H18	6,00	32,89	34,04	31,14
7	Hähncheninnenbrustfilet	P7H19	9,15	24,79	25,93	21,10
		P7H20	7,73	29,00	30,41	25,75
		P7H21	4,88	34,43	35,33	31,68
8	Hähncheninnenbrustfilet	P8H22	8,61	20,81	22,96	20,72
		P8H23	7,46	25,05	25,80	25,48
		P8H24	4,71	35,44	34,62	30,06
9	Hähncheninnenbrustfilet	P9H25	9,49	20,92	21,70	18,42
		P9H26	9,04	22,35	23,85	18,76
		P9H27	7,16	31,98	31,40	28,04
10	Hähncheninnenbrustfilet	P10H28	9,40	20,40	21,34	19,93
		P10H29	8,57	22,26	24,75	21,35
		P10H30	7,57	31,62	32,53	28,43
Negativkontrolle		n. v	n. v	n. v	37,46	32,45

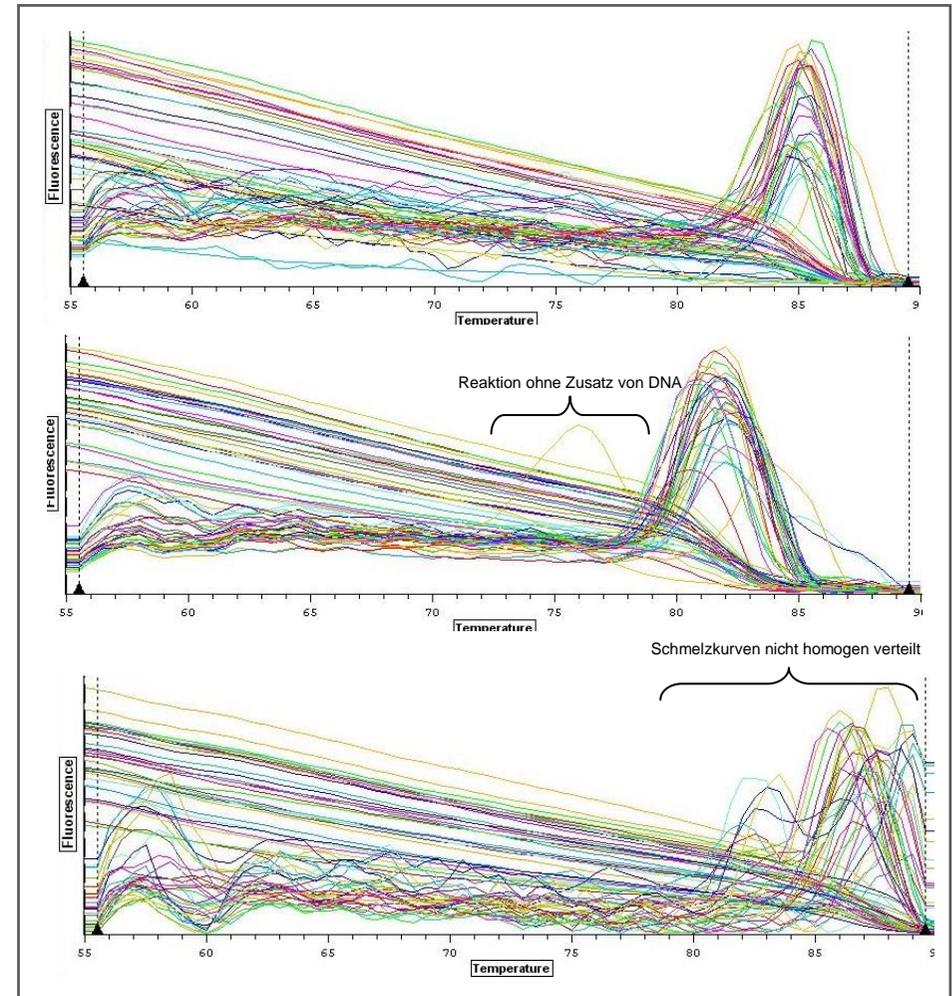
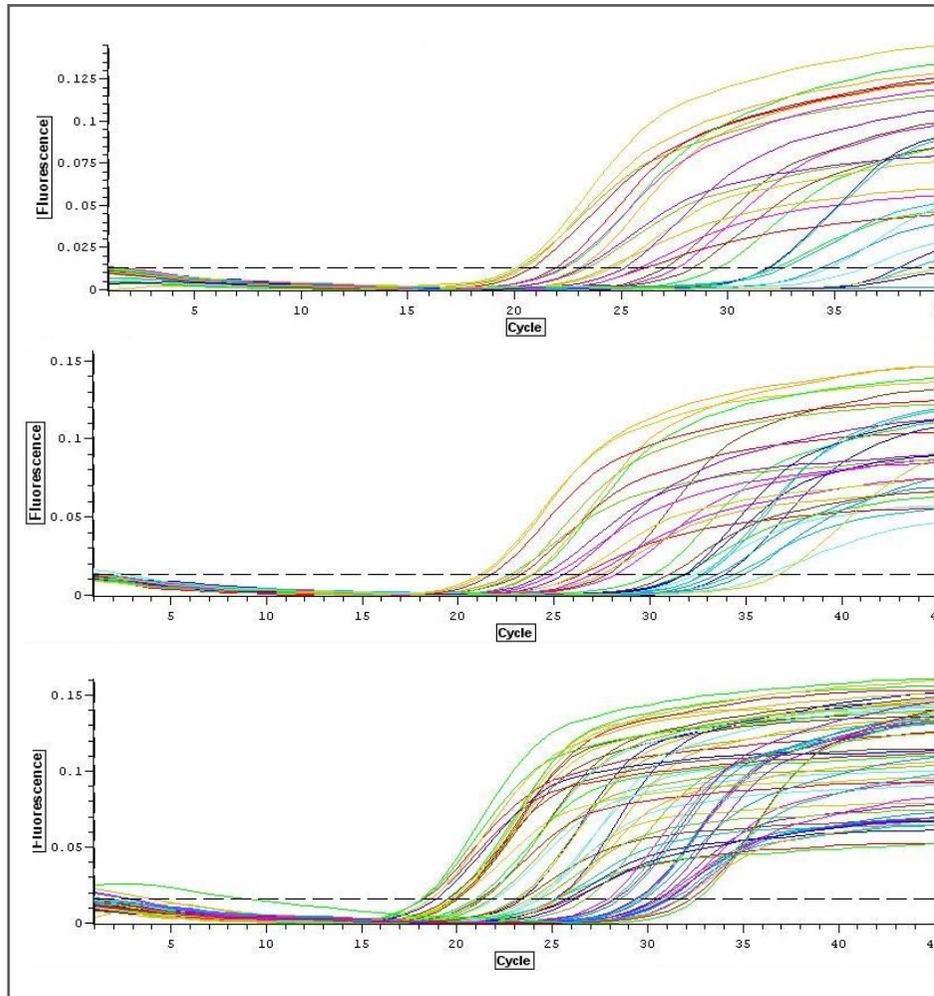


Abbildung 22: Ct-Kurven (links) und Tm-Kurven (rechts) mit Hilfe des Primersets *rpoB* 15 (oben), *rpoB* 6 (Mitte) und *rpoB* 1C (unten) (Doppelbestimmung ist nur bei den Ct-Kurven des Primersets *rpoB* 1C dargestellt).

3.4.3.2 Spezifität des Primerpaares rpoB 15

Die Amplifikation der DNA aus Einzelkolonien unter Anwendung des Primerpaares rpoB15 ergab ein hohes Ct-Wertespektrum zwischen 14 und 36 (Tab. 39). Dies lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen der isolierten Nukleinsäuren bei der DNA-Extraktion erklären. Alle Templates mit Ausnahme der Probe-Nr. 50 wurden amplifiziert. Für die Negativkontrolle wurde keine Amplifikationskurve erhalten. Das Schmelztemperaturespektrum lag zwischen 82 °C und 88 °C mit mehr Akkumulation bei 85 °C ($M: 85,33$; $SD: 1$). Alle Amplifikationskurven sind, wie in Abbildung 21 dargestellt, sigmoid angestiegen. Die Schmelzkurven weisen trotz relativ hoher Standardabweichung auf eine zielspezifische Amplifikation hin, davon ausgenommen Probe 61 (Nr. 50) ($T_m = 75$ °C) und die Negativkontrolle.

Tabelle 39: Ergebnisse der PCR-Analyse zur Bestimmung der Spezifität des Primerpaares rpoB 15 (Ct-Werte und Schmelztemperaturen)

Nr.	Kolonien-nr.	Ct-Werte	Tm-Werte	Nr.	Kolonien-nr.	Ct-Werte	Tm-Werte	Nr.	Kolonien nr.	Ct-Werte	Tm-Werte
1	1	16,98	85,0	18	38	14,36	85,0	35	71	27,29	87,5
2	6	21,68	85,5	19	39	14,44	85,5	36	72	15,61	85,0
3	10	17,49	85,0	20	40	29,62	85,5	37	73	17,92	86,0
4	14	20,11	84,5	21	41	29,27	87,0	38	77	17,90	85,0
5	15	19,95	85,0	22	44	21,97	85,5	39	79	14,84	85,5
6	17	26,70	85,5	23	46	29,00	87,0	40	98	23,14	85,5
7	18	22,34	85,5	24	48	25,67	87,5	41	100	27,80	84,0
8	19	13,97	85,0	25	47	29,80	86,5	42	102	27,61	84,0
9	20	14,98	85,0	26	55	31,55	85,5	43	112	36,07	85,0
10	24	17,51	85,0	27	56	26,62	85,0	44	113	32,39	85,0
11	25	17,41	85,0	28	58	35,26	84,5	45	127	30,28	86,5
12	27	20,22	84,0	29	59	27,30	84,5	46	131	29,59	88,0
13	29	30,07	86,0	30	60	36,80	84,5	47	132	17,14	85,0
14	31	15,27	85,5	31	62	33,91	85,5	48	135	17,07	85,0
15	32	15,01	85,5	32	64	30,17	84,5	49	136	16,67	85,0
16	36	14,96	86,0	33	67	34,16	85,5	50	61	n. v.	75,0
17	37	18,16	85,5	34	69	22,26	82,0	51	N	n. v.	76,5

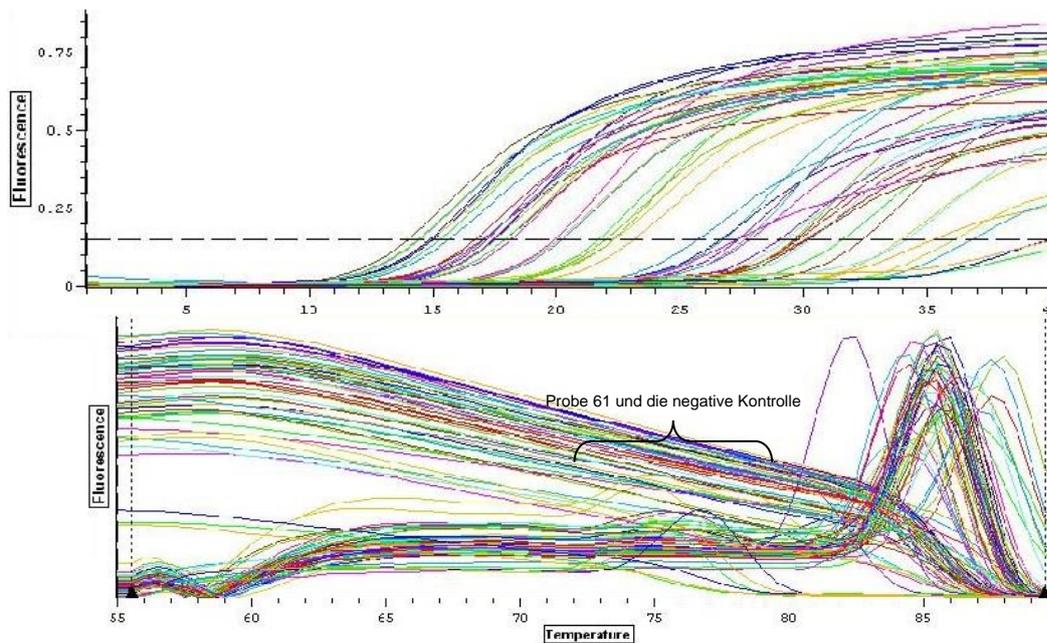


Abbildung 23: Amplifikationskurven zur Bestimmung der Spezifität des *rpoB* 15 (oben) und entsprechende Schmelzkurven der PCR-Produkte (unten), die drei kleineren Schmelzkurven gehören zu den zwei Negativkontrollen und zu Probe Nr. 50.

3.4.3.3 Bestimmung der Annealing-Temperatur für *rpoB* 15

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur des Primerpaares *rpoB* 15 wurde eine Gradienten-PCR-Analyse durchgeführt. Als Template wurde für jede Gradienten-Analyse nur eine Probe verwendet, sodass die Schwankungen, die durch unterschiedliche Proben verursacht würden, vermieden wurden. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde zwar auf die resultierenden Ct-Werte und Schmelzkurven (Tab. 40, Abb. 24 und Abb. 25) geachtet, mehr Gewicht wurde aber auf die Stärke der DNA-Banden während der Gelelektrophorese (Abb. 26) gelegt. Wie in Tabelle 40 aufgelistet, lagen sowohl die Ct-Werte als auch die T_m-Werte sehr nahe beieinander. Die Schmelztemperatur von 85,5 °C (Tab. 40 und Abb. 25) weist auf eine zielspezifische Amplifikation hin.

Tabelle 40: Ergebnisse der Gradientenanalyse zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für Primerpaar rpoB 15

Probennr. (P3H8)	Annealing-Temperatur	Ct-Wert	Tm (°C)
1	52,0 °C	23,82	85,5
2	52,4 °C	23,95	85,5
3	53,3 °C	25,09	86,0
4	54,5 °C	24,56	85,5
5	56,2 °C	23,82	86,0
6	58,4 °C	24,29	85,5
7	61,0 °C	24,64	85,5
8	63,1 °C	25,30	85,5
9	64,7 °C	24,64	85,5
10	65,8 °C	24,04	85,5
11	66,7 °C	23,03	85,5
12	67,0 °C	24,76	85,5

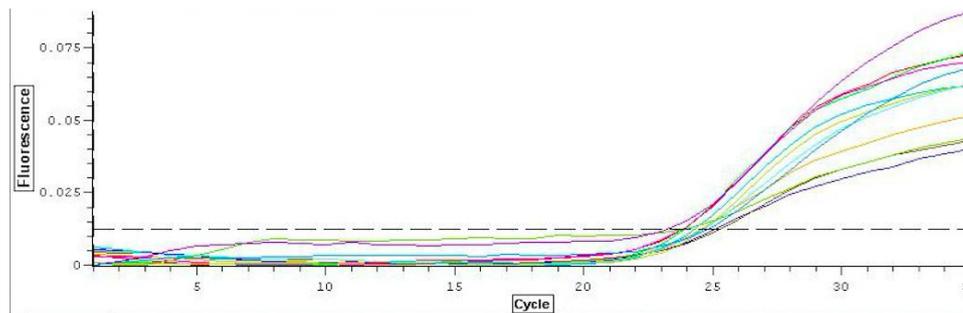


Abbildung 24: Amplifikationskurven resultierend aus der Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für Primerpaar rpoB 15.

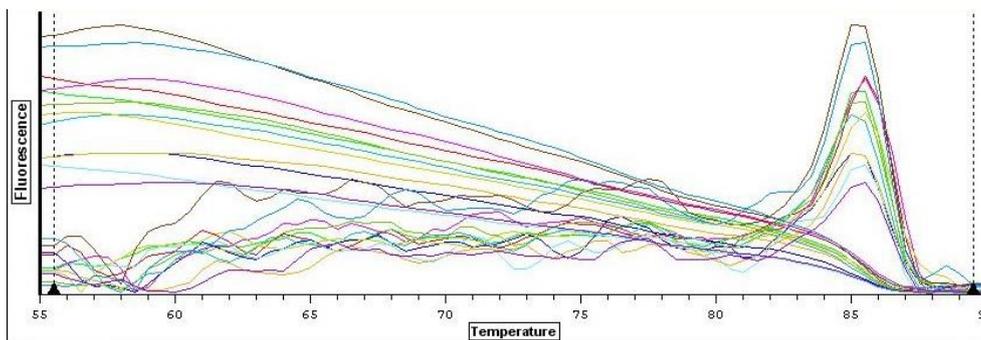


Abbildung 25: Schmelzkurvenanalyse der Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für Primerpaar rpoB 15. Die Schmelztemperaturen sind bei 85,5 °C akkumuliert.

Bei der ersten Gradientenanalyse wurden die PCR-Produkte nach der Amplifikation nicht purifiziert, weshalb die getrennten DNA-Banden nicht die ideale Auflösung aufwiesen (Abb. 26). Dennoch ist zu sehen (Abb. 26), dass die DNA-Banden von Proben, die bei Annealing-Temperaturen von 56 bis 60 °C (Nr. 5, 6 und 7) amplifiziert wurden, eine bessere Qualität aufweisen.

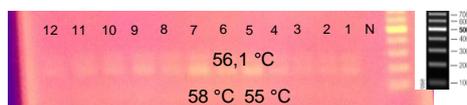


Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für das Primerpaar *rpoB* 15. Die Elektrophorese wurde ohne vorherige PCR-Aufreinigung durchgeführt, weshalb die Qualität der DNA-Banden nicht ideal ist. Allerdings ist zu sehen, dass die Qualität der DNA-Banden zwischen 54-61 °C deutlich besser war. Die DNA-Banden von rechts nach links: Negativkontrolle, Probe Nr. 1 bis 12 (Tab. 40).

Die zweite Gradienten-PCR erfolgte unter Verwendung einer schmaleren Temperaturspanne von 55-67 °C (Tab. 41). So war es möglich zu erkennen, ob bei der bisher verwendeten Annealing-Temperatur von 57 °C eine optimale Amplifikation stattfindet. Im Anschluss an die Amplifikation wurden die PCR-Produkte zur Verbesserung der DNA-Bande purifiziert. Wie in Tabelle 41 dargestellt, liegen die Ct-Werte, resultierend aus der Amplifikation bei den Annealing-Temperaturen zwischen 55-65 °C, sehr nahe beieinander. Die homogenen Schmelzkurventemperaturen (85,5 °C) zeigten eine primerspezifische Amplifikation.

Tabelle 41: Ergebnisse der Gradienten-PCR mit geringer Annealing-Temperatur-Spanne zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für das Primerpaar *rpoB* 15

Probennr. (P8H22)	Annealing-Temperatur	Ct-Wert	Tm
1	55,0 °C	22,49	86,0 °C
2	55,4 °C	21,54	85,5 °C
3	56,1 °C	22,24	85,5 °C
4	57,0 °C	22,44	85,5 °C
5	58,4 °C	21,99	85,5 °C
6	60,2 °C	22,62	85,5 °C
7	62,2 °C	22,57	85,5 °C
8	63,9 °C	23,23	85,5 °C
9	65,2 °C	23,44	85,5 °C
10	66,0 °C	24,72	85,5 °C
11	66,8 °C	21,33	85,5 °C
12	67,0 °C	25,63	85,5 °C

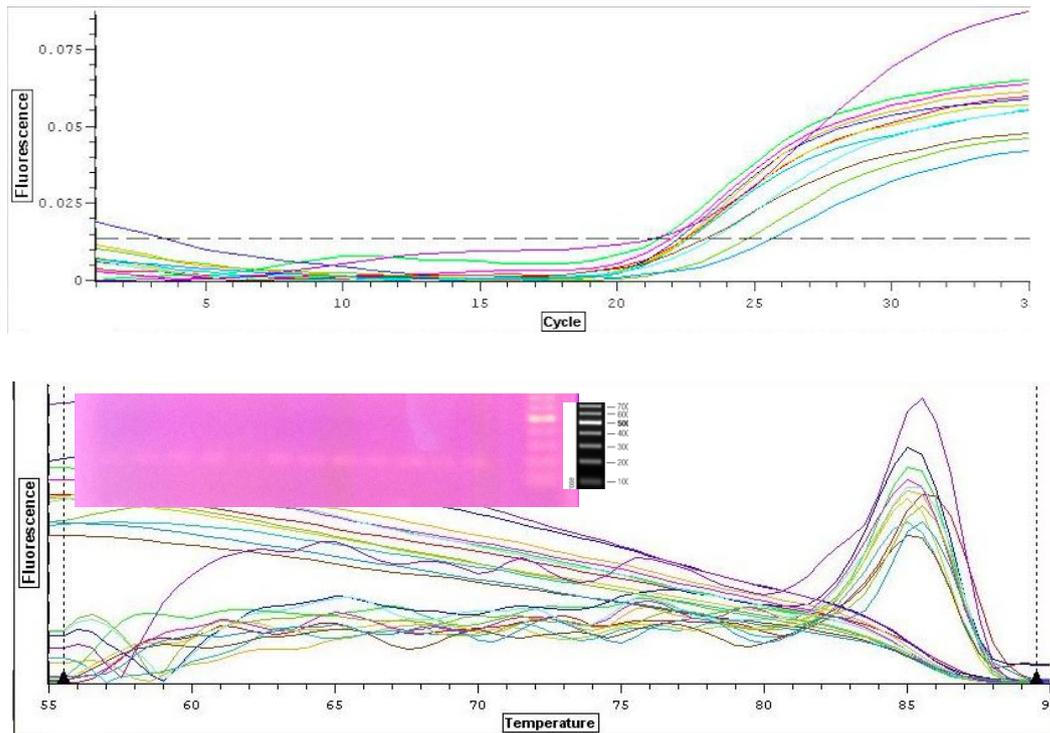


Abbildung 27: Ergebnisse der Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur für das Primerpaar rpoB 15. Oben: Ct-Kurven, resultierend aus der Gradienten-PCR. Unten: Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte und DNA-Banden der Gel-Elektrophorese. Die Schmelzkurven sind bei fast allen Annealing-Temperaturen bei 85,5 °C akkumuliert. Die Qualität der Banden war zwischen 56 °C und 60 °C besser (durch die schlechte Auflösung nicht gut auf dem Foto erkennbar) Die DNA-Banden von rechts nach links: Negativkontrolle, Probe Nr. 1 bis 12 (Tab 41).

Durch das Purifizieren der Amplifikate Post-PCR wurden stärkere DNA-Banden erhalten. Auch beim zweiten Versuch waren die DNA-Banden der Proben, die bei den Annealing-Temperaturen zwischen 56,1-58,4 °C (Nr. 3, 4 und 5) amplifiziert wurden, am deutlichsten zu visualisieren (Abb. 27). Allerdings waren die Intensitätsunterschiede nur marginal. Aufgrund der besseren visuellen Qualität der DNA-Banden bei der Temperaturspanne zwischen 56,1 °C-60,2 °C und des relativ hohen Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,81$) aus der Amplifikation der DNA-Proben mit Hilfe des Primerpaares rpoB 15 bei einer Temperatur von 57 °C, wurde diese Temperatur für weitere Quantifizierungsversuche als optimale Annealing-Temperatur betrachtet. Die Ct-Werte dieser Analyse und die resultierenden T_m-Werte aus der Schmelzkurvenanalyse wurden in Tabelle 42 zusammengefasst. Die Abbildungen 25 und 27 stellen die Amplifikationskurven und die Schmelzkurven dar, die aus dieser Analyse resultierten.

3.4.3.4 Korrelationsanalyse

Für die endgültige Auswahl des geeigneten Primerpaares zum Einsatz in der qPCR-Analyse und um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus den PCR-Analysen mit denen aus dem Plattenkulturverfahren zu überprüfen, wurden die Ct-Werte und \log_{10} KbE/g (Tab. 38) in drei Korrelationen ausgewertet und deren Determinationskoeffizienten aus den Regressionsgeraden ermittelt. Wie in Abbildung 28 dargestellt, ist erkennbar, dass die Ergebnisse der PCR-Analyse mit Hilfe des Primerpaares rpoB 15 die höchsten Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,82$, $P < 0,005$) aufwiesen. Die anderen zwei Analysen unter Anwendung der Primerpaare rpoB 6 ($R^2 = 0,66$) und rpoB 1C ($R^2 = 0,76$) erzielten geringere Determinationskoeffizienten. Die ermittelten P-Werte von allen eingesetzten Primerpaaren lagen niedriger als 0,005, was auf keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden hinweist.

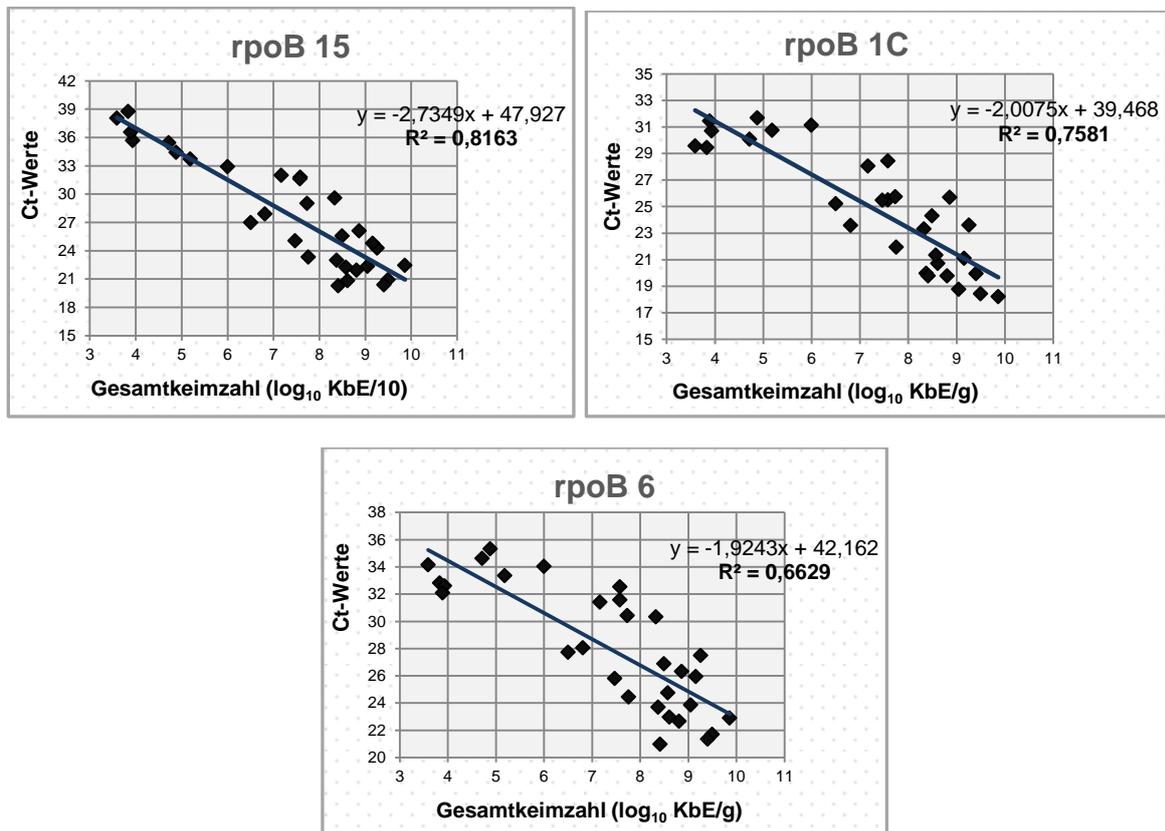


Abbildung 28: Korrelation der Ergebnisse der qPCR (Mittelwert der Ct-Werte) unter Anwendung der Primerpaare rpoB 15 (oben links), rpoB 6 (unten) und rpoB 1C (oben rechts) mit denen aus dem Kulturverfahren (\log_{10} KbE/g: gewichteter Mittelwert).

3.4.4 Diskussion

3.4.4.1 Korrelationsanalyse

Statistische Auswertung

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels des Plattenkulturverfahrens in Anlehnung an die DIN 10161-01:1984-02 gilt als mikrobiologischer Goldstandard und dient als Referenzverfahren im Bereich der Fleischmikrobiologie. Deshalb sollten alle neu-entwickelten Methoden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl trotz der bereits diskutierten Defizite (Abschn. 1.2.2.4) mit dieser verglichen werden (Dolan et al., 2009). Aus diesem Grund wurden auch in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der PCR-Analysen zur Quantifizierung der Keime in Geflügelfleisch mit denen aus dem klassischen Standardverfahren verglichen. Wenn ein Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen untersucht werden soll, wie z. B. zwischen den Ergebnissen aus zwei vergleichbaren Untersuchungsmethoden, wird dieser häufig in einer Korrelation analysiert, denn in einer Korrelation wird der Zusammenhang von sich in wechselseitiger Abhängigkeit voneinander ändernden Größen berechnet. Das Ergebnis einer Korrelationsanalyse wird in Form eines „Korrelationskoeffizienten“ (R), welcher die Exaktheit dieser gegenseitigen Beziehung wiedergibt, und eines P-Wertes angegeben. Der Korrelationskoeffizient gibt die Stärke und die Richtung des Zusammenhangs an. Er liegt zwischen -1 und 1. Während ein Wert nahe -1 einen starken negativen Zusammenhang bezeichnet, spricht ein Wert nahe 1 für einen starken positiven Zusammenhang. Wenn der Wert nahe 0 liegt, besteht kein Zusammenhang. Je nachdem, welche Daten in der Analyse eingesetzt werden, können verschiedene Korrelationskoeffizienten verwendet werden. Wenn die Daten normalverteilt sind und es einen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen gibt, wird meistens der „Pearsons-Korrelationskoeffizient“ verwendet. Oft wird anstelle des Korrelationskoeffizienten R der Determinationskoeffizient R^2 angegeben, d. h. das Quadrat des multiplen Korrelationskoeffizienten. Hier gilt, je näher der Determinationskoeffizient R^2 an 1 liegt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit des linearen Zusammenhangs. Neben der Beurteilung des Determinationskoeffizienten ist der t-Test zur Prüfung der statistischen Signifikanz des vermuteten Zusammenhangs zwischen den Merkmalen x und y sinnvoll. Der daraus resultierende P-Wert sagt aus, ob der Korrelationskoeffizient sich signifikant von 0 unterscheidet, d. h. ob es einen signifikanten Zusammenhang gibt. P-Werte kleiner als 0,05 werden meistens als statistisch signifikant bezeichnet (Grouven et al., 2007). In Anlehnung an die oben beschriebenen statistischen Kriterien wurden zur Bestimmung der Validität der neuentwickelten Real-Time PCR-Methode, deren Ergebnisse, vorliegend als Ct-Werte, in einer Korrelationsanalyse mit den Ergebnissen aus dem klassischen Plattenkulturverfahren, d. h. \log_{10} KbE/g, überprüft und der Determinationskoeffizient R^2 berechnet. Wie in Abschnitt 3.4.4 dargestellt, zeigten die Ergebnisse aus der PCR-Analyse, unter Anwendung vom

Primerpaar rpoB 15, einen besseren Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,82$) im Vergleich zu den Determinationskoeffizienten aus den Analysen mit rpoB 6 ($R^2 = 0,66$) und rpoB 1C ($R^2 = 0,76$). Die resultierenden Determinationskoeffizienten zeigen zwar eine Korrelation zwischen den Ergebnissen der zwei angewendeten Methoden und bestätigen somit die Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse, bedeuten jedoch nicht, dass die neuentwickelten Analysen perfekt funktionieren. Vergleicht man die Ergebnisse der Untersuchungen so wird festgestellt, dass bei gleicher Keimzahl der Proben sehr unterschiedliche Ct-Werte aufweisen. Betrachtet man z. B. die qPCR-Analyse mit dem Primerpaar rpoB 15 und die mit dem Kulturverfahren analysierten Keimzahl von ca. 10^8 KbE/g ($\log_{10} = 8 \pm$) so zeigt sich, dass eine breite Ct-Wertspanne zwischen 21 und 29 aus der gleichen Analyse ermittelt wurde. Wird gleichzeitig keine Plattenkultur durchgeführt, kann anhand der erhaltenen Ct-Werte die Gesamtkeimzahl der Proben nicht ermittelt werden. Deshalb wird in der Regel für die absolute Quantifizierung von Keimen unabhängig vom Kulturverfahren eine Standardkurve bei jeder qPCR-Analyse verwendet (siehe Abschnitt 3.5). Da das Ziel dieses Teils der Arbeit darin bestand, die Ergebnisse der zwei Methoden auf Vergleichbarkeit zu prüfen, werden die Ergebnisse unter Berücksichtigung der verschiedenen Einflussfaktoren auf die Korrelation nach folgend beschrieben und interpretiert:

Detektionsspanne und Spezifität der entworfenen Primer für die Zielbakterien

In Abschnitt 3.3 wurde die Detektionsspanne der generierten Primer mit Hilfe der BLAST-Analyse getestet. So zeigte z. B. Primerpaar rpoB 15 eine breite Detektionsspanne für verschiedene *Enterobacteriaceae*-Spezies, *E. coli*, Salmonellen und nur wenige *Pseudomonas*, während rpoB 6 und 1C eine viel bessere Detektionsspanne für diverse Spezies von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* aufwiesen. Eine Keimbelastung der untersuchten Proben, bestehend aus der Mischung von *Enterobacteriaceae* und *E. coli* und weniger aus *Pseudomonas*, kann den höheren Determinationskoeffizienten bei Verwendung von rpoB 15 im Vergleich zu dem bei der Verwendung der anderen Primer erklären. Die Spezifität eines Primerpaares kann bestimmt werden, indem die Amplifikation der Sequenzen der Zielspezies in einer Mischung von Bakterien mit Hilfe des Primerpaares getestet wird. Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl gibt es keine Bakterien, die nicht zur Quantifizierung in Frage kommen würden. Dies bedeutet, je mehr Stämme mit Hilfe des Primers erfasst werden, desto näher kommen diese an die reale Gesamtkeimzahl der Probe heran. Im Prinzip werden zur Erfassung mehrerer homologer Sequenzen mittels PCR Universalprimer eingesetzt (Clarridge, 2004). Gutiérrez et al. (1998) haben die Verderbsflora von Schweinefleischproben mittels PCR (und ELISA) und unter Anwendung eines 16S rRNA-basierenden Universalprimerpaares quantifiziert und diese mit den Gesamtkeimzahlen des Plattenverfahrens verglichen. Die von den Autoren verwendeten Primer wurden an einer Reihe von verderbserregenden Spezies (*Pseudomonas fluorescens*,

P. putida, *P. fragi*, *P. aureofaciens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter liquifaciens*, *Flavobacterium* spp., *Moraxella* spp. und *Brochothrix thermosphacta*) bei Fleisch getestet und erfolgreich detektiert (Gutiérrez et al., 1998). Dies ist zwar ein positives Ergebnis, dennoch spricht die Erfassung von anderen Spezies mit Hilfe des eingesetzten Primers nicht gegen den Erfolg der PCR-Analyse, da deren Ergebnisse mit der Gesamtkeimzahl der Fleischproben verglichen wurden.

Die Detektionsspanne des Primerpaares rpoB 15 wurde in einer separaten PCR-Analyse unter Anwendung von Nukleinsäuren, die direkt aus den Bakterienkolonien von Geflügelfleischproben (Abschn. 3.4.2) extrahiert wurden, untersucht. Somit konnte praktisch festgestellt werden, inwieweit dieses Primerpaar die Bakterien aus den Geflügelfleischproben detektieren könnte.

Diese Analyse zeigte, dass die Mehrheit der Nukleinsäuren, die direkt aus den Bakterienkolonien von Geflügelfleischproben extrahiert wurden (49 aus 50 DNA-Proben) durch das Primerpaar rpoB 15 detektiert werden können. Da die Ergebnisse der Kultivierung auf Universal-Agar wie Plate Count Agar-Platten (PC-Platten) nur Auskunft über die Quantität der Keimbelastung der Proben geben (Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl) und nicht über ihre Keimzusammensetzung, ist schwer festzustellen, ob die Korrelationsbeeinträchtigung unmittelbar durch die Detektionsspanne der Primer verursacht wurde. Es ist bekannt, dass sich beim Verderb von Lebensmitteln die Anzahl der mesophilen Bakterien (wie *Enterobacteriaceae*) mit steigender Temperatur erhöht (Mead, 2004a; Cox et al., 1998). Da die Mehrheit der Fleischproben über Nacht bei 20 °C bzw. 30 °C bebrütet wurde, und in Anbetracht der Ergebnisse der Keimidentifikation in Abschnitt 3.2, kann davon ausgegangen werden, dass ein hoher Anteil von *Enterobacteriaceae* und weniger von den Pseudomonaden in diesen Proben vorhanden war. Dieser wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das Primerpaar rpoB 15 besser als durch rpoB 6 und rpoB 1C detektiert. Das Primerpaar rpoB 1C, das eine breite Detektionsspanne für *Enterobacteriaceae* besitzt, zeigte ebenfalls einen relativ hohen Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,76$).

Diese Analyse (3.4.3.2) war generell nicht zur Identifizierung der Bakterien geeignet, aber betrachtet man die Bakterienidentitäten in Tabelle 50 (Anhang) und die Ct-Werte in Tabelle 39 ist erkennbar, dass ein großer Teil der hohen Ct-Werte (>29) zu den grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus* spp. und *Lactobacillus* spp. gehört, während die niedrigeren Ct-Werte (<15) meistens zu Bakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae* gehören. Diese Ct-Wertspanne könnte einerseits mit der breiteren Detektionsspanne des Primerpaares für Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* erklärt werden, könnte aber andererseits auch in der Größe der entnommenen Kolonien zur DNA-Extraktion oder der Effizienz der DNA-Extraktion begründet sein.

Kultivierbarkeit der Keime aus Geflügelfleischproben

Die andere Frage ist jedoch, ob alle Bakterien, die auf den Fleischproben vorhanden waren, auch auf den PC-Platten wachsen können. Der PC-Agar ist ein komplexes, universelles Nährmedium, welches für das Wachstum vieler verschiedener Mikroorganismen geeignet ist. Allerdings ist die Vielfalt innerhalb der Fleischflora sehr groß (Mead, 2004a; Fehlhaber, 2001; Cox et al., 1998). Die Mikroorganismen benötigen, abhängig von ihren physiologischen Fähigkeiten unterschiedliche Makro- und Mikroelemente für ihr Wachstum. Viele Mikroorganismen stellen größere Ansprüche an mehrere Wachstumsfaktoren und wichtige organische Nährstoffe (Madigan und Martinko, 2009). Außerdem sind Mikroorganismen nicht nur von einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen abhängig, sondern auch von Umweltfaktoren wie a_w -Wert, Sauerstoffgehalt, pH-Wert und vor allem der Temperatur. Bezüglich der Wachstumstemperatur können die Mikroorganismen sehr unterschiedliche Ansprüche haben. Es kommt in der Regel darauf an, welchen Temperaturbereich sie in ihrem natürlichen Lebensraum vorfinden (Cox et al., 1998). Psychrophile Mikroorganismen können z. B. bei mittleren und hohen Temperaturen nicht mehr wachsen, weil sie an die unteren Temperaturbereiche (optimal 12–15 °C) angepasst sind. Ebenso können die mesophilen und thermophilen Bakterien nicht bei niedrigen Temperaturen wachsen. *Campylobacter* spp. beispielsweise vermehren sich erst bei Temperaturen über 40 °C optimal. Bei der Kultivierung von Mikroorganismen wird daher versucht, die Inkubationstemperatur möglichst nahe am Optimalbereich der zu detektierenden Spezies zu wählen. Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl ist es allerdings nicht möglich, allen Bakterien optimale Temperaturbedingungen zu bieten, denn es gibt auch Unterschiede zwischen einzelnen Spezies sowie innerhalb von Spezies bzw. Subspezies (Messelhäuser, 2010). Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleisch und Fleischerzeugnissen werden die PC-Platten nach DIN 10161-1:1984-02 für 72 h bei 30 °C bebrütet. Von den hauptsächlich in frischen und verdorbenen Lebensmitteln vorkommenden *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. putida*, *P. chlororaphis*) vermehren sich bis auf *Pseudomonas aeruginosa* alle bei 4 °C, jedoch nicht bei einer Temperatur von 41 °C mit Ausnahme von *P. aeruginosa* (Messelhäuser, 2010). So besteht die Möglichkeit, dass einige psychrophile Pseudomonadenstämme in Geflügelfleischproben, insbesondere in frischen Proben, nicht auf den PC-Platten bei 30 °C wachsen, während ihre Nukleinsäuren in der PCR-Analyse amplifiziert werden. Dies kann zur Beeinträchtigung der Korrelation zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden und einer eventuell falschen Einschätzung der Keimbelastung der Proben führen.

Obwohl die Plattenkulturmethode als eine sehr empfindliche Methode betrachtet wird, kann es manchmal zu wenig zuverlässigen Ergebnissen kommen. Es wurde berichtet, dass Zählungen natürlicher Proben unter dem Mikroskop in der Regel viel mehr Organismen umfassen als nach der Kultivierung auf Agarplatten. In der Literatur wird dieser Sachverhalt

als „große Anomalie bei der Zählung von Kolonien auf einer Platte“ bezeichnet. So stellen verschiedene Mikroorganismen in selbst sehr kleinen Proben ganz erheblich unterschiedliche Ansprüche an die Ressourcen und Bedingungen einer synthetisierten Kultur. Somit erlaubt die Kultivierung auf einem Medium unter einheitlicher Bebrütungstemperatur und –zeit nur das Wachstum eines Teils der gesamten Mikroorganismen, was zu einer gewaltigen Unterschätzung der Zahl tatsächlich vorhandener lebender Zellen führen könnte. Die Zählung der Gesamtzellzahl unter Verwendung eines einzigen Mediums und verschiedener Wachstumsbedingungen kann dazu beitragen, dass es zu Unterschätzungen von einer bis zu mehreren Größenordnungen kommt. Außerdem eignet sich dieses Verfahren vor allem für fakultativ anaerobe, aerotolerante Mikroorganismen und wenig empfindliche Anaerobier. Somit werden die strikten Anaerobier unter Anwendung dieser Methode nicht erfasst (Madigan und Martinko, 2009). Die Nukleinsäuren dieser anaeroben Mikroorganismen werden jedoch mittels PCR amplifiziert.

Bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl auf den Platten ist die Grundannahme, dass eine Kolonie immer aus einer Zelle stammt, nicht immer richtig. Bei den Spezies, deren Zellen zusammen im Cluster wachsen, kann dieses zu einer relativ starken Unterschätzung der wahren Population führen. Manche *Staphylococcus* Spezies sind z. B. dafür bekannt, „Clumps“ (Klümpchen) von Mikroorganismen zu bilden, wobei aus jedem Clump eine Kolonie hervorgeht. Deshalb wird auch grundsätzlich der Begriff „KbE pro ml oder g“ statt Bakterien pro ml oder g als Ergebnis angegeben (Madigan und Martinko, 2009). Dies ist anders bei der DNA-basierenden Quantifizierung von Bakterien, bei der eine Kopie vom amplifizierten Zielgen als eine Zelle betrachtet wird (im Falle der Einzelkopiegene) (Cocolin und Rantsiou, 2012). Deshalb können solche „Irrtümer“ beim Plattenzählen zu Problemen bei der Korrelation der beiden Methoden führen.

Eine weitere Problematik des Plattenkulturverfahrens stellt die Unfähigkeit dieser Methode zur Detektion der Bakterien im „viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand bzw. sublethal geschädigter Zellen dar, wodurch die Bestimmung der wahren Population in den Proben erschwert wird. VBNC ist ein Latenzzustand, in dem die Mikroorganismen nur eine diskrete metabolische Aktivität zeigen und sensorische Fehler hervorrufen aber sich nicht replizieren können. Diese wird in Lebensmitteln durch Stresssituationen wie Nährstoffmangel oder niedrige Temperatur induziert (Oliver, 2005). Dieser Zustand ist in Folge der Behebung der Stresssituation reversibel und die bakteriellen Zellen sind in der Lage ihren Gesundheitszustand wiederherzustellen. Obwohl der unmittelbare Zusammenhang des VBNC-Zustandes in Bakterien in Verbindung mit dem Verderb des Lebensmittels nicht ausreichend erforscht ist, wurde über die Präsenz von geschädigten Bakterien in pasteurisierter Milch und auf säuregereinigten Rinderschlachtkörpern (Hart und Kite, 1977) sowie über das Vorkommen von Milchsäurebakterien im VBNC-Zustand in Wein berichtet

(Millet and Lonvaud-Funel, 2000). Gray et al. (1973) berichteten, dass geschädigte *Pseudomonas fluorescens*-Zellen, die offensichtlich nicht auf Agar kultivierbar sind, durch die Aufwärmung der Bakterien bei 36 °C für 2 h wieder aktiviert werden können. Da die verwendeten Geflügelfleischproben frisch gekauft wurden, wurden diese kaum post-mortalen Weiterbearbeitungsprozessen unterzogen, weshalb das Vorkommen von geschädigten bakteriellen Zellen in großer Anzahl höchstwahrscheinlich weniger in Frage kommt. Dennoch ist die Versetzung einiger mesophiler Spezies durch Kälte oder bei manchen psychrophilen Stämmen durch Inkubation bei 30 °C in den VBNC-Zustand durchaus möglich. VBNC-Zellen wachsen zwar nicht auf Agarplatten, jedoch wird deren DNA in der PCR amplifiziert.

DNA-Extraktion

Einen sehr kritischen Punkt für die sensitiven, amplifikationsbasierenden Verfahren stellt die Qualität der Nukleinsäuren dar. Diese ist ausschlaggebend für den Erfolg oder Misserfolg der sich anschließenden molekularbiologischen Analyse (Bernardo et al., 2007). Die Qualität der DNA-Proben wird in verschiedene Faktoren, wie der Anwesenheit von PCR-Inhibitoren in der Probenmatrix, den Schädigungsgrad (z. B. Depurination) der DNA und der durchschnittlichen Fragmentenlänge der enthaltenen Nukleinsäuren, unterteilt. Diese Faktoren sind wiederum von der Probe selbst sowie den physikalischen und chemischen Parametern des verwendeten Extraktionsverfahrens abhängig. Ein geeignetes Extraktionsverfahren trägt dazu bei, dass der nachzuweisende DNA-Abschnitt so weit wie möglich in hochmolekularer Form und frei von hemmenden Substanzen erhalten wird. Bei der DNA-Extraktion aus Lebensmittelproben stellt insbesondere die Natur der Lebensmittelmatrix ein zentrales Element dar, da die Anwesenheit von vielen Komponenten wie Fetten, Zuckern, Proteinen und sekundären Inhaltsstoffen zu einer Inhibierung der PCR führen kann. Außerdem üben die auf der Matrixoberfläche existierenden DNA-abbauenden Enzyme eine hemmende Wirkung aus (Messelhäuser, 2010).

Grundsätzlich erfolgt das DNA-Extraktionsverfahren, mit oder ohne Hilfe eines kommerziellen Kits, nach ähnlichem Prinzip. Nach einer initialen Homogenisierung der Probe findet in der Regel der Zellaufschluss statt, während dieser und in einem sich anschließenden Waschschriff die inhibitorischen Substanzen entfernt werden. Danach wird die DNA an eine DNA-adsorbierende Matrix gebunden und nach dem Waschen und der Aufreinigung von der Matrix eluiert und anschließend ausgefällt. Die Lyse kann durch verschiedene physikalische (Ultraschall, Mörsen, Vortexen oder Homogenisierung durch Labormixer), chemische (Detergenzien wie SDS, GuSCN und Triron-X) oder biologische (Verwendung von Enzymen wie Proteinase K) Methoden erfolgen, wobei meistens eine Kombination aus mehreren dieser Methoden effektiver wirkt (Messelhäuser, 2010). Die Zerstörung der Zellwandintegrität reicht manchmal nicht aus, um die DNA-Amplifikation zu erlauben. Zusätzlich ist die enzymatische Degradation der Zelle notwendig. Unzureichende

Lyse kann sich aus mangelhaften Lyse-Reaktionsbedingungen, Enzyminaktivierung oder lytischen Enzymen mit schlechter Qualität oder Konsistenz ergeben (Wilson, 1997). Durch eine fehlerhafte Lyse kann der Kontakt mit den Nukleinsäuren als Amplifikationziel in der PCR verhindert werden (Wilson et al., 1993). Dies kann insbesondere bei grampositiven Bakterien mit dicker Mureinschicht in ihrer Zellwand problematisch werden. Die höheren Ct-Werte bei den grampositiven Stämmen in der PCR-Analyse zur Bestimmung der Detektionsspanne des Primerpaares rpoB 15 kann in diesem Zusammenhang erklärt werden und auch die Beeinträchtigung der Korrelationsergebnisse.

Auch die Degradation von Ziel-DNA kann zu einer unerwünschten Fehlreaktion führen. Selbst bereits amplifizierte DNA kann degradiert werden. Dieses kann durch physikalische, chemische und enzymatische Prozesse erfolgen (Wilson et al., 1994). Die Stabilität der primären Struktur der DNA ist prinzipiell gegen Hydrolyse, nichtenzymatische Methylierung, oxidative Schädigung und enzymatische Degradierung anfällig (Lindhal, 1993). Nukleasen können z. B. durch unvorsichtige Handhabung aus dem Probenmaterial in die DNA-Extrakte gelangen und später die PCR-Reaktion inhibieren (Gibson et al., 1994). Nicht-spezifische Degradierung der DNA kann in Anwesenheit von Restriktionsendonukleasen entstehen (Alonso et al., 1992). Nukleasen werden von vielen Bakterien produziert, jedoch zeigen manche DNasen ungewöhnliche Hitzestabilität und sind in der Lage, genomische DNA während der Amplifikation zu hydrolysieren (Gibson et al., 1994). Bakterielle Zellen, deren Überreste (engl. debris) Proteine und Polysaccharide, die in vielen Studien als Inhibitionsfaktoren benannt wurden, können die Ziel-DNA möglicherweise mit physikalischen Effekten für die Polymerase unverfügbar machen. Ein Nicht-Vorhandensein der Ziel-DNA kann die Amplifikation beeinträchtigen.

Eine große Gefahr für die Nukleinsäurepräparationen stellt auch die Kontamination durch Proteine, Nukleasen, Salze, Makromoleküle oder andere Nukleinsäuren dar. Wie oben beschrieben, kommen diese häufig als Matrixkomponenten vor. Viele Studien berichten, dass diese Inhibitoren den Anstieg der Real-Time PCR-Kurven verzögern können, was eventuell zur Unterschätzung der effektiven DNA-Menge, die in einer Probe vorhanden ist, führen kann. Dies bezeichnet man als „Matrix-Effekt“ (Rådström et al., 2004; Wilson, 1997). Agrimonti et al. (2013) untersuchten in einer Studie zur Quantifizierung von *Salmonella enterica* den Matrix-Effekt von Geflügelfleisch auf die DNA-Amplifikation. Hierzu haben diese Autoren die Amplifikationseffizienz von Nukleinsäuren, die direkt aus den Kolonien extrahiert wurden, bestimmt und mit denen aus den mit *Salmonella enterica* beimpften Proben verglichen. Nach Angaben dieser Studie wies die PCR-Analyse der beimpften Proben keinen signifikanten Unterschied zu den Proben aus den Kolonien auf. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht direkt auf die Bestimmung der Gesamtkeimzahl übertragbar, da die

Interferenz zwischen Matrixinhibitoren mit vielen verschiedenen Bakterienstämmen nicht ausreichend erforscht ist.

Um die Existenz der Inhibitoren bei der DNA-Extraktion zu minimieren, wurden alle Geflügelfleischproben nach der Homogenisierung einem Waschschrift unterzogen (Abschn. 3.1.2). Dieser sollte dazu beitragen, dass Proteine, Kollagen und andere Fleisch-Matrixkomponenten vor der DNA-Isolierung eliminiert wurden. Ziel dieser Methode war es, die Inhibitoren so weit wie möglich zu entfernen und somit stets gut amplifizierbare Nukleinsäuren zu erhalten. Jedoch ist möglicherweise durch diesen Schritt ein Verlust an Amplifikationsmaterial entstanden, welcher die Korrelation der anschließenden PCR-Analyse mit dem Kulturverfahren negativ beeinflusst haben könnte.

Um eine akzeptable Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR-Analyse und dem Kulturverfahren zu erreichen, sollte DNA aus möglichst allen Bakterienspezies, die in Geflügelfleisch vorkommen (grampositive und gramnegative Stämme) eingesetzt werden. Deshalb sollte das angewendete Extraktionsverfahren in der Lage sein, auch die Nukleinsäuren aus Bakterien mit schwer lysierbarer Zellwand zu isolieren. Hierzu wird häufig ein proteolytisches Enzym wie z. B. Proteinase K oder Lysozym im Lyseschrift eingesetzt. Diese Enzyme sind in der Lage, die dicke Mureinschicht in der Zellwand der grampositiven Bakterien abzubauen (Busch, 2010). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete DNA-Extraktionskit (Fast ID[®] Genomi DNA Extraktionskit) eignet sich nach Angaben des Herstellers [Genetic (Europe) ID] zur Isolierung der bakteriellen DNA aus verschiedenen Lebensmitteln. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben wurde, bestätigte die Studie von Irwin et al. (2014), dass das Kit auch grampositive Bakterien erfassen kann. Dennoch zeigte diese Studie auch, dass das Fast ID[®] Kit mittelmäßige Ergebnisse hinsichtlich der DNA-Ausbeute und -Qualität im Vergleich zu anderen untersuchten Kits lieferte. Die in dieser Arbeit erhaltenen hohen Ct-Werte, die bei der Amplifikation der DNA aus grampositiven Kolonien erzielt wurden, weisen möglicherweise darauf hin, dass die DNA dieser Bakterien nicht mit gleicher Effizienz, wie die der gramnegativen, extrahiert werden kann. Derzeit empfiehlt der Hersteller des Kits den zusätzlichen Einsatz von Lysozym zur Erhöhung der DNA-Extraktionseffizienz aus grampositiven Bakterien. In Anbetracht des breiten Bakterienspektrums in Geflügelfleisch und der matrixbedingten Inhibitoren des Gewebes war eine vollständige und kontaminationsfreie Erfassung des gesamten Bakterienspektrums schwer zu realisieren. Diesbezüglich und je nach Kultivierbarkeit der Flora auf den Nährplatten könnte die Korrelation zwischen den Ergebnissen der Methoden negativ beeinflusst werden.

Detektion von toten und lebendigen Bakterien

Abgesehen von Prä-PCR und plattenkulturbedingter Problematik stellt die PCR-Analyse selbst noch eine Einschränkung für die Korrelation zwischen zwei Methoden dar. Denn so

viele Vorteile die qPCR-Technologie in Bezug auf Detektion und Quantifizierung der Mikroorganismen anbietet, stellt die Unfähigkeit zwischen DNA von toten und lebendigen bakteriellen Zellen zu diskriminieren doch einen großen Nachteil dar (Nocker und Camper, 2006). In wie weit diese Einschränkung die Analyse negativ beeinflusst, hängt prinzipiell vom Anteil der vorhandenen toten Zellen in der Probe ab. Die Schädigung der Zellen oder der Zelltod werden durch Veränderungen der optimalen Wachstumsbedingungen der Bakterien verursacht. Diese Veränderungen können z. B. durch Weiterbearbeitungs- und Konservierungsprozesse wie Erhitzen, Erfrieren, Zerkleinern, Räuchern und Zugabe von Salz in Lebensmitteln induziert werden (Barbut, 2004). Frische Fleischproben werden jedoch, abgesehen vom Kühlen, Zerkleinern und Verpacken, im Vergleich zu anderen verarbeiteten Lebensmitteln nur wenigen Prozessschritten ausgesetzt. Deshalb ist eine große Anzahl von toten und geschädigten Zellen in den verwendeten Geflügelfleischproben weniger wahrscheinlich. Abgesehen davon wurde ein großer Teil der Proben über Nacht bei 20 °C und 30 °C inkubiert, was das Wachstum von vielen mesophilen Stämmen gefördert hat. Dennoch können die Proben mit toten Zellen durch externe Quellen (z. B. Luftkeime oder Laborausüstung) kontaminiert werden. Die Amplifikation von Nukleinsäuren aus bereits toten Zellen kann zum Erzielen falsch-positiver Ergebnisse und letztendlich zur Überschätzung der Gesamtkeimzahl führen, welche die Korrelation mit der Plattenzahl negativ beeinflusst.

3.4.4.2 Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelztemperaturanalyse der PCR-Produkte stellte neben der Korrelationsanalyse ein wertvolles Mittel dar, um die Einsetzbarkeit der generierten Primer in der qPCR miteinander zu vergleichen. So zeigten die Schmelzkurven der PCR-Produkte, die mit Hilfe des Primerpaares rpoB 15 amplifiziert wurden, homogene akkumulierte Schmelzkurven im zu erwartenden Temperaturbereich, was auf eine zielspezifische Amplifikation hinweist. Die T_m-Werte bei der Amplifikation unter Anwendung vom Primerpaar rpoB 6 zeigten eine größere Standardabweichung als bei der Amplifikation mit Hilfe vom Primerpaar rpoB 15. Dennoch lagen die Kurven im zu erwartenden Temperaturbereich. Dies war bei den PCR-Produkten, die mit Hilfe vom Primerpaar rpoB 1C amplifiziert wurden, nicht der Fall. Die Schmelzkurven waren nicht ausreichend homogen im zu erwartenden Temperaturbereich verteilt. Dies kann im Zusammenhang mit einem hohen Degenerationsgrad (5 Nukleotide) des Primerpaares und ein dadurch verursachtes Risiko, mehr unspezifische PCR-Produkte zu erhalten, erklärt werden. Degenerierte Primer können sich je nach Degenerationsgrad durch ihre degenerierten Nukleotide an unrelevante Sequenzen binden und dadurch eine Amplifikation von nicht spezifischen Sequenzen des Templates verursachen (Linhart und Shamir, 2005). Deshalb wurde das Primerset rpoB 1C unabhängig von den Ergebnissen der Korrelationsanalyse für die weiteren PCR-Versuche ausgeschlossen.

3.4.4.3 Bestimmung der Annealing-Temperatur für das Primerpaar rpoB 15

Im Prinzip richtet sich die Annealing-Temperatur nach der Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Primer. Es gibt verschiedene Methoden für die Berechnung der T_m der Primer. Am einfachsten wäre, die Schmelztemperatur der Primer näherungsweise aus dem GC-Gehalt anhand der folgenden Formel (Nr. 4) zu berechnen:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Allerdings ist diese Methode nur für kürzere Primer (bis 20 bp) anwendbar. Eine empirische Methode zur Bestimmung der genaueren Annealing-Temperatur stellt die Gradienten-PCR dar. Dafür wird ein PCR-Cycler benötigt, der in der Lage ist, innerhalb des Thermoblocks einen Temperaturgradienten zu erzeugen. Auf diese Weise ist es möglich, in einem einzigen Lauf eine ganze Reihe von verschiedenen Temperaturen auszutesten und somit die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. Um das Verfahren präziser einzusetzen, werden in der Regel zwei PCR-Analysen durchgeführt: die erste mit einem „steileren“ Gradienten, d. h. einer größeren Temperaturdifferenz zwischen der linken und der rechten Blockseite, z. B. 15 °C oder 20 °C und die zweite mit einem „flacheren“ Gradienten, der sich auf den Temperaturbereich beschränkt, der im ersten Versuch die besten Ergebnisse erbrachte. So wurde die optimale Annealing-Temperatur für das Primerpaar rpoB 15 mit Hilfe einer Gradienten-PCR bestimmt. Die Ergebnisse der Gradienten-PCR haben zwar auf einen optimalen Temperaturbereich zwischen 56-58 °C hingewiesen, waren aber nicht so eindeutig, dass eine definitive Temperatur festgelegt werden konnte. Wie in Abschnitt 3.4.2. (Tab. 40 und 41) dargestellt, waren die Ct-Werte der Amplifikate sehr ähnlich. Die Schmelztemperaturen von allen PCR-Produkten lagen im zu erwartenden Bereich. Die Qualität der DNA-Banden, die elektrophoretisch getrennt wurden, war das einzige Kriterium, das Unterschiede zwischen den gut amplifizierten und den weniger gut amplifizierten Produkten aufzeigte. Die Erstellung einer Gradienten-PCR ist die meist verwendete Methode zur Bestimmung der optimalen, präzisen Annealing-Temperatur für neu generierte Primer. Allerdings ist auch bei dieser Methode eine kritische Betrachtung der Ergebnisse nötig, da die Temperaturverteilung des Thermoblocks häufig nicht so uniform ist, wie es der Hersteller angibt (Saunders et al., 2001). Das kann manchmal zur falschen Interpretation der optimalen Annealing-Temperatur führen. Dennoch wurde aufgrund der bisherigen positiven Ergebnisse der PCR-Analysen unter Anwendung von rpoB 15 mit den deutlichsten DNA-Banden bei Annealing-Temperaturen zwischen 56-58 °C, die Annealing-Temperatur von 57 °C für weitere Analysen ausgewählt.

3.4.5 Schlussfolgerung

Das Ziel dieses Teils der Arbeit bestand darin, anhand verschiedener Kriterien den best funktionierenden Primer für weitere Analysen auszuwählen, die optimalen PCR-Bedingungen für diesen Primer einzustellen und die Korrelation zwischen den Ergebnissen der PCR-Analyse mit denen aus dem Kulturverfahren zu analysieren. Dazu wurden drei PCR-Analysen durchgeführt, in denen die drei ausgewählten Primerpaare (rpoB 15, rpoB 6 und rpoB 1C) eingesetzt und die PCR-Bedingungen so optimal wie möglich eingestellt wurden. Die Ct-Werte, resultierend aus diesen Analysen, wurden mit der Gesamtkeimzahl aus der Plattenkulturmethode in drei Korrelationsanalysen verglichen und die Determinationskoeffizienten (R^2) berechnet. Der beste R^2 -Wert wurde aus der PCR-Analyse unter Anwendung von rpoB 15 erzielt ($R^2 = 0,82$; $P < 0,005$). Durch die diskutierte Problematik in Bezug auf die PCR-Analyse (PCR Inhibition, Nukleinsäurekontamination, DNA-Extraktionseffizienz, Primerspezifität, Diskriminierung zwischen toten und lebendigen Zellen, etc.) sowie die problematischen Faktoren des Kulturverfahrens (Kultivierbarkeit der Mikroorganismen, VBNC-Zustand der Zellen, Auswertung der Plattenzahl etc.) lässt sich das Erreichen einer perfekten Korrelation ($0,99 < R^2 < 1$) zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden schwer realisieren. In Anbetracht der relativ hohen Determinationskoeffizienten der PCR-Analyse unter Anwendung vom Primerpaar rpoB 15 im Vergleich zu den anderen eingesetzten Primerpaaren und den akzeptablen Schmelzkurven der PCR-Produkte dieses Primersets sowie der nicht vorhandenen Ct-Kurve der Negativkontrolle, wurde das Primerpaar rpoB 15 (Forward Primer: 5'TATCCGTTCCGTTGGCGAAA3' Reverse Primer: 5'TGGCTGGAACCGAAGAACTC3') für weitere qPCR-Analysen zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch ausgewählt. Die Bestimmung der Spezifität und die Detektionsspanne der Primerpaare bei der Amplifikation der Nukleinsäuren aus der Geflügelfleischflora zeigte, dass trotz sehr variabler Ct-Werte und nicht im perfekten Bereich liegender Schmelzkurven bei einigen Proben, das Primerpaar rpoB 15 alle Templates detektierte. Mit Hilfe der Gradienten-PCR wurde die optimale Annealing-Temperatur für dieses Primerpaar mit 57 °C bestimmt und somit die Amplifikationsbedingungen für die anschließenden Quantifizierungsanalysen optimiert.

3.5 Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch mittels qPCR

3.5.1 Ziel und Aufbau der Versuche

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit bestand darin, ein quantitatives Real-Time PCR-System zu entwickeln, mit dem anhand einer Standardkurve die Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben bestimmt werden kann. Dazu wurde mit Hilfe einer verdorbenen Geflügelfleischprobe eine Bakterienmischkultur hergestellt und das bakterielle Wachstum photometrisch verfolgt. Als das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht wurde, wurde aus dieser Bakterienmischkultur eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt, die zur Kultivierung der Bakterien auf PC-Platten zur Bestimmung der Keimzahl jeder Verdünnung diente. Gleichzeitig wurde aus diesen Verdünnungen DNA isoliert und in der PCR eingesetzt. Eine Standardkurve wurde erstellt, indem die resultierenden Ct-Werte mit den Keimzahlen der gleichen Verdünnungsstufen (\log_{10} KbE/g) korreliert wurden und der Determinationskoeffizient der Regressionsgerade ermittelt wurde. Die Erstellung der Standardkurve wurde automatisch durch die PCR-Software Opticon Monitor™ durchgeführt. Als Templates wurden die 30 DNA-Isolate aus den Geflügelfleischproben, die in Abschnitt 3.4 (P1H1-P10H30) vorbereitet und verwendet wurden, eingesetzt. Die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung anhand der Kalibrationskurve mittels qPCR wurden als \log_{10} GE/g (genomic equivalents) angegeben. In einem parallelen Versuch wurde die gleiche Prozedur wiederholt, mit dem Unterschied, dass die erstellten Verdünnungen zusätzlich einem Aufreinigungsschritt mittels Zentrifugation und Waschen zur Verminderung der PCR-Inhibitoren in der Fleischmatrix und zur Verbesserung der Standardkurvenqualität unterzogen wurden. Die Ergebnisse der Quantifizierung mittels qPCR-Analyse und die Ergebnisse des Plattenkulturverfahrens wurden sowohl für den ersten als auch für den zweiten Versuch in einer Korrelationsanalyse verglichen und die Determinationskoeffizienten berechnet. Die extrahierte DNA aus den Geflügelfleischproben wurden in sechs PCR-Läufen analysiert. Die Versuche, die mit Standards ohne den initialen Waschschrift durchgeführt wurden, wurden als Gruppe A und die Analysen mit Aufreinigung der Standards als Gruppe B bezeichnet.

3.5.2 Methode

3.5.2.1 Erstellung einer Standardkurve mit Hilfe einer Bakterienmischkultur

Ein Gramm Hähnchenfleisch wurde in 100 ml einer mit 0,5 % Glucose [Merck KGaA] versetzten sterilen TSB-Lösung (Tryptic Soy Bouillon) (TSB⁺) [Merck KGaA], bei Raumtemperatur unter Rühren bei 200 rpm bei 20 °C bebrütet, bis das Ende der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterienmischkultur erreicht wurde. Die Zelldichte der Suspension wurde photometrisch bei 600 nm mittels eines Photometers [WPA CO 80.000, Biowave; Harvard Bioscience, Inc] bei 20 °C verfolgt. Hier wurde in bestimmten Zeitintervallen (30 min.) 1 ml der Zellsuspension in eine Mikroküvette pipettiert und in das Zelldichtemessgerät eingesetzt. Die optische Messung erfolgte bei 600 nm. Eine initiale Blindwertmessung wurde mittels 1 ml steriler TSB⁺-Lösung verfolgt. Da die Ernte der Zellen zu einem geeigneten Zeitpunkt erfolgen sollte, wurde das Wachstumsstadium der Bakterienmischkultur periodisch gemessen. Gegen Ende des logarithmischen Wachstums (OD = ca. 0,9) wurden die Bakterienzellen geerntet (Abb. 29). Aus der resultierenden Zellsuspension wurden zwei dezimale Verdünnungsreihen erstellt. Dazu wurde 1 ml aus der Zellsuspension in 9 ml TSB⁺-Lösung pipettiert und dezimal bis 10⁻¹⁰ verdünnt. Aus der ersten Verdünnungsreihe wurden PC-Platten als Doppelbestimmung kultiviert. Die gewachsenen Bakterien auf den PC-Platten wurden ausgezählt und die Gesamtkeimzahl der Fleischproben nach entsprechender Formel (Nr. 3) ermittelt. Die Keimzahl jeder Verdünnung wurde berechnet und als log₁₀ KbE/g wiedergegeben. Für die PCR-Analyse in Gruppe A (ohne Aufreinigung der Standards) wurde aus jeder Verdünnung DNA extrahiert. Das DNA-Extraktionsverfahren wurde mit Hilfe des DNA-Extraktionskits [Bio-Rad Laboratories GmbH] durchgeführt. So wurden zur Erstellung der Standardkurve aus jeder einzelnen Verdünnung Nukleinsäuren (gelöst in 100 µl TE) isoliert. Zur Erstellung der zweiten Verdünnungsreihe (Gruppe B, mit initialem Waschvorgang) wurden 10 ml aus der oben beschriebenen Zellsuspension in 10 Mikrozentrifugengefäße verteilt (je 1 ml) und bei 9.500 g (10.000 rpm) für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet aus jedem Gefäß wurde in 1 ml SMS-Lösung (NaCl 85 % und 1 mM MgSO₄) resuspendiert. Die erhaltenen Zellsuspensionen (je 1 ml) wurden in einem Reagenzglas vereint (insgesamt 10 ml) und homogenisiert. Aus dieser Zellsuspension wurde eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt, indem 1 ml aus der Zellsuspension in 9 ml SMS-Lösung pipettiert und dezimal bis 10⁻¹⁰ verdünnt wurde. Eine DNA-Isolierung erfolgte aus jeder Verdünnung.

3.5.2.2 Absolute Quantifizierung mit Hilfe der Standardkurve

Als Templates für die qPCR-Analysen wurden die 30 DNA-Isolate, die in Abschnitt 3.4.2 (Tab. 35) vorbereitet wurden, verwendet. Die Vorbereitung dieser Proben, Gesamtkeimzahlbestimmung, Entfernung von PCR-Inhibitoren und das DNA-

Extraktionsverfahren wurden in 3.1.2 ausführlich beschrieben. Es wurden insgesamt acht qPCR-Analysen (R1 bis R8) mit Hilfe von Standardkurven durchgeführt. Für die ersten sechs Analysen (R1 bis R6) wurden jeweils 34 Reaktionen eingesetzt, einschließlich der zehn Reaktionen, die als Template Geflügelfleisch-DNA-Proben beinhalteten im Doppelansatz, zwei negativen Kontrollen (Wasser) und sechs Standards (S1 bis S6) auch im Doppelansatz. Die letzten zwei Analysen (R7 und R8) waren eine Wiederholung der sechs Analysen, wobei statt jeweils zehn, 30 Proben gemeinsam (insgesamt 74 Reaktionen) in einem PCR-Lauf eingesetzt wurden. Die qPCR-Analysen R1, R2, R3 und R7 erfolgten, indem für die Erstellung der Kalibrationskurve die normalen Standards (ohne den Waschschrift, Gruppe A) verwendet wurden. Für die Analysen R4, R5, R6 und R8 wurden die aufgereinigten Standards (Gruppe B) verwendet. In allen Reaktionen wurde das Primerset *rpoB* 15 zur Amplifikation der Zielsequenz verwendet. Basierend auf der bereits durchgeführten Gradienten-PCR (Abschn. 3.4.2) wurde eine Annealing-Temperatur von 57 °C gewählt. Die Konzentrationen der PCR-Mischung und die weiteren PCR-Bedingungen wurden in Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Der Einsatz von Standards erfolgte, indem in der Software Opticon Monitor™ die entsprechenden „Wells“ im Quantifizierungsfenster als Standard definiert wurden und zu jeder Verdünnung die entsprechende Keimzahl (10^3 bis 10^8) eingegeben wurde. Als Einheit für die Keimzahl der Verdünnungen wurde \log_{10} kbE/g und für die Standards „log genome equivalent“ pro Gramm (log GE/g) eingegeben, da das *rpoB*-Gen (Ziel-Gen) eine Kopienzahl im Genom der Bakterien hat. So kann eine kolonienbildende Einheit als eine Kopienzahl und ein GE berechnet werden. Nach Eingabe der Standards wurde die Quantifizierungsanalyse gestartet.

3.5.3 Ergebnisse

3.5.3.1 Erfassung der optischen Dichte der Bakterienmischkultur

Die Erstellung der Standardkurve für die Quantifizierung der Keimzahl in Geflügelfleisch erfolgte mit Hilfe einer Bakterienmischkultur, die direkt aus einer Fleischprobe stammte. Dazu wurde das Wachstum der Bakterien in der Suspension periodisch mit Hilfe eines Dichtezellmessgeräts photometrisch erfasst bis das Ende der logarithmischen Wachstumsphase (OD = ca. 0,9) erreicht wurde (Abb. 29).

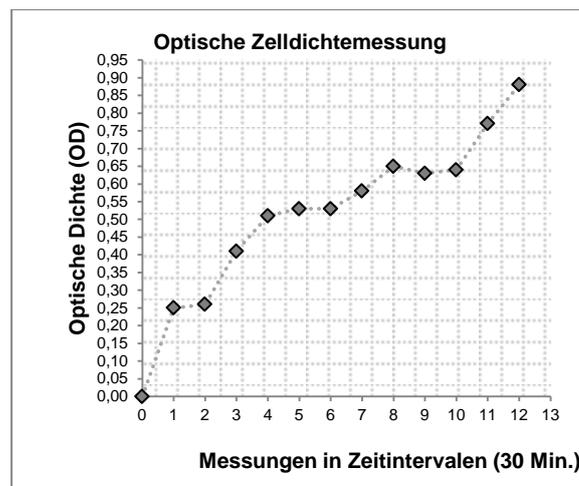


Abbildung 29: Periodische Erfassung der Wachstumsrate der Bakterienmischung mit Hilfe der optischen Zelldichte (OD). Die OD wurde alle 30 min gemessen.

3.5.3.2 Auswertung der qPCR-Analysen

Erstellung der Standardkurve

Die Bestimmung der Keimzahl der hergestellten Bakterienmischkultur in TSB⁺-Lösung erfolgte durch die Erstellung einer Verdünnungsreihe und Kultivierung auf PC-Platten. Die Platten wurden für 72 h bei 30 °C bebrütet und die Keimzahl der Bakterienmischung ermittelt. Die Keimzahl jeder Verdünnung wurde hieraus berechnet (Tab. 42). Gleichzeitig wurden die extrahierten Nukleinsäuren aus diesen Verdünnungen als Templates für die PCR-Analyse verwendet. Im ersten Auswertungsschritt wurden die resultierenden Ct-Werte mit den entsprechenden log-Werten in einer Korrelation verglichen und deren Korrelationskoeffizient ermittelt, um die Eignung der Methode zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 42 und Abbildung 30 zusammengefasst.

Tabelle 42: Ergebnisse der Real-time PCR-Analyse der Standards S1 und S6 (10^8 - 10^3 KbE/ml) und die entsprechenden Gesamtkeimzahlen aus den Plattenkulturverfahren

Standars	GKZ	Ct-Werte	
	\log_{10} KbE/ml	Doppelbestimmung	$M \pm SD$
S1	8,84	21,11 21,99	$21,55 \pm 0,44$
S2	7,84	25,28 25,36	$25,32 \pm 0,04$
S3	6,84	27,68 27,08	$27,38 \pm 0,30$
S4	5,84	29,42 30,11	$29,76 \pm 0,34$
S5	4,84	34,33 33,43	$33,88 \pm 0,45$
S6	3,84	35,80 34,99	$35,39 \pm 0,40$

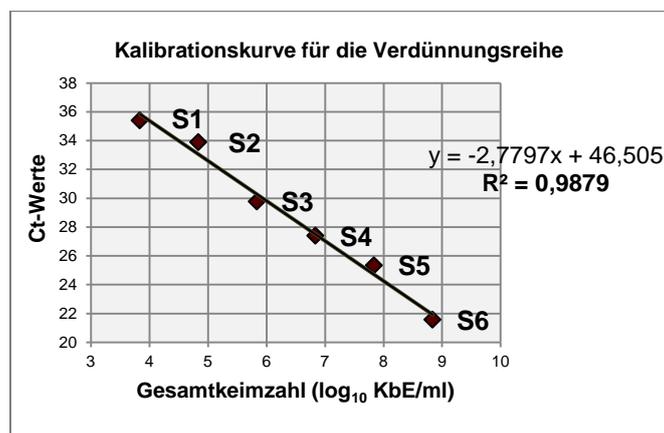


Abbildung 30: Korrelation zwischen Ct-Werten und Keimkonzentration der Standards.

Abbildung 30 stellt die erstellte Standardkurve, die aus der Korrelation zwischen den Ct-Werten der PCR-Analyse und den Keimzahlen jeder Verdünnung resultierte, dar. Diese Korrelation weist einen geeigneten Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,99$) auf. Wie in Tabelle 42 dargestellt wurde, war die Standardabweichung der Ct-Werte innerhalb der Duplikate sehr gering (0,04 bis 0,45). Diese war bei der Amplifikation der DNA-Templates aus den niedrigeren Verdünnungen (Keimgehalt: 10^2 , 10^1 und 10^0 KbE/ml) sehr groß (Abb. 31). Außerdem wies die T_m-Analyse dieser Proben keine spezifische Amplifikation auf, während die PCR-Produkte der Standards S1-S6 eine homogenere Schmelztemperatur bei etwa 85 °C gezeigt haben (Abb. 31). Deshalb wurden die Standards mit Keimgehalt unter 10^3 KbE/ml in den weiteren qPCR-Analysen nicht mehr eingesetzt. Dieser Versuch wurde auch für die aufgereinigten Standards (Gruppe B) durchgeführt, wobei ähnliche Ergebnisse erzielt wurden.

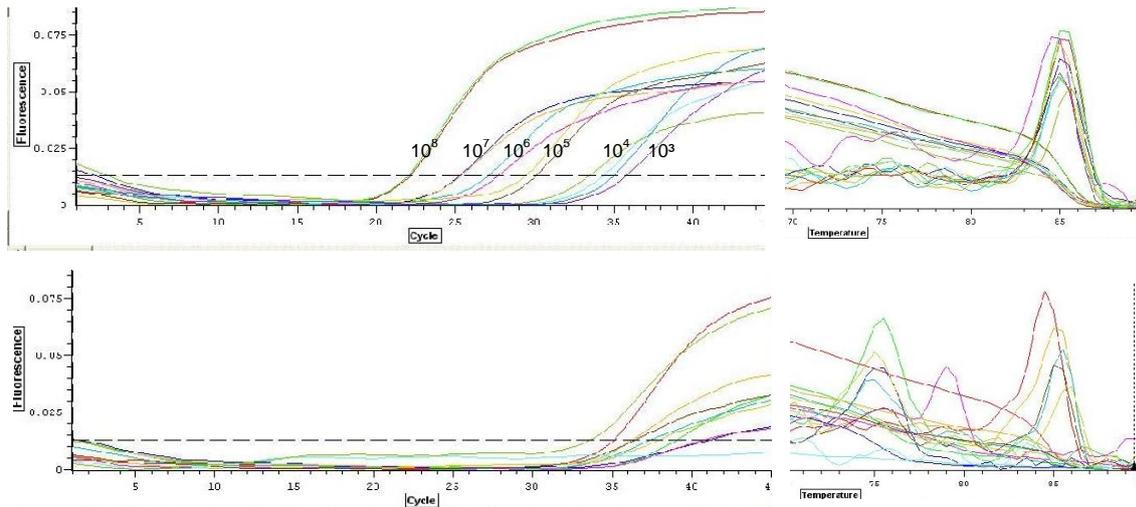


Abbildung 31: PCR Ergebnisse der Standards. Ct-Kurven (links) und dazugehörige Schmelzkurven (rechts) der Standards S1-S6 (oben) und der Standards mit Keimgehalt von 10^2 , 10^1 , 10^0 KbE/ml (unten).

Für alle weiteren qPCR-Versuche erfolgte die Erstellung der Standardkurven automatisch durch die Opticon Monitor™-Software des Real-Time PCR-Systems [Bio-Rad Laboratories, GmbH]. Die Software stellt die Ct-Werte der Amplifikate der Standards den Gesamtkeimzahlen gegenüber, erstellt daraus eine Standardkurve und berechnet aus der Regressionsgerade den Determinationskoeffizienten (R^2) und die Amplifikationseffizienz der Analyse. Der Standardgraph plottet den Logarithmus zur Basis 10 der Ausgangs-DNA-Konzentration (ng, Kopie, etc.) gegen die Ct-Werte für die Proben, die als Standard mit dem ausgewählten Farbstoff im Farbstoff-Feld der Software definiert wurden. Eine Linie wird als Standardgraph angezeigt. Diese beschreibt die lineare Standardkurve und den R^2 Wert dieser Linie. Die Geradengleichung lautet $y = mx + b$, wobei m für die Steigung der Gerade und b für den y-Achsenabschnitt steht. Bei einer 100 %igen Amplifikationseffizienz, wobei die Verdopplung der DNA-Templates bei jedem Zyklus erreicht würde, würde die Steigung der Gerade -0,30 betragen. Wenn die „Threshold-Linie“ richtig positioniert ist, sollte die Steigung nahe an diesem Wert liegen. Der R^2 -Wert entspricht dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten, häufig bezeichnet als Determinationskoeffizient (Bestimmtheitsmaß). Dieser Wert gibt an, wie nah die Datenpunkte an der Regressionslinie liegen. Der R^2 -Wert kann zwischen 0 und 1 variieren, wobei Werte näher an 1 eine bessere Korrelation beschreiben. Ein R^2 -Wert von 0,999 zeigt, dass die lineare Standardkurve 99,9 % die Variation in den Daten erklärt. Wenn gewünscht, kann die Standardkurve durch Abwahl entlegener Punkte angepasst werden. Dabei wird die Standardkurve automatisch neu berechnet. Da die Amplifikationseffizienz von Lauf zu Lauf variieren kann, wurden die

Standards bei jedem qPCR-Lauf neu parallel zu den Proben analysiert. Dadurch entstanden für acht qPCR-Analysen (R1 bis R8) acht Standardkurven mit entsprechendem Determinationskoeffizienten. Bei den ersten drei Analysen wurde kein Zellwaschvorgang vorgenommen und die DNA-Extraktion erfolgte direkt aus den Verdünnungen (R1 bis R3 und R7, Gruppe A). Bei der zweiten Analysenreihe fand hingegen ein initialer Waschschrift vor der DNA-Extraktion statt, mit dem Zweck PCR-Inhibitoren der Fleischmatrix zu entfernen und dadurch die PCR-Effizienz der Standards zu verbessern. Tabelle 43 stellt die Ct-Werte, die aus der Amplifikation der Standards in R1, R2 (Gruppe A) und R4-Analysen (Gruppe B) entstanden sind und die entsprechenden \log_{10} KbE/g-Werte jedes Standards dar. Optimal ist, wenn es zwischen jeder dezimalen Verdünnung der Standards ein 3,3 Zyklen-Intervall gibt (3,3 Cts) und die Doppelansätze fast identisch sind, sodass ein R^2 nahe 1 erreicht wird. Abbildung 32 stellt die zwei erstellten Standardkurven, mit und ohne Waschschrift, dar. Die entsprechenden Ct-Kurven sind in Abbildung 33 zu sehen. Es ist zu erkennen, dass je niedriger die Verdünnungsstufe, desto geringer ist die Abweichung der Doppelansätze. Dieser Trend ist auch in den Amplifikationskurven der aufgereinigten Standards zu erkennen (Abb. 32).

Tabelle 43: Ergebnisse der Standards (extrahiert aus den bakteriellen Verdünnungen und die berechnete Keimzahl jeder Verdünnung)

Standards	Keimzahl der Verdünnungen	Ct-Werte		
	\log_{10} KbE/g	R1 Gruppe A	R2 Gruppe A	R4 Gruppe B
S1	8,84	21,99	21,67	21,31
		22,10	21,89	21,44
S2	7,84	25,02	25,10	22,56
		24,60	24,27	22,39
S3	6,84	27,06	26,24	25,14
		26,85	26,25	25,49
S4	5,84	29,56	28,51	27,66
		29,01	---	27,67
S5	4,84	31,55	32,26	31,23
		32,01	32,29	32,09
S6	3,84	34,62	34,92	32,51
		35,57	---	33,65

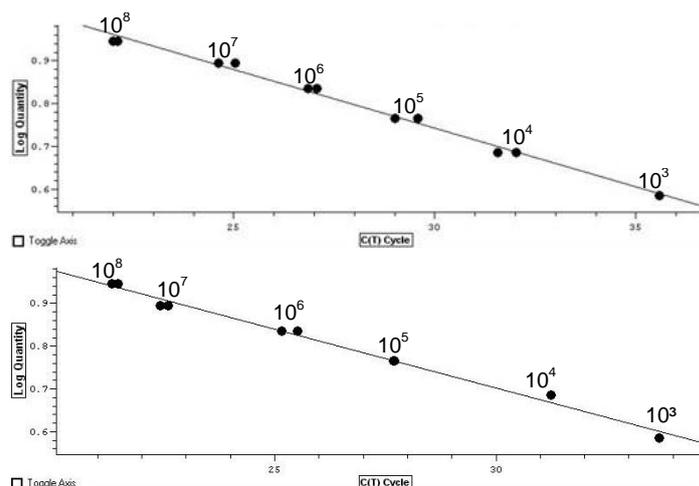


Abbildung 32: Standardkurven, erstellt durch die Software Opticon Monitor™ anhand der Standards ohne initialen Waschschrift ($R^2 = 0,99$) (oben) und mit initialem Waschschrift (S1-S6) ($R^2=0,98$) (unten).

In Anbetracht der Ergebnisse aus den qPCR-Analysen der Gruppe A und B lässt sich erkennen, dass der initiale Waschschrift vor der DNA-Extraktion eine optimierende Wirkung auf die Amplifizierungseffizienz der Standards hatte, da die Ct-Werte mit diesen Proben 1 bis 3 Zyklen niedriger waren als die bei den Proben ohne Waschschrift (Tab. 43). Dennoch war keine Verbesserung hinsichtlich der Korrelation mit den Ergebnissen der Plattenkultur und des Determinationskoeffizienten zu erkennen. Das R^2 war, anders als erwartet, bei diesen Proben geringer ($R^2 = 0,98$). Die anschließende Schmelzkurvenanalysen der Standards (Abb. 33) zeigten primerspezifische Amplifikationen. Die T_m -Werte der Amplifikate aus der Analyse R1 lagen zwischen $84,0\text{ °C}$ und $86,0\text{ °C}$ mit starker Akkumulation bei $85,5\text{ °C}$. Bei Analyse R4 lagen diese Werte bei $85,0\text{ °C}$. Das nichtspezifische Amplifikat bei Analyse R4 ($T_m = 82,0\text{ °C}$) gehörte zu einer negativen Kontrolle (Wasser).

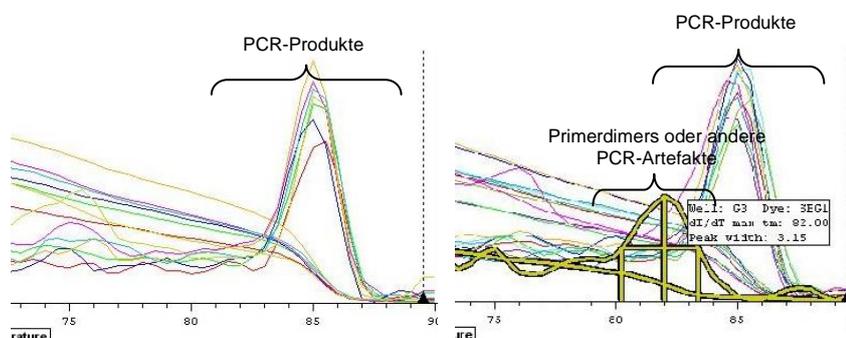


Abbildung 33: Schmelzkurvenanalyse der Amplikate der Standards aus den qPCR-Analysen R1 (links, Gruppe A) und R4 (rechts, Gruppe B).

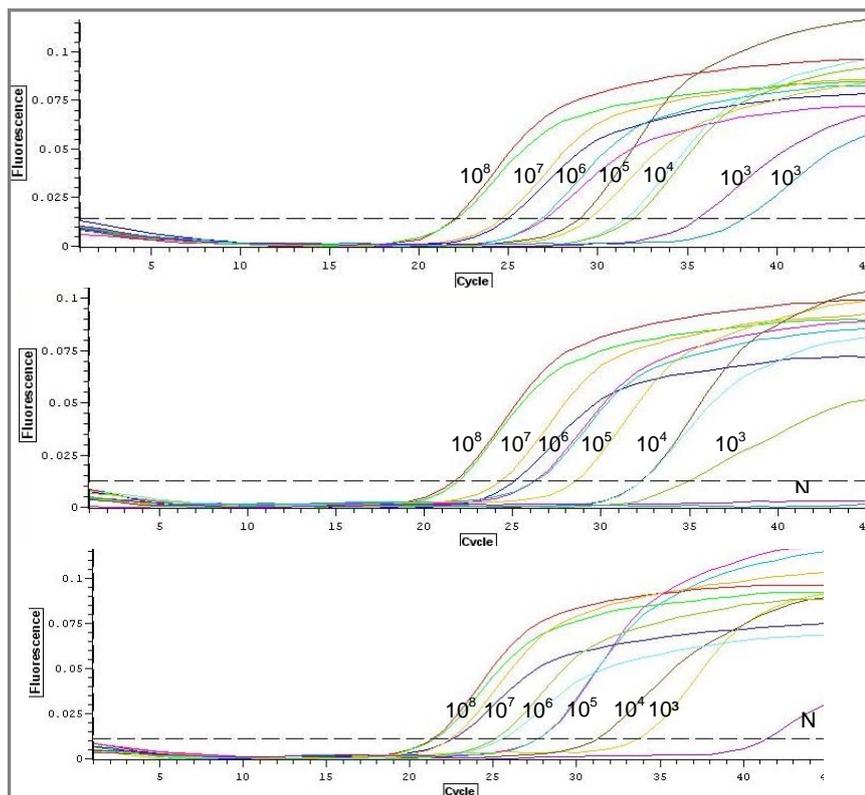


Abbildung 34: PCR-Kurven der Standards von 3 Analysen: R1 und R2 aus Gruppe A (Keimgehalt 10^3 - 10^8 KbE/ml) (oben und Mitte) und R4 aus Gruppe B (unten); jede Probe im Doppelansatz.

3.5.3.3 Auswertung der ermittelten Keimzahlen

Die Bestimmung der Keimzahlen von Geflügelfleisch mittels Kulturmethode und das Extrahieren der DNA aus diesen Proben ($n = 30$) erfolgte wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 zusammengefasst. Die qPCR-Analysen wurden durchgeführt, indem die oben beschriebenen Nukleinsäuren als Quantifizierungsziel und die Proben S1 bis S6 (im Doppelansatz) als Template für die Erstellung der Standardkurven verwendet wurden. Insgesamt 74 Reaktionen wurden in drei qPCR-Analysen aufgeteilt. Diese drei Analysen wurden, unabhängig voneinander, unter Anwendung der DNA-Proben mit und ohne Waschschrift (Gruppe A und B) durchgeführt; d. h. insgesamt sechs qPCR-Analysen (R1 bis R6) (Tab. 44). Neben den Analysen der Ct- und log GE-Werte erfolgte die statistische Auswertung dieser Versuche durch Korrelationanalysen zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden und der Bestimmung von R^2 . Außerdem wurden die Determinationskoeffizienten der Analysen ohne Waschschrift (Gruppe A) und mit Waschschrift (Gruppe B) miteinander verglichen, um festzustellen, ob der Waschschrift die Effizienz der Quantifizierung verbessert. Aus den zwei qPCR-Läufen der Gruppe A und Gruppe B, ist erkennbar, dass mehr als 70 % der log GE-Werte, resultierend aus den

Analysen der Gruppe B, kleiner waren als die aus Gruppe A. Die restlichen log GE-Werte, die höher waren als die der Gruppe A, gehörten zu den Proben mit niedrigeren GKZ-Werten (10^3 und 10^4 KbE/g). Auch mehr als 90 % der Ct-Werte, resultierend aus Gruppe B, lagen etwas höher als bei Gruppe A.

Tabelle 44: Ergebnisse der qPCR-Analysen der 30 Proben (wurden anhand der erstellten Standardkurve in sechs verschiedenen PCR-Läufen (R1 bis R6) quantifiziert) A: Proben ohne Waschschrift; B: Proben mit Waschschrift

Nr.	Proben	GKZ log ₁₀ KbE/g	log ₁₀ GE-Werte		Ct-Werte		Tm-Werte °C	
			A	B	A	B	A	B
			R1	R4	R1	R4	R1	R4
1	P1H1	9,08	8,08	7,64	23,42	23,96	85,50	85,50
2	P1H2	8,33	5,16	5,55	28,50	31,09	84,25	84,50
3	P1H3	3,59	3,46	3,41	36,14	37,41	86,00	85,25
4	P2H4	8,37	7,72	7,42	23,88	24,70	86,00	85,75
5	P2H5	6,81	5,88	5,48	28,64	29,01	85,50	85,50
6	P2H6	3,83	3,40	3,58	35,36	37,85	85,50	85,25
7	P3H7	8,41	9,80	9,34	20,26	20,91	85,50	85,50
8	P3H8	6,50	6,01	5,72	27,99	28,67	85,50	85,25
9	P3H9	3,93	2,90	3,82	34,33	40,55	85,50	85,50
10	P4H10	8,80	9,70	9,52	19,96	21,07	85,50	85,50
			R2	R5	R2	R5	R2	R5
11	P4H11	7,75	7,66	6,90	24,47	25,48	85,50	85,75
12	P4H12	5,18	4,38	4,98	33,48	31,15	85,50	85,75
13	P5H13	8,08	7,60	7,45	24,39	24,09	85,00	85,25
14	P5H14	7,58	5,08	5,01	31,11	31,06	85,25	85,50
15	P5H15	3,89	3,70	3,79	36,24	36,00	85,50	85,50
16	P6H16	9,26	8,51	8,11	22,78	22,61	87,00	87,00
17	P6H17	8,49	7,74	7,39	24,32	24,24	85,25	85,50
18	P6H18	6,50	4,48	4,65	33,13	32,36	85,50	85,50
19	P7H19	9,15	7,28	7,11	25,29	24,92	85,50	85,50
20	P7H20	7,73	6,83	6,35	26,34	26,89	85,50	85,50
			R3	R6	R3	R6	R3	R6
21	P7H21	4,88	3,37	3,25	37,15	35,26	84,75	85,00
22	P8H22	8,61	9,35	8,85	22,93	21,20	86,00	85,50
23	P8H23	7,46	7,18	7,01	26,61	24,93	86,00	86,00
24	P8H24	4,71	3,29	3,57	37,48	35,84	86,25	85,50
25	P9H25	9,49	9,58	8,86	22,58	21,15	86,25	86,25
26	P9H26	9,04	9,23	8,16	23,14	22,48	86,00	86,00
27	P9H27	7,16	4,33	4,58	33,24	31,82	85,50	86,00
28	P10H28	9,40	9,19	8,84	23,17	21,20	85,50	85,25
29	P10H29	8,57	8,12	7,70	24,91	23,42	85,50	85,5
30	P10H30	7,57	4,56	4,68	32,96	31,45	85,50	85,25

Aus dem Vergleich der Ct-Werte mit der GKZ in den Korrelationen für die Analysen R1, R2 und R3 wurden Determinationskoeffizienten von 0,84; 0,84 und 0,87 ermittelt, die nicht deutlich von den entsprechenden Werten der Gruppe B abwichen (0,82; 0,84 und 0,86). Ebenso zeigte der Vergleich zwischen den log GE-Werten und den GKZ von diesen Analysen R² von 0,78; 0,80 und 0,83, welche ebenfalls nicht deutlich von denen aus Gruppe B abwichen (0,75; 0,81 und 0,84). Angesichts der Ergebnisse der sechs qPCR-Analysen war zu erkennen, dass bei der Mehrheit der Proben die log GE-Werte niedriger als

die Gesamtkeimzahlen der entsprechenden Proben lagen. Diese Abweichung betrug zwar vorwiegend die 10-fache Größenordnung, aber bei 5 Proben betrug sie etwa das 100 bis 1000-fache (Tab. 44).

Im Anschluss an die Amplifikationen erfolgte bei jeder qPCR-Analyse eine Schmelzkurvenanalyse. Die T_m -Werte lagen bei Gruppe A zwischen 84,25 °C und 87,00 °C ($M = 85,5$ °C; $SD = 0,47$). Dieser Temperaturbereich weist auf eine primerspezifische Amplifikation hin. Nur bei drei Proben, gehörend zu den verschiedenen Doppelansätzen, wurden abweichende T_m -Werten (75,50 °C und 76,00 °C) festgestellt. Da das andere Duplikat bei diesen Werten jeweils einen normalen T_m -Wert zeigte, wurden die Ergebnisse mit den abweichenden T_m -Werten aus der Analyse ausgeschlossen. Bei Gruppe B wurde ebenfalls eine normale PCR-Produktbildung beobachtet. Die T_m Werte lagen bei diesen Analysen zwischen 84,50 °C und 87,00 °C ($M = 85,5$ °C; $SD = 0,42$). Hier wurde keine abweichende Schmelztemperatur festgestellt (Abb. 35).

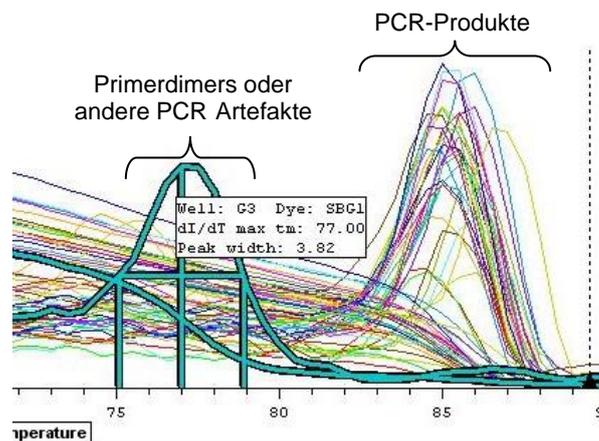


Abbildung 35: Schmelzkurvenplots der qPCR-Analyse (als Beispiel R6, Gruppe A). die Kurven liegen durchschnittlich bei 85,60 °C. Die einzige nicht spezifische Kurve (77,00 °C) gehörte zu der Negativkontrolle).

Um einen besseren Überblick über die Ergebnisse der oben durchgeführten qPCR-Analysen zu gewinnen, wurden diese zu zwei Teilanalysen zusammengeführt und ausgewertet. Der erste Teil besteht aus den Ergebnissen der Gruppe A und beinhaltet die Analysen R1, R2 und R3. Der zweite Teil besteht aus den Ergebnissen der Gruppe B und beinhaltet die Analysen R4, R5 und R6. Diese sind in Abbildung 36 dargestellt. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, dass generell eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der qPCR-Analysen und denen des Kulturverfahrens besteht (Gruppe A: $R^2 = 0,83$ und $0,76$; $P < 0,005$; Gruppe B: $R^2 = 0,78$ und $0,70$; $P < 0,005$). Allerdings zeigen die Ergebnisse der Analysen mit Hilfe der Standards ohne initialen Zellwaschvorgang (Gruppe A), eine höhere Korrelation mit der Gesamtkeimzahl, als Gruppe B.

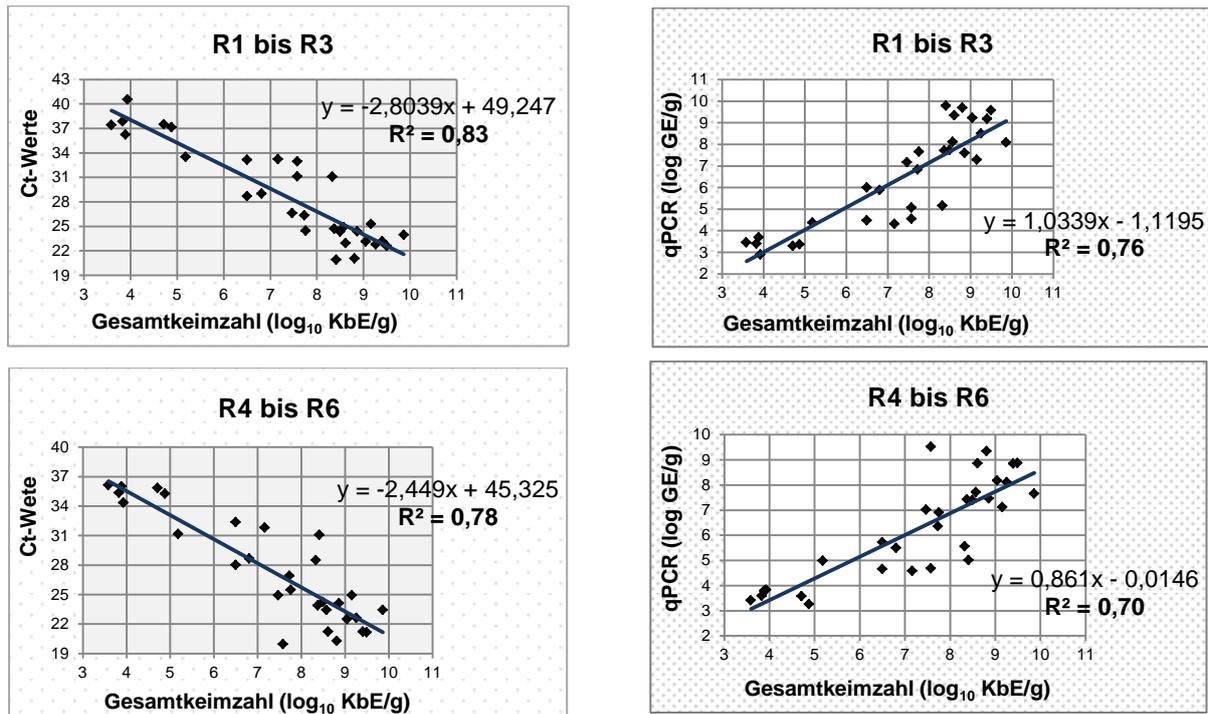


Abbildung 36: Vergleich der Ergebnisse der qPCR-Analysen; Oben: Gruppe A (R1, R2 und R3), unten: Gruppe B (R4, 5 und 6), zusammengefügt in zwei Korrelationsanalysen (Mittelwert der Ct-Werte) mit der GKZ (gewichteter Mittelwert der log₁₀ KbE/g).

Um die Wiederholbarkeit der entwickelten qPCR-Analysen zu überprüfen, erfolgten zwei weitere Versuche, ähnlich wie die in Abschnitt 3.5.2.2. beschriebenen, unter Anwendung von gleichen DNA-Templates, mit dem Unterschied, dass die gesamten Proben in zwei qPCR-Analysen (R7 und R8) amplifiziert und quantifiziert wurden. Als Standards wurden die DNA-Templates, die aus den Verdünnungsreihen mit und ohne Waschvorgang extrahiert wurden, verwendet. Die erste Analyse erfolgte unter Anwendung der Standards ohne initialen Waschvorgang (Gruppe A, R7) und die zweite Analyse erfolgte unter Anwendung der aufgereinigten Standards (Gruppe B, R8). Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildungen 37 bis 39 dargestellt. Tabelle 45 fasst die resultierenden Ct-Werte, log GE-Werte, Gesamtkeimzahl der Proben und T_m-Werte zusammen. Die Ergebnisse aus den qPCR-Analysen wurden mit denen aus dem Kulturverfahren verglichen und die Determinationskoeffizienten berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse der Gruppe A und B miteinander verglichen. Abbildung 37 stellt die Ergebnisse dieser Analysen dar.

Tabelle 45: Ergebnisse von qPCR-Analysen in zwei Probensets (Gruppe A ohne und B mit Zellwaschvorgang)

Proben	log ₁₀ KbE/g	log ₁₀ GE/g		Ct-Werte		Tm °C	
		Gruppe A-R7	Gruppe B-R8	Gruppe A-R7	Gruppe B-R8	Gruppe A-R7	Gruppe B-R8
P1H1	9,08	8,60	8,01	21,63	22,43	86,25	85,00
P1H2	8,33	5,53	5,12	29,25	29,85	84,50	84,00
P1H3	3,59	3,66	4,21	36,33	33,11	75,00	84,50
P2H4	8,37	8,20	7,36	22,46	23,85	84,25	85,25
P2H5	6,81	7,25	5,76	24,58	27,90	84,40	85,00
P2H6	3,83	3,66	2,25	36,34	43,48	76,00	73,50
P3H7	8,41	6,81	9,02	25,64	20,47	84,25	85,50
P3H8	6,50	6,17	6,00	27,34	27,22	84,75	84,75
P3H9	3,93	4,39	3,67	33,20	35,35	85,00	85,25
P4H10	8,80	8,90	8,58	21,09	21,29	84,75	85,50
P4H11	7,75	7,16	8,16	24,81	22,11	86,50	85,50
P4H12	5,18	5,00	4,12	30,96	33,48	86,00	85,75
P5H13	8,08	-	6,79	-	25,33	83,00	84,25
P5H14	7,58	7,74	5,06	23,44	30,05	85,25	85,00
P5H15	3,89	4,16	3,55	34,14	36,13	85,00	86,50
P6H16	9,26	7,55	7,26	23,89	24,07	88,25	87,50
P6H17	8,49	7,00	6,99	24,05	24,67	86,25	85,50
P6H18	6,00	5,23	4,65	30,22	31,44	85,50	85,00
P7H19	9,15	7,68	7,52	23,59	23,47	84,75	85,00
P7H20	7,73	6,05	5,68	27,91	28,11	84,25	84,50
P7H21	4,88	4,08	3,74	34,47	35,06	86,50	85,75
P8H22	8,61	8,49	8,55	21,86	21,36	86,50	85,75
P8H23	7,46	6,90	7,17	25,42	24,25	86,25	86,00
P8H24	4,71	4,33	4,02	33,45	33,83	74,75	62,50
P9H25	9,49	9,36	8,55	20,19	21,34	85,50	85,50
P9H26	9,04	10,45	7,81	19,17	22,85	87,25	86,00
P9H27	7,16	5,22	4,81	30,23	30,87	86,25	86,00
P10H28	9,40	8,98	9,15	20,89	20,22	85,25	85,00
P10H29	8,57	8,87	7,93	21,16	22,59	85,25	85,50
P10H30	7,57	6,21	4,57	28,41	31,73	85,00	85,50

Beim Betrachten der Ergebnisse der qPCR-Analysen von Gruppe A (R7), ist zu erkennen, dass sich zwar mehr als 76 % der Ct-Werte im Vergleich zu den ersten Analysen (R1, R2 und R3, Tab. 44) erhöhten, sich jedoch mehr als die Hälfte der log GE-Werte an die Gesamtkeimzahlen annäherten. Hierbei wurde bei nur vier Werten eine Erhöhung der Standardabweichung von den Gesamtkeimzahlen beobachtet und bei den restlichen Werten waren keine Abweichungen festzustellen. Bei Gruppe B (R8) näherten sich etwa ein Drittel der log GE-Werte, im Vergleich zu den letzten Analysen (R4, R5 und R6), an die Gesamtkeimzahlen an. Bis auf sieben Werte zeigte der Rest keine Abweichungen (Tab. 44 und 45).

Die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte von Gruppe A zeigte mit Ausnahme von fünf Proben eine produktspezifische Amplifikation, während die Gruppe B nur zwei abweichende Proben aufwies, wobei es sich hier um Duplikate handelte. Insgesamt haben sich die Ergebnisse der wiederholten qPCR-Analysen (R7 und R8) etwas an die Gesamtkeimzahlen

angenähert und wiesen auf eine akzeptable Wiederholbarkeit der qPCR-Analysen hin. Bezüglich der Ct-Werte zeigten diese Korrelationsanalysen für Gruppe A eine Erhöhung des Determinationskoeffizienten im Vergleich zu den Analysereihen R1 bis R3 ($R^2 = 0,84$; $P < 0,005$). Bei Gruppe B wurde diesbezüglich keine Veränderung beobachtet ($R^2 = 0,78$). Ebenso war bezüglich der log GE-Werte eine leichte Erhöhung in den Korrelationsanalysen der Gruppe A zu erkennen ($R^2 = 0,79$) und eine Erhöhung des Determinationskoeffizienten bei Gruppe B ($R^2 = 0,75$). Diese Korrelationsanalysen sind in Abbildung 37 dargestellt.

Die Determinationskoeffizienten lagen immer noch im akzeptablen Bereich und wiesen eine hohe Vergleichbarkeit mit dem Kulturverfahren auf. Außerdem war wiederholt zu erkennen, dass der initiale Waschschrift der Standards keine optimierende Wirkung auf die Quantifizierung der Keimzahl mittels PCR-Analyse anhand der Standards aufwies, da die Korrelationsergebnisse der Gruppe A meistens höher waren, als die der Gruppe B. Die Standardkurven der beiden Analysen zeigten zwar fast identische Determinationskoeffizienten (Gruppe A: 0,98 und Gruppe B 0,99) und die Ct-Werte der Standards der Gruppe B lagen, vermutlich bedingt durch die Waschschriffe, niedriger als die der Gruppe A. Dennoch war letztendlich kein positiver Effekt auf die Korrelationsergebnisse festzustellen. Außerdem sollte der Standard S6, aufgrund der abweichenden Ct-Werte, aus der Analyse, ausgeschlossen werden. Hieraus folgte eine ungünstige untere Detektionsgrenze für die Analyse. Abbildungen 38 und 39 stellen die Ergebnisse der eingesetzten Standards der beiden Analysen dar. Tabelle 46 fasst die Ct-Werte der Standards von diesen Analysen zusammen.

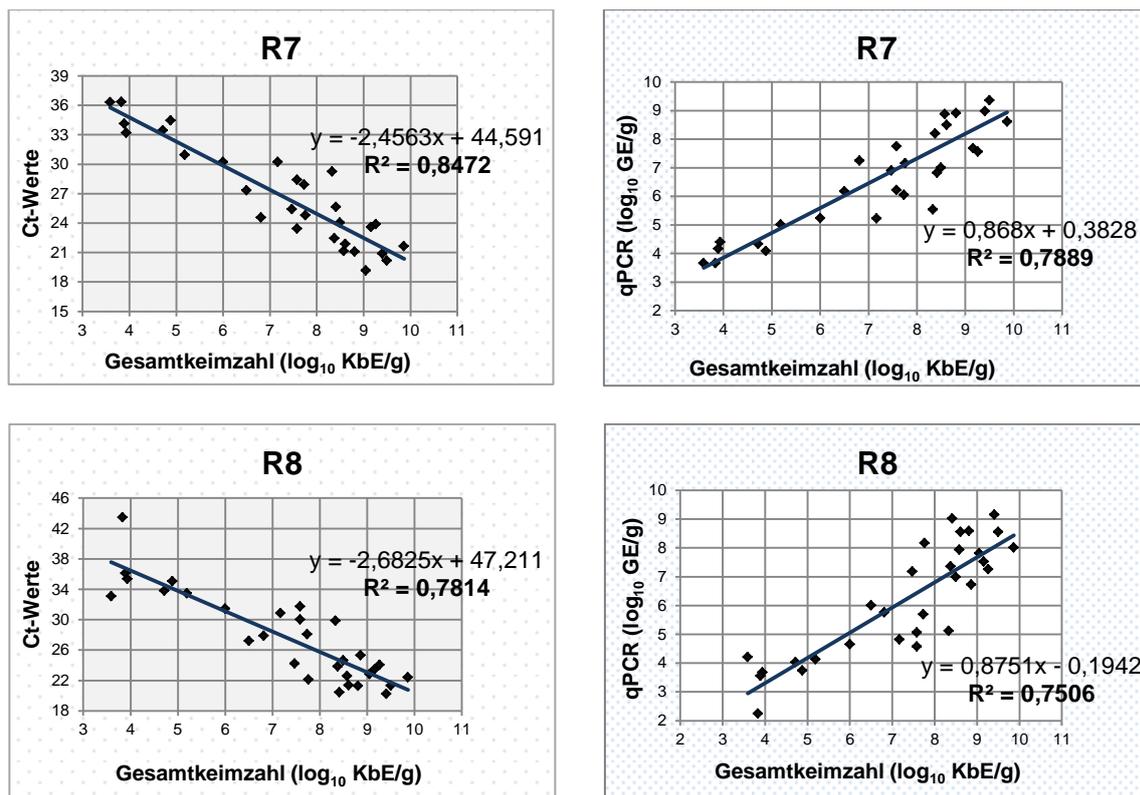


Abbildung 37: Ergebnisse der Korrelationsanalysen (Mittelwerte der Ct-Wertegewichtete Mittelwerte der log₁₀ KbE/g), ohne Waschschrift (oben), mit Waschschrift (unten).

Tabelle 46: Ct-Werte der Standards, die zur Quantifizierung in der PCR-Analyse verwendet wurden (R7: Gruppe A und R8: Gruppe B); Die Standards, die aufgrund der hohen Standardabweichung aus der Analyse ausgeschlossen wurden, sind nicht dargestellt

Standards	GKZ der Verdünnungen log ₁₀ KbE/g	Ct-Werte (Duplikate)	
		R7 Gruppe A	R8 Gruppe B
S1	8,84	21,25 ---	20,35 ---
S2	7,84	24,61 23,65	22,03 22,17
S3	6,84	26,81 26,85	24,58 25,07
S4	5,84	29,56 29,02	27,44 ---
S5	4,84	32,10 ---	31,46 31,39
S6	3,84	35,40 ---	---
R² der Standards:		0,99	0,98

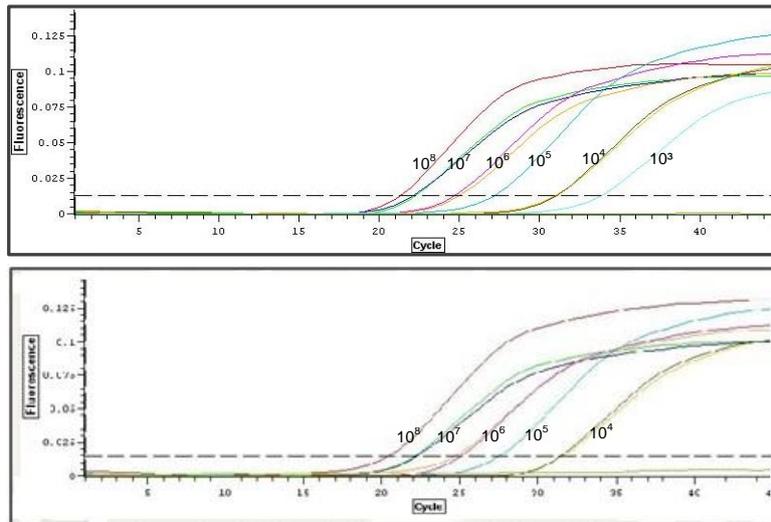


Abbildung 38: Ct-Kurven der Standards (S1-S6, Keimgehalt: 10^3 bis 10^8 KbE/ml) von Gruppe A (oben) und der Standards (S1-S5 Keimgehalt: 10^4 bis 10^8) von Gruppe B (unten).

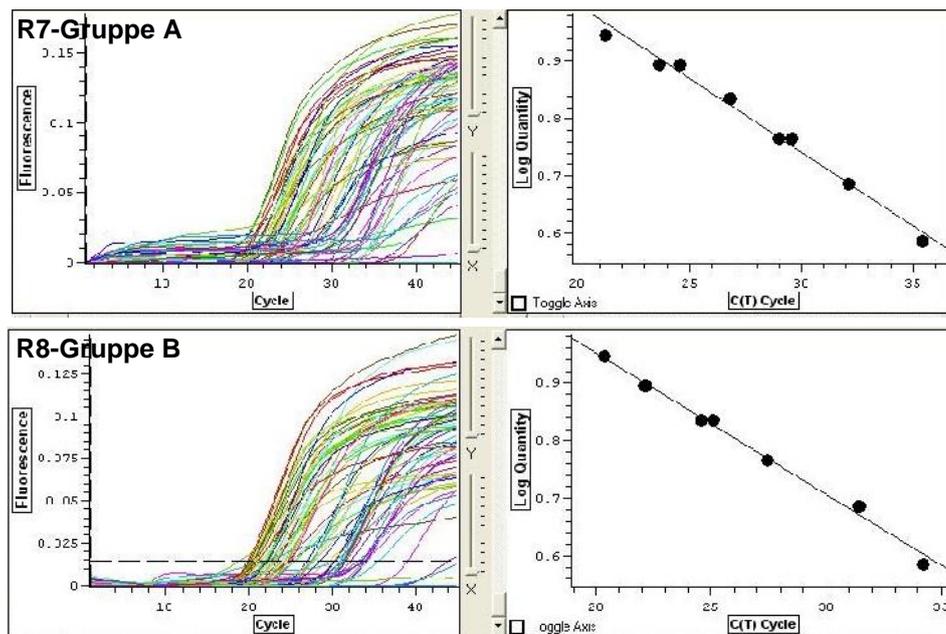


Abbildung 39: Amplifikationsplots und Standardkurven automatisch erstellt durch die Software Opticon Monitor™ anhand der angegebenen Standards. Gruppe A ($R^2 = 0,99$) (oben), Gruppe B ($R^2 = 0,98$) (unten).

3.5.4 Diskussion

3.5.4.1 Erstellung einer geeigneten Kalibrationskurve für die qPCR-Analyse

Die Zuverlässigkeit der absoluten qPCR-Analyse beruht vor allem auf der Validität der verwendeten Kalibrationskurven und einer hohen Amplifikationseffizienz (Pfaffl, 2012). Zur Erstellung einer geeigneten Kalibrationskurve und zur Quantifizierung der Ziel-DNA mittels PCR, wird in der Regel eine Verdünnungsreihe aus einer Bakterienkultur verwendet. Üblicherweise wird der zu quantifizierende Organismus in einem geeigneten, zum Wachstum fördernden Nährmedium bebrütet und aus der resultierenden Zellsuspension eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt. Anschließend wird aus jeder Verdünnung DNA extrahiert und diese als Template für die Standards in die PCR eingesetzt (Lee und Levin, 2007b).

Da bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl eine große Reihe von Mikroorganismen in Frage kommt, sollte daher eine geeignete Mischkultur aus diversen Bakterienstämmen präpariert werden, die für die zu untersuchende Matrix repräsentativ ist. Diese Methode ist allerdings für eine nährstoffreiche Matrix wie Fleisch nicht ganz einfach, da in diesen Proben viele verschiedene Mikroorganismen vorkommen können. Deshalb wurde in dieser Arbeit zur Erstellung der Standardkurve anstatt des Mischens zahlreicher Bakterienspezies eine Geflügelfleischprobe in einem geeigneten Nährmedium bebrütet und dadurch das Wachstum der vorhandenen verderbniserregenden Keime gefördert. So war die Standardmatrix ähnlich wie die der Proben. Lee und Levin (2007b) haben zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl (total viable count) in Kabeljau eine Mischkultur von einem Fischfilet präpariert und diese zur Erstellung der Verdünnungsreihe verwendet. Diese Autoren haben einen hohen Determinationskoeffizienten ($R^2 = 0,998$) aus den so erstellten Standardkurven für die qPCR-Analyse erhalten. Die Determinationskoeffizienten, die aus der Standardkurve der Geflügelfleischbakteriensuspension errechnet wurden, lagen ebenfalls im geeigneten Quantifizierungsbereich ($>0,98$). Allerdings sollten bei der Erstellung der Standardkurve vor der Berechnung eine Ausreißeranalyse der Messwerte vorgenommen werden, damit der angestrebte Determinationskoeffizient erzielt werden kann. Dieses Vorgehen weist auf ein Bedürfnis zur Verbesserung des PCR-Protokolls und -Bedingungen zur Erstellung der Standardkurve hin.

Takahashi et al. (2006) haben eine Standardkurve zur Quantifizierung der Keimzahl in frischem verzehrfertigem Obst und Gemüse mittels qPCR erstellt, indem sie eine definierte Bakterienmischkultur aus fünf vorherrschenden Bakterienspezies, die als primäre Ursache für den Verderb in diesen Lebensmitteln bekannt sind, vorbereitet und die DNA aus den dezimalen Verdünnungen dieser Bakteriensuspension extrahiert. Diese Autoren haben in ihrer Studie geeignete Quantifizierungsergebnisse aus der qPCR-Analyse erhalten, da die Verderbsflora in den verwendeten Proben ähnlich die der Standardkeime war (Takahashi et al., 2006). Würden andere Keime in größerer Anzahl in Obst und Gemüse vorkommen,

würde die Standardkurve nicht für die zu messenden Proben repräsentativ sein. Außerdem wäre bei dieser Standardkurve der Einfluss der in den Obst und Gemüse vorhandenen PCR-Inhibitoren nicht mitberücksichtigt. Die in diesem Teil der Arbeit erstellte Standardkurve war hingegen repräsentativ für die gesamten vorhandenen Mikroorganismen im Geflügelfleisch, da die hergestellte Bakteriensuspension direkt aus der Geflügelfleischprobe gewonnen wurde, die später zur Quantifizierung angewendet wurde. Allerdings ist diese Methode im Vergleich zur Verwendung einer definierten Bakterienmischkultur hinsichtlich der Bebrütungszeit und Bestimmung der Keimkonzentration der Standards zeit- und arbeitsaufwendiger. Dennoch können einmalig produzierte Standards in mehreren PCR-Läufen bei den gleichen Proben verwendet werden.

Dolan et al. (2009) haben zwei separate Standardkurven zur Quantifizierung von grampositiven und gramnegativen Bakterien generiert, um die Gesamtkeimzahl in Rindfleisch mittels einer reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) zu bestimmen. Diese Autoren stellten fest, dass eine einzige Standardkurve nicht zur Quantifizierung beider Bakteriengruppen ausreichen würde. Bei dieser Studie wurden akzeptable Ergebnisse aus der generierten Standardkurve ermittelt ($R^2 = 0,88$), aber der Aufwand für die Erstellung von zwei Standardkurven aus RNA-Templates ist im Vergleich zu einer einzigen DNA-basierten Standardkurve zu hoch und in diesem Sinne nicht vergleichbar mit einer einfachen Plattenkultur als Standardmethode. In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine Standardkurve zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl der Proben mittels qPCR verwendet. Die Bakteriensuspension, die aus den Geflügelfleischproben gewonnen wurde, bestand mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Bakterien, die bei den angewendeten Bebrütungsbedingungen in der TSB⁺-Lösung innerhalb der Messzeit wachsen konnten. Das bedeutet, dass die Mikroorganismen, die bei den beschriebenen Bedingungen nicht vermehrungsfähig waren, bei der Erstellung der Standardkurve in der qPCR-Analyse nicht berücksichtigt wurden. Allerdings konnte durch die hohen Korrelationsergebnisse, die mit Hilfe der Standardkurve erzielt wurden, eingeschätzt werden, dass ein großer Teil der vorhandenen Bakterien in der Suspension wachsen konnte. Außerdem ist eine SYBR[®] Green I basierende qPCR-Analyse unter Anwendung einer Standardkurve, die wahrscheinlich nicht jede einzelne grampositive und gramnegative Bakterienspezies mit erfasst, aber hohe Korrelationsergebnisse liefert, hinsichtlich der praktischen Anwendung einfacher durchzuführen und im Vergleich zu der oben beschriebenen Studie wesentlich weniger arbeits- und zeitaufwendig.

Einsatz eines initialen Waschvorgangs vor der DNA-Extraktion

Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, existieren bei der Untersuchung von Lebensmittelproben große Barrieren für den Erfolg der Amplifizierung durch diverse matrixbedingte PCR-Inhibitoren. Daher ist die Probenaufbereitung ein kritischer Faktor für die Erstellung der Standardkurve, wenn die Lebensmittelprobe selbst dazu verwendet wird.

Es ist wichtig, dass die zu analysierenden Proben und Standards in Bezug auf Inhibitoren vergleichbar sind. Da zur Minimierung der PCR-Inhibitoren bei der Probenaufbereitung vor der DNA-Extraktion zwei Zellwaschschritte durchgeführt wurden, wurde in einem parallelen Versuch (Gruppe B) auch bei den Standards ein Waschschritt vor der DNA-Extraktion eingesetzt. So sollte die Ziel-DNA konzentriert und die PCR-inhibitorischen Substanzen in den Proben entfernt werden. Im Prinzip bestehen die Ziele der Probenaufbereitung darin, PCR-inhibitorische Substanzen, die die Amplifikationskapazität und -effizienz reduzieren zu entfernen und die Konzentration des/der Zielorganismus/-DNA zu erhöhen, sodass die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit der Analyse gewährleistet werden kann (Rådström et al., 2004). Deshalb, und um die Effizienz der DNA-Extraktion aus den Verdünnungen zu verbessern und dadurch die Qualität der Standardkurve zu optimieren, wurde ein Zell-Waschschritt mittels einer zusätzlichen Zentrifugation der Standards direkt vor dem DNA-Extraktionsverfahren eingesetzt. Der Waschschritt sollte also dabei helfen, die negativen Effekte dieser Substanzen zu verringern und die Amplifikationseffizienz zu verbessern. Der Zell-Waschschritt für die Standards in diesem Teil der Arbeit hat zwar die Zyklenanzahl für das Erreichen der Amplifikationskurven an den Schwellenwert um ein bis zwei Zyklen verringert (Tab. 46), dabei war aber kein deutlicher Einfluss auf die Qualität der Standardkurve zu erkennen (Abb. 39). Der Determinationskoeffizient, der aus der Gegenüberstellung der Ct-Werte mit dem Keimgehalt der Standards (\log_{10} KbE/g; S1 bis S6) resultierte, war sogar bei den aufgereinigten Standards etwas kleiner als die der normalen Standards (Tab 46). Dieser Trend war auch bei den PCR-Quantifizierungsergebnissen (\log_{10} GE/g) zu sehen (Abb. 39 und Tab. 45). Diese Ergebnisse können, wie bereits beschrieben, in Zusammenhang mit dem Verlust an Nukleinsäuren in Folge der Zentrifugation und den Waschschritten vor der DNA-Extraktion erklärt werden. So wurde weniger Nukleinsäurematerial zur Amplifizierung zur Verfügung gestellt, wodurch die Korrelation mit den Gesamtkeimzahlen der Standards beeinträchtigt wurde. Berichten zufolge stellen die Prä-PCR-Aufbereitungsmethoden oft andere Probleme, wie die Beeinträchtigung der unteren Quantifizierungsgrenze aufgrund des Verlustes an Nukleinsäuren und einer zu kleinen zu analysierenden Probenmenge, dar (Löfström et al., 2010; Warren et al., 2007; Wolffs et al., 2004).

Bestimmung der unteren Quantifizierungsgrenze der Standardkurve

Zur Erstellung der Standardkurve wurde zuerst eine PCR-Analyse durchgeführt, indem die Standards als normal zu messende Proben (und nicht zur Erstellung der Kalibrationskurve) in der Analyse eingesetzt wurden, sodass die obere und untere Quantifizierungsgrenze sowie die Einsetzbarkeit der Standardkurve festgestellt werden konnten. Diese Analyse zeigte, dass sich eine sinnvolle Standardkurve zwischen den Standards mit einer Keimkonzentration in Höhe von 10^3 - 10^8 KbE/ml generieren ließ. Hier waren die

Abweichungen der Ct-Werte der Doppelansätze sehr gering (Tab. 43) und der Unterschied zwischen den Amplifikationskurven einer Verdünnungsstufe betrug ca. zwei bis drei Zyklen (Abb. 31). Die erstellte Kalibrationskurve, resultierend aus der Gegenüberstellung der Ct-Mittelwerte und der \log_{10} KbE/ml der Gesamtkeimzahl jeder Verdünnung, wies einen Determinationskoeffizienten (R^2) von 0,99 auf. Wie in Abbildung 31 dargestellt, wurden die DNA-Templates der Standards mit Keimkonzentrationen von 10^2 , 10^1 und 10^0 KbE/ml zwar amplifiziert, aber die Ct-Kurven, entsprechend dieser Proben erschienen erst ab dem 35. Zyklus und sogar nach der Negativkontrolle (33,60). Zudem lagen die Kurven von diesen Standards sehr weit voneinander entfernt (ca. drei bis fünf Zyklen). Dadurch wurden die Amplifikationseffizienz und die Determinationskoeffizienten der Standardkurve verschlechtert. In der letzten Analyse der Gruppe B (R8) musste, aufgrund der hohen Standardabweichung, der Standard mit einem Keimgehalt von 10^3 KbE/ml (S6) aus der Auswertung ausgeschlossen werden, wodurch die untere Detektionsgrenze bei diesen Proben beeinträchtigt wurde. Wie oben beschrieben, kann dies mit der Degradierung oder dem Verlust der Nukleinsäure in Folge des Waschschriffs zusammenhängen. Außerdem zeigte die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte, resultierend aus der Amplifikation der Standards mit Keimkonzentrationen von weniger als 10^3 KbE/ml, keine ausreichende Amplifikationsspezifität. Aus diesen Gründen, und da die Gesamtkeimzahl der untersuchten Geflügelfleischproben kaum unter 10^3 KbE/g lag, wurde 10^3 KbE/g als untere Detektionsgrenze für die Standardkurve und die Quantifizierungen festgelegt.

3.5.4.2 Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR in Geflügelfleisch

Die Quantifizierung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR in Geflügelfleischproben erfolgte in acht verschiedenen Analysen (R1 bis R8), wobei R7 die Wiederholung von R1, R2 und R3 (Gruppe A: Standards ohne initialem Waschschriff) und R8 die Wiederholung von den Analysen R4, R5 und R6 (Gruppe B: Standards mit initialen Waschvorgang) waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in verschiedenen Korrelationsanalysen mit denen aus dem Kulturverfahren verglichen. Es wurden sowohl die resultierenden Ct-Werte aus den jeweiligen Analysen, als auch die log GE-Werte mit den \log_{10} KbE/g verglichen und die entsprechenden Determinationskoeffizienten berechnet. In Anbetracht der gesamten qPCR-Analysen wurden generell hohe Korrelationen mit den Ergebnissen des Kulturverfahrens erhalten. Bezogen auf die Ct-Werte resultierten aus den Korrelationsanalysen von vier qPCR-Assays unter Verwendung der Standards bei Gruppe A (R1, R2 und R3; $n = 10$ und R7, $n = 29$) Determinationskoeffizienten zwischen 0,83 und 0,87 und aus den vier qPCR-Analysen unter Verwendung der Standards bei Gruppe B (R4, R5 und R6; $n = 10$ und R8, $n = 30$) zwischen 0,78 und 0,82. Bezogen auf die log GE-Werte resultierten aus den Korrelationsanalysen von vier qPCR-Assays unter Verwendung der Standards bei Gruppe A Determinationskoeffizienten zwischen 0,78 und 0,83 und aus den

vier qPCR-Assays unter Verwendung der Standards bei Gruppe B zwischen 0,75 und 0,84. Vergleicht man die log GE-Werte mit der Gesamtkeimzahl, ist zu erkennen, dass trotz hoher Korrelation zwischen den Ergebnissen der qPCR-Analysen (R7 und R8) und der Kulturmethode die Mehrheit der log GE-Werte bei allen Analysen niedriger als die der \log_{10} KbE/g lag. Allerdings betrug diese Abweichungen bei mehr als 60 % der Proben von Gruppe A weniger als das 10-fache (1 log) und insgesamt zeigten nur zwei Proben mehr als die 100-fache (2 log) Abweichung.

Bezugnehmend auf die Analysen R1 bis R6 gehörten die log GE-Werte, die größer als die Gesamtkeimzahlen waren, zu den Proben, die eine sehr hohe Keimzahl aufwiesen ($>10^8$ KbE/g). Allerdings betrug dieser Unterschied weniger als das 10-fache (fast identisch mit der Gesamtkeimzahl). Verbindet man diese Ergebnisse mit dem negativen Einfluss der PCR-Inhibitoren in den Proben, widersprechen diese der Theorie, dass je höher die Templatekonzentration ist, desto höher die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von PCR-Inhibitoren (Rådstöm et al., 2004). Möglicherweise können die generierten Primer sich bei höheren Templatekonzentrationen effizienter an die Zielsequenzen hybridisieren und sind in der Lage mehr Bakterien zu erfassen, wodurch höhere Korrelationen mit den Gesamtkeimzahlen erzielt werden konnten. Bei den Wiederholungsversuchen R7 (Gruppe A) und R8 (Gruppe B), die bessere Ergebnisse im Vergleich zu R1 bis R6 geliefert haben, wurde das gleiche Verhältnis beobachtet, wobei die Standardabweichungen sehr klein waren.

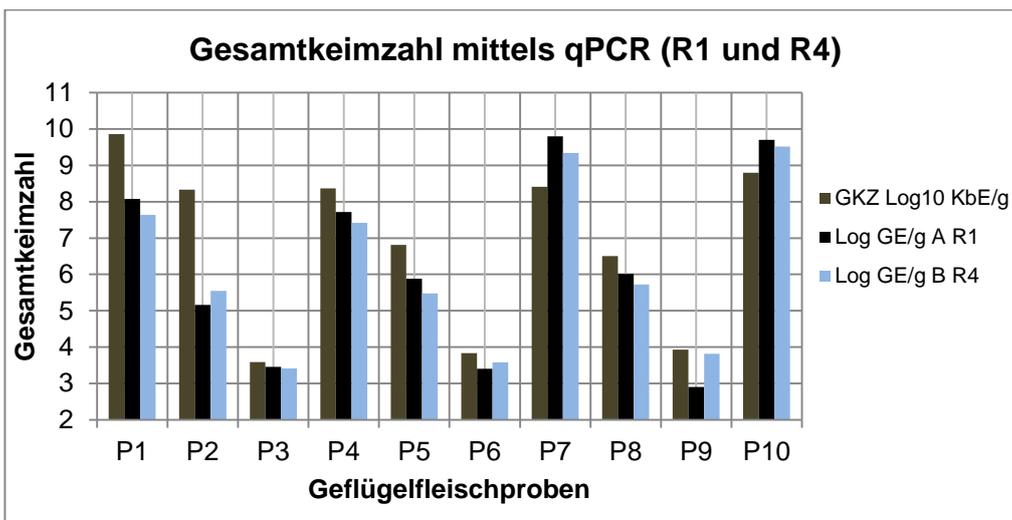
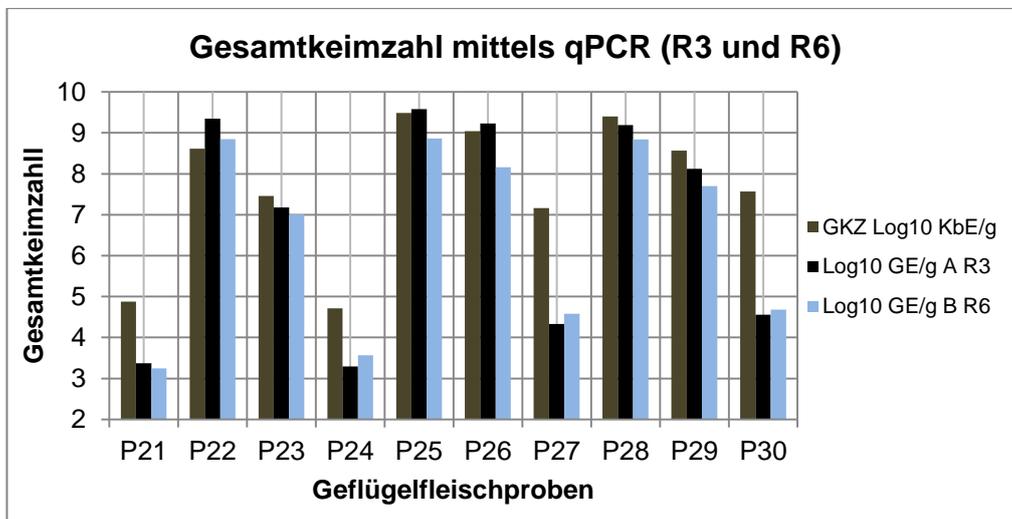
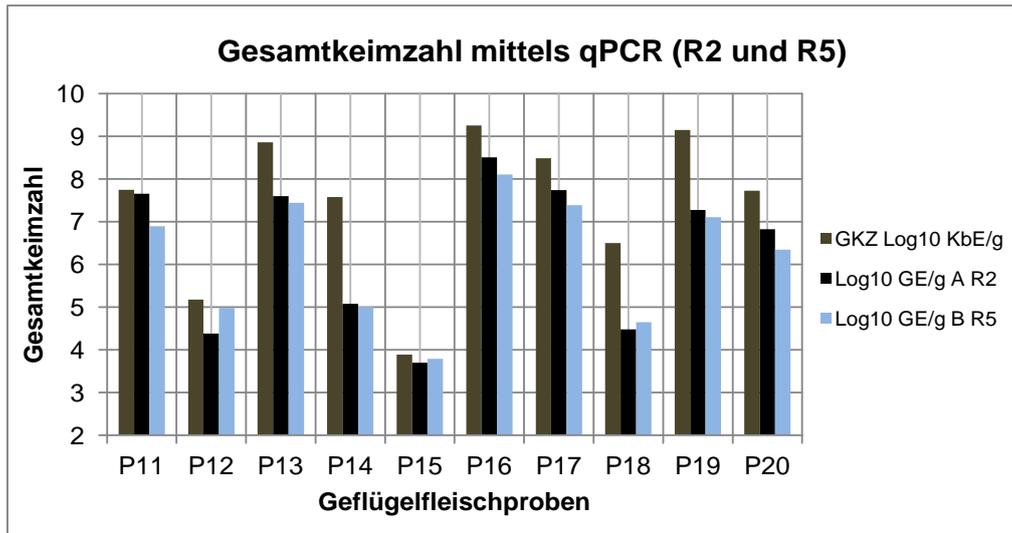


Abbildung 40: Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtkeimzahl mittels qPCR, mit und ohne vorgeschaltetem Zellwaschschritt der Standards, dargestellt im Vergleich zum Kulturverfahren. Die Daten beziehen sich auf Tabelle 44.

Diese Ergebnisse wurden erzielt, obwohl in der Regel bei der qPCR zu erwarten ist, dass aufgrund möglicher enthaltener „viable but non-culturable“ Zellen (VBNC-Zellen) (Nocker und Camper, 2006) subletal geschädigter und toter Zellen (Lee und Levin, 2007a), die log GE-Werte höher als die \log_{10} KbE/g liegen. Die Ergebnisse können neben den bereits diskutierten Einflussfaktoren in Abschnitt 3.4.4 folgende Ursachen haben:

PCR-Inhibitoren

Bei der Quantifizierung von DNA mittels PCR stellen PCR-Inhibitoren häufig ein unvermeidbares Hindernis für den Erfolg der Analyse dar. PCR-Inhibitoren üben ihre Wirkung durch unmittelbare Interaktion mit DNA oder durch Interferenz mit thermostabilen DNA-Polymerasen aus. Direkte Bindung von Agenzien an die einzel- oder doppelsträngige DNA kann die Amplifikation verhindern (Taylor et al., 2005; Wilson, 1997). Ebenso können Inhibitoren unmittelbar mit der DNA-Polymerase interagieren und somit deren Enzymaktivität blockieren (Ely et al., 1998; Park und Kohel, 1994). PCR-Inhibitoren können aus der Probe selbst stammen (z. B. Blut, Stoffe, Gewebe und Erde), aber auch in Folge der angewendeten Methode zur Gewinnung und Aufbereitung der Probe entstehen (Opel et al., 2010; Kainz, 2000; Wilson, 1997; Rossen et al., 1992). Auf die eine oder andere Art können Inhibitoren die Sensitivität und Amplifikationseffizienz der PCR stark reduzieren (Rådström et al., 2004). Lebensmittelproben, wie Fleisch, sind aufgrund der PCR-Inhibitoren eine schwierige Matrix bei den PCR-Analysen. Diese Inhibitoren unterscheiden sich in Fleischproben je nach Probenart, -teilstück und -aufbereitungsart und beeinträchtigen neben den anderen oben beschriebenen Inhibitoren die Amplifizierung von DNA-Templates. Wie der Tabelle 47 zu entnehmen ist, gelten Fett, Eiweiß, Kollagen und andere Fleischkomponenten als PCR-inhibitorische Substanzen, wodurch möglicherweise die Amplifikation von bakterieller DNA blockiert oder vermindert wird. Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurde versucht, mit Hilfe von Prä-PCR Waschschrinen, den negativen Einfluss von Matrix-bedingten Inhibitoren zu minimieren. Dieser Vorgang wirkte sich bei den zu messenden Proben in Bezug auf die PCR-Effizienzerhöhung positiv aus. Die im Vergleich zu den kolonienbildenden Einheiten niedrigeren log GE-Werte der qPCR weisen allerdings darauf hin, dass der damit verbundene Verlust an Zellmaterial und Amplifikationstemplates die Quantifizierung der wahren mikrobiellen Belastung der Fleischproben teilweise verhinderte.

Tabelle 47: PCR-Inhibitoren in verschiedenen Lebensmitteln (Klančnik et al., 2012; Wilson, 1997)

Probe	PCR-Inhibitor	Beispiel Literatur
Milchprodukte Milch (roh, entrahmt, pasteurisiert, trocken) Käse (trocken, weich).	Fett, Eiweiß, Calcium, Chelatbildener, tote Zellen	Kim et al., 2001; McKilip et al., 2000; Rådström et al., 2004
Fleisch		
Hähnchen (Fleisch, Karkasse, Hauthomogenate, Schenkel, Wurst, Muskel); Pute (Schenkel, Muskel, Haut, innere Organe); Rind (Hackfleisch, Roastbeef); Schwein (Schinken, Hackfleisch, Schenkel roh, Wurst, Fleischrollen).	Fett, Eiweiß, Kollagen (Blut), Fetuin und andere Fleischkomponenten	Grant et al., 1993; Uyttendaele et al., 1999; De Medici et al., 2003; Hudson et al., 2001; Whitehouse & Hottel, 2007; Silva et al., 2011
Meeresfrüchte Fisch (mariniert, geschnitten); Lachs (geräuchert), Garnelen, Schellfisch (Muscheln, Austern).	Phenolsäure, Kresolsäure, Aldehyde, Eiweiß, Fett	Agersborg et al., 1997

Qualität der Standardkurve

Die Erstellung einer geeigneten Standardkurve gilt als Voraussetzung für eine erfolgreiche DNA-Quantifizierung mittels qPCR. Deshalb ist die Qualität und Effizienz der Kalibrationskurve ein sehr wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Validität der entwickelten Methode. Die für die qPCR erforderliche Standardkurve wurde unter Anwendung einer Bakterienmischkultur, die direkt aus einer Geflügelfleischprobe hergestellt wurde, generiert. Dieser Schritt war sehr wichtig für die Anpassung der Standardkurve an die zu messenden Proben. So konnte die Amplifikation der Standards und der zu untersuchenden Proben unter gleichen Bedingungen erfolgen. Abgesehen vom Einfluss des bereits diskutierten Aufreinigungsprozesses führte insgesamt die Anwendung von Standardkurven zu Quantifizierungsergebnissen, die laut Plattenkulturverfahren nahe den Gesamtkeimzahlen lagen. Es wurden stets hohe Korrelationen zwischen log GE-Werten und GKZ-Werten erzielt. Um die Funktionalität der Standards in Bezug auf die Gesamtkeimzahl zu überprüfen, wurden die Gesamtkeimzahlen der Geflügelfleischproben, die mit Hilfe der Plattenkultur ermittelt wurden, gemeinsam mit den Standardkurven in einem Diagramm dargestellt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, lagen die Ergebnisse der Proben ohne initialem Waschschrift deutlich näher an der entsprechenden Standardkurve, als die Punkte der Proben mit aufgereinigten Standards. Außerdem lag die Regressionsgerade, resultierend aus der Gegenüberstellung von Gesamtkeimzahlen und Ct-Werten (Abb. 41), sehr nah an der Standardgerade in der R7 Analyse. Allerdings zeigt diese Abbildung auch, dass viele Punkte der Gesamtkeimzahlen oberhalb der Standardgeraden lagen. Dies bedeutet, dass die Keimzahlen, die durch qPCR ermittelt wurden, kleiner als die \log_{10} KbE/g waren, die durch

die Kulturmethode ermittelt wurden. Dennoch lagen bei der Analyse R7 viele Punkte genau auf der Kurve oder unterhalb der Kurve, was auf bessere Anpassung dieser Kurve im Vergleich zu R8 hinweist. Außerdem ist anhand der Abbildung 41 erkennbar, dass aufgrund der fehlenden Standardpunkte der unteren Quantifizierungsgrenze (10^3 KbE/g) bei dieser Analyse die niedrigsten Werte nicht mit der Standardkurve verglichen werden konnten.

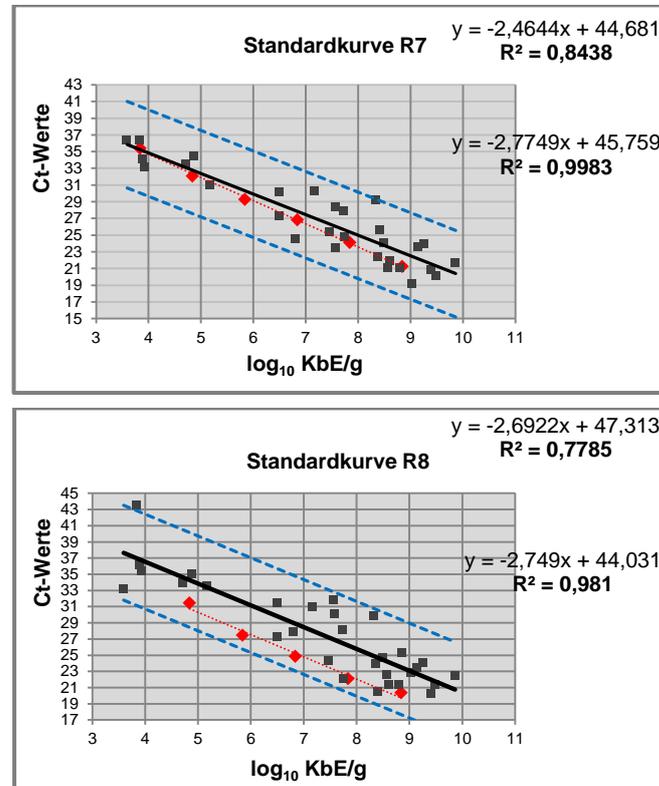


Abbildung 41: Die Standardkurven von qPCR-Analysen R7 ($n = 29$) und R8 ($n = 30$). Dazu wurde die Gesamtkeimzahl der Proben hinzugefügt. \blacklozenge : Standardwerte \blacksquare : Gesamtkeimzahl.

qPCR-Amplifikationseffizienz

Die Berechnung der Amplifikationseffizienz erfolgt über die Regressionsanalyse der Standardkurve. Alle Standardpunkte werden in einer linearen Regression zusammengefasst. Diese sollte mit einem hohen Korrelationskoeffizienten linear sein und eine Steigung von idealerweise -3,33 aufweisen. So wird eine Amplifikationseffizienz von 100 % erhalten, die einer perfekten Verdopplung in jedem Zyklus entspricht. Eine konstante PCR-Amplifikationseffizienz stellt ein wichtiges Kriterium für die Validität der Analyse dar (Tab 48). Schlecht optimierte qPCR-Analysen können zu einer verminderten Sensitivität und Spezifität führen (Pfaffl, 2012). Die Markenzeichen einer optimierten Analyse sind:

- lineare Standardkurve ($R^2 > 0,980$ oder $r \approx -0,990$)
- hohe Amplifikationseffizienz (90-105 %)
- Konsistenz über wiederholte Ansätze

Einige quantitative Modelle gehen davon aus, dass die analysierten Gene optimal mit 100 %-iger Effizienz oder zumindest mit ähnlicher Effizienz amplifiziert werden. Dieses ist jedoch praktisch nur schwer realisierbar. Vom Primer-Design bis zum Pipettieren können diverse Faktoren die PCR-Effizienz beeinflussen. Wie bereits diskutiert, können PCR-Inhibitoren, Probenverunreinigungen in Reaktionsansätzen oder ein Nukleinsäureabbau die Effizienz der PCR-Reaktion beeinträchtigen (Becker et al., 2010; Stahlberg et al., 2004).

Tabelle 48: Einflussfaktoren auf die Effizienz der qPCR (Pfaffl, 2012)

Effizienz%	Analyse	mögliche Ursache
100 %	Sehr gut	kein Problem
90-105 %	gut	kein Problem
<90 %	schlecht	mangelhaftes Primer-Design, suboptimale Reaktionsbedingungen
>105 %	schlecht	Pipettierfehler bei der Erstellung von Verdünnungen oder Mit-Amplifikation von nichtspezifischen Produkte

Die Berechnung der PCR-Effizienz (E) der durchgeführten acht qPCR-Analysen erfolgte anhand der Gleichung „ $E = 10^{-[1/\text{Steigung}] - 1}$ “. Dafür wurde die Steigung der Standardkurve aus seriellen Verdünnungen der Bakterienmischkultur (\log_{10} KbE/g) in Abhängigkeit der ermittelten Ct-Werte der qPCR berechnet. Mittels dieser Formel konnte eine hohe PCR-Effizienz zwischen 99,50 und 99,90 % für alle durchgeführten Analysen errechnet werden (Tab. 49).

Tabelle 49: Regressionsanalysen und Amplifikationseffizienz von Standardkurven aller qPCR-Analysen

qPCR-Analyse	Geradengleichung der Standardkurven	Determinationskoeffizienten (R ²)	qPCR-Amp. Effizienz (%)
R1/Gruppe A (n = 10)	y = -2,5283x + 44,358	0,9956	99,71
R4/Gruppe B (n = 10)	y = -2,5266x + 42,947	0,9795	99,73
R2/Gruppe A (n = 10)	y = -2,5924x + 44,505	0,9871	99,77
R5/Gruppe B (n = 10)	y = -2,3745x + 41,686	0,9628	99,66
Wiederholung (n = 6)	y = -2,4509x + 43,092	0,9725	99,70
R3/Gruppe A (n = 10)	y = -2,3047x + 43,521	0,9949	99,52
R6/Gruppe B (n = 10)	y = -2,6474x + 44,003	0,9900	99,80
Wiederholung (n = 6)	y = -2,8919x + 45,92	0,9633	99,90
R7/Gruppe A (n = 29)	y = -2,7749x + 45,759	0,9983	99,83
R8/Gruppe B (n = 30)	y = -2,7490x + 44,031	0,9810	99,84
Mittelwert ± SD:	2,58 ± 0,18 (Steigung)	0,982 ± 0,01 (R²)	99,74 ± 0,01

Trotz hoher Korrelationswerte zwischen den Plattenkultur- und qPCR-Analysen lässt ein genauerer Blick auf die qPCR-Ergebnisse erkennen, dass bei fast allen durchgeführten Analysen einige Proben mit ähnlicher Keimzahl sehr unterschiedliche Ct-Werte aufwiesen. Betrachtet man beispielsweise die Ergebnisse der R7-Analyse, ist zu sehen, dass die Proben mit einer Keimbelastung zwischen 6,5 und 7,5 log₁₀ KbE/g eine breite Ct-Wertspanne zwischen 23 und 30 aufwiesen. Das war in den oberen (10⁸ KbE/g) und unteren (10³ KbE/g) Detektionsbereichen weniger bemerkbar. Solche Abweichungen der Ct-Werte innerhalb einer oder mehrerer Analyse/n sind bei der qPCR-Methode sehr typisch und wurden bei ähnlichen Studien häufig beobachtet (Dolan et al., 2009; Lee und Levin, 2007b und Takahashi et al., 2006). Der Grund dafür kann im variablen Inhibitorengehalt der einzelnen Reaktionen, in der DNA-Kontamination, in einer Verschlechterung der Template-Qualität und -Integrität durch mehrmaliges Einsetzen in die Analysen, Signalschwankungen des Detektors innerhalb einer Platte und in suboptimalen Amplifikationsbedingungen liegen. Wie bereits beschrieben, wirken sich diese Faktoren negativ auf die PCR-Effizienz aus und lösen dadurch hohe Abweichungen in den Ct-Werten aus. Deshalb ist es notwendig, neben der Verbesserung der PCR-Analysenbedingungen, stets die Standards bei jeder Analyse mitamplifizieren zu lassen. So wird der Einsatz externer Standards in jedem PCR-Lauf nicht nur der Quantifizierung der Templates sondern, auch als positive Kontrolle für das gesamte Assay dienen.

In der Regel weisen Ct-Wert-Lücken von vier bis fünf Zyklen zwischen Standards und Proben auf ein Problem der PCR-Analyse selbst (z. B. PCR-Bedingungen oder Primerdesign) und nicht auf die Reaktion hin (Vorhandensein von Inhibitoren oder DNA-Degradierung) (Pfaffl, 2012). Vergleicht man die Ct-Werte der Standards mit denen der Proben in der Analyse R7 (Tab. 46), so ist zu sehen, dass zwar Ct-Abweichungen zwischen den Proben und Standards (mit gleichen Template-Konzentrationen) zu erkennen sind, diese aber bei allen Reaktionen bis auf zwei Werte (P1H2 und P9H27) nicht mehr als vier Zyklen betragen. Daher ist davon auszugehen, dass die Ct-Abweichungen in den qPCR-Analysen mehr mit einzelnen Reaktionen (PCR-Inhibitoren, DNA-Kontamination, Template-Degradierung, etc.) zusammenhängen, als mit den PCR-Bedingungen oder dem Primerdesign. Hierzu ist es wichtig, dass die Standards für jede Analyse neu erstellt und eingesetzt werden, damit die DNA-Qualität der Reaktionsansätze durch ständiges Einfrieren und Auftauen nicht beeinträchtigt wird.

3.5.5 Schlussfolgerung

Das Ziel des letzten Teils der Arbeit bestand darin, das in Abschnitt 3.4 entwickelte Protokoll durch eine Standardkurve zu einer quantitativen Analyse weiterzuentwickeln, sodass anhand dieser die Gesamtkeimzahl von Geflügelfleischproben, unabhängig von der Kultivierungsmethode, bestimmt werden kann. Die mit Hilfe der dezimalen Verdünnungen

aus der Bakterienmischkultur erstellten Standardkurven wiesen, trotz der komplexen Fleischmatrix und der vielfältigen Fleischflora, eine hohe Amplifikationseffizienz und ebenso geeignete Determinationskoeffizienten auf. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der PCR-Analysen von Gruppe A und B kann geschlossen werden, dass die Qualität der Standardkurve durch den initialen Waschschrift nicht verbessert wurde. Dies kann im Zusammenhang mit geringen Templatevolumina und Degradierung von DNA in Folge der Zentrifugation und des Waschens erklärt werden. Demzufolge scheint, dass bei direkter DNA-Extraktion aus jeder Verdünnung, wodurch offensichtlich ein ähnlicher Amplifikationsrhythmus bei den zu analysierenden Proben und Standards erfolgte, eine effizientere Standardkurve erzeugt und dadurch eine genauere Quantifizierung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch erzielt wurde. Angesichts der hohen Determinationskoeffizienten der Standardkurven war zu erwarten, dass die Ergebnisse der qPCR-Analysen (log GE-Werte) relativ hohe Korrelationen mit der Gesamtkeimzahl der Geflügelfleischproben zeigen würden, zumindest in gleicher Größenordnung wie die Korrelation von Ct-Werten und Gesamtkeimzahl in Abschnitt 3.4 liegen würden. Dies war zwar bei einem großen Teil der Proben der Fall, dennoch waren einige Werte kleiner als die Ergebnisse der Plattenkulturmethode. Diese Ergebnisse wurden erzielt, obwohl aufgrund der Nicht-Diskriminierung zwischen toter und lebendiger DNA und variablen Kopienzahl vom Ziel-Gen erwartet wurde, dass die Keimgehalte, die mittels der qPCR erzielt werden, höher als die Keimzahlen, die mittels des Plattenkulturverfahrens ermittelt wurden, liegen. Da die frisch gekauften Geflügelfleischproben jedoch mit keinem zellzerstörendem komplexem Verarbeitungsprozess versehen wurden, war eine hohe Anzahl an toten Zellen in diesen Proben nicht zu erwarten. Außerdem gehörten die zu amplifizierenden Sequenzen zu einem Einzelkopiegen (*rpoB*), wodurch eine Genkopienzahl einer kolonienbildenden Einheit entsprach. Die im Vergleich zu den \log_{10} KbE-Werte niedrigeren log GE-Werte können in Zusammenhang mit in Geflügelfleisch vorhandenen PCR-Inhibitoren, Nukleinsäuredegradierung/-verlust während der Probenaufbereitung, DNA-Kontamination und der Detektionsspanne der angewendeten Primer für manche Bakterienstämme erklärt werden. Um die wahre Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch bestimmen zu können und bessere Quantifizierungsergebnisse zu erzielen, sollten diese Abweichungen so weit wie möglich minimiert werden. In Anbetracht der gesamten Ergebnisse der sechs qPCR-Analysen und der Wiederholungen R7 und R8 kann man erkennen, dass die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch mittels quantitativer Real-Time PCR, unter Anwendung einer geeigneten Standardkurve, vergleichbare Ergebnisse mit denen aus dem Kulturverfahren liefern kann. Allerdings wäre die große Herausforderung, neben der Erstellung einer effizienten Standardkurve für das Erzielen besserer Ergebnisse in dieser Methode, eine niedrigere Detektionsuntergrenze als 10^3 KbE/g für die Quantifizierung zu erreichen. Eine Erstellung der Standardkurve war in dieser Arbeit nur zwischen den

Keimgehalten 10^3 und 10^8 KbE/g möglich. Die Werte darunter (10^2 und 10^1 KbE/g) führten zu nichtausreichenden Determinationskoeffizienten ($R^2 < 0,98$) und einer ungünstigen Amplifikationseffizienz. Allerdings war der erreichte Quantifizierungsbereich für die zu untersuchenden Geflügelfleischproben anwendbar, da die Gesamtkeimzahl dieser Proben, anhand der Ergebnisse des Plattenkulturverfahrens, kaum niedriger als 10^3 KbE/g lag. Außerdem kann die Analyse durch den Einsatz einer geeigneten Prä-PCR-Methode zur Beseitigung der in der Geflügelfleischmatrix vorhandenen PCR-Inhibitoren, ohne viel Verlust an Zellmaterialien, weiter optimiert werden.

4 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde eine quantitative Real-Time PCR-Methode zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch entwickelt. Hierfür wurde im Rahmen der Vorversuche die Eignung dieser Methode unter Anwendung eines Universalprimerpaares, das auf die konservierten Regionen des *16S rRNA*-Gens abzielt, ermittelt. Die Determinationskoeffizienten, die sich aus der Korrelation zwischen den Ct-Werten dieser Versuche mit der klassisch ermittelten Gesamtkeimzahl der Fleischproben ergaben, stellten eine geeignete Grundlage für die Weiterentwicklung des Protokolls dar. So wurde basierend auf den Ergebnissen der linearen Regressionsanalyse ($R^2 = 0,72$) die Eignung der eingesetzten Prä-PCR-Schritte zur Aufbereitung der Proben, des DNA-Extraktionsverfahrens und der Anwendung von SYBR[®] Green I als Detektionssystem bestätigt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Identifizierung der bakteriellen Kontaminanten mit Hilfe einer *16S rRNA*-Sequenzenanalyse vorgenommen. Somit wurde eine Bakterienreferenzliste für die Geflügelfleischproben erstellt, die zur Bestimmung der Spezifität und Detektionsspanne der im Anschluss zu generierenden Primer diente. So wurde die Detektionsspanne der generierten Primerpaare in der BLAST-Analyse für diese Bakterien analysiert. Die Geflügelfleischproben, die bei diesem Versuch verwendet wurden, wurden über Nacht bei verschiedenen Temperaturen gelagert, um eine für einen möglichen Abbruch der Kühlkette potentiell repräsentative Mikroflora (Pooni und Mead, 1984) zu erhalten. Dieser Schritt war für die im Anschluss zu generierenden Primer wichtig, da somit im Falle einer Temperaturschwankung ein großer Teil der Mikroflora erfasst werden konnte (Cox et al., 1998).

Der größte Teil der erhaltenen *16S rRNA*-Sequenzen zeigte eine über 99 %-ige Sequenzenähnlichkeit mit den entsprechenden Treffern in der BLAST-Analyse, sodass Identifizierungen bis zum Genusgrad möglich waren. Zeigten mehrere Spezies Sequenzenübereinstimmungen in der BLAST-Analyse, so wurden alle als Treffer angenommen. Diese Spezies stellten ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien dar, die zu einem großen Teil mit den Angaben der Literatur über die Verderbsassoziierten Mikroorganismen in Geflügelfleisch übereinstimmten. Über die Anwendung der *16S rRNA*-Gensequenzanalyse zur Identifizierung der Verderbniserreger in Geflügelfleisch wurde bis jetzt in der Literatur nicht berichtet. Deshalb kann dieser Teil der Arbeit als eine geeignete Grundlage zur Weiterentwicklung der molekularbiologisch basierenden Identifizierung der Verderbsmikroorganismen in Geflügelfleisch verwendet werden.

Das Primerdesign stellte in dieser Arbeit die größte Herausforderung dar. Wie eigene Ergebnisse der Bakterienidentifizierung und Literaturangaben zeigten (Hinton et al., 2004; Mead, 2004a; Fehlhaber, 2001; Russel et al., 1996) besitzt Geflügelfleisch eine vielfältige Mikroflora. Diese ist je nach Einflussfaktoren, wie Lagerungstemperatur, Produktionshygiene und Verpackungsart, sehr variabel (Fehlhaber, 2001). Um dieses breite Spektrum der Bakterien zu erfassen, sollte ein Primerpaar generiert werden, das eine sehr breite Detektionsspanne besitzt. Dies bedeutet, dass das Primerpaar auf eine sehr konservierte Region im Genom der Bakterien abzielen muss, die in allen in Geflügelfleisch vorkommenden Bakterien existiert. Das Alignment der *rpoB*-Gensequenzen der Zielbakterien zeigte, dass eine konservierte Region, die sich für das Primerdesign und für Quantifizierungszwecke eignet, kaum existierte. Deshalb sollten nur Primerpaare in Betracht gezogen werden, die den bedeutsamsten Teil der Zielbakterien detektieren können.

Mit den Primerpaaren, die in der BLAST-Analyse eine geeignete Detektionsspanne aufwiesen, wurden in den Korrelationsanalysen sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. So konnten die Primerpaare *rpoB* 6 und *rpoB* 1C variabelere Spezies erfassen als das Primerpaar *rpoB* 15. Dennoch lagen die Determinationskoeffizienten, die aus der Korrelation zwischen den Ergebnissen der qPCR-Analyse unter Anwendung des Primerpaares *rpoB* 15 und der Plattenkulturmethode resultierten, deutlich höher als bei den Analysen, bei denen *rpoB* 6 und *rpoB* 1C eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Primerpaar *rpoB* 15 *in vitro* mehr Bakterien detektieren konnte als *in silico* in der BLAST-Analyse. Die einfachste Methode die Spezifität der generierten Primer zu ermitteln, wäre eine PCR-Analyse unter Anwendung vom Primerpaar *rpoB* 15 und der DNA-Extrakte, die aus den Zielbakterien erhalten wurden, durchzuführen. Praktisch würde das bedeuten, dass sämtliche Zielbakterien als Reinkulturen für die DNA-Extraktion verfügbar sein müssten. Hinsichtlich der großen Anzahl der Zielbakterien zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl war dieses Vorgehen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht anwendbar. Allerdings konnten mit Hilfe des Primerpaares *rpoB* 15 fast alle DNA-Templates, die aus den Kolonien der Geflügelfleischbakterien extrahiert wurden, erfolgreich amplifiziert werden. Dennoch ist zur praktischen Anwendung der entwickelten qPCR-Analyse zu empfehlen, dass das Primerpaar *rpoB* 15 in einer Laboreinrichtung, die die Zielbakterien als Reinkulturen zur Verfügung hat, auf seine universelle Anwendbarkeit für Geflügelfleischproben getestet wird.

Die Eignung des entwickelten PCR-Protokolls und die Anwendung des Primerpaares *rpoB* 15 wurden mit Hilfe von Korrelationsanalysen ermittelt. In den Korrelationsanalysen wurden die Ergebnisse der PCR-Assays (Ct-Werte) mit den Gesamtkeimzahlen aus dem Kulturverfahren (\log_{10} KbE/g) verglichen. Die hohen Determinationskoeffizienten, resultierend aus diesen Analysen, zeigten, dass das Primerset *rpoB* 15 für den Einsatz in der PCR zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch geeignet ist.

Als zu analysierende Geflügelfleischproben, aus denen die bakterielle DNA isoliert wurde, wurde Hähnchenfleisch (Brustfilet oder Brustinnenfilet) ausgewählt. Der Vorteil dieser Probenselektion war, dass eine homogene Keimbeschaffenheit unter den Proben erzielt werden konnte. Somit konnten die Korrelationsanalysen einfacher ausgewertet werden. Zum Generieren der Primerpaare wurden jedoch Bakterien, die in vielen verschiedenen Geflügelfleischproben detektiert wurden, einbezogen. Deshalb kann die entwickelte qPCR-Methode potentiell für alle Geflügelfleischarten eingesetzt werden. Dennoch sollte für die Validierung der Methode und Anwendung in der Lebensmittelindustrie das entwickelte PCR-Protokoll mit anderen Geflügelfleischarten durchgeführt werden und ihre Übertragbarkeit auf diese Proben überprüft werden.

Im Rahmen der Weiterentwicklung des Real-Time PCR-Protokolls zu einer quantitativen Analyse wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus einer Bakteriensuspension Standards hergestellt. Diese dienten zur Erstellung einer Standardkurve, anhand derer die absolute Quantifizierung der Gesamtkeimzahl der Proben durchführbar war. Das Ziel der Quantifizierungsanalyse war es, dass die entwickelte Real-Time PCR-Methode, auch unabhängig vom Plattenkulturverfahren, durchgeführt werden kann. So wurden die Standards mit bekannten Keimgehalten gleichzeitig mit den zu untersuchenden Proben in der PCR eingesetzt. Aus dem Vergleich der Ct-Werte der zu messenden Proben mit denen der Standards konnte auf den Keimgehalt der Geflügelfleischproben geschlossen werden. Allerdings kann durch diese Methode die Unabhängigkeit der qPCR-Analyse vom Kulturverfahren nicht vollständig ausgeschlossen werden, da zur Bestimmung der Keimkonzentration der Standards Aliquote der erstellten Verdünnungen auf den Agarplatten kultiviert wurden. Hierdurch können die sich ergebenden Keimzahlen der Platten auf die Standards bezogen werden und diese wiederum auf die Ct-Werte der qPCR-Analyse. Allerdings kann die einmalig erstellte Standardkurve zur Messung der gleichen Probenart stets verwendet werden. Alternativ können zur weiteren Verwendung dieser Methode in der Lebensmittelindustrie Standards produziert werden, die unabhängig von der Kulturmethode in der Analyse eingesetzt werden können, wie z. B. DNA-Extrakte aus den reinen bakteriellen Mischkulturen mit bekannten Keimkonzentrationen. Jedoch sollte bei der Erstellung der Standards, die unabhängig von der Matrix der zu analysierenden Proben erstellt werden, in Betracht gezogen werden, dass die darin enthaltenen DNA möglicherweise nicht mit gleicher Effizienz amplifiziert wurden, wie jene in den zu messenden Geflügelfleischproben. Der Vorteil der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Quantifizierungsmethode liegt darin, dass die Standardproben direkt aus einer Bakteriensuspension erstellt wurden, die aus der gleichen Matrix, wie der zu analysierenden Geflügelfleischprobe entstammte. Somit konnte der Einfluss von Inhibitoren auf die Amplifikationseffizienz mitberücksichtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine qPCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Geflügelfleisch durchgeführt. Das neugenerierte Primerpaar *rpoB* 15, das auf Konsensusregionen des *rpoB*-Gens abzielte, zeigte eine hohe Detektionsspanne für viele mit dem Verderb des Geflügelfleisches assoziierte Bakterien. Die zur Quantifizierungsanalyse erstellte Standardkurve diente zur Übertragung der Ct-Werte der qPCR auf die kolonienbildenden Einheiten des Plattenkulturverfahrens. Durch die Geradengleichungen, die sich aus den Standardkurven ergeben, wurde eine hohe Amplifikationseffizienz für die entwickelte qPCR-Analyse erhalten. Die mittels der qPCR kalkulierten Bakterienzahlen wiesen eine hohe Korrelation mit der Gesamtkeimzahl der Proben, bestimmt durch das Plattenkulturverfahren, auf.

Die Vorteile der Anwendung der qPCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl hinsichtlich der Geschwindigkeit und der Spezifität des Assays sowie der Detektion der nichtkultivierbaren und anaeroben Mikroorganismen, wurden beschrieben. Ebenso wurden verschiedene Nachteile dieser Methode bezüglich der Nicht-Diskriminierung zwischen den toten und lebenden Zellen sowie des Einflusses der amplifikationsinhibitorischen Substanzen der Geflügelfleischmatrix dargestellt. Für die Anwendung der qPCR-Analyse zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in verarbeiteten Geflügelfleischprodukten, bei denen eine Abtötung von Keimen erfolgt ist, ist die zusätzliche Anwendung eines diskriminierenden Farbstoffsystems zwischen toten und lebenden bakteriellen Zellen (wie z. B. EMA/PMA-qPCR) empfehlenswert.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Hähnchenfleischproben stellte sich die entwickelte qPCR-Analyse als eine vielversprechende Methode heraus. Für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie und für die Anwendung zur Prognose der Haltbarkeitsdauer von Geflügelfleisch sowie für die Übertragbarkeit dieser Analyse auf weitere Geflügelarten, ist eine Weiterentwicklung dieser Methode zu empfehlen.

Literaturverzeichnis

Abbott, M. A.; Poiesz, B. J.; Byrne, B. C.; Kwok, S.; Sninsky, J. J.; Ehrlich, G. D. (1988): Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detection proviral DNA amplified *in vitro*. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol.158, S. 1158-1169.

Acinas, S. G.; Marcelino, L. A.; Klepac-Ceraj, V.; Polz, M. F. (2004): Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, S. 2629–2635.

Adekambi, T.; Berger, P.; Ralout, D.; Drancour, M. (2006): *rpoB* gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 56, S. 133–143.

Adekambi, T.; Raoult, D.; Drancourt, M. (2008b): The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, Vol. 17, S. 37–45.

Adekambi, T.; Shinnick, T. M.; Raoult, D.; Drancourt, M. (2008a): Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, S. 1807–1814.

Agersborg, A.; Dahl, R.; Martinez, I. (1997): Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 35, S. 275–280.

Agostino, M. (2012): Practical Bioinformatics. 1st edn. Gerland Science.

Agrimonti, C.; Bortolazzi, L.; Maestri, E.; Sanagelantoni, A. M.; Marmioli, N. (2013): A Real-Time PCR/SYBR Green I Method for the Rapid Quantification of *Salmonella enterica* in Poultry Meat. *Food Analytical Methods*, Vol. 6, S. 1004–1005.

Ahmed, M. A. (1979): Aspects of the Microbiology of the Spoilage of Meat with Special Reference to Gram-negative Facultatively Anaerobic Rods of the Family *Enterobacteriaceae*.

Akbar, A.; Anal, A. K. (2013): Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. Vol. 3, S. 163–168.

Alonso, R.; Nicholson, P. S.; Pitt, T. L. (1993): Rapid extraction of high purity chromosomal DNA from *Serratia marcescens*. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.16, S. 77–79.

Altekruse, S. F.; Stern, N. J.; Fields, P. I.; Swerdlow, D. L. (1999): *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 5, S. 28–35.

Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K. H. (1995): Phylogenetic Identification and *in Situ* Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 59, S. 143-169.

Anon. (2003): Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of microorganisms - colony count technique at 30 C°. EN ISO 4833:2003.

- Apfalter, P.; Reischl, U.; Hammerschlag, M. R.** (2005): In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, S. 1863–1868.
- Arnaut-Rollier, I.; Vauterin, L.; De Vos, P.; Massart, D. L.; Devriese, L. A.; De Zutter, L.; Van Hof, J.** (1999): A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 87, S. 15–28.
- Ayres, J. C.; Ogilvy, W. S.; Stewart, G. F.** (1950): Post mortem changes in stored meats. 1. Microorganisms associated with the development of slime on eviscerated cut up poultry. *Food Technology*, Vol. 4, S. 199–205.
- Baert, L.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.** (2008): Evaluation of viral extraction methods on a broad range of ready-to-eat foods with conventional and real-time RT-PCR for Norovirus GII detection. *International Journal Food Microbiology*, Vol. 123, S. 101–108.
- Bailey, J. S.; Thomson, J. E.; Cox, N. A.** (1987): Contamination of Poultry during Processing. In: Cunningham, F. E.; Cox, N. A. (ed.), *The microbiology of poultry meat products*. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc., S. 193–211.
- Bangsow, T.; Huch, R.; Male, D.; Müller, S.** (2002): Polymerase-Kettenreaktion. In: Schimpf (Hrsg.), *Gentechnische Methoden*. Berlin Heidelberg: Spektrum Verlag, S. 147-167.
- Barbut, S.** (2004): Other poultry preservation techniques. In: Mead, G. C. (ed.), *Poultry meat processing and quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press, S. 186–210.
- Barnes, E. M.; Impey, C. S.** (1968): Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 31, S. 97–107.
- Barnes, E. M.; Mead, G. C.; Impey, C. S.; Adams, B. W.** (1979a): Spoilage organisms of refrigerated poultry meat. In: Russel, A. D.; Fuller, R. (ed.), *Cold Tolerant Microbes in Spoilage and the Environment*. Society for Applied Bacteriology Technical Series no 13. London: Academic Press, S. 101–116.
- Bast, E.** (2014): Bestimmung der Zellzahl und Zellmasse in Population einzelliger Mikroorganismen. In: Bast, E., *Mikrobiologische Methoden, Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Verlag, S. 319–366.
- Becker, C.; Hammerle-Fickinger, A.; Riedmaier, I; Pfaffl, M. W.** (2010): mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, Vol. 50, S. 237–243.
- Benson, D. A.; Clark, K.; Karsch-Mizarhi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J.; Sayers, E. W.** (2015): GenBank. *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, S. 30 – 35.
- Bernardo, Di. G.; Del Gaudio, S.; Galderisi, U.; Cascino, A.; Cipollaro, M.** (2007): Comparative evaluation of different DNA extraction from food samples. *Biotechnology Progress*, Vol. 23, S. 297–301.
- Berrang, M. E.; Dickens, J. A.** (2000): Presence and level of *Campylobacter* spp. On broiler carcasses throughout the processing plan. *Journal of Applied Poultry Research*, Vol. 9, S. 43–47.
- Bilgili, S. F.** (2002): Poultry meat processing and marketing. What does the future hold? In: Mead, G. C. (ed.), *Poultry meat processing and quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press, S. 12–22.

Bocchetta, M.; Gribaldo, S.; Sanangelantoni, A.; Cammarano, P. (2000): Phylogenetic depth of the bacterial genera *Aquifex* and *Thermotoga* inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 50, S. 366–380.

Boor, K. J.; Duncan, M. L.; Price, C. W. (1995): Genetic and transcriptional organization of the region encoding the beta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, S. 20329–20336.

Borukhov, S.; Nudler, E. (2003): RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. *Current Opinion Microbiology*, Vol. 6, S.93–100.

Boyapalles, S.; Weseley, I. V; Scott Hurd, H.; Gopal Reddy, P. (2001): Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. *Journal of Food Protection*, Vol. 64, S.1352-1361.

Brehm-Stecher, B.; Young, C.; Jaykus, L. A.; Tortorello, M. L. (2009): Sample preparation: the forgotten beginning. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, S. 1774–1789.

Bundesverband der deutschen Fleischwaren (bvdf) (2015): URL:<http://www.bvdf.de>. Elektronische Publikation, URL 2015.

Burton, Z.; Burgess, R. R.; Lin, J.; Morre, D.; Holder, S.; Gross, C. A. (1981): The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E coli* K12. *Nucleic Acids Research*, Vol. 9, S. 2089–2903.

Busch, U. (2010): Molekulare Lebensmittelanalytik.; PCR-Reaktion und Komponenten. In: Busch, U. (Hrsg.), *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S. 1–4; S. 36–47.

Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, V.25, S.169-193.

Bustin, S. A. (2004): *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla: IUL Press.

Bustin, S. A. (2008): Real-time polymerase chain reaction – towards a more reliable, accurate and relevant assay. *European Pharmaceutical Review*, Vol. 16, S. 19–27.

Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellems, J.; Hugget, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W.; Shipley, G. L. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, Vol. 55, S. 611–622.

Bustin, S. A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. (2005): Review: quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction – A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 34, S. 587–601.

Bustin, S. A.; Nolan T. (2004): *Chemistries*. In: *A-Z of Quantitative PCR*. Bustin, S. (Hrsg.), 1.Aufl. La Jolla: International University Line, S. 215–263.

Bustin, S. A.; Zaccara, S.; Nolan T. (2012): *An Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction*. In: Fillion, M. (ed.), *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Norfolk: Caister Academic Press, S. 1–25.

Case, R. J.; Boucher, Y.; Dahllo, I.; Holmstro, C.; Doolittle, W. F.; Kjelleberg, S. (2007): Use of *16S rRNA* and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73, S. 278–288.

Ceverny, J.; Meyer, J. D.; Hall, P. A. (2009): Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products. In: Sperber, W. H.; Doyle, M. P. (ed.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. New York, Dodrecht, Heidelberg, London: Springer Verlag, S.69–86.

Chen, B. Y.; Pyla, R.; Kim, T. J.; Silva J. L. (2010): Prevalence and contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in catfish processing environment and fresh fillets. *Food Microbiology*, Vol. 27, S. 645–652.

Chipley, J. R. (1987): Standard and Experimental Methods of Identification and Enumeration. In: Cunningham, F. E.; Cox, N.A. (ed.), *The microbiology of poultry meat products*. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc., S. 43–138.

Cilia, V.; Lafay, B.; Christen, R. (1996): Sequence Heterogeneities Among 16S Ribosomal RNA Sequences and Their Effect on Phylogenetic Analyses at the Species Level. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 13, S. 451–461.

Clark, A. J.; Sandler, S. J. (1994): Homologous genetic recombination: The pieces begin to fall into place. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 20, S. 125–142.

Clarridge, J. E. (2004): Impact of *16S rRNA* Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology reviews*, Vol. 17, S. 840–862.

Clough, H. E.; Clancy, D.; O'Neill, P. D.; Robinson, S. E.; French, N. P. (2005): Quantifying Uncertainty Associated with Microbial Count Data. A Bayesian Approach. *Biometrics*, Vol. 61, S. 610–616.

Cocolin, L.; Rantsiou, K. (2012): Quantitative Polymerase Chain Reaction in Food Microbiology. In: Filion, M. (ed.), *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Norfolk: Caister Academic Press, S. 149–160.

Corless, C. E.; Guiver, M.; Borrow, R.; Kaczmarski, E.; Fox, A. J. (2000): Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38, S. 1747–1752.

Cox, N. A.; Juven, B. J.; Thomson, J. E.; Mercuri, A. J.; Chew, V. (1975): Spoilage odors in poultry meat produced by pigmented and nonpigmented *Pseudomonas*. *Poultry Science*, Vol. 54, S. 2001–2006.

Cox, N. A.; Russel, S. M.; Bailey J. S. (1998): The microbiology of stored poultry. In: Davies, A.; Board, R. (ed.), *The microbiology of meat and poultry*. London: Blackie Academic and Professional, S. 266–287.

Cunningham, F. E. (1987): Types of Microorganisms Associated with Poultry Carcasses. In: Cunningham, F. E.; Cox, N. A. (ed.), *The microbiology of poultry meat products*. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc., S. 29–42.

Dahllof, I.; Baillie, H.; Kjelleberg, S. (2000): *rpoB*-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in *16S rRNA* Gene Intraspecies Heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, S. 3376–3380.

Dang, G. C.; Jayasena, S. D. (1996): Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 264, S.268-278.

Dawson, P. L. (1987): Packaging of Processed Poultry. In: Cunningham, F. E.; Cox, N. A. (ed.), *The microbiology of poultry meat products*. Orlando, San Diego, New York, Austin, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press Inc., S. 223–233.

Dawson, P. L.; Clemson University, Clemson, USA; Stephens, C.; (2004): Poultry packaging. In: Mead, G. C. (ed.), *Poultry meat processing and quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press, S. 135–163.

Deletoile, A.; Decre, D.; Courant, S.; Passet, V.; Audo, J.; Grimont, P.; Arlet, G.; Brisse, S. (2009): Phylogeny and Identification of *Pantoea* Species and Typing of *Pantoea agglomerans* Strains by Multilocus Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 47, S. 300–310.

DeLong, E. F.; Wickham, G. S.; Pace, N. R. (1989): Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, Vol. 10, S. 1360–1363.

De Medici, D. L.; Croci, E.; Delibato, S.; Di Pasquale, E.; Toti, L. (2003): Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, S. 3456–346.

Directive 71/118/EEC (1971): URL:<http://www.eur-lex.europa.eu>. Elektronische Publikation, URL am 15.02.2016.

Dolan, A.; Burgess, C. M.; Barry, T. B.; Fanning, S.; Duffy, G. (2009): A novel quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) for the enumeration of total bacteria, using meat microflora as a model. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 77, S. 1–7.

Drancourt, M.; Raoult, D. (2002): *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, S. 1333–1338.

Drancourt, M.; Roux, V.; Fournier, P. E.; Raoult, D. (2004): *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of Aerobic Gram-Positive Cocci of the Genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Abiotrophia*, and *Granulicatella*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, S. 497–504.

Edwards, U.; Rogall, T.; Blocker, H. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, S. 7843–7853.

Elliott, R. P.; Michener, H. D. (1960): Microbiological Standards and Handling Codes for Chilled and Frozen Foods. A Review. *Applied Microbiology*, Vol. 9, S. 452–468.

Ely, J. J.; Reeves-Daniel, A. Campbell, M. L.; Kohler, S.; Stone, W. H. (1998): Influence of magnesium ion concentration and PCR amplification conditions on cross-species PCR. *Biotechniques*, Vol. 25, S. 38–40, 42.

Eriksson, P. V.; Graciela, N. P.; Peseti, M. F.; Manghi, M. A. (1995): Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas fluorescens* on meat surface. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, S. 397–398.

Evans, R. N.; Blaha, G.; Bailey, S.; Steitz, T. A. (2008): The structure of *lepA*, the ribosomal back translocase. *PNAS*, Vol. 105, S.4673–4678.

Farrelly, V.; Rainey, F. A.; Stackebrandt, E. (1995): Effect of Genome Size and *rrn* Gene Copy Number on PCR Amplification of *16S rRNA* Genes from a Mixture of Bacterial Species. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, S. 2798–2801.

Fehlhaber, K. (1992): Geflügel und Geflügelfleischprodukte. In: Fehlhaber, K., Janetschke, P., (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer.

Fehlhaber, K. (2001): Bedeutung des Geflügelfleisches. *Mikrobiologie des geschlachteten Geflügels. Zerlegung und Verpackung*. In: Fries, R.; Bergmann, V.; Fehlhaber, K., *Praxis der Geflügelfleischuntersuchung*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft, S.11–16.; S.197–210.; S.217–221.

Fenollare, F.; Raoult, D. (2004): Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS*. Vol.112, S.785–807.

Fleischatlas Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel (2014): URL: <http://www.bund.net>. Elektronische Publikation, URL am 15.02.2016.

Fontana, C.; Favaro, M.; Pelliccioni, M.; Pistoia, E. S.; Favalli, C. (2005): Use of the MicroSeq *16S rRNA* gene-based sequencing for identification of bacterial isolates that commercial automated systems failed to identify correctly. *Journal Clinical of Microbiology*, Vol. 43, S. 615–619.

Fries, R.; Kobe, A.; Klaschka, S. J. (1992): Einfluß der Bandgeschwindigkeit auf die Ausleseeffektivität der Kontrolle bei der Geflügelfleischuntersuchung (Broiler). *Archiv für Geflügelkunde*, Vol. 56, S. 247–255.

Fukushima, H.; Katsube, K.; Hata, Y.; Kishi, R.; Fujiwara, S. (2007): Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 73, S. 92–100.

Gallo, L.; Schmitt, R. E.; Schmidt-Lorenz, W. (1988): Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. III. Effect of storage temperature on the microbial association of poultry carcasses. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, Vol. 21, S. 216–233.

Geoffery, C. R.; Abosbkiwa, M.; Coleman, G. (1992): Comparative sequence analysis and predicted phylogeny of The MA-dependent RNA polymerase B subunits of *Staphylococcus aureus* and other eubacteria. *Biochemical Society Transactions*, Vol. 21, S. 40.

Geornaras, I.; von Holy, A. (2000): Bacterial counts associated with poultry processing at different sampling times. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 40, S. 343–349.

Gibson, J. R.; Sutherland, K.; Owen, R. J. (1994): Inhibition of DNase activity in PFGE analysis of DNA from *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, Vol.19, S. 357–358.

Gill, G.; Sadowski, I.; Ptashne, M. (1990): Mutations that increase the activity of a transcriptional activator in yeast and mammalian cells. *Proceedings of the National Academy Science*, Vol. 87, S. 2127–2131.

Goldenberger, D.; Künzli, A.; Vogt, P.; Zbinden, R.; Altweg, M. (1997): Molecular Diagnosis of Bacterial Endocarditis by Broad-Range PCR amplification and Direct Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, S. 2733–2739.

- Gonzalez, G.; Martin, R.; Garcia, T.; Morales, P.; Sanz, B.; Hernandez, P. E.** (1996): Polyclonal antibodies against the protein F of *Pseudomonas fluorescens* for the detection of psychrotrophic bacteria in meat using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Meat science*, Vol. 42, S. 305–313.
- Grant, K. A.; Dickinson, J. H.; Payne, M. J.; Campebell, S.; Collins, M. D.; Kroll, R. G.** (1993): Use of the polymerase chain reaction and 16S rRNA sequences for the rapid detection of *Brochothrix* spp. in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 74, S. 260–267.
- Grau, F. H.** (1986): Microbial Ecology of Meat and Poultry. In: Pearson, A. M.; Dutson, T. R. (ed.), *Advances in Meat Research: meat and poultry microbiology*. United Kingdom: Macmillan publishers LTD, S. 1–47.
- Gray, R. J. H.; Witter, L. D.; Ordal, Z. H.** (1973): Characterization of mild thermal stress in *Pseudomonas fluorescens* and its repair. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 26, S. 78–85.
- Grouven, U.; Bender, R.; Ziegler, A.; Lange, S.** (2007): Vergleich von Messmethoden, Artikel Nr. 24 der Statistik-Serie in der DMW. *Statistik*, Vol. 132, S. 69–73.
- Gutiérrez, R.; Garcia, T.; Gonzalez, I.; Sanz, B.; Hernandez, P. E.; Martin, R.** (1998): Quantitative detection of meat spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction (PCR) and an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 26, S. 372–376.
- Hansen, A.** (2004): Primerdesign. *Bioinformatik: Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler*. 2. Aufl. Basel: Springer, S. 113–115.
- Harris, J. K.; Kelley, S. T.; Spiegelman, G. B.; Pace, N. R.** (2003): The Genetic Core of the Universal Ancestor. *Genome Research*. Vol. 13, S. 407–412.
- Harris, K. A.** (2003): Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 52, S. 685–691.
- Hart, A.; Kite, P. E.** (1977): Comparison of four selective agars for the isolation of *Pseudomonas*. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 33, S. 1209–1214.
- Hartmann, Britta.** (2007): Entwicklung einer Real-Time PCR-Nachweismethode für *Yersinia enterocolitica*. München : Vet. Med. Diss.
- Heid, A. C.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M.** (1996): Real Time Quantitative PCR, *Genome Research*, Vol 6, S. 986–994.
- Higuchi, R.; Fockler, C.; Dolling, G.; Watson, R.** (1993): Kinetic PC analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, Vol. 11, S.1026–1030.
- Hinton, A.; Cason, J. A.; Ingram, K. D.** (2004): Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 91, S. 155–165.
- Hoffmann, H.; Roggenkamp, A.** (2003): Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 69, S. 5306–5318.
- Holzappel, W. H.** (1998): In: Davies, A.; Board, R. (ed.), *The microbiology of meat and poultry*. London: Blackie Academic and Professional, S. 35–84.

Hoorfar, J.; Malorny, B.; Abdulmawjood, A.; Cook, N.; Wagner, M.; Fach, P. (2004): Practical consideration in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, S. 1863–1868.

Hudson, J. A.; Lake, R. J.; Savill, M. G.; Scholes P.; McCormick, R. E. (2001): Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 90, S. 614–621.

Ibekwe, A. M.; Walt, P. M.; Grieve, C. M.; Sharma, V. K.; Lyons, S. R. (2002): Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 68, S. 4853–4862.

Irwin, P.; Nguyen, L.; He, Y.; Paoli, G.; Gehring, A.; Chen, Chin-Y. (2014): The near-quantitative sampling of genomic DNA from various food-borne Eubacteria. *BMC Microbiology*, Vol. 14, S. 326.

Ishikawa, J.; Yamashita, A.; Mikami, Y.; Yasutaka, H.; Kurita, H.; Hotta, K.; Shiba, T.; Hattori, M. (2004): The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proceeding of the National Academy of Science, USA.*, Vol. 101, S. 14925–14930.

Jacobson, N. R.; Boganovich, T.; Skurnik, M.; Lübeck, P. S.; Aherns, P.; Hoorfar, J. (2005): A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 63, S.151-156.

Janda, J. M.; Abbott, S. L. (2007): *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls.* *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 459, S. 2761–2764.

Jay, J. M.; Loessner, M. J.; Golden, D. A. (2005): *Modern food microbiology.* 7th edn. New York: Springer Verlag.

Jin, D. J.; Gross, C. A. (1989): Three *rpoC* mutations that suppress the termination defects of rho mutants also affect the functions of *nusA* mutants. *Molecular Genetics and Genomics*. Vol. 216, S. 269–275.

Josefsen, M. H.; Jacobsen, N. R.; Hoorfar, J. (2004): Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 70, S. 3588–3592.

Jourdan, A. D.; Johnson, S. C.; Wesley, I. V. (2000): Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 66, S.3750-3755.

Jurtshuk, R. J.; Blick, M.; Bresser, J.; Fox, G. E.; Jurtshuk, P. (1992): Rapid *in situ* hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms *Bacillus polymyxa* and *Bacillus macerans*. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 58, S. 2571–2578.

Kainz, P. (2000): The PCR plateau phase—Towards an understanding of its limitations. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1494, S. 23–27.

Karlin, S.; Brocchieri, L. (1996): Evolutionary Conservation of *recA* Genes in Relation to Protein Structure and Function. *Journal of Bacteriology*, Vol. 178, S. 1881–1894.

Kawahara, M.; Rikihisa, Y.; Lin, Q; Isogai, E.; Tahara, K.; Itagaki, A.; Hiramitsu, Y.; Tajima, T. (2006): Novel Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma central*, and a Novel *Ehrlichia* sp. In Wild Deer and Ticks on Two Major Island in Japan. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, S. 1102–1109.

Keer, J. T. (2008): Essentials of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach. Cambridge: Royal Society of Chemistry, S. 132–166.

Kim, C. H.; Khan, M.; Morin, D. E.; Hurley, W. L.; Tripathy, D. N.; Kehrl M.Jr.; Oluoch A. O.; Kakoma, I. (2001): Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. Journal of Dairy Science, Vol. 84, S. 74–83.

Kim, B. J.; Lee, S. H.; Lyu, M. A.; Kim, S. J.; Bai, G. H.; Kim, S. J.; Chae, G. T.; Kim, E. C.; Cha, C. Y.; Kook, Y. H. (1999): Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). Journal of Clinical Microbiology, Vol. 37, S. 1714–1720.

Klančnik, A.; Kovač, M.; Toplak, N.; Piskernik, S.; Jersek, B. (2012): PCR in Food Analysis. In: Dr. Hernandez-Rodriguez, P. (ed.), Polymerase Chain Reaction. Ljubljana: InTech, S. 195–220.

Klenk, H. P. ; Zillig, W. (1994): DNA-dependent RNA polymerase subunit as a tool for phylogenetic reconstructions: branching β topology of the archaeal domain. Journal of Molecular Evolution. Vol. 38, S. 420–432.

Konrad, R.; Busch, U. (2010): PCR und Real-Time PCR. In: Busch, U. (Hrsg.), Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S. 35–47.

Korczak, B.; Christensen, H.; Elmer, S.; Frey J.; Kuhnert, P. (2004): Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 54, S. 1393–1399.

Kotula, K. L.; Pandya, Y. (1995): Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. Journal of Food Protection, Vol. 58, S. 1326–1329.

Kowalczykowski, S. C.; Dixon, D. A.; Eggleston, A. K.; Lauder, S. D.; Rehrauer, W. M. (1994): Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. Vol. 58, S. 401–465.

Kreuzer, K. A.; Lass, U.; Peters, U. R.; Schmit, C. A. (2000): Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan (TM) probe format in the LightCycler (TM) instrument. Molecular and Cellular Probes. Vol. 14, S. 57–60.

Kronberg, A. (1998): DNA Replication Freeman, San Francisco.

Kupfer, M.; Kuhnert, P.; Korczak, B. M.; Peduzzi, R.; Demarta, A. (2006): Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from *16S rRNA*, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 56, S. 2743–2751.

Kwok, S.; Kellogg, D. E.; McKinney, N.; Spasic, D.; Goda, L.; Levenson, C.; Sninsky, J. J. (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Research. Vol.18 (4): S. 999–1005.

Kwon, H. J.; Park, K. Y.; Kim, S. J.; Yoo, H. S. (2001): Application of nucleotide sequence of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) to molecular differentiation of serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Veterinary Microbiology*, Vol. 82, S. 121–129.

Labrenz, M.; Brettar, I.; Christen, R.; Flavier, S.; Botel, J.; Hofle, M. G. (2004): Development and Application of a Real-Time PCR Approach for Quantification of Uncultured Bacteria in the Central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, S. 4971–4979.

Ladefoged, S. A.; Christiansen, G. (1994): Sequencing Analysis Reveals a Unique Gene Organization in the *gyrB* Region of *Mycoplasma hominis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 176, S. 5835–5842.

Lantz, P. G.; Hahn-Hägerdal, B.; Radstöm, P. (1994): Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 5, S. 384-389.

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics applications note*, Vol. 23, S. 2947–2948.

Le Guillou-Guillemette, H.; Lunel Fabiani, F.; Sato, T. (2009): Detection and quantification of serum or plasma HCZ RNA: mini review of commercially available assays. *Methods Molecular Biology*, Vol. 510, S. 3–14.

Lee, J. L.; Levin, R. E. (2007b): Rapid Quantification of total bacteria on cod fillets by using real-time PCR. *Journal of Fisher Sciences.com*, Vol. 1, S. 58–67.

Lee, J.; Levin, R. E. (2007a): Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.118, S. 312–317.

Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, Vol. 362: S. 709–715.

Linhart, C.; Shamir, R. (2005): The degenerate primer design problem: theory and applications. *Journal of Computational Biology*, Vol. 12, S. 431–456.

Lisitsyn, N. A.; Monastyrskaya, G. S.; Sverdlov, E. D. (1988): Genes coding for RNA polymerase beta-subunit in bacteria. Structure/function analysis. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 177, S. 363–369.

Livak, K. J.; Flood, S. J. A.; Maramaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applications*, Vol. 4, S.357–362.

Löfström, C.; Schelin, J.; Norling, B.; Vigre, H.; Hoorfar, J.; Rådström, P. (2010): Culture independent quantification of *Salmonella enterica* in carcass gauze swabs by flotation prior to real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, Vol.145, S. 103-109.

Lottspeich, F.; Engels, J. W. (Hrsg.) (2006): Polymerasekettenreaktion. In: *Bioanalytik*. 2. Aufl. München: Spektrum Akademischer Verlag, S 827–858.

Lu, X.; Holloway, B.; Dare, R. K; Kuypers, J.; Yagi, S.; William, J. V.; Hall, C. B.; Erdman, D. D. (2008): Real-time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 46, S. 533–539.

Ludewig, M. (1998): Untersuchung zur Generationszeit ausgewählter gramnegativer Bakterienspezies unter Anwendung der Impedanzmessung. Leipzig : Vet. Med. Diss.

Lyon, W. J. (2001): TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 67, S. 4658–4693.

Mackay I. M. (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. Vol.10, S.190-212.

Mackay, I. M.; Mackay J. F.; Nissen, M. D.; Sloots, T. P. (2007): Real-time PCR in Microbiology. In: From Diagnosis to Characterization. Mackay, I. M. (ed.), 1.Aufl. Queensland: Caister Academic Press.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. (2008): Brock Mikrobiologie. 11. Aufl. München, Boston, San Fransisco, Harlow, England, Don Mills, Ontario, Sydney, Mexico City, Madrid, Amsterdam : Pearson Studium. S. 150–183.

Malkawi, H. I.; Gharibeh, R. (2003): Multiplex PCR for the direct detection of *Salmonella enterica* from chicken, lamb and beef food products. *Journal of Basic Microbiology*, Vol. 43, S. 328–336.

Manzano, M.; Cocolin, L.; Cantoni, C.; Comi, G. (1998): Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and oligonucleotide-specific capter plate hybridization. *Food Microbiology*, Vol. 15, S. 651–657.

Marshall, S. M.; Melito, P. L.; Woodward, D. L; Johnson, W. M.; Rodgers, F. G.; Mulvey, M. R. (1999): Rapid Identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* Isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S *rRNA* Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37, S. 4158–4160.

Masco, L.; Vanhoutte, T.; Temmerman, R.; Swings, J.; Huys, G. (2007): Evaluation of real-time PCR targeting the 16S *rRNA* and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 113, S. 351–357.

Mateo, E.; Cárcamo, J.; Urquijo, M.; Perales, I.; Fernández-Astorga, A. (2005): Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Research in Microbiology*, Vol. 156, S. 568–574.

May, K. N. (1962): Bacterial contamination during cutting and packaging chicken in processing plants and retail stores. *Food Technology*. Vol. 16, S. 89–91.

May, K. N. (1974): Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercially slaughtered broilers. *Poultry Science*. Vol. 53, S. 1282.

McKillip, J; Drake, M. (2004): Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *Journal of Food Protection*. Vol. 67, S.823-832.

McKilip, J. L.; Drake, M. (2000): Molecular beacon polymerase chain reaction detection of *Escherichia coli* O157:H7 in milk. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, S. 855–859.

McMeekin, T. A. (1975): Spoilage association of chicken breast muscle. *Applied Microbiology*, Vol. 29, S. 44–47.

McMeekin, T. A. (1977): Spoilage association of chicken leg muscle. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 33, S. 1244–1246.

Mc Pherson, M. J.; Moller, S. G. (2000): Analysis, sequencing and *in vitro* expression of PCR products. In: PCR. New York: Springer Verlag, S. 169-174.

Mead, G. C. (2004a): Shelf-life and spoilage of poultry meat. In: Mead, G. C.(ed); formerly Royal Veterinary College, UK. Poultry meat processing and quality. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press, S. 283–298.

Mead, G. C. (2004b): Microbiological quality of poultry meat: a review. Brazilian Journal of Poultry Science, Vol. 6, S. 135–142.

Mead, G. C. (2005): Food safety control in the poultry industry. Cambridge: Woodhead Pub.; Boca Raton: CRC Press.

Meng, Q.; Switzer, R. L. (2001): Regulation of Transcription of the *Bacillus subtilis pyrG* Gene, Encoding Cytidine Triphosphate Synthetase. Journal of Bacteriology, Vol.183, S. 5513–5522.

Merhej, V.; Adékambi, T.; Pagnier, I.; Raoult, D.; Drancourt, M. (2008): *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 58, S.779–784.

Messelhäußer, U. (2010): Kultivierungsverfahren für Bakterien. In: Busch, U. (Hrsg.), Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S. 5–18.

Millet, V.; Lonvaud-Funel, A. (2000): The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Letters in Applied Microbiology, Vol. 30, S.136–141.

Mollet, C.; Drancourt, M.; Raoult, D. (1997): rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Molecular Microbiology, Vol. 26, S. 1006–1011.

Momtaz, H.; Rahimian, M. D; Safarpour Dehkordi, F. (2013): Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from raw chicken meat based on molecular and biological techniques. The Journal of Applied Poultry Research, Vol. 22, S. 137–145.

Morrison, T. B.; Weis, J. J.; Wittwer, C. T. (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during Amplification. Biotechniques, Vol.24, S. 954-962.

Morse, R.; Cillins, M. D.; O'Hanlon, K.; Wallbanks, S.; Richardson, P. T. (1996): Analysis of the beta-subunit of DNA-dependent RNA polymerase does not support the hypothesis inferred from 16S rRNA analysis that *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) is a tachytelic (fast-evolving) bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 46, S.1004–1009.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology, Vol. 51, S. 263–373.

Nadkarni, M. A.; Martin, F. E.; Jacques, N. A.; Hunter, N. (2002): Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Printed in Great Britain, Vol. 148, S. 257–266.

Narasimha Rao, D.; Nair, D. D.; Sakhare, P. Z. (1998): Meat microbiology and spoilage in tropical countries. In: Davies, A.; Board, R. (ed.), The microbiology of meat and poultry. London: Blackie Academic and Professional, S. 220–265.

National Academy of Science (1985): An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients. National Academy Press.

Newton, C. R.; Graham, A. (1994): PCR. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Verlag.

Nocker, A.; Camper, A. K. (2006): Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, S. 1997–2004.

Oliver, J. D. (2005): The Viable but Nonculturable State in Bacteria. The Journal of Microbiology, Vol. 43, S. 93–100.

Olsen, J. J.; Aabo, S.; Hill, W.; Notermans, S; Wernars K.; Granum, P. E.; Popovic, T.; Rasmussen, H. N.; Olsvik, O. (1995): Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. International Journal of Food Microbiology. Vol. 28, S.1-78.

Opel, K. L.; Chung, D.; McCord, B. R. (2010): A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. Journal of Forensic Sciences, Vol. 55, S. 25–33.

Ovchinnikov, Yu. A.; Monastyrskaya, G. S.; Gubanov, V. V.; Guryev, S. O.; Chertov, O. Yu.; Modyanov, N. N.; Grinkevicg, V. A.; Makarova, I. A.; Marchenko, T. V.; Polovinkova, I. N. (1981): The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase, Nucleotide sequence of the *rpoB* gene and amino acid sequence of the beta-subunit. European Journal of Biochemistry, Vol. 116, S. 621–629.

Ovchinnikov, Yu. A.; Monastyrskaya, G. S.; Gubanov, V. V.; Salomatina, I. S.; Shuvaeva, T. M.; Lipkin, V. M.; Sverdlov, E. D.(1982): The primary structure of *Escherichia coli* RNA polymerase, Nucleotide sequence of the *rpoC* gene and amino acid sequence of the beta-subunit. Nucleic Acids Research, Vol. 10, S. 4035–4044.

Ovchinnikov, Yu. A.; Lipkin, A.; Modyanov V. M.; Chertov, N. N.; Yu, O.; Smirnov, Yu. A. (1977): Primary structure of alpha-subunit of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. FEBS Letters, Vol. 16, S. 108–111.

Park, Y. H.; Kohle, R. J. (1994): Effect of concentration of MgCl₂ on random-amplified DNA polymorphism. Biotechniques, Vol. 16, S. 652–656.

Paster, B. J.; Russel, M. K.; Alpagot, T.; Lee, A. M.; Boches, S. K.; Galvin, J. L.; Dewhirst, F. E. (2002): Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. Annals of Periodontology, Vol. 7, S. 8–16.

Patel, J. B. (2001): *16S rRNA* gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Journal of Molecular Diagnostic, Vol. 6, S. 313–321.

Pfaffl, M. W. (2004): Quantification strategies in real-time RT-PCR. In: Bustin, S. A. (ed.), The Real-time PCR Encyclopedia A-Z of Quantitative PCR. 1st ed. La Jolla: International University Line, S. 87–120.

Pfaffl, M. W.; Vandesompele, J.; Kubista, M. (2009): Real-time PCR technology. In: Logan, J.; Edwards, K; Saunders, N. (ed.), Data Analysis Software. Norwich: Caister Academic Press, S. 65–83.

Pooni, G. S.; Mead, G. C. (1984): Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry-meat products. Food Microbiology, Vol. 1, S. 67–78.

Primer design for a PCR Assay: URL:<http://www.Bio-Rad.com>.

Pühler, G.; Leffers, H.; Grop, F.; Palm, P.; Klenk, H. P.; Lottspeich, F.; Garrett, R. A.; Zillig, W. (1989): Archaeobacterial DNA-dependent RNA Polymerases Testify to the Evolution of the Eukaryotic Nuclear Genome. *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 86, S. 4659–4573.

Pusch, D. J.; Busta, F. F.; Moats, W. A.; Schulze; A. E. (1976): Total counts as indexes of food quality. Direct microscopic count. In: Speck, M. L. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, D.C.: Public Health Association.

Qi, Y.; Patra, G.; Liang, X.; Williams, L. E.; Rose, S.; Redkar, R. J.; DeVecchio, V. G. (2001): Utilization of the *spoB* Gene as a Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, S. 3720–3727.

Rådström, P.; Knutsson, R.; Wolffs, P.; Dahlenborg, M.; Löfström, Ch. (2004): Pre-PCR Processing of Samples. In: Sachse, K.; Frey, J. (ed.), *PCR Detection of Microbial Pathogens*. 2nd edn. Totowa: Humana Press Inc., S. 31–50.

Raj, A. B. M. (2004): Stunning and slaughter of poultry. In: Mead, G. C. (ed); formerly Royal Veterinary College, UK. *Poultry meat processing and quality*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; Boca Raton: CRC Press, S. 283–298.

Rantsiou, K.; Alessandria, V.; Urso, R.; Dolci, P.; Cocolin, L. (2008): Detection and quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal Food of Microbiology*, Vol. 121, S. 99–105.

Reece, R. J.; Maxwell, A. (1991): DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Molecular Biology*, Vol. 26, S. 335.

Rindhe, S. N.; Zanjad, P. N.; Doifode, V. K.; Siddique, A.; Mendhe, M. S. (2008): Assessment of microbial contamination of chicken products sold in Parbhani city. *Veterinary World*, Vol. 1, S. 208–210.

Rodriguez-Lazaro, D.; Lombard, B.; Smith, H.; Rzezutka, A.; D'Agostino, M.; Helmut, R.; Schroeter, A.; Malorny, B.; Miko, A.; Guerra, B. (2007): Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 18, S. 306–319.

Roca, A. I.; Cox, M. M. (1990): The *recA* protein: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Molecular Biology*, Vol. 25, S. 415–456.

Rolfs, A.; Schuller I.; Finckh, U.; Weber-Rolfs, I. (1992): *PCR: Clinical diagnostics and research*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, S. 1–10 und 53–57.

Rossen L.; Norskov, P.; Holmstrom K.; Rasmussen, O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* Vol.17, S.37–45.

Rowan, N. J. (2004): Viable but non culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 15, S. 462–467.

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

Russel, S. M. Fletcher, D. L.; Cox, N. A. (1996): Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses, *Poultry Science*, Vol. 75, S. 2041–2047.

Rutledge, R. G.; Cote, C. (2003): Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, S. 2–6.

Sagner, G.; Goldstein, C.; Van Miltenburger R. (1999): Detection of multiple reporter dyes in real-time, online PCR analysis with the LightCycler®System. *Biochemica*, Vol. 2, S.7-11.

Sakaridis, I.; Soultos, N.; Dovas, C. I.; Papavergou, E.; Ambrosiadis, I.; Koidis, P. (2012): Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe*, Vol. 18, S. 62–66.

Santos, S. R.; Ochman, H. (2004): Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environmental Microbiology*, Vol. 6, S. 754–759.

Saunders, G.; Dukes, J.; Parkers, H. C.; Cornett, J. H. (2001): Interlaboratory Study on Thermal Cycler Performance in Controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. Vol. 47, S. 47–55.

Scheidegger, E. M. D.; Fracalanza S. A. P.; Teixeira L. M.; Cardarelli-Leite, P. (2009): RFLP analysis of a PCR-amplified fragment of the 16S rRNA gene as a tool to identify *Enterococcus* strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 104, S. 1003–1008.

Shrimpton, D. H.; Barns, E. M. (1960): A comparison of oxygen permeable and impermeable wrapping materials for the storage of chilled eviscerated poultry. *Chemistry and Industry*, S. 1492–1493.

Silliker, J. H. (1963): Total counts as indexes of food quality. In: Slanetz, L. W.; Chichester, C. W.; Gaufin, A. R.; Ordal, Z. J. (ed.), *Microbiological Quality of Food*. New York, London: Academic Press.

Silva, D. S. P.; Canato, T.; Magnani, M.; Alves, J.; Hirooka, E. Y.; Rocha, T. C.; Moreira de Oliveira, T. C. R. M. (2011): Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. & *Salmonella enteritidis* in food. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 46, S. 1502–1507.

Stackebrandt, E.; Goebel, B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 44, S. 846–849.

Sunagawa, S.; Mende, D. R.; Zeller, G.; Izquierdo-Carrasco, F.; Berger, S. A.; Kultima, J. R.; Coelho, L.P.; Arumugam, M.; Tap, J.; Nielsen, H. B.; Rasmussen, S.; Brunak, S.; Pedersen, O.; Guarner, F.; de Vos, W. M.; Wang, J.; Li, J.; Doré, J.; Ehrlich, S. D.; Stamatakis, A.; Bork, P. (2013): Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Medicine*, Vol. 10, S. 1196–1199.

Smith, C. J.; Osborn, A. M. (2008): Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 67, S. 6–20.

Souaze, F.; Ntodou-Thome, A.; Tran, C. Y.; Rostene, W.; Forgez, P. (1996): Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques*, Vol. 21, S. 280–285.

Stahlberg, A.; Kubista, M.; Pfaffl, M. W. (2004): Comparison of reserve transcriptases in absolute and relative gene expression analysis. *Clinical Chemistry*, Vol. 50, S. 1678–1680.

Stoesser, G.; Moseley, M. A.; Sleep, J.; McGowarn, M.; Garcia-Pastor, M.; Sterk, P. (1998): The EMBL Nucleotide Sequence Database. Vol 26, S. 8–15.

Takahashi, H.; Hirota, K.; Hara-Kudo, Y. (2006): Development of a quantitative real-time PCR method to enumerate total bacterial counts in ready-to-eat fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, S. 2504–2568.

Tarr, C. L.; Jayna S. Patel, J. S.; Pühr, N. D.; Sowers, E. G.; Cheryl A. Bopp, C. A.; Stroockbine, N. A. (2007): Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 45, S.134–140.

Taylor, T. M.; Elhanafi, D.; Drake, M.; Jaykus, L. A. (2005): Effect of Food Matrix and Cell Growth on PCR-Based Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *Journal of Food Protection*, Vol. 68, S. 225–232.

Thatcher, F. S.; Clark, D. S. (ed.) (1973): *Microorganisms in Foods. Their Significance and Methods of Enumeration*. Toronto: University of Toronto Press.

The structure of bacterial RNA polymerase: URL: <http://www.bact.wisc.edu/landick>. Elektronische Publikation am 05.03.2016.

Torriani, S.; Gatto, V.; Sembeni, S.; Tofalo, R.; Suzzi, G.; Belletti, N.; Gardini, F.; Bover-Cid, S. (2008): Rapid Detection and Quantification of Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdc*) and Its Expression in Gram-Positive Bacteria Associated with Fermented Foods Using PCR-Based Methods. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, S. 93–101.

Tuncer, B.; Sireli, U. T. (2008): Microbial Growth on Broiler Carcasses Stored at Different Temperatures After Air- or Water-Chilling. *Poultry Science*, Vol. 87, S. 793–799.

Tyagi, S.; Kramer, F. R. (1996): Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*. Vol.14, S.303-308.

UN-Organisation für Ernährung und Landschaft (FAO) (2015): URL: <http://www.bund.net>. Elektronische Publikation, URL am 15.02.2016.

Uyttendaele, M.; van Boxtael, S.; Debevere, J. (1999): PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 52, S. 85–95.

Vander Horn, P. B.; Zahler, S. A. (1992): Cloning and Nucleotide Sequence of the Leucyl-tRNA Synthetase Gene of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, S. 3928–3935.

Vandesompele, J.; De Preter, k.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, Vol. 3, S. 0034.1–0034.11.

Vandesompele, J.; Kubista, M.; Pfaffl, M. W. (2009): Real-time PCR technology. In: Logan, J.; Edwards, K; Saunders, N. (ed.), *Reference Gene Validation Software for Improved Normalization*. London: Caister Academic Press, S. 47–64.

Van Immerseel, F.; De Buck, J.; Pasmans, F.; Huyghebaert., G.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. (2004): *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology*, Vol. 33, S. 537–549.

Venkitanarayanan, K. S.; Faustman, C.; Crivello, J. F.; Khan, M. I.; Hoaglan, T. A.; Berry, B. W. (1997): Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology*, Vol. 82, S. 359–364.

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 (2004): URL:<http://www.eur-lex.europa.eu>. Elektronische Publikation, URL am 30.04.2004.

Viehweg, S.; Schmitt, R. E.; Schmidt-Lorenz, W. (1989): Microbial spoilage of refrigerated fresh boilers. VII. Production of off odours from poultry skin by bacterial isolates. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, Vol. 22, S. 356–367.

Vishinubhatla, A.; Fung D. Y. C.; Oberst, R. D.; Hays M. P.; Nagaraja, T. G.; Flood, S. J. A. (2000): Rapid 5'Nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Applied Environment Microbiology*, V. 66, S.4131–4135.

Von Haeseler, A.; Liebers, D. (2003): Fischer Kompakt, Molekulare Evolution Fischer Taschenbuch Verlag, S. 96.

Vos, M.; Quince, C.; Pijl, A. S.; de Hollander, M.; Kowalchuk, G. A. (2012): A Comparison of 16S rRNA Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. *PLoS ONE*, Vol. 7, S. e30600.

Warren, B. R.; Yuk, H. G.; Schneider, K. R. (2007): Detection of *Salmonella* by flow-through immunocapture real-time PCR in selected foods within 8 hours. *Journal of Food Protection*, Vol. 70, S. 1002–1006.

Waters A. E.; Contente-Cuomo, T.; Buchhagen, J.; Liu, C. M.; Watson, L.; Pearce, K.; Foster, J.T.; Bowers, J.; Driebe, E. M.; Engelthaler, D. M.; Keim, P. S.; Price, L. B. (2011): Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 52, S. 1227–1230.

Weise, E. (1996): Mikrobiologie des geschlachteten Geflügels. Zerlegung und Verpackung. In: Fries, R.; Bergmann, V.; Fehlhaber, K., *Praxis der Geflügelfleischuntersuchung*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft, S. 197–210.

Wells, F. E.; Spencer, J. V.; Stadelma, W. J. (1985): Effect of packaging materials and techniques on shelf-life of fresh poultry meat. *Food Technology*, Vol. 12, S. 425.

Whitehouse, C. A.; Hottel, H. E. (2007): Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes*, Vol. 21, S. 92–96.

Wilson, I. G. (1997): Minireview, Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 63, S. 3741–3751.

Wilson, I. G.; Gilmour, A.; Cooper, J. E. (1993): Detection of enterotoxigenic microorganisms in foods by PCR. In: Kroll, R. G.; Gilmour, A.; Sussman, M. (ed.), *New techniques in food and beverage microbiology*. Scientific Publishers, United Kingdom: Blackwell Oxford.

Wilson, I. G.; Cooper, J. E.; Gilmour, A. (1994): Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 gene (sec+) by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, Vol, 22, S. 55–62.

Wittwer, C. T; Herrmann, M.G.; Gundry,C. N.; Elenitoba-Johnson, K. S. J. (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods*. Vol. 25, S.430–442.

Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen R. P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, Vol. 22, S. 130–138.

Wolffs, P.; Norling, B.; Rådström, P. (2004): Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, S. 1042–1047.

Wolffs, P.; Norling, B.; Rådström, P. (2005): Risk assessment of false-positive quantitative real-time PCR results in food, due to detection of DNA originating from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 60, S. 315–323.

Wu, S. B.; Rodgers, N.; Mangan, C. (2011): Real-Time PCR Assay for *Clostridium perfringens* in Broilers Chickens in a challenge Model of Necrotic Enteritis, Vol. 77, S. 1135–1139.

Zhang, X. X.; Zhang, T.; Fang, H. H. (2009): Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology Biotechnology*, Vol. 82, S. 397–414.

Zschaler, R. (1995): Mikrobiologische Schnellmethoden. In: Baltes, W. (Hsg.), Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen. 3. Aufl. Berlin: Behr's Verlag, S. 305–321.

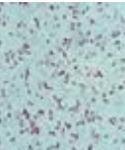
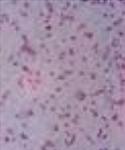
Anhang

Tabelle 50 zeigt die Ergebnisse der in Abschnitt 3.2 durchgeführten 16S rRNA-Sequenzanalyse als FASTA-Sequenzen. Die Ergebnisse der BLAST-Analyse sind gegenübergestellt. Ebenfalls sind Bakterienkolonien, deren DNA als Template für Amplifikationen verwendet wurden sowie die entsprechenden Gramfärbungsbilder dargestellt.

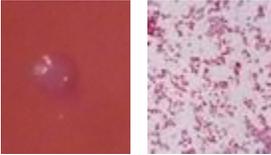
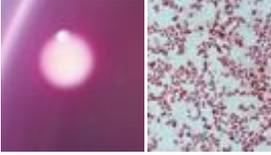
Tabelle 51 enthält die Bakterienstämme, deren rpoB-Gensequenzen teilweise oder vollständig in öffentlichen Datenbanken verfügbar sind. Diese Sequenzen wurden in das Alignment einbezogen und zum Erstellen der Primer verwendet.

Tabelle 50: Ergebnisse der 16S rRNA Sequenzanalyse

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
1	MacConkey Agar, 4 °C, Probe 1, (Putenbrustinnenfilet)	34,44	2,15	15,23			<p>>1_Forward (38-588)</p> <p>GAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGG TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAA CTACTGGAACCGTAGCTAATACCCGTAATGTCCGAAG ACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCTCTGCCATCGGATG TGCCAGATGGGATAGCTAGTAGGTGGGTAAACGGCTC ACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACC AGCCACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG GAGGACGAGTGGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGC CTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGCCCTCGG GTTGTAAAGTACTTTACGGGGGAGGAAGGAGTAAAGT TAATACCTTTGCTCATTGAGCTTACCCGCGAAGAAGCAC CGGCTAACTCCGTGCCAGACGCCCGGTAAATACGGAGG GTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAC GACGGCGTTTGTAAAGTACGATGTGAAATCCCGGGCT CAACCTG</p> <p>Länge (F):550</p>	<p>>1_Reverse (10-963)</p> <p>GGGGTAGCGCCCTCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTT GCAACCCACTCCCATGGGTGACGGGGGTGTGTACAAG GCCCGGGAACGATATTCACCGTGGCATTCTGATCCAGAT TACTAGCGATTCCGACTTATGAGGTGACGATGACAGAT CCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGTCCGCTTGC TCTCCGAGGTCCGCTTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCA CGTGTGTAGCCCTGGTGAAGGGCCATGATGACTTACG GTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTACTGCGAGTCTCC TTTGAGTCCCGGGCCGACCGTGGCAACAAGGATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTACAA CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAT TCCCAGGACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTGTGGA TGCAAGACCAGTAAGGTTCTTCCGCTTGCATCGAATTA AACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT CATTGAGTTTAACTTGGCGGCTACTCCCGAGCGCG TCGACTTAACGCGTTAGTCCGGAAGCCACGCCCTCAAG GCACAACCTCAAGTCGACATGTTTACGGCGTGAATA CCAGGGTATCTAATCTGTTTGTCCCCACGCTTTCCGAC CTGAGCGTCACTTCTCCAGGGGGCCGCTTCCGCA CCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGTACAC CTGGAATTTACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCCA GTATCAGATGCAAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCA CATCTGACTTAAACAACCGCTCGGTGCGCTTTACGCC AGTAAATCCGATTAAGGCTTGCACCTCCGATTACCGCG GCTGCTGGCACGG</p> <p>Länge (R):953</p>	<p><i>Shigella flexneri</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Shigella dysenteriae</i></p> <p><i>Escherichia fergusonii</i></p> <p><i>Escherichia albertii</i></p>
6	MacConkey Agar, 20 °C, Probe 3, (Putengulasch)	2,00	10,74	18,42			<p>>6_Forward (13-956)</p> <p>TACCATGCAGTCGACGGTAACAGGAAACAGCTTGCTGCT TCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACCGTAG CTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAGAGGGGGACC TTCCGGCCTCTTCCCATCGGATGTCCAGATGGGATTA GCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACAGCCACTGGAAGT GAGACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGACAGTGGG GAATATTGCACAATGGGCGAAGCTGTAGCAGCCATGC CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAGGAGTAAAGTAACTTTGCTCA TTGAGGTTACCGCAGAAAGCACCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGTTGCAAGCGTTAATC GGAAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGAGCGGTTTGTTA AGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGA ATCTGATACTGGCAAGCTTGAAGTCTGAGAGGGGGGTA GAATTCAGGTGTAGCGTGAATGCGTAGAGATCTGGA GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGGCCCTGGAACGAAGAC TGACCTCAGGTGCGAAGGCGTGGGAGCAACACAGGAT TAGATACCTGTGATGTCACGCCCTAAACGATGTCGACT TGAGGTTGTCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGAGCTAAC GCTTAAGTGCACCGCTGGGAGTAGCGGCCGAAGGT TAAACTCAAATGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCGGT GGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGGAAGAACCTT ACCTGCTTGTACA</p> <p>Länge (F):943</p>	<p>>6_Reverse (452-1007)</p> <p>CACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTGTGGATGCAAGACC AGGTAAGGTTCTTCCGCTTGCATCGAATTAACCAACATGC TCCACCGTTGTGCGGGCCCCGCTCAATTCAATTTGAGTTT TAACCTTGGCGGCTACTCCCGAGCGGTGCACTTAACG CGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCTCAAGGCCAACACTCC AAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCT AATCCTGTTTGTCCCCACGTTTCCGACCTGAGCGTCA GTCTTCTCCAGGGGGCCGCTTCCGCCCGGATTTCTCT CCAGATCTCTACGATTTACCGCTACACCTGGAATTTCTA CCCCCTCTACGAGACTCAAGCTTCCGATATCAGATGC AGTTCCAGGTTGAGCCGGGATTTACATCTGACTTA ACAACCCGCTGCGTGGCTTTACGCCAGTAATCCGA TTAACGTTGCAACCTCCGATTAACCGGGCTGCTGGCA CGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACGTCATG AGCAAA</p> <p>Länge (R):555</p>	<p><i>Shigella flexneri</i></p> <p><i>Escherichia fergusonii</i></p> <p><i>Shigella dysenteriae</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Escherichia albertii</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
10	MacConkey Agar, 30 °C, Probe 6, (Wachtel frisch)	24,70	2,21	15,37			>10_Forward (287-301) ACTGCCCATTTGTGA Länge (F):14	>10_Reverse (71-338) CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTTACCCTG AGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTCAGC GAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGACTACGACCGCACT TTATAGGTTCCGCTTCTCTCGCGAGTTCCTTCTCTTTG TATACGCCATTGTAGCAGCTGTGAGCCCTACTCGTAAG GGCCATGATGACTTGACGTCAATCCCCACCTTCCTCCGT TTATC ACCGCGACTCTCCTTTGAGTCCACCA Länge (R): 267	<i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia fonticola</i>
14	MacConkey Agar, 30 °C, Probe 8 (Perlhuhnbrust mit Haut frisch)	5,41	1,95	15,37			>14_Forward (48-941) CTTTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT GGGAACTGCCTGATGGAGGGGATACTACTGGAAACG GTAGCTAATACCCGATACGCTCGCAAGACCAAGAGGGG GACCTTCGGCCTCTTCCATCGGATGTGCCAGATGGG ATTAGCTAGTAGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACG ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGACGAGT GGGGAATATTGCACAATGGGCCAAGCCTGATGCAGCCA TGCCCGTGTATGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGTAC TTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTAAACCTTTGC TCATTGACGTTACCCGACAGAAAGCACCCTGACTCC GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTT AATCGGAATTAAGCGTAAAGCGCACAGGCGGGTTTT GTTAAGTCAGATGAAATCCCCGGGCTCAACTGGGAA CTGCATCTGATGCAAGCTTGAAGTCTCGTAGAGGGG GGTAGAATCCAGGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC TGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGA AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA GGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAGCCGCTAAGCATGTC GACTTGGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGA GCTAACCGGTTAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCCG CAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACA AGCGGTGAGCATGTTAATTGATGCAACGCGGAAGA ACC Länge (F): 893	>14_Reverse (22-940) CCGAAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGAACCCACTCCC ATGGTGTGACGGGCGGTGTACAAGGCCCGGGAACGT ATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCC GACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTA CGACGCATTTATGAGGTCGCTTCTCGCGAGGTGCG CTTCTCTTTGATGCGCCATTGACGACGTGTGAGCCCT GGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCT TCCTCCAGTTTACTGCGAGTCTCCTTTGAGTCCCGG CCGGACCCTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTT GCGGGACTTAACCCAACATTTCAACAACGAGCTGACGA CAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGGTTCCCGAAGGCACA TTCTCATCTGAAAACCTCCGTGGATGCAAGACAGGT AAGGTTCTTCCGCTTGATCGAATTAACCAATGCTCCA CCGCTTGTGCGGGCCCCGCTCAATTCATTTGAGTTTTAAC CTTGCGGCGTACTCCCAGCGGTGCACTAACCGGTT AGCTCCGGAAGCCAGCCTCAAGGACACAACCTCAAGT CGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCGGATCTAATC CTGTTTGTCTCCACGCTTTCCGACCTGAGCGTCAGTCT CGTCCAGGGGGCGCCTTCCGACCCGATTCCTCCAG ATCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTCACCC CCTCTACGAGACTCAAGCTTCCAGTATCAGATGCAATTC CCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCTGACTTAACAAA CCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTAAC GCTTGACCCCTCCG Länge (R): 918	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia albertii</i> <i>Shigella dysenteriae</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
15	MacConkey Agar, 20 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	9,74	2,00	17,21			>15_Forward (267-292) AGCCACGCTGGAACCTGAGACACGCC Länge (F):25	>15_Reverse (13-975) TGGTAGCGCCCTCCGAAAGTTAAGCTACCTACTCTTTTG CAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTAACAAG CCCGGAAACGATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTA CTAGCGATTCCGACTTACGGAGTCGAGTTGCAGACTCC GATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCGGCTGGCTC TCGGGAGTTCGGTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAG TGTGTAGCCCTACTCTAAGGGCCATGATGACTTGACGT CATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGAGTCTCCTT TGAGTCCCGCCATTACGGCTGGCAACAAGGATAAGG GTTGCGCTGTTGGGGACTTAACCCACATTTTACAACA CGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGACTTC CCGAAGGCACTAAGCTATCTCAGCGAATTCTCTGATGT CAAGAGTAGGTAAAGTTCTCGCTTGCATCGAATTAAC CACATGCTCCACCGTTGTGGGGCCCGCTCAATTCAT TTGAGTTTAACTTGGCGCCGTACTCCACGGCGGTG ACTTAACGGTTAGTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCA CAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGGGTGGACTCCA GGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCACGCTTTCGACCTG AGCGTACGCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCCGCCCG GTATTCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTG GAATTCTACCCCTCTACAAGACTTAGCTGGCAGTTT CAAATGCAGTTCACCGTTAAGCGGGGATTTCACATC TGACTTAACAAACCGCTGCGTGGCTTACGCCAGTA ATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGATTACCGCGGCT GCTGGCACGGGTTA GCC Länge (R): 962	<i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia plymuthica</i>
17	MacConkey Agar, 20 °C, Probe 10, (Putensteaks)	22,60	2,15	16,88			>17_Forward (13-655) TGCATGCAGTCTAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTT GAGAGCGGGGAGCGGTGAGTAATACCTAGGAATCTGC CTGGTAGTGGGGATAACGTTCCGAAACGGACGCTAATA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAG TTGGTAGGTAATGGCTCACCAGGCTACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGACA CGGTCCAGACTCTACGGGAGGACAGTGGGGAAATAT GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTG TGTGAAGAAGGCTTCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGG GAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGCTTTGACGTT ACCGACAGAATAAGCACCAGGCTAAGTGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAC TGGGGGTAAGCGCCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAAT GTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACCTGCATCCAAA CTGGCAAGCTAGAGTATGAGAGGGTAGTGAATTTCC TGTGTAGCGGTGAAATGCC Länge (F): 642	>17_Reverse (76-1004) GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAAGCTATCCACCGTGA CATTCTGATTACAGATTACTAGCGATTCCGACTTCAGCA GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGACTACGATCGGTTTT ATGGGATTAGCTCCACTCGCGGTTGGCAACCTTTGT ACCGACATTGTAGCACGTTGTAGCCAGGCGGTAAAG GCCATGATGACTTGAGCTCATCCCACTTCTCCGGTTT GTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCACCACTACTGTG TGGTAACATAAGGACAAGGGTGGCGCTGTTACGGGACT AACCCAACATCTCACGACAGGCTGAGCAGCACCATGC AGCACCTGTCTCAATGTCCCGAAGGACCAATCCATCTC TGAAAGTTTCATTGGATGTCAAGCCCTGTAAGGTTCTC GCGTGTCTGAAATAAACACATGCTCCACCGCTTGTGC GGCCCGCGTCAATTCATTGAGTTTAACTTGGCGCC GTACTCCACGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCC ACTAAGAACCTCAAGGTTCCCAAGGCTAGTTGACATCGTT TACGGCGTGGACTACAGGGTATCAATCCTGTTGTCTC CCCACGCTTTGCACCTCAGTGCATGATCAGTCCAGGT AGTCGCTTCCGCACTGGTGTTCCTCTATATCTACGCA TTTACCGCTACACAGGAAATCCACTACCTTACCCATC CTCTAGCTTGGCAGTTTGGATGAGTCCAGGTTGAG CCCGGGGATTTCACATTCACCTTAAACAAACCACTACGG CGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCCTC TGATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTCT TATTCTGCGGTAACGCTCAAAGC Länge (R): 928	<i>Pseudomonas lundensis</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas moraviensis</i> <i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Pseudomonas kilonensis</i> <i>Pseudomonas taetrolens</i>

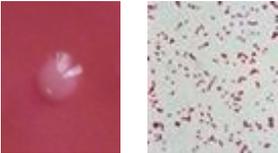
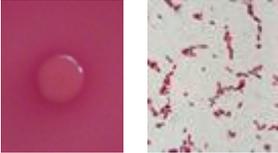
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
18	MacConkey Agar, 20 °C, Probe 10, (Putensteaks)	12,64	1,73	17,80			>18_Forward (853-898) TAAAGGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGCCCCG ACAAGCG Länge (F): 45	>18_Reverse (17-970) GTAGCGCCCTCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGCAA CCCCTCCATGGTGTGACGGCGGTGTGACAAAGGCC CGGAAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACT AGCGATTCCGACTTACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGA TCCGACTACGACGACTTTATGAGGTCGGCTTGTCTCTC GCGAGTTCGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAGTG GTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCA TCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCAGCAGTCTCCTTTG AGTCCCACCATACGTGCTGGCAACAAGGATAAGGGT TGCGCTGTTGCGGACTTAACCCAAACATTTACAAACAC GAGCTGACGACAGCCATGCGAGCACTGTCTCAGAGTTCC CGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCCGAATTCCTGGATGTC AAGAGTAGGTAAGGTTCTTCCGCTTGCATGAAATTAACC ACATGCTCCACCGCTTGTCCGGGCCCCCTCAATTCATT TGAGTTTAACTTGGCGGCTACTCCCAGGGCGGTCCA CTTAACGCTTAGCTCCGGAAGCCAGCCCTCAAGGGCAC AACCTCCAAGTCGACATCGTTACAGCGTGGACTACAG GGTATCTAATCCTGTTTGTCCACCGCTTCCACCTGA GCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCCTTCGCCACCGG TATTCTCCAGATCTACGATTTACCCGTACACCTGG AATTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTTGCCAGTTT AAATGCAGTCCCACGTTAAGCGGGGATTCACATCT GACTTACAACCCGCTGCGTCCGCTTACGCCAGTAA TTCCGATTACGCTTGACCCCTCCGATTACCGCGGCTG CTGGCACGGAG Länge (R): 953	<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia plymuthica</i>
19	VRBD Agar, 4 °C, Probe 1, (Putenbrustinnenfilet)	75,13	2,11	14,78			>19_Forward (14-940) CCATGCAGTCGAGCGGTACACAGAGACTTGTCTCGGG TGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACT GCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACCGTAGCTAA TACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGACCTTCG GGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTA GTAGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA GCTGCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGCTGAGA CACGCTCAGACTCCTACGGGAGGCACAGTGGGAAT ATTGCAATGSGGCAAGCCTGATGACCCATGCCCG TGTGTGAAGAAGCCCTCGGGTTGAAGCACTTACAG GGGAGGAAGCGTTAAGGTTAATAACCTTGGCGATTGA CGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCCGGA TTACTGGCGTAAAGCGCACGACGCGGCTGTCAAGTC GGATGGAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCAATTC GAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAAT TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA TACCGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGAC GCTCAGGTGCGAAGCGGTGGGAGCAACAGGATTAGAT ACCCTGGTGTCCACGCCCTAAACGATGTCGATTTGGAG GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGAGCTAACCGGTT AAATCGACCCGCTGGGAGTACGGGCCGAAAGGTTAAAC TCAAATGAAATGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGC ATGTGGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT Länge (F): 926	>19_Reverse (27-939) TCCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGAACCACTCC CATGGTGTGACGGCGGTGTGACAAAGGCCGGGAACG TATTACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATT CGACTTCTAGGAGTCCGAGTTCGACAGCTCAAATCCGACT ACGACATACCTTTATGAGGTCGGCTTGTCTCCGAGGTC GCTTCTTTGTATATGCCATTGTAGCAGCTGTAGCCC TGGTCGTAAGGCCATGACTTGAAGCTATCCCACCC TTCTCCAGTTTACTACTGACCTCTCTTGAAGTTCCCG GCCGAACCCCTGGCAACAAGGATAAGGTTGCGCTCGT TGCGGACTTAAACCAACATTTACAACACAGAGCTGACG ACAGCCATCGACACCTGTCTCAGATTCCCGAAGGCAC CAATCCATCTCGAAGGTTCTGTGGATGTCAAGACCAG GTAAGGTTCTCCGCTTGCATCGAATTAACACATGCTC CACCCTTGTGCGGGCCCCGTCAAITTCATTGGATTTTA ACCTTGGCGCCACTCCCAGGGCTGATTTAACCGG TTAGTCCGGGAAGCCAGCCCTCAAGGGCACAACTCCAA ATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT CCTGTTTGTCTCCCAGCTTTTCGACACTGAGCGTCAGTC TTTGTCCAGGGGGCCGCTTCCGACCCGATTCCTCCA GATCTCTACGATTTACCGCTACACTGGAATTTACCC CCCTCTACAAGACTTACGCTGCGGATTTGGAATGAGT CCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGAGTTGACAG ACCGCTGCGTCCGCTTACGCCAGTAATTCG ATTAACGCTTGCA Länge (R): 912	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. Ozaenae</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
20	VRBD Agar, 30°C, Probe1, (Putenbrustinnenfilet)	40,67	2,11	15,85			<p>>20_Forward (588-896) GCATCTGATACTGGCCAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG TAGAATCCAGGTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTG GAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCTGGACGAAG ACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG ATTAGATACCCCTGAGTCCACGCCGTAACGATGTGCGA CTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTCCGGAGCTA ACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAG GTTAAAACCTAAATGAATTGACGGGGGCC GCACAAGCG</p> <p>Länge (F): 308</p>	<p>>20_Reverse (22-344) CCTCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGAACCCACTC CCATGGTGTGACGGCGGTGTACAAGGCCCGGGAAC GTATTACCGGTGGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATT CCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAC TACGACATCTTTATGAGGTCGCCCTTGCTCGCGAGGT CGCTTCTCTTTGTATGCCCATTTGAGCACGTGTGTAGCC CTGTGCTAAGGGCCATGATGACTGACGTATCCCCAC CTTCTCCGGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCC GGCCGGAC</p> <p>Länge (R): 322</p>	<p><i>Citrobacter</i> <i>youngae</i> <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> subsp. <i>salamae</i> <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> <i>Escherichia</i> <i>fergusonii</i> <i>Escherichia</i> <i>albertii</i> <i>Shigella</i> <i>flexneri</i> <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> <i>Cronobacter</i> <i>dublinensis</i> subsp. <i>dublinensis</i> <i>Cronobacter</i> <i>turicensis</i> z3032</p>
24	VRBD Agar, 30°C, Probe 3, (Putengulasch)	12,47	2,10	19,04	 		<p>>24_Forward (13-911) TACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGC TTTGTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGA AACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACCGGTAG CTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACC TTCGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTA GCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAAGCCACTGGAAC GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGG GAATATTGCACATGGGCGCAAGCCTGATGCGAGCCATGC CGCGTGATGAAGAAGGCCTTGGGTTGTAAAGTACTTT CAGCGGGGAGGAAGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCA TTGACGTTTACCCGAGAAAGGACACCGGCTAACTCCGTG CCAGGAGCCCGGTAATACGGAGGTGCAAGCGTTAATC GGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGCGAGCGGTTTGTTA AGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGAACTGC ATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTA GAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA GGAATCCGGTGGCGAAGCGGCCCTGGACGAAGAC TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCTGGTGTCCACCGCTAAACGATGTGCGACT TGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTCCGGAGCTAAC GCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT TAAAACCTAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGT GGAGCAT</p> <p>Länge (F): 898</p>	<p>>24_Reverse (455-966) ACCTATCCATCTCTGGAAAGTTCTGTGGATGTCAGACCA GGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAACCACATGCT CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTAATTCATTTGAGTTTT AACCTTGGCGCCGTACTCCCGAGGCGGTGCGATTAACGC GTTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCA AGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCTA ATCCCTGTTTGTCCCGCGCTTTCCGACCTGACCGCTCAG TCTTCGTCGAGGGCCCGCTTCGCGCAGGTTATTCCTC CAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTCAC CCCCCTACGAGACTCAAGCTTCCAGTATCAGATGCA GTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTACATCTGACTTAA CAAACCGCTGCGTGGCGGTTTACGCCAGTAATCCGAT TAAAGCTTGCACCTCCGTATTACCGCGCTGCTGGCAC G</p> <p>Länge (R): 511</p>	<p><i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> <i>Escherichia</i> <i>fergusonii</i> <i>Escherichia coli</i></p>

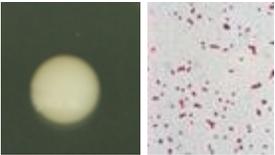
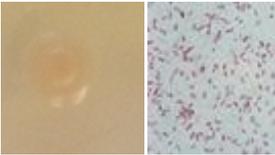
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
25	VRBD Agar, 20 °C, Probe 4, (Hähnchen- Unterschenkel)	10,69	2,18	18,86			<p>>25_Forward (22-979)</p> <p>AGTCGACGGTAAACAGGAAGCAGTTGCTGCTTTGCTGAC GAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTGGGAAACTGCCT GATGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACC GCATAACGTCCGAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGC CTCTTGGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA GGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAGTACGACAC GGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATT GCACATGGGCGCAAGCTGATGCAGCCATGCCGCGTG TATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGG GGAGGAAGGAGTAAAGTAAATCACTTTGCTCATTGACCT TACCCGAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAG CCGGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTTTGTAAAGTCAGA TGTAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACGATCATGTGAT ACTGGCAAGCTTGTGCTCTGTAGAGGGGGTGAATTC AGGTGAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGGAGGAATAC CGGTGGCGAAGGGGGCCCCCTGGAGCAAGACTGACGCT CAGGTGGCAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACC CTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTT GTGCCCTTGAAGCGGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAG TCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCA AATGAATTGACGGGGCGCCACAGCGGTGGAGCATG TGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCT TGACATCCACGGAAAGTTTTCAGAGATG</p> <p>Länge (F): 957</p>	<p>>25_Reverse (14-976)</p> <p>GTAGCGCCCTCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGCA ACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGACAAGGC CCGGAAAGTATTACCGGTGGCATTCTGATCCAGATTA CTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCCGAGTGCAGACTCC AATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCGCTTGCTC TCGGAGGTCGCTTCTTTGATGGCCATTTGATGACAC GTGTGATCCCTGGTGTGTAAGGGCCATGATGACTTGAGC TCATCCCACTTCCAGGTTATCACTGGCAGTCTCTCT TTGAGTTCCCGGGCGGACCGCTGGCAACAAGGATAAAG GTTGCGCTCGTTGGGGACTTAACCCCAACTTTCACAACA CGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGCGTTC CCGAAGGCACATTCTCATCTCTGAAAACCTTCGGTGGATG CAAGACCCAGTAAAGTTCTTCGGGTTGATCAGAATTAAC CACATGCTCCACCGCTTGTGGGGGGCCCCGTAATTCAT TTGAGTTTTAACTTCGGGCGCTACTCCCAAGCGGTGCG ACTTAACGCGTTCAGTCCGGAAAGCCACGCTCAAGGGCA CAACCTCCAAGTGCACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGATCTAATCCTGTTTCTCCCAAGCGCTTCGCACTG AGCGTCAGTCTTCGTCAGGGGGGGCGCTTCGCAACCG GTATTCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTG GAATTCACCCCGCTCTACGAGACTCAAGCTTGGCCGAT CAGATGCAATCCAGGTTGAGCCGGGGGATTCACACTG TGACTTAACAACCGCGTTCGCTGGGCTTACGGCCAGTA ATTCGATTAACGCTTGCACCTCGTATTACCGGGGCT GCTGGCACGGAGTTAGCCGGT</p> <p>Länge (R): 962</p>	<p><i>Escherichia fergusonii</i></p> <p><i>Shigella flexneri</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Escherichia albertii</i></p>
27	VRBD Agar, 30 °C, Probe 5, (Entenkeule frisch)	19,49	2,06	18,09			<p>>27_Forward (14-935)</p> <p>TACCATGCAGTCGAGCGGTAGCACAAGAGAGCTTGCTCT CTGGGTGACGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCTCTGGG AAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTA GCTAATACCGCATGACGCTCTTCGGACCAAAGTGGGGAC CTTCGGGCTCACGCCATCACATGTGCCAGATGGGATT AGCTAGTAGGTGGGTAATGGGCTCACCTAGGCGACGATC TCTAGCTGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAACCT GAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGG GAATATTGACAAATGGGGCAAGCCTGATGCAAGCCATGC CGGCTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTT CAGCGAGGAGGAAGCCTTAAGGTTAATAACCTTGTGA TTGACGTTACTCGCAGAGAAGCACCAGGCTAACTCCGCTG CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATC GGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCAGCAGCGGTTTGTGA AGTCAGATGTGAATCCCGGACTTAACTTGGGAAGTGC ATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGCTTGTAGAGGGGGGTA GAATTCAGGTTGACGGTGAATGCGTAGAGATCTGGA GGAATACCGGTGGCGAAGGGGGCCCCCTGGACAAGAC TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGAT TAGATACCCCTGGTACCCAGCTGTAACAGATGTCGACTT GGAGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCGGAGCTAAC GCGTTAAGTGCAGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGACAAAGCGGT GTAGCATG TGGTTAATTCGATGCAACGCG</p> <p>Länge (F): 921</p>	<p>>27_Reverse (15-942)</p> <p>GTAGCGCCCTCCGAAAGTTAAGCTACCTACTCTTTTGCA ACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGACAAGGC CCGGAAAGTATTACCGGTAGCATTCTGATCTACGATTAC TAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTCGACACTCCA ATCCGGACTACGACATACTTTATGAGTTCGCTTGCTCTC GCGAGTTCCCTTCTTTGTAATGCAATTTAGCAGCTG TGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGCTCA TCGCCACTTCTCCGGTTTATCACCCGCACTCTCCCTTTG AGTTCCGACATTACTCGCTGGCAACAAGGATAAGGGT TGCGCTGTTGGGGACTTAAACCAACTTTCACAACAC GAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAGATTTCC CGAAGGCACTAAGTATCTTAGCAATTTCTCGGATGTC AAGAGTAGTAAGGTTCTTCGGGTTGATGCAATTAACCC ACATGCTCCACCGCTTGTGGGGGGCCCCGTAATTCATT TGAGTTTTAACTTGGGGCGTACTCCCAAGGGCGTCA CTTAACGCGTTCAGTCCGGAAAGCCACGCTCAAGGGCAC AACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCA GGTATCTAATCCTGTTTGTCCCAAGCGTTTCGCACTGA CGCTCAGTCTTTTTCAGGGGGGGCGCTTCGCCACCGG TATTCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACCTGG AATTCTACCCCGCTTCAACAAGACTCTAGCTTGGCAGTTC AAATGCAAGTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTCACACTCTG ACTTAACAACCGCGTTCGCTGGGCTTACGGCCAGTAAT CCGATTAACGCTTGCACCCTC</p> <p>Länge (R): 927</p>	<p><i>Serratia grimesii</i></p> <p><i>Rahnella aquatilis</i></p> <p><i>Serratia liquefaciens</i></p> <p><i>Serratia plymuthica</i></p> <p><i>Obesumbacterium proteus</i></p> <p><i>Serratia proteamaculans</i></p> <p><i>Hatnia alvei</i></p>

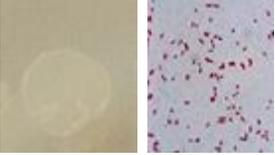
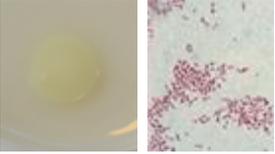
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
29	VRBD Agar, 20 °C, Probe 6, (Wachtel)	60,32	2,18	14,93			<p>>29_Forward (50-304) TCGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGG GATCTGCCGATATAGGGGATAACCACTGGAAACGGTG GCTAATACCGCATACGCTCTCAAGACCAAGAGGGGGAC CTTCGGGCTCTCACTATCGGATGAACCCACATGGGATT ATCTATTAGCGGGTAATGGCCACATATCGACAATC CCTATCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGAAC GAGACAC GGTCCACTCTCTAC</p> <p>Länge (F): 254</p>	<p>>29_Reverse (24-977) TCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTGCAACCCACTCC CATGGTGTGACGGGCGGTGTACAAGGCCCGGGAAACG TATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATT CGACTTCAAGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACT ACGACGCACTTTGTGAGGTCGGCTTGTCTCGCGAGGTC GCTTCTCTTTGATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCC TACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACCTATCCCCACC TTCTCCGGTTTATCACCGGCGAGTCTCCTTTGAGTTCGG ACCGAATCGCTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTCGT TGCGGACTTAACCAACATTTCAACAACAGGAGTGCAGC ACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACCGTTCGCGAAGGCAC CAAAGCATCTCTGCTAAATTCCTGGATGTCAAGAGTAGG TAAGTTCTTCGGTTGCACTCGAATTAACCAACATGCTCC ACCGCTTGTCCGGCCCCGTCGAATTCATTTGAGTTTAA CCTTCCGGCCGTAATCCAGCGGCTGCAGTTAACCGGT TAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAG TCGACATCTTTACGGCGTGGACTACCAAGGATCTAAT CCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTTCGACCTGAGCGTCACT TTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCGCCGATTCCTCCA GATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCACCC CCCTCTACAAGACTCAAGCTCCGAGTTCAAATGCAGTT CCCAGGTTAAGCCCGGGATTTCACATCTGACTTAACAG ACCGCTGCGTGGCTTACCGCCAGTAATTCGATTAA CGCTTGCAACCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGGA GTTAGCCGGT</p> <p>Länge (R): 953</p>	<p><i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pantoea ananatis</i> <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i></p>
31	VRBD Agar, 30 °C, Probe 7, (Maishähnchen- schenkel)	39,73	2,04	14,43			<p>>31_Forward (584-681) ACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGG GGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTATAGAT CTGGAGGAATACCGGTGGCG</p> <p>Länge (F): 97</p>	<p>>31_Reverse (22-852) CTCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTGCAACCCACTC CCATGGTGTGACGGGCGGTGTACAAGGCCCGGGAAAC GTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATT CCGACTTCAAGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAC TACGACGCACTTTATGAGTCCGCTTGTCTCGCGAGGT CGCTTCTCTTTGATGCCCAATTTAGCACGTTGTAGCC CTGGTCTAAGGGCATGATGACTGACGTCATCCCAAC CTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCC GGCCGGACCGCTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTC GTTGGGGACTTAACCAACATTTCAACAACAGGACTGA CGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGCGTTCCGAAAGGC ACATTCTCATCTCGAAACTTCGTTGGATGTCAAGACCA GGTAAGGTTCTTCGCTGTCATCGAATTAACCAACATGCT CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTTGAGTTT AACCTTGCAGGCGTACTCCCAAGCGGTGCAGTTAACGC GTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCA AGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAGGATCTA ATCCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTTCGACCTGAGCGTCA TCTTCTCCAGGGGGCCGCTTCCGCAAGCGTATTCTC CAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCAC CCCCCTACGAGACTCAAGCTTCCAGTATCAGATGCA GTTCCC</p> <p>Länge (R): 830</p>	<p><i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Escherichia coli</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
32	VRBD Agar, 30 °C, Probe 7, (frische Maishähnchen- Schenkel)	20,80	2,09	15,29			<p>>32_Forward (344-495) GCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAG GCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTAGCGGGGAGGAAAGG >32_Forward (131-833) AGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCACA T AAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG</p> <p>Länge (F): 151</p>	<p>>32_Reverse (453-940) ACCATTCCATCTCTGAAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCA GGTAAGGTTCTTCGGTTGCATCGAATTAACCACATGCT CCACCGCTTGTGGGGCCCCGCAATTCATTGAGTTTT AACCTTGCGGCCGTACTCCCGAGGCGGTGACTTAACGC GTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCA AGTCGACATCGTTTACGGCGTGAACACCAGGATCTA ATCCTGTTTGCTCCCGCAGCTTTCGCACCTGAGCGTCAG TCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATTCTCT CAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCTAC CCCCCTACGAGACTCAAGCTTGCCAGTATCAGATGCA GTTCCAGGTTGAGCCGGGGATTTCACATCTGACTTAA CAAACCGCTGCGTGCCTTACGCCCAAGTAATCCGAT TAACGCTTGACCCCTC</p> <p>Länge (R): 487</p>	<p><i>Escherichia fergusonii</i></p> <p><i>Shigella flexneri</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Shigella dysenteriae</i></p>
36	VRBD Agar, 20 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	180,62	1,24	18,98			<p>>36_Forward (731-833) TACAACAGGATTAGATACTCTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGATGCGACTTGGAGTTGTGCCCTTAGGCGTGGCTT CCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGAC</p> <p>Länge (F): 102</p>	<p>>36_Reverse (13-378) CGGGTAGCGCCCTCCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTT TGCAACCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTACAA GGCCCGGAACGTATTACCGTGGCATTCTGATCCACGA TTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGACAGCT CCAATCCGACTACGACGCACTTTATGAGTCCGCTTGC TCTCGGAGGTCGCTTCTCTTTGATGCGCCATTGTAGCA CGTGTGATGCCCTGGTCTAAGGCCATGATGACTTTGAC GTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCC TTTGAGTTCCCGCCGACCGCTGGCAACAAGGAAAAG GGTTGCGCTCGT</p> <p>Länge (R): 365</p>	<p><i>Citrobacter youngae</i></p> <p><i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i></p> <p><i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i></p> <p><i>Escherichia fergusonii</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
37	VRBD Agar, 20 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	58,54	2,22	17,02			>37_Forward (741-805) CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATG TCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGG Länge (F): 64	>37_Reverse (13-890) GGTAGCGCCCTCCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGG CAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGGTGTGTACAAGG CCCGGGAACGATTACACCGTACGATTCTGATCTACGATTA CTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC AATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCGGCTTGTCTCT CGCGAGTTCGCTTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGT GTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTC ATCCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCTTT GAGTTCACCACTTATGTGCTGGCAACAAGGATAAGGG TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTACAACAC GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCC CGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCAAATTTCTGGATGTC AAGAGTAGTAAGGTTCTTCCGGTTGCATCGAATTAACCC ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCAATTCATT TGAGTTTTAACCTTCCGGCCGACTCCCCAGGCGGTGCGA CTTAACCGGTTAGTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCAC AACCTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAG GGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTGA GGTCTGAGTCTTGTCCAGGGGGCCCGCTTCCGCCACCGG TATTCTCCAGATCTACGATTTTACCGCTACACCTGG AATTCTACCCCTCTACAAAGCTCTAGCTTGCAGTTTC AAATGCAGTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACACATCTG ACTTAATAAA Länge (R): 877	<i>Obesumbacterium proteus</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia fonticola</i> <i>Serratia plymuthica</i>
38	VRBD Agar, 30 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	36,66	2,06	15,17			>38_Forward (49-946) CTTTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCT GGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACG GTAGTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGG GACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGG ATTAGCTAGTAGGTTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACG ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA TGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGTAC TTTCAGCGGAGGAAGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCT CATTGACGTTACCCGCAAGAAGCACCGCTAACTCCG TGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA ATCCGAATTAAGTGGGCTAAAGCGCACGAGCGGTTTTG TTAAGTCAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAAC TGATCTGATAGTGGCAGCTTGTAGTCTCGTAGAGGGG GTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACGAA GACTGACGCTCAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGATGTCACCGGTAACGATGTCG ACTTGSAGGTTGTCCTTGCAGCGTGGCTTCCGAGCT AACGCGTTAAGTCAACCGCTGGGAGTACGGCCGCAA GGTAAAACCTAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAG GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGGAAGAAC CCTTA Länge (F): 897	>38_Reverse (449-936) CACATTCTCATCTCTGAAAAATCCGTTGGATGTCAAGACC AGGTAAAGTTCTTCGGTTGATCGAATTAACACATGC TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAATTCATTGAGTTT TAACCTTCCGGCCACTCCCCAGGCGGTGCACTTAAGC CGTTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCAACCTCC AAGTCGACATCGTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCT AATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCA GTCTTCGTCAGGGGGCCCGCTTCCGCCCGGATTCCT CCAGATCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTC CCCCCTCTACGAGACTCAAGCTTCCAGTATCAGATGC AGTTCCAGGTTGAGCCGGGGATTTACATCTGACTTA ACAACCGCTCGTGGCTTACGCCCAAGTAATCCGA TTAACGTTGACCCCT Länge (R): 487	<i>Shigella flexneri</i> <i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Escherichia coli</i>

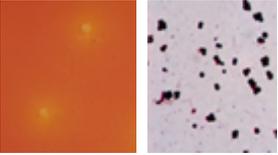
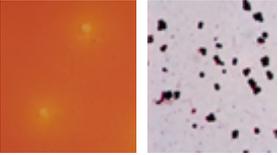
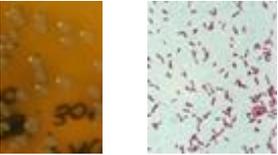
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
39	VRBD Agar, 20 °C, Probe10, (Putensteaks)	101,00	2,15	17,17			>39_Forward (346-367) CCTCTACCACGGCGCGTGTGT Länge (F): 21	>39_Reverse (16-862) AGGCGCCTCGAAGGTTAAGCTACCTACTCTCTTTGCAAC CCACTCCATGGTGTACGGGGGTTGTGTACAAGGCC GGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTA GCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGAT CCGGACTACGAGCTACTTTATGAGGTCGCTTGTCTCG CGAGTTGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTTG GTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCA CCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGAGTCTCCTTTGA GTTCCACCATTAAGTGTCTGGCAACAAGGATAAGGTT GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTTTCACAACAG AGCTGACGACAGCCATGCAGACCTGTCTCAGAGTTCC GAAGGCACTAAGCTATCTAGCGAATCTCTGGATGCA AGAGTAAAGTAAAGTTCTCGCGTTGATCGAATTAACCA CATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATTT GAGTTTTAACCTTGGCGCGTACTCCCAGGCGTCCGAC TTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCACA ACCTCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGG GTATCTAATCTGTTGCTCCCGCGCTTTCGACACTGAG CGTCAAGTCTTGTCCAGGGGGCCCTTCGCCACCGTA TTCTCCAGATCTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAA TTTACCCCTCTACAAGACTTAGCTTCCAGTTTCAA ATGCAGTTTCCAAGTTAAG Länge (R): 846	<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia grimesii</i>
40	VRBD Agar, 30 °C, Probe 10, (Putensteaks)	20,17	1,86	15,21			>40_Forward (23-416) TCTAGCGGTAGAGAGGTGCTTGCACCTCTGAGAGCGGC GGACGGGTGAGTAATACCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG GGGATAACGTTCCGAAACGGAGCCTAATACCGCATACGT CCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCCT ATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAAGT AATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA GGATGATCAGTACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGAC TCCTACGGAGGACGAGTGGGAATTTGGACAATGG GCCAAAGCCTGATCCACCATGCCGCTGTGTGAAGAAG GTCCTTCGATTGTAAGCATTAAAGTTGGGAGGAAGGG CATTAA Länge (F): 393	>40_Reverse (16-923) GTACGTCTCCGAGGGTTAGACTAGCTACTCTGGTGCA ACCCACTCCATGTTGTACGGGGGTTGTGTACAAGGC CCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATTCACGATTAC TAGCGATTCCGACTTCACGAGTCGAGTTGCAGACTCGG ATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCGCT CGCGGTTGGCAACCCTTGTACCCACCAATTGTAGCACG TGTGTAGCCAGGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT CATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGCGTCTCCTT AGAGTGCCCAACATTACGTGCTGGTAACAAAGGACAAGG GTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACTCTCACGAC ACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTT CCGAAGGCCAACCTCCTCTGGAAGATTCATGGAT GTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTA ACCCACTGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTC ATTTGAGTTTTAACCTTGGCGGCTACTCCCAGGCGGT CAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAATCAAGGTT CCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACC AGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCGCGCTTTCGCACT CAGTGTCAATCAGTCCAGGTAGTCCGCTTCCGCACTG GTGTTCTCTCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGG AAATCCACTACCTCTACCATACTCTAGCTTCCAGTTTT GGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTCACATTC AACTTAACAACCACCTACGGCGCTTTACGCCAGTAAT TCC Länge (R): 907	<i>Pseudomonas lundensis</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas moraviensis</i> <i>Pseudomonas taetrolens</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
41	Pseudomonas Agar, 30 °C, Probe 1, (Putenbrustinnenfilet)	17,10	2,05	17,36			>41_Forward (609-636) CGCCGCCTGTTGCTGTTTGAACGAATA Länge (F): 27	>41_Reverse (12-736) GCGGTAGGGCCCTCCGAAGGTTAAGCTACCTACTCTTTT GCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGACAAG GCCGGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGATCAGGATT ACTAGCGATTCCGACTTACGGAGTCGAGTTGCAGACTC CGATCCGGACTACGACGACTTTATGAGGTCGGCTTCT CTCGCGAGTTTCGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGACTTGACG TCATCCCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCT TTGAGTTCCCACATTACGTGCTGGCAACAAGGATAAG GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTACAA CACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGT TCCGAAGGCACCTAAGCTATCTTAGCGAATTCTCTGGAT GTCAAGAGTAGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTA ACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCAATTC ATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGCTACTCCCAGGCGGT CGACTTAACGCGTTAGTCCGGGAAGCCAGCCTCAAGGG CACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACAGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACC TGAGCGTCAGTCTTTG Länge (R): 724	<i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia grimesii</i>
44	Pseudomonas Agar, 30 °C, Probe7, (frische Maishähnchen-Schenkel)	67,65	2,16	16,78			>44_Forward (700-725) CCTCGTACTGACACTGACGCTGCAAG Länge (F): 25	>44_Reverse (404-634) ATTTACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTG TGTACAGTCCCAGGACCAATCCATCTCTGGAAAG TTCTCTGATGTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTCGGTTGC TTGCAATTAACCAATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCC CCGTAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGACTCC CCAGCGGTCAACTTAATGCGTTAGTGCACAGC Länge (R): 230	<i>Pseudomonas mosselii</i> <i>Pseudomonas japonica</i> <i>Pseudomonas pohangensis</i> <i>Pseudomonas vranovensis</i> <i>Pseudomonas fulva</i>

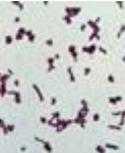
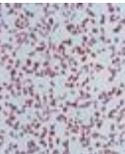
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
46	Pseudomonas Agar, 30 °C, Probe 8, (Perlhuhnbrust mit Haut)	19,91	1,87	17,54			>46_Forward (284-340) CACGGTCCATACTCCTACGGTAGGCAGCACTGGGGAATA TTGAACAATGCCTAAAG Länge (F): 56	>46_Reverse (80-940) GGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACTTACCCGTGA CATTCTGATTACAGTACTACTAGCGATTCCGACTTCAGCA GTCSAGTTGCAGACTCGATCCGACTACGATCGGTTTT ATGGGATTAGCTCCACTCGGGCTTGCAACCCCTTTGT ACCGACCATGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGG GCCATGATGACTTGACGTCATCCCACTTCTCCGGTTT GTCACCGGCACTCCTTAGAGTGCCCACTTACGTGC TGGTAAGTAAAGCAAGGGTTGGCTCCTTACGGGACTT AACCAACATCTCAGCACAGGCTGACGACAGCCATGC AGCACCTGTCTCAATGTTCCGAAGGCAACATCTATCTC TAGAAAGTTCATTGGATGTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTC CGTTGCTTCAAAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTG CGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCAGC CGTACTCCCAAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCCG CACTAAGAGTTCAAGACTCCCAACGGCTAGTTGACATCG TTTACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTGTCT CCCCACGCTTTCGCACTCAGTGTCAAGTATCAGTCCAGG TAGTCGCTTTCGCACTGGTTCCTTCTATATCTACGC ATTTACCGCTACACAGGAAATCCACTACCCTACCAT ACTCTAGCTTCCAGTTTGGATGCACTTCCAGGTTGAG CCCCGGGATTTCACTTCACTTAACAACCACTACGCG CGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACTLänge (R): 860	<i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas taetrolens</i> <i>Pseudomonas lundensis</i>
47	Pseudomonas Agar, 30 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	70,09	1,99	14,77			>47_Forward (280-298) CACTGTGCCGGACTCCTT Länge (F): 18	>47_Reverse (15-956) GGTACGTCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTG CAACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGGTGTACAAG GCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCGATTCGCGAT TACTAGCGATTCCGACTTACGCACTCGAGTTGCAACT GCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGGATTAGCTCCA CCTCGCGGCTTGGCAAGCCTCTGTACCGACCATTTAGC ACGTGTGTAGCCCAGGCGTAAGGGCCATGATGACTTGA CGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGCGAGTCT CCTTAGAGTGCCCAACGATAAGGTGCTGTTAACTAAGGAC AAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAAACCAACATCTCA CGACACGAGCTGACGACAGCCATCGACACTGTCTCAA TGTTCCGAAAGCAACCAATCCATCTCTGGAAGTTCAATG GATGTCAAGGCTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCSAA TTAAACCAATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGCTCA ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGGCTACTCCCCAGGC GGTCAACTTAATGCGTTAGCTGGCCCACTAAGAGCTCAA GGCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGAC TACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGC ACCTCAGTGTCAATATCAGTCCAGGTGGTCCCTTCGCC ACTGGTTCCTCTATATCTACGCAATTCACCGCTACA CAGGAAATTCACCAACCTCTACCATACTCTAGCTTGCCA GTTTTGGATGCACTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTTCA CATCCAATTAACAACCACTACGCGGCTTACGCC AGTAATTTCCGATTAACGCTTGCAACCTCTGATTACCGC G Länge (R): 941	<i>Pseudomonas koreensis</i> <i>Pseudomonas migulae</i> <i>Pseudomonas moraviensis</i> <i>Pseudomonas reinekei</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i> <i>Pseudomonas caricapapayae</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
48	Pseudomonas Agar, 4 °C, Probe 10, (Putensteaks)	42,87	2,17	16,59			<p>>48_Forward (13-950) TACCATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGGTGCTTGACCTCT TGAGACGGCGGACGGGTGAGTAATACCTAGGAATCTG CCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGAAACGGACGCTAAT ACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTTCG GGCCTTGCCTATACAGATGAGCCTAAGGTCCGATTAGCTA GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTA CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGTGAGAC ACGGTCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATA TTGGACAATGGGGCAAAGGCTGATCCAGCCATGCCGCT GTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGACCTTTAAGTTG GGAGGAAGGGCTTAACCTAATACGTTAGTGCTTTGACG TTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA GCCCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATT ACTGGCGTAAGCGCGCTGAGTGGTTTGTAAAGTTGA ATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACGCAATCCAA AACTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGTGGAAATTT CCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA CCAGTGGCGAAGCGCACCTGGACTGATACCTGACACT GAGGTGCSAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATA CCTGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTT GGGAGTCTTGAACCTTACTGGCGAGCTAACGCATTAA GTTGACCGCTGGGAGTAGCGGCCGAAGGTTAAACTC AAATGAATTACGGGGCCGCCACAAGGGTGCAGCAT GTGGTTAATTCGAAGCAACGGGAAGACCTTACCAGGC CTTGAC</p> <p>Länge (F): 937</p>	<p>>48_Reverse (19-938) TCCTCGAGGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCCCA CTCCATGTTGTGACGGGCGGTGTGTACAGGCCCGGG AACGTATTACCGGTGACATTCTGATTACGATTACAGCG ATTCCGACTTACGCGAGTGGAGTTGCAGACTGCGATCCG GACTACGATTCCGTTTTATGGATTAGCTCCACCTCCGG CTTGGCAACCCCTTTGACCCACCTTTAGCACGTGTGA GCCAGCGCTAAAGGCCATGATGACTTGGAGCTATCCC CACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCACTCTCTTAGAT GCCACCATACGTGCTGTAACCTAAGGACAAGGGTTGC GCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAG CTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAATGTTCCGA AGGCACCAATCTATCTAGAAAAGTTCATTGGATTGCAAG GCCTGGTAAGTTCTTCGGTTCGTTGCAATTAACACCACA TGCTCCACCGCTTGGCGGGCCCCGCTCAATTCATTGA GTTTTAACCTTGGCGCCACTCCCAGGGCGTCAACTT AATGCGTTAGTGGCGCACTAAGAGTTCAAGACTCCCAA CGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGCT ATCTAATCCTGTTTGTCCCGCAGCTTCCGACCTCAGTG TCAGTATCAGTCCAGGTGCTGCTTCCGACTGTGT CCTTCTATATCTACGCACTTCCCGCTACACAGGAAAT CCACCACCTCTACCATACTACTGCTTCCAGTTTGGAT GCAGTCCCAGGTTGAGCCCGGGATTCACATTCACCT TAACAAACCACTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTC GATTAACGCTTGACCC</p> <p>Länge (R): 919</p>	<p><i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas kilonensis</i> <i>Pseudomonas taetrolens</i></p>
55	PALCAM Agar, 20 °C, Probe 7, (frische Maishähnchen-Schenkel)	14,99	1,93	11,25			<p>>55_Forward (15-915) TAATGCAGTCGAGCGAACAGATGAGAAGCTTCTCTCT GATGTTACGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC CTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCT AATACCGGATAATATTTTAAACCGCATGTTCAATAGTGA AAGACGGTTTCGGCTGTCACTTATAGATGGAACCGCGCC GTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGA CGATACGTAGCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACT GGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGC AGTAGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACCGA GCAACGGCGGTGAGTGAAGGTCTTCGGATCGTAAA ACTCTGTGTTAGGGAAGCAAAATTTGTTAGTAACTGAA CAAGTCTTGACGGTACTTAAACGAAAGCCACCGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTATCCGGAATATTGGCGGTAAAGCGCGGTAGGCGG TTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTG GAGGGTCAATGGAACCTGGAAACTTGAAGTGCAGAAAG GAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAG ATATGGAGAAACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCGT CTGTAACCTGACGCTGATGTGCAAAAGCTGGGATCAAA CAGGATTAGTACCTGGTGTGCAACCGCTTAAACGATG AGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTATGCTGCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGATACGACCCG AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAA GCGGTGGA</p> <p>Länge (F): 900</p>	<p>>55_Reverse (14-926) CGACGGCTAGCTCCTACAGGTTACTCCACGGCTTCGGG TGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA GACCCGGGAACGATTACCCGTAGCATGTGATCTACGA TTACTAGCGATTCCAGCTTCAATGATGCGAGTTCGAGACT ACAATCCGAACCTGAGAAATATTTATGGGATTTGCTTGGC CTCGCGGATTGCTGCTCCCTTTGATTAATCCATTGTAGCAC GTGTGTAGCCAAATCATAAGGGGCACTGATGTTGACG TCATCCCACCTTCTCCGGTTTTGACCGGCACTCAAC CTAGAGTGCACCACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAAG GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGAC ACGAGCTGACGCAACGATGACACCTGTCACTTTGTG CCCCGAAGSGGAAGACTCTATCTTAGAGCCGTCAAAG ATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTCCGCTTGTGCTCAATT AAACCACATGCTCCACCGTGTGGCGGTTCCCGCTCAAT TCCTTTAGTTTCAACCTTGGCGGTACTCCCAAGGG GAGTGTCTAATGCGTTAGCTGACGACTAAGGGCGGAA ACCCCTAACACTTAGCACTGCTGTTACGGCGTGGAC TACCAGGTTATCTAATCTGTTGATCCCCAGCTTTCCG ACATACGCTCAGTTACAGACAGAGAGCCGCTTCGGC ACTGGTTCCTCATATCTCTGCGCAATTTACCCTCA CATGAAATTCACCTCTCCTCTTGGCACTCAAGTTCCC AGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTC ACATCAGACTTAAGAAACCGCTACGCGCGCTTTA CGCCAAATAATTC</p> <p>Länge (R): 912</p>	<p><i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>camalicus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Staphylococcus vitulinus</i> <i>Staphylococcus fleuretii</i></p>

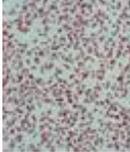
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
56	PALCAM Agar, 30 °C, Probe 8, (Perlhuhnbrust mit Haut)	18,80	1,90	10,81			>56_Forward (33-649) AGATGAAAGCTTGCTTCTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGG TGAGTAACACGTGGTAACTACCTATAAGACTGGGATA ACTCCGGGAAACCGGGCTAAACCGGATAATTTTTGA ACCGCATGGTTCAATAGTAAAGACGGTTTCGGCTGTCA CTTATAGATGGACCCGCGCTATTAGCTACTTGGTAAG GTAACGGCTTACCAAGGGACGATACGTAGCCGACCTGA GAGGGTGATCGGCCACTGGAACAGACACGGTCCA GACTCCTACGGGAGGCAGAGTGGGAATCTTCGCAAT GGGCGAAAGCTGACGGAGCAACGCGCGTGAAGTATG AAGGCTTCGGATCTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC AAATTTGTTAGTAACTGAACAAGTCTTACGGGTACCTAAC CAGAAAGCCACGGCTAACCTGCGCCAGCAGCGCGGT AATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTTTGGGCG TAAAGCCGCGTAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA GCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTATTGAAACTGGG AAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGTGGGAATTCCTCA Länge (F): 616	>56_Reverse (13-477) GACGGCTAGCTCCTAAAGGTTACTCCACCGGCTCGGGT GTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTACAAG ACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATACGAT TACTAGCGATTCCAGCTTATGATGCGATTGCGAGACTA CAATCCGAACTGAGAATAATTTTATGGATTGCTTGGCC TCGCGGATTCCGTCGCTTTGATATTCATTTGAGCAGC TGTGTAGCCCAAATCATAAGGGCATGATGATTGACGT CATCCCCACTTCTCCGGTTGTGACCGGCGTCAACC TAGAGTGCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGT TGCGCTGTTGCGGACTTAACCAACATCTCACGACAC GAGCTGACGACAACCATGACCCACTGTCACCTTTGCC CCGAAGGGGAAGACTCTATCTTAGAGCGGCT Länge (R): 464	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>camalicus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>Rodentium</i>
57	PALCAM Agar, 30 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	30,68	2,21	12,62			>57_Forward (15-1023) TACATGCAAGTCGAGCAACAGATGAGAAGCTTGCTTCT CTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGG CTAATAACCGATAAATATTTTGAACCGCATGTTCAATAGT GAAAGACGGTTTCGGCTGTACTTATAGATGSAACCGCG CGTATTAGCTAGTTGGTAAGTAACCGCTTACCAAGGC GACGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTGATCGGCCACA CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGGCAAAGCCTGACG GAGCAACGCGCGTGAGTGATGAAGGTCCTCGGATCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAATTTGTTAGTAACTG AACAAAGCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGTA ACTACGTCCGACGACCGCGGTAACTAGGTGGCAAC CGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGC GGTTTCTTAAAGTCTGATGTAAAGCCACCGCTCAACCG TGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAG AGGAGAGTGGAAATCCATGTAGCGGTGAAATGCGCAG AGATATGGAGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTCTCTG GTCTGTAACGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCA AACAGGATTAGATACCCGTGAGTCCACGCGCTAACGA TGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAAAGTCT GCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCGTGGGAGTACGAC CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATGACGGGGAACCGCA CAAGCGGTGGAGCATGGTTTTAATCGAAGCAACGCGA AGAACCCTACCAAACTTACACTCCCTTACCGCTCTAGA GATAGAGTCTTCCCTTCCGGGGACAAAGTGACAGGT Länge (F): 1008	>57_Reverse (17-984) CGACGGCTAGCTCCTAAAGGTTACTCCACCGGCTCGGG TGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTACAA GACCCGGGAACGTATTACCGTAGCATGCTGATCAGCA TACTAGCGATTCCAGCTTATGATGTCGAGTTGCGAGACT ACAATCCGAACGAGAATAATTTATGGGATTTGCTTGGC CTCGCGGATTCCGTCGCTTTGATTTATCCATTTAGCAC GTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGCATGATGATTGACG TCATCCCCACTTCTCCGTTTTGTCACGGGCACTCAAC CTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGG GTTGCGCTCGTTGCGGCACTTAACCAACATCTCACGAC ACGAGCTGACGACAACCATGACCACTGTCACCTTTGTC CCCCGAAGGGGAAGACTCTATCTAGAGCGGTCAAAGG ATGTCAAGATTTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTCGAATT AAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGTTCCCGTCAAT TCCTTTGAGTTTCAACCTTCCGCTGCTACTCCCGAGCG GAGTGCTTAAAGCGTTAGCTGACGACTAAGGGGCGGAA ACCCCTAACACTTAGCACTATCGTTTACGGCGTGGAC TACCAGGGTATCTAATCTGTTGATCCCCAGCTTTCCG ACATCAGGCTCAGTTACAGACCAAGAGCCCGCTCGCC ACTGGTGTCTCCATATCTCTGCGGATTTACCGCTACA CATGGAATTCACCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCCA GTTTTCAATGACCTCCACGGTTGACCGTGGGCTTCA CATCAGACTTAAGAAACCGCTTACCGGCTTTACGCC AATAATTCGGATAACGCTTCCCACTAGCTATTACCGG GCTGCTGGCACGTAGT TAGCCGTG	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>Sciuri</i>

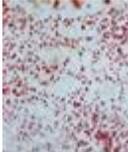
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
58	PALCAM Agar, 20 °C, Probe 9, (Enteninnenfilet)	17,34	1,80	23,51			>58_Forward (19-1030) ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGATGAGAAGCTTGCTTC TCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTACCTATAAGACTGGGATACTCCGGGAAACCGGG CTAATACCGGATAAATTTGACCGCATGGTTCAATAGT GAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTATAGATGGACCCGG CCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGC GACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCACA CTGGAACTGAGACACGGTCCGACTCCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGCCGAAAGCCGTGACG GAGCAACGCCCGTGAAGTATGAAAGTCTTCGGATCGTA AAACTCTGTTTGGGAAGAACAAATTTGTTAGTAAGT AACAACTTGGACGTAACCTAACCGAAAGCCACGGGTA ACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAA CGCTTATCCGGAATTTAGGGCGTAAAGCGCGCTAGGC GGTTTTCTAAGTCTGATGTAAGCCACCGCTCAACCG TGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTGAGTGCGAAG AGGAGAGTGAATCCATGTGAGCGGTGAAATGCGCAG AGATATGGAGAACACCGTGGCGAAGCGGCTCTCTG GTCTGTAACCTGACGTGATGTCGCAAGCGTGGGGATCA AACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACGCGCTTAAACGA TGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCT CGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGAC CGCAAGTTGAAACTCAAGGAATGACGGGACCCGCAC AAGCGTGGAGCATGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACAAATCTTGACATCTTTGACCGCTTAGAG ATAGAGTCTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGTG Länge (F): 1011	>58_Reverse (20-998) GGCTAGCTCCTAAGAGGTTACTCCACCGGCTTCGGGTGT TACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGACAAGAC CCGGGAACGTATTACCGGTAGCATGCTGATCTACGATTA CTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGTACGATTGCGAGACTACA ATCCGAACTGAGAATAAATTTATGGGATTTGCTTGGCCTC GCGGATTCGCTGCCCTTTGATATTTCATTGTAGCAGCTG TGTAGCCAAATCATAAGGGGACATGATGATTTGACGTAG CCCAACCTTCTCCGGTTTGTACCGGGAGTCAACGTAG AGTGCCCACTTAATGATGGCACTAACCTTAAAGGTTG CGCTCGTTCGCGGACTTAAACCAACATCTCACGACACGA GCTGACGACAACCATGACCACTGTCTACCTTGTCCGCC GAAGGGGAGACTCTACTCTAGAGCGGTCAAAGGATGT CAAGATTTGGTAAGTTCTTCGGCTTCTCGAATTAAC CACATGCTCCACCGCTTGGGGGTCGCCGTAATTCCT TTGAGTTTCAACCTTCCGCTGTACTCCCGCCGCGGAGT GCTTAATGCGTGTAGTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCC CCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGTACTAATCTGTTGATCCCAACGCTTCCGACACT AGCGTCAAGTACAGACCAAGAGCGCCCTTCCGACCTGG TGTTCCCTCATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGG AATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTG CAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTTGGGCTTTCACATCA GACTTAAGAAACCGCTACGCGGCTTTACGCCAATA TTCCGGATAACGCTTGCACCTACGATTACCGCGGCTG CTGGACGTAGTTAG CCGTGGCTTTCGGGTTAG Länge (R): 978	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>carniaticus</i> <i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> <i>Staphylococcus fleurettii</i> <i>Staphylococcus lentus</i> <i>Staphylococcus vitulinus</i>
59	PALCAM Agar, 30 °C, Probe 10, (Putensteaks)	55,95	2,11	11,63			>59_Forward (17-1002) TATAATGCAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCT TTGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA ACCTACCTATAAGACTGGGATAAATTCGGGAAACCGGAG CTAATACCGGATAACATTTGGAACCGCATGGTTCTAAAGT GAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGC CGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCG ACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACT GGAACCTGAGACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGACG AGTAGGGAATCTTCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGA GCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTCGGCTCGTAA ACTCTGTATTAGGGAAGAACAAACGTGTAAAGTAACTGTG CACGCTTACGCGTAACTAATCAGAAAGCCACGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC GTTATCCGGAATTTAGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGG TTTCTTAAGTCTGATGTAAGGCGCACCGCTCAACCGTG GAGGGTCATTTGAAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAAG GAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGGCGCAGAG ATATGAGGAACCCAGCTGGCGAAGCGACTTCTGATC TGTAACCTGACGCTGATGGGAAGCGTGGGATCAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACCGCGTAAACGATGA GTCTAAGTGTAGGGGGTTTCGCCCTTATGCTGCTCA GCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGC AAGGTTGAAACTCAAAGAAATGACGGGACCCGCACAA GCGGTGGAGCATGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCCTTACCAATCTTGACATCTTTGAAACTCTAGAGA TAGAGCTTCCC Länge (F): 985	>59_Reverse (15-1011) CGACGGCTAGCTCCATAAATGGTTACTCCACCGGCTCG GGTGTACAACCTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGATC AAGACCCGGGAACGTATTACCGCTAGCATGCTGATCTAC GATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGATGCTGAGTTGCAGA CTACAATCCGAACTGAGAACCACTTATGGGATTTGCATG ACCTCCGCGTTAGTGCCTTTGATTTGTCATTGTAGC ACGTGTGTAGCCCAATCATAAGGGGACATGATTTTGA CGTCATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCCGCGAGTCA ACCTAGAGTGCCCAACTAATGATGGCAACTAAGCTTAA GGTTGCGCTGTTGCGGACTTAAACCAACATCTCAGCA CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTTTGT CCCCGAAAGGGGAGGCTCTACTCTAGAGTTTCAAAG GATGTCAAGATTGGTAAGTTCTTCGGCTGTCTCGAAT TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGCTCAA TTCCCTTGGAGTTTCAACCTTGGGCTGCTACTCCCGAGCC GGAGTGTCTAATGCTGTAGCTGCAGCACTAAGGGCGGGA AACCCCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTGGGA CTACCGGATATCTAATCCTGTTGATCCCAACGCTTCC CACATCAGCGTACCTTACAGACCAAGAAAGTCCGCTTCC CACTGGTGTTCCTCATATCTCTGCGCAATTCACCGCTAC ACATGGAATCCACTTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCC AGTTTTCAATGACCCTCCAGCTTGGGAGTACCGCTGGCCTT ACATCAGACTTAAAGAACCCGCTACGCGGCTTACCGC CAATAATTCGGGATAACGCTTGGCACTACGATTTACCGC GGCTGCTGGCAGCTAGTAGCGGTGCTTCTGATTAGG TACCGTCAAGCT	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>

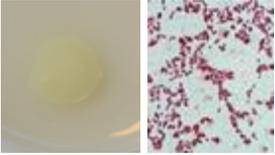
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse	
60	MRS Agar, 30 °C (-2) Epi 2, Probe 1, (Putenbrustinnenfilet)	0,58	0,38	23,80			>60_Forward (344-364) CTTCACATGAGACTCTCC Länge (F): 20	>60_Reverse TGGAAACGGGTTTTAGAAAATACCT Länge (R): 24	184..208 ...	
62	MRS Agar, 30 °C, Probe 3, (Putengulasch)	3,15	1,47	16,59			>62_Forward (15-967) ATACATGCAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTT GCATTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACCTGCCTAAAGAAAGGGGATAACACTT GAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCAT GATCCTTAGATGAAAGATGGTTCGCTATCGCTTTAGAT GGACCCGCGGCTATTAAGTATTGGTGGGTAACGGC CTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACGTAGAGGTTGA TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAGCGCAA GTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGTCTTC GGATCGTAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGAGTGA GAGTAACTGTTTCATTGATGACGGTATCTAACAGCAAGT CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAA CGCAGGCGGCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGC TTAACCGGAGTAGTGCATTGGAACCTGGAAGACTTGAGT GCAGAAAGAGGAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATGGAAGAACCCAGTGGCGAAAGCGGC TCTCTGCTGTAACTGACGCTGAGGTTGAAAGCGTGG TAGCAACAGGATTAGTAACTGGTGTCCACGCCGTA AACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGTTTCCGCCCTTCA GTGCCGAGCTAACGCAATAGCATCCGCTGGGGAGT ACGACCCGAAAGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGC CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAAGCAA CGCGAAGACCTTACC	>62_Reverse (16-987) AGACGGCTGGCTCCTTGCGGTTACCCACCGGCTTTGG GTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGACA AGGCCGGGAACGTATTCACCCGACATGCTGATTCGGC ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGC CTACAATCCGAACGAGAACGGCTTAAAGAGATTAGCTAA ACCTCGCGGCTTTCGCACTCGTTGTACCGCTCATTGTAG CACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGACTTTG ACGTCGTCCCCACCTTCCCGGTTTGCACCGGCAATC TGCCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGACAACA AGGGTTGCGTCTGTTGCGGACTTAACCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACTGTCAACTT GTCCCGAAGGGAAAGCCTAATCTCTTAGGTGTCAAAG GATGTCAGACCTGGTAAGGTTCTTCGGCTTGCCTCGAAT TAAACCACATGCTCCACGCTTGTGCGGGCCCGCTCAA TTCCCTTGAGTTTCAACTTGGGTCGACTCCCGCAGGC GCAATGCTTATTGCGTGTAGCTGCGCACTGAAAGCGGGA AACCTCCAACTAGCAITTCATGTTACCGCGTGA CTACCAGGATCTAATCTGTTGCTACCCAGCCTTTCG AACCTCAGCGTCACTTACAGACCAGAGAGCCGCTTTCG CACTGGTGTTCCTCATATATCTACGATTTACCCGCTAC ACATGGAGTTCACCTCTCCTCTGCACTCAAGTCTTCC AGTTTCAAATGCACTACTCCGTTAAAGCCGAGGCTTTC CATCAGACTTAAAGACCGCTGCGTTCCTTTACGGC AATAAATCCGGACACCGCTGCCCACTACGTATTACCGC GGTCTGGCAGTGTAGTTAGCCGTGACTTTC	Länge (F): 952 Länge (R): 971	<i>Lactobacillus salivarius</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
67	MRS Agar, 20 °C, Probe 10, (Putensteaks)	4,47	1,02	19,87			<p>>67_Forward (15-1046) TATAATGCGAGTCGACGCACTCTCGTTAGATTGAAGGAG CTTGCTCCTGATTGATAAACATTTGAGTGAGTGGCGGAC GGGTGAGTAACACGTGGTAACTGCCTAAAGTGGGG GATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCT AACACCCGATGGTGTAGGGTTGAAAGATGGTTCCGGCTA TCACITTTAGGATGGACCCGGTGCATTAGTTAGTTGGT GAGGTAAGGCTCACCAAGACCGTATGATAGCCGAC TGAGAGGTAATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCAC AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCGCGTGA AGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGGAGAAGA ATGATCTGATAGTAAGTATGATCAGGTAGTGACGGTATCCA ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGATTTATTGGG CGTAAAGCAGCGCAGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGGA AAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGG GAAACTTCTGAGTGAAGAAGGACAGTGAACCTCATGTG TAGCGTGAAATGCGTAGATATATGGAAAGAACCCAGTG CGAAAGCATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAGTGTGGAGGGT TTCCGCCCTTCACTGCCGAGCTAACGCTTAAAGCACTC CGCTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTT TAAATTCGAAGCAACCGCAAGCACTTACCAGGCTTGGACA TCCTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGGA CAAAGTGCACAGGTGT Länge (F): 1031</p>	<p>>67_Reverse (14-982) TAGACGGTGGCTCCCCAAGGGTTACCTACCAGGCTTT GGGTGTCAAACACTCTCATGGTGTACGGGGGTTGTGA CAAGGCCCGGAAACGATTAACCGCGCATGCTGATCC GCGATTACTAGCGATTCCGGCTCATGTAGCCGAGTTGC AGCCTACAATCCGAAGTGAAGTGGTTTAAAGAGATTAGC TAAACCTCGCGTCTCGCAACTCGTTTACCATCATTGT AGCACGTGTGTAGCCAGGTATCAAGGGGATGATGATT TGACGTGTCGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAG TCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAAT AAGGTTGCGCTGTTGCGGGACTAAACCAACTCTCA CGACACGAGCTGACGACAACCTGACCACTGTCACTT TGCCCCGAAGGAAAGCTCTATCTAGAGTGGTCAAA GGATGCAAGACTGGTAAAGTCTTCCGCTGTTCTCGA ATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCGCTC AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGGCGTCTACTCCCCAGG CGGAGTGCTTAAAGCGTTAGCTGCGGCACTGAAAGGCG GAAACCCCAACACTAGCACTGCTTACGGCATG GACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGTACCCATGCTTT CGAGCCTCAGCGTCAAGTACAGACAGACAGCCGCTTC GCCACTGGTGTCTCCATATATCTAGCATTACCCGCT ACACATGGAGTTCACCTGTCTCTCTGCACTCAAGTTT CCAGTTTCCGATGCACTTCTTCCGTTGAGCCGAAAGCTT CACATCAGACTTAAAGAACCCGCTGCGCTCGCTTACGC CCAATAATCCGGCAACGCTTCCCACTACGTATTACCG CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG Länge (R): 968</p>	<p><i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carosus</i> <i>Lactobacillus sakei</i></p>
69	GSP Agar, 20 °C, Probe 2, (Hähncheninnenfilet)	84,66	2,18	19,81			<p>>69_Forward (16-660) CCATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTG AGAGCGGCGGACGGTGTAGTAACTAGGAATCTGCCT GATAGTGGGGATAACCTTCCGAAACGACGCTAATACC GCATACCTCTACGGGAGAAGCAGGGACCTTCGGGC CTTGGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTT GGTGAAGTAAAGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAAGT GTCTGAAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACAG GTCCAACTCTACGGGAGCAGCAGTGGGAAATATTGG ACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGT GAAGAGGCTCTCCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGA GGAAGGCGATTAACTAATACGTTGGTCTTACGCTTAC GCACAGAATAAGCAGCGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGT GGCCTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGT GAAATCCCGGGCTCAACTGGGAAGTGCATCCAAAACCT GGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGTGGAATTTCTG TGTACCGGTGAAATGGCGTAGA Länge (F): 644</p>	<p>>69_Reverse (14-1007) GGTACCGTCTCCCGAGGGTTAGACTAGTACTTCTGGT GCAACCCACTCCCATGGTGTACGGGGGTTGTACAAG GCCCGGAAACGATTAACCGTGAATTTGATTACGATT ACTAGCGATTCCGACTTACGCAAGTGCAGACTG CGATCCGACTACGATCGTTTTATGGGATTAGCTCCAC CTCGCGGCTGGCAACCTTTGTACCGACATTGTAGCA CGTGTGTAGCCCAAGCCGTAAGGGCATTGATGACTTCC GTATCCCACTCTCCCGTTTGTACCGGCAAGTCTC CTTAGAGTGCCCACTTACGCTGTGGTAACTAAGGACA AGGTTGCGCTGTTACGGGACTTAAACCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCATTGACGACCTGTCTCAAT GTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTAGAAAGTTCATTGG ATGTCAAGGCGTGGTAAAGTCTTCCGCTTGTTCGAATT AAACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGCCCGCCGCTCAAT TCATTTGAGTTTTAACCTTGCAGGCTACTCCCGAGGCG GTCAACTTAAAGCGTGTAGCTGCCCACTAAGAGTTCAAGA CTCCCAACGCTAGTTGACATCTGTTACGGCGTGAAGT CGAGGATCTAATCTGTTTGTCTCCAGCCTTCCGAC CTCAGTGTGATCAGTCCAGGTTAGTCCGCTTCCGAC TGGTTCCTTCTATATCTAGCATTACCGCTACACA GGAAATCCACTACCCTACTACACTCTAGCTGCCACT TTGGATGCAATCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACACA TTCACTTAAACCAACCTAGCGCGCTTACCGCCAGT AATTCGATTAAAGCTTGCACCTCTGTTACCGCGCT GCTGGCACAGAGTTAGCCGCTTATCTGTCGGTAAAC GTCAGACAC Länge (R): 993</p>	<p><i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i></p>

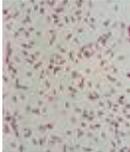
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
71	GSP Agar, 30 °C, Probe 4, (Hähnchen- unterschenkel)	13,87	1,88	17,75			<p>>71_Forward (17-984) CACATGCAGTCGAGCGGCAGCGGAAAGTAGCTTGCTAC TTTTGCCGGCGAGCGGGACCGGTGAGTAATGCCTGG GGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGGAAACGAC TGCTAATACCCGATACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGG ACCTTCGGGCCTTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGA TTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAGGCGACGA TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAA CTGAGACACGTCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTG GGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCGATGCAAGCCAT GCCGCTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGCACT TTCAGCGAGGAGGAAAGTTGGCGCTAATACGTGTCAA CTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGCTAAGTCCG TGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTA ATCGGAATTACTGGGCTAAAGCGCAGCGAGCGGTTG GATAAGTTAGATGTGAAGCCCGGGCTCAACTGGGAA TTGCAATTAAGCTGTCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGG GTAGAATTCAGGTTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT GGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGCCCGCTGCAAAA GACTGAGCTCAGGTGCGAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGCG ATTGGAGGCTGTCTTGTAGAGCTGGCTTCGGAGCT AACGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAACAGC GGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGGAAGAAC CTTACCTGGGCCCTGACATGCTGGGATCT GTAGAGAT Länge (F): 967</p>	<p>>71_Reverse (16-1011) GTAACGCCCTCCCGAGGTTAAGCTATCTACTTCTGGTGC AACCCACTCCCATGGTGAAGGGCGGTGTGACAAGGC CCGGGAACGTATTACCGGGACATTCGATTCCGATTA CTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCAAGTTCCAGACTCC GATCCGSACTACGACGGCTTTTGGGATTCCGCTACTA TCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGACGGCCATTGTAGCAC GTGTGAGCCCTGGCGTAAGGGCCATGATGACTTGAGC TCATCCCACTTCTCCGTTTTATACCGGCAAGTCTCC TTGAGTCCCACTTACGTGCTGCAACAAGGACAGG GGTTGCGCTGTTGGGGACTTAACCAACATCTCACGA CACGAGCTGACGACGCCATGCACGACTGTGTTCTGAT TCCGAAGGCACCTCCGCATCTCTACAGGATCCAGACA TGCAAGGCCAGGTAAGTTCCTCGGTTGATCGAATTA AACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATT CAATTTGAGTTTAACTTTCGGCCGCTACTCCCGAGGG TCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCAGTCTCAAG ACACAGCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGACTA CCAGGGTATCTAATCTGTTTCCGCCAGCTTTCCGAC CTGAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGGCAC CGGTATTCTCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACCC TGAATTTACCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGT TTTAAATGCAATTCAGGTTGAGCCGGGGCTTTCACAT CTAATTTACCAACCGCTCGCTGCGCTTTACGCCAGT AATTCGATTAAACGCTTGCACCTCCGTTAATCCGCGCT GCTGGCACGGAGTAGCCGGTCTTCTTCCGAGTAAC GTCACAGTTGACAC Länge (R): 995</p>	<p><i>Aeromonas bestiarum</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i></p>
72	GSP Agar, 4 °C, Probe 5, (Entenkeule)	16,72	2,16	15,57	 		<p>>72_Forward (641-668) GGGTATAGCTGTGATATGCGTAGATCTC Länge (F): 27</p>	<p>>72_Reverse (16-1009) TAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGC AACCCACTCCCATGGTGAAGGGCGGTGTGACAAGGC CCGGGAACGTATTACCGTAGCATCTGATACGATTAC TAGCGATTCCGACTTACGGAGTCGAGTTGCGAGACTCCG ATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCGCTTGCTCT GCGAGTTCGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAGCTG TGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCA TCCCACTTCTCCCGTTTTATACCGGCAAGTCTCTTTG AGTTCCCACTTACCGGCTGGCAACAAGGATAAGGGT TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATTTCAACAAC GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACTGTCTCAGAGTTCC CGAAGGCACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCCTGTGATGTC AAGAGTAGTAAGGTTCTTCCGCTGCAATGAAATTAACC ACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGCTCAATTCATT TGAGTTTAACTTGGCGGCTACTCCCAAGGCGGTGCA CTTAAAGCGTTAGCTCCGGAAGCCAGCCCTCAAGGGCAC AACCTCCAAGTCGACATCGTTACAGCGTGGACTACCA GGTATCTAATCCTGTTTGTCCCAACGCTTTCGCACTGA GGCTCAGTCTTGTCCAGGGGGCCGCTTCCCAACCGG TATTCTCCAGATCTCTACGATTTTACCGCTACACCTGG AAATCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTTC AAATGCAAGTTCCCAAGTTAAGCGCGGGATTTCACATCT GACTTAAACAAACCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAA TTCCGATTAAACGCTTGCACCTCCGTTAATCCGCGGCTG CTGGCACGGAGTAGCCGGTCTTCTTCCGAGTAAC GTC AATGCAA Länge (R): 993</p>	<p><i>Serratia grimesii</i> <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Serratia proteamaculans</i> <i>Serratia plymuthica</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
73	GSP Agar, 20 °C, Probe 7, (Maishähnchen-Schenkel)	59,13	2,14	15,93			<p>>73_Forward (14-977) TACACATGCAGTCGAGCGGCAGCGGAAAGTAGCTTGCT ACTTTTCCCGCGAGCGCGGACCGGTGAGTAATGCCT GGGGATCTGCCACTCGAGGGGGTAACAGTTGGAAAC GACTGCTAATACCCGATACGCCCTACGGGGGAAAGGAG GGGACCTTCGGGCTTTCCGCGATTGGATGAACCAAGGTG GGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGCCTCACCAGGCGA CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG GAAGTGAAGACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCA GTGGGGAATTTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGC CATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGC ACTTTACGCGAGGAGGAAAGGTTGGCCCTAATACGTGT CAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAATC CCGTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCG TTAATCGGAACTACTGGGCGTAAAGCGCACAGGCGGT TGGATAAGTTAGATGTGAAGCCCGGGCTCAACCTGGG AATTGCATTTAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGG GGGTAGAATTCACGCTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGAT CTGGAGGAATACCGGTGGCAAGGGCGGCCCTGAGCA AAGACTGACGCTAGGTGGAAAGCGTGGGGAGCAAAAC AGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATG CGATTTGGAGGCTGTGCTTGTAGAGCTGGCTTCCGGAG CTAACCGGTTAAATGACACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGTTAAACTCAAATGAATTTACGGGGGCCCGCACAAG CGGTGGAGCATGGTAAATTCGATGCAACGCGAAGAA CCTTACCTGGCCTGACATGCTGGAATCCTGTA Länge (F): 963</p>	<p>>73_Reverse (12-1011) CTGGTACGCCCTCCGAGGTTAAGCTATCTACTTCTGGT GCAACCCTCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAG GCCCGGGAACGTTATTCACGGCACTTCTGATTCGCGAT TACTAGCGATTCGACTTCAGCGAGTCCAGTTCCAGACT CGATCCGACTACGACGCGCTTTTGGATTCCGCTCAC TATCGCTAGCTTGCAGCCCTCTGACGGCCATTGTAGC ACGTGTGATGCCCTGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTGA CGTCAATCCCACTTCTCCGGTTTATGACCCGAGTCT CCCTTGAATCCCACCTTACGTGTGGCAACAAGGAC AGGGGTTGGCTCGTTCGGGACTTAAACCAACTCTCA CGACACGAGCTGACGACGCCATGACGACCTGTGTTCT GATTCGCAAGGCACTCCCGTATCTACAGGATCCAG ACATGTCAAGGCCAGTAAAGTTCTTCGCGTTGCATCGA ATTAACCAACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCGCTC AATTCATTTAGTTTTAACCTTGGGGCGTACTCCCCAGG CGGTGATTTAACCGTTAGCTCCGGAAGCCACGTCTCA AGGACACAGCCTCAAATCGACATCGTTACGGCGTGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCTCCCCAGCTTTCG CACCTGAGCGTCACTTTGTCCAGGGGGCGCCTTCCG CACCGGATTTCCAGACTCTACGCAATTCACCGCTAC ACCTGGAATTTACCCCTCTACAAGACTTACGTGGAG AGTTTTAATGCAATTCAGGTTGAGCCGGGCTTTCA CATCTAATTTCAACCCCTCGCTGCGCTTACGCCCA GTAATTCGGATTAAGCTTGCAGCTTACCCCTTACCGCG CTGCTGGCAGGAGTTAGCCGCTTCTTCTGCGAGTA ACGTACAGTTGACACGT Länge (R): 999</p>	<p><i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> <i>Aeromonas molluscorum</i> <i>Aeromonas bestiarum</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>pectinolytica</i> <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>smithia</i></p>
77	Campylobacter Agar, 20 °C, Probe1, (Putenbrustinnenfilet)	11,52	1,55	17,72			<p>>77_Forward (21-336) AAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTG ACGAGTGGCGGACGGTGAGTAATGCTCGGAAACTGC CTGATGGAGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATA CCGCATAACGTCGGAAGACAAAGAGGGGACCTTCGG GCCTCTTCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAG TAGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGCAGTCCCTAGC TGGTCTGATAGGATGACCAACCACACTGGAAGTGAACA CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCACAGTGGGGAATAT GCACA Länge (F): 315</p>	<p>>77_Reverse (21-945) CGCCTCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTGCAACCCA CTCCATGGTGTGACGGGGGGTGTACAAGGCCGGG AACGTATTCACCGTGGCATTTGATCCACGATTACTAGCG ATTCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCG GACTACGACGCATTTATGAGGTCGCGTCTGCTCCGGA GGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGA GCCCTGGTGTAAAGGCCATGATGACTTGAAGCTATCCC CACCTTCTCCAGTTTATCACTGGGAGTCTCCTTTGAGTT CCCCCGGACCGCTGGCAACAAGGATTAAGGTTGCG CTCGTTCCGGGACTTAAACCAACTTTCACAACAGGACT GACGACAGCCATGACAGCCTGTCTCACAGTTCCGGAAG GCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTGTGATGTCAGAC CAGGTAAGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCAATG CTCCACCGCTTGTGGGGCCCCCGCTCAATTCATTGAGT TTAACTTGGGGCGTACTCCGAGGGCGTCACTAA CGGTTAGCTCCGGAAGCCAGCCCTCAAGGGCACAACCT CCAAGTGCATCTGTTACGGCGTGGACTACCAAGGAT CTAATCCTGTTGCTCCCGAGCTTTCGACCTGAGCGTC AGTCTTCTCCAGGGGGCGCCTTCGCCACCGGATTTCC TCCAGATCTTACGCAATTCACCGCTACACCTGGAATTT ACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCAGTATCAGATG CAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGACTT AACAACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCG ATTAACGCTTGCACCTCCGT Länge (R): 924</p>	<p><i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella flexneri</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
79	MacConkey agar, 30 °C, Probe 1, (Putenbrustinnenfilet)	24,73	2,22	17,01			<p>>79_Forward (19-991)</p> <p>CATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAAGCTTGCTCTCGG GTGACGAGCGCGGACCGGGTGAATGCTGGGAAAC TGCTGATGGAGGGGGATAACTCTGGAAACGGTAGCTA ATACCGCATAACGTGCGAAGACAAAGTGGGGACCTTC GGCCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT AGTAGGTGGGTACCGCTCACCTAGGCGACGATCCCTA GCTGGTCTGAGAGGATGACCGCCACACTGGAACGAGA CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAT ATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGTGACGCCATGCCGCG TGTTGGAAGAAGCCCTTCGGGTTGAAGCACTTTCAGC GGGAGGAAGGCGTTAAGGTTAATAACCTTGGCGATTGA CGTTACCCGCAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGTAATACGGAGGTGCAAGCGTTAATCGGAA TTACTGGGCGTAAGCGCAGCGAGCGGCTGTCAAGTC GGATGTAATCCCGGGCTCAACTGGGAACGCAATTC GAAACTGGCAGCTAGAGTCTTTAGAGGGGGTAGAAT TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA TACCGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAAGACTGAC GCTCAGGTGCGAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCAGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAG GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGTAAACCGTT AAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC TCAATGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGC ATGTGTTAATTGATGCAACGCAAGAACCTTACCTGG TCTGACATCCACAGAACTTTCAGAG ATGCATTGGTGCC</p> <p>Länge (F): 972</p>	<p>>79_Reverse (12-983)</p> <p>GGTAGCGCCCTCCGAAGGTTAAGCTACACTCTTTTGG CAACCCACTCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTAACAAGG CCCGGAACGTATACCGTAGCATTCTGATCTACGATTA CTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCC AATCCGGACTACGACATACCTTATGAGTCCGCTTGCTCT CGCGAGGTCGCTTCTTTGTATATGCCATTTGAGCACGT GTGTAGCCCTGGTGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTC ATCCCACTTCTCCAGTTTATCACTGGGAGTCTCTCTT GAGTTCCCGGGCGAACCGCTGGCAACAAGGATAAAGGG TTGCGCTCGTTGCGGACTTAAACCAACTTTCACAACAC GAGCTGACGACAGCGATGACAGCCTGTCTCACATTC CGAAGGCACCAATCCATCTGGAAGTTCTGTGATGT CAAGACAGGTAAGGTTCTTGGGTTGATCGAATTAAC CACATGCTCCACCCTTGTGGGGCCCCCGTCAATTCAT TTGAGTTTTAACCTTGGCGGCTACTCCACGGGGCTG ATTTAACGGTTAGCTCCGAAGCCACCGCTCAAGGGCA CAACCTCCAATGACATCGTTTACGGGGTGGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCGACGTTTCCGACCTG AGCGTCACTTTGTCAGGGGGCCGCTTCCGCCCGC GTATTCCTCCAGTCTCTACGCAATTCACCGTTCAGCT GAATTCACCCCTCTACAAGACTTAGCTCCGACGTTT CGAATGCACTTCCAGGTTGAGCCGGGGATTCCACTC CGACTGACAGACCGCTCGCTGGCTTTACGCCAGTA ATTCGATTAACGCTTGCACCTCGTATTACCGGGCT GCTGGCACGGAGTTAG CCGGTGCTCTT</p> <p>Länge (R): 971</p>	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p>subsp. <i>rhinoscleromatis</i></p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p><i>Klebsiella variicola</i></p> <p><i>Klebsiella pneumoniae</i></p> <p>subsp. <i>ozaenae</i></p>
98	Pseudomonas Agar, 4 °C, Probe 3, (Putengulasch)	25,65	2,22	19,13			<p>>98_Forward (13-974)</p> <p>CTACCATGCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTC TTGAGAGCGCGGACCGGGTGAATACCTAGGAATCTG CCTGATAGTGGGGATAAAGCTTCGGAAACGGACCTAAT ACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGACCTCG GGCCTTGGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGATTAGCTA GTTGGTAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTA CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACTGGAACCTGAGAC ACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGAATA TTGGACAATGGGCGAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCT GTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACCTTAAGTTG GGAGGAAGGGCATTACCTAATACGTGATTGTCTTGACGT TACCAGCAGAAATAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG CCGGGTAAACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTGTTAAGTTGAA TGTGAAATCCCGGGCTCAACTGGGAACCTGCATCCAAA ACTGGCAAGCTAGATAGTGTAGAGGGTAGTGGAAATTC CTGTGAGCGGTGAAATGCTAGATATAGGAAGGAACAC CAGTGGCGAAGCGACTACCTGGACTGATGACAGCT AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATAACC TGTAGTCCACCGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGG GAGCTTTGAACTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTT GACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA TGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTG GTTTAATTGAAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTT GACATCCAATGAACCTTCTAGAGATA</p> <p>Länge (F): 961</p>	<p>>98_Reverse (14-1008)</p> <p>GGTAGCTCCTCCGAGGGTTAGACTAGCTACTTGGTGC AACCCACTCCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGTAACAAGG CCGGGAACGTATACCGTAGCATTCTGATTCACGATTAC TAGCGATTCCGACTCACGAGCTCGAGTTGCAGACTCGC ATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTC GCGGCTGGCAACCTTTGACCGACCATGATGACACGT GTGTAGCCAGGCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTC ATCCCACTTCTCCGTTTTGTCACGGGCGTCTCCTTA GAGTGCCCACTTACGTGCTGTAACAAAGGCAAGGG TTGCGCTGTTACGGGACTTAAACCAACTCTCAGGACA CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTT CCGAAGGCACCAATCCATCTCGGAAGTTCTATTGGATG CAAGGCCTGGTAAGGTTCTTGGGTTGCTTCGAATTAAC CACATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCGTAATTCAT TTGATTTTTAACCTTGGGGCCGACTCCCGAGCGGTCA ACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGTTCAAGACTCC CAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCG GGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCAAGCTTGGCACTCA GTGTCAGTATCAGTCCAGGTAGTCGCTTCCGCACTGCT GTTCTTCTATATCTAGCATTTCACCGCTACACAGSAA ATTCCACTACCTCTACCACTCTAGCTTCCGACTTTG GATGCACTTCCAGGTTGAGCCCGGATTTCCAGTTCA ACTTAACAACCACTACCGCGCTTACGCCAGTAACT CCGATTAACGCTTGCACCTGTATTACCGGGCTGCT GGCACAGATTAGCCGCTGCTATTCTGCTGGTAACTGC AAGACATCAC</p> <p>Länge (R): 994</p>	<p><i>Pseudomonas fragi</i></p> <p><i>Pseudomonas psychrophila</i></p>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
100	Pseudomonas Agar, 30 °C, Probe 4, (Hähnchen- Unterschenkel)	69,10	2,20	15,48		<pre>>100_Forward (35-944) ACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGGCGGACGGGTGA GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGT TTCGAAAGGACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAG AAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTCCGCTATCAGATGACC CTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACC AAGGCGACGATCCGTAACGTGGTCTGAGAGGATGATCAGT CACACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG GCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA TCCAGCCATGCCCGGTGTGAAGAAGGCTCTTCGGATTG AAAGCCATTTAAGTTGGGAGGAAAGGCGAGTAAGCTAAT ACCTTGCTGTTTTGACGTTTACCGACAGAATAAGCACCGG CTAAGTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAGCGCGCTAG GTGGTTGCTTAAGTTGGATGTGAAGCGCCCGGCTCAAC CTGGGAACTGCATCCAAAACGGGCGAGCTAGAGTACGGT AGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATAGGAAGGAAACACAGTGGCGAAGCGCACACTT GGACTGATACTGACACTGAGGTGGCGAAGCGTGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTATCCAGCGCTACAC GATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGGATTTTAAAGTGGC GCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGC CGCAAGGTTAAAACCTAAATGAATTAGCGGGGCGCGCA CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACCGCA AGAA CCTTACCAGG</pre>	<pre>>100_Reverse (18-991) GTCCTCCGAAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCC ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAGGCGCGG GAACGTTATTCACCGGACACTTCTGATTGCGGATTACTAGC GATTCGACTTCACCGCAGTCCAGTTCCAGACTCCGATCC GGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACTCCGG GCTTGGCAACCCTCTACCACCATTGTAGCACGTTGTG TAGCCAGGCGCTAAGGGCCATGATGACTGACGTATC CCCACCTTCTCCGGTTTTGTCCACCGCAGTCTCTAGAG GTGCCACCATAAGCTGTGTAACTAAGGACAAGGGTT GCCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGACAGTTCC GAAGGACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTCTGCTGCA AGGCTGGTAAGGTTCTCGGTTGCTCGAATTAACCA CATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCGTCATTCATT GAGTTTTAACCTTGCGGCTACTCCCAGCGGCTCAAC TTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGATTCCA ACGGCTAGTACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG TATCTAATCCTGTTTGTCTCCACCGCTTTCGCACTCAGT GTCAATCACTCAGTCCAGGTTGCTGCGCTCCGCACTGGT TCTTCTATATCTACGCTTTTCCACCGTACACAGAAAT TCCACCACCTTACCGTACTCTAGCTGCCAGTTTGA TGCAGTTCCAGGTTGAGCCGGGGTTTTACATCCAAC TTAACGAACCACTACCGCGCTTACCGCAGTAATTC GATTAACGCTTGCACCTCTGATTAACCGCGCTGCTGG CACAGAGTTAGCCGGTCTTATTCTGTGCT</pre>	<i>Pseudomonas plecoglossida</i> <i>Pseudomonas montelii</i> <i>Pseudomonas fulva</i> <i>Pseudomonas mosselii</i> <i>Pseudomonas cremoricolorata</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas oryzae</i>	
102	Pseudomonas Agar, 4 °C, Probe 5, (Entenkeule)	53,78	2,12	15,85		<pre>>102_Forward (16-933) CATGCAGTCGAGCGGACGCGGGAAGATAGCTTGTATCT TTGCCGCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGG ATCTGCCAGTCGAGGGGATAAACAGTTGAAACGACTG CTAATACCGCATACCGCTACGGGGAAAGGAGGGGAC CTTCCGGCTTCCGCGATTGGATGAACCTAGGTGGGATT AGCTAGTTGGTGAAGTAAATGGCTCACCAGGCGACGATC CCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACT GAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAATGG GAATATTGCACAAATGGGGAAACCTGATGACGCCATGC CGGTGTGTGAAGAAAGCCCTTCGGGTTGTAAGCATT CAGTAGGAGGAAAGGGTGAATCTTAATACGGCTCATCT GTGACGTTACTACAGAAAGGACCGGCTAATCCGCTG CAGCAGCCCGGTAATACGGAGGCTCCGAGGTTAAT CGGAATTAAGTGGGCTAAAGCGTCCGCGAGCGGTTGTT AAGCGAGTGTGAAGCCCGGGCTCAACTGGGAATTG CATTTCCAGCTGGCGAATAGAGTCTTGTAGAGGGGGT AGAATTCAGGTTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG AGGAATACCGGTTGGCGAAGCGGCCCCGTCGACAAAGA CTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACGGA TTAGATACCCCTGATCCAGCGGTAACGATGCTACTC GGAGTTGGTGTCTTGAACACTGCTCTCAAGTAAAGC CATTAAAGTACCGCTTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAACAGCGGTG GAGCATGTGGTTAATTCGATGCAAC</pre>	<pre>>102_Reverse (23-940) CCCCCGAAGGTTAAGCTACCCACTTCTTTTGCAGCCCA CTCCCATGGTGTGACGGGGGTTGTGTACAAAGGCGCGG AACGTATTCACCGTGGCATTCTGTACCAAGATTACTAGCG ATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCG GACTACGACGAGCTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCCGG CTTTGCAACCCTCTGTACTCGCATTGTAGCACGTTGTGA GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTGACGTCGTCCC CACCTTCTCCGGTTTATCACCAGGCACTCCCTAGAGTT CCCACCTTACGCTGCTGGCAAAATAGGATAGGGGTTGG CTCGTCCGGGACTTAAACCAACTTCCAAACAGAGCT GACGACAGCCATGCACACTGCTCTCAGAGTTCCCGAAG GCCTAAGCTATCTTACGAAATCTCTGATGTCAAGAG TAGGTAAGTTCTTCGCTGTCATGCAATTAACCCATG CTCCACCGCTTGGCGGGCCCCGCTCAATTCATTGAGT TTAACCTTGGGGCTACTCCACCGGCTCTACTAAT GGTTAGCTTGAAGCCAGTGTCAAGACCAAACTC CGAGTAGACATCGTTTACGGGCTGACTCCAGGGTATC TAATCCTGTTTGTCCCGCTTCTGGCTGAGCGTCA GTCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCCACCGGATTCCT CCAGATCTCAGCATTTCACCGTACACCTGGAATCTA CCCCCTCTACAAGACTTATGTTCCGCAATGGAATGCA ATTCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCTCGCTAA CAAACCGCTGCGCACGCTTACCGCCAGTAATCCGAT TAACGCTCGGAC</pre>	<i>Shewanella hafniensis</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella baltica</i>	

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
112	MRS Agar, 30 °C, Probe 2, (Hähncheninnenfilet)	1,79	4,16	19,63			<p>>112_Forward (14-889)</p> <p>CTATACATGCAGTCGACGAACCTTCTTACACCGAATGCTT GCATTCACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACCTGCCTAAAGAAGGGGATAACACTT GGAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCAAGGATCGCAT GATCCTTAGATGAAAAGTGGTTCTGCTATCGCTTTTAGAT GGACCCCGCGGTATTAAGTGGTGGGGTAACGGC CTACCAAGGTGATGATAGTACGAGCGAAGTGAAGGTTGA TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA GTCTGATGGAGCAACGGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTC GGATCGTAAACTCTGTGTTAGAGAAGAACACGAGTGA GAGTAACTGTTGATCGATGACGGTATCTAACGACAAAGT CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAG GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGCGTAAGGGGAA CGCAGCGGCTCTTTAAGTCTGATGTGAAGCCTTCGGC TTAACCGGAGTAGTGCATTTGAAACTGGAAGACTTGAT GCAGAAGAGGAGAGTGAACCTCCTGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGATATATGGAAGAACACCGTGGCGAAAGCGGC TCTCTGCTCTTAACTGAGCGTGAAGTTGAAAAGCGTGG GGTACCAACACGATTAAGTACCGTGGTAGTCCACCGCG TAAACGATGAATGCTAGTGTGTTGAAGGTTTCGGCCTT CAGTCCGCGAGCTAACGCAATAAGCATTCCCGCTGGGGA GTACGACCGCAAGTT</p> <p>Länge (F): 875</p>	<p>>112_Reverse (13-931)</p> <p>TAGACGGCTGGCTCCTTGCGGTTACCCACCGGCTTTGG GTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACA AGGCCCGGGAACGTAATTCACCGGCACATGCTGATTGCG ATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGCGGAGTTGACGC CTACAATCCGAACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTAA ACCTCGCGTCTTCCGACTCCTGTGACCGTCCATTGTAG CACGTGTGTAGCCCAAGTCTAAGCGGCATGATGACTTG ACGTGCTCCCACTTCTCCGGTTTGTACCGGCACATC TCGCCAGATGCCCACTTAATGCTGGCACTGACAACA AGGGTTGCGCTGTTGCGGACTTAACCCAACTCTCAC GACAGGCTGACGACAGCCATGACACCGTGTGACTTT GTCCCGAAGGGAAAGCCTAATCTTAGTGGTCAAAG GATGTCAAAGACCTGGTAAAGTTCTCGGTTGCTCGAAT TAAACCACTGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAA TTCTTTGAGTTTCAACCTTCCGGTCTACTCCCGGGC GAATGCTTATGCGTTAGTCCGACTTAACCCAACTCTCAC ACCTCCCAACACTAGCATTGATCGTTTACGGCGTGGACT ACCGGATCTAATCCTGTTGCTACCCACGCTTTCCGAA CCTCAGCGTCACTACAGACAGAGCGGCTTTCCGCA CTGGTGTCTTCCATATATCTACGCTTACCGGCTAC ATGGAGTCCACTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAG TTTCAATGCACTACTCCGCTTAAAGCGAAAGGCTTAC ATCAGACTTAAAGACCGCCTGCGTTCCCTTACGCCAA TAAATCCGGACAC</p> <p>Länge (R): 918</p>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
113	MRS Agar, 4 °C, Probe 7, (Maishähnchen-Schenkel)	1,14	1,37	16,62			<p>>113_Forward (15-939)</p> <p>ATACATGCAGTCGACGCACTGGCCAACTGATTGATGG TGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAAGTGG GGACGGGTGAGTAACACGTAAGTAACTGCCCGGAGC GGGGATAAACATTTGGAACAGATGCTAATACCGCATAA CAACAAAAGCCACATGGCTTTGTTGAAAAGATGGCTTTG GCTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCTATTAGCTAGT TGGTAAAGTAAAGCGCTTACCAAGCGGATGATGCTAGCC GAGTTGAGAGACTGATCGGCCAATGGAAGTGAAGACAC GGTCCATCTCTACGGGAGGCAAGTAGGGAATCTTTC CACATGGCGCAAGCCTGATGGAGCAACCGCGTGA GTGAAGAAGGTTTCGCTGCTGTAAGCTCTCTTCTTGA GAAGAAGCTGGTGAAGTAACTGTTATCGAGTGAACGG TATCCAACAGAAAATCACCGCTAAGTACGTCGACGAG CCGGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTA TTGGCGTAAAGCGAGCGCAAGCGGTTGCTTAGTCTGA TGTGAAGCCTTCGGCTTAAACCGAAGAGTGCATCGGAA ACCGGGCAGCTTGAAGTGCAGAAAGGACAGTGAAGTCT CATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATGGAAGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTGTTGCTGCAACTGACGC TGAGGCTCGAAAGCATGGTGAAGCAAGGATTAGATAC CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTCTAGTGTG GAGGGTTTCCGCTTCAAGTCCGCGGAGTAAACGATTA GCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGT</p> <p>Länge (F): 924</p>	<p>>113_Reverse (22-967)</p> <p>TCCATAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAACCT CCCATGGTGTGACGGCGGTTGTACAAAGCCCGGAA CGTATTCACCGCGGATGCTGATCCCGGATTAAGCGA TTCCGACTTCTGTAGGCGGAGTTGACGCTACAGTCCGA ACTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGGAG CTTGCGACTGTTGACCGCTTGTAGCAGTGTGTA GCCAAGTCAATAAGGGGATGATGATGACGCTGCTCC CACCTTCTCCGGTTGTACCGGCACTGCTACATAGAT GCCCACTTAATGCTGGCACTGTAACAAGGTTGCGC TGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGAGCT GACGACGACCATGACCACTGTCTGCTCCCGAAG GGAACCGCTTATCTCAAGTGAAGCGAAGATGCAAGA CCTGGTAAAGTCTTCCGCTAGCTTCAATTAACCCACT GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATCCTTTGAG TTTCAACTTGGGCTGACTCCCGAGGCGGAGTGGCTTA ATGCGTTAGTCCGCACTGAAAGGGCGAACCCTCCAA CACCTAGCACTCATCTTTACGGCATGGACTACAGGCT ATCTAATCTGTTGCTACCCATGCTTCCGACCTAGCG TCAGTTGACAGACAGACGCGCCCTTCCGCACTGGTGT CTTCCATATATCTACGCACTCCACCGCTACACATGGAGT CCACTGTCCTCTCTGCACTCAAAGTCCGCGGTTCCGAT GCACTTCTCGGTTAAGCGAAGGCTTTTACATCAGACT AAGCAACCGCTGCGCTGCTTACCGCAATAAATCCG GGATACGCTTGGCACCTACGATTTACCGCGGCTGCTGG ACGTAG</p> <p>Länge (R): 945</p>	<i>Lactobacillus frumenti</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Lactobacillus vaginalis</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
127	GSP Agar, 20 °C, Probe 8, (Perlhuhnbrust mit Haut)	57,16	2,13	15,07			>127_Forward (306-367) GCAGCAGTGCGCAATTGGACAATGGCGAAAAGCCTGA TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA Länge (F): 61	>127_Reverse (12-977) TGGTACGTCCTCCCGAGGGTTAGACTAGCTACTTCTGGT GCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG GCCCGGGAACGTATTACCGGTGACATTCTGATTACAGATT ACTAGCCGATCCGACTTACCGCAGTCGAGTTGGAGACTG CGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCAC CTCGCGCTTGGCAACCTTTGTACCGACATTGTAGCA CGTGTGTAGCCGAGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC GTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCACTCTC CTTAGAGTGCCACCATACGCTGCTGTAACCTAAGGACA AGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAAT GTTCCGGAAGGCACCAATCTATCTAGAAAAGTTGATTGG ATGTCAAGGCTGTGAAGTTCTTCGCGTTGCTTCAATT AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAAT TCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGGCTACTCCCAAGCGG GTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGTTCAAGA CTCCAAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTCGCAC CTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTAGTGCCTTCGCCAC TGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACA GGAAATCCACTACCTCTACCACTACTAGCTTGCCAGT TTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTCACA TTCAACTTAACAAACCACTACGCGCGCTTACGCCAGT AATTCGATTAAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCT GCTGGCACAGAGTTAGCCGGT Länge (R): 965	<i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas lundensis</i>
131	GSP Agar, 4 °C, Probe 10, (Putensteaks)	124,04	2,17	15,77			>131_Forward (918-977) ACGGCGAAGAACCCTTACCAGCCCTTGACATCCAATGAA CTTTTCTAGAGATAGATTGGT Länge (F): 59	>131_Reverse (14-996) GGTACCGTCCTCCCGAGGGTTAGACTAGCTACTTCTGGT GCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG GCCCGGGAACGTATTACCGTGACATTCTGATTACAGATT ACTAGCCGATCCGACTTACCGCAGTCGAGTTGGAGACTG CGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCAC CTCGCGCTTGGCAACCTTTGTACCGACCATGTAGCA CGTGTGTAGCCGAGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC GTCATCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCACTCTC CTTAGAGTGCCACCATACGCTGCTGTAACCTAAGGACA AGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCAC GACACGAGCTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCAAT GTTCCGGAAGGCACCAATCTATCTAGAAAAGTTGATTGG ATGTCAAGGCTGTGAAGTTCTTCGCGTTGCTTCAATT AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGCAAT TCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGGCTACTCCCAAGCGG GTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGTTCAAGA CTCCAAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTA CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCAAGCTTTCGCAC CTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTAGTGCCTTCGCCAC TGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACA GGAAATCCACTACCTCTACCACTACTAGCTTGCCAGT TTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTCACA TTCAACTTAACAAACCACTACGCGCGCTTACGCCAGT AATTCGATTAAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCT GCTGGCACAGAGTTAGCCGGTCTTATTCTGTCGGTAA Länge (R): 982	<i>Pseudomonas fragi</i>

Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
132	Campylobacter Agar, 20 °C, Probe1, (Putenbrustinnenfilet)	24,50	2,21	19,58			>132_Forward (151-299) GCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCCTCTGCCATC GGATGTGCCCGGATGGGATTAGCTAGTATGTGGGGTAAC GGCTCACTAGCGACGATGCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA TGA CCAACACCGCTGGAAGTGGAGACAGGCTCC	>132_Reverse (19-972) GCGCCCTCCCGAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTGAACC CACTCCGATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCG GGAACGTAATCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTAAGT CGAATCCGACTCATGGAGTGGAGTTSCAGACTCCAATC CGGACTACGACGCACTTATGAGTCCCGCTGTCTCCG GAGTCCGTTCTCTTTGTATGGCCATTGTAGCACGTGT GTAGCCCTGGTGTAGGGCCATGATGACTGACGTCAT CCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGA GTTCCGGCCGACCGCTGGCAACAAGGATAAGGTT GCGCTCGTTCCGGGACTAAACCAACATTCACAACACG AGTGACGACAGCCATGACGACCTGTCTCACAGTTCOC GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTGTGGATGC AAGACCAGTAAGGTTCTTCGCTTGCATCGAATTAACCC ACATGTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCAATTCATT TGAGTTTTAACCTTGGCGCCGACTCCCAAGGCGGTCA CTTAACCGGTTAGTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCAC AACCTCAAGTCCGATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAG GGTATCTAATCTGTTTGTCCACGCTTTCGACCTGA GCGTCAGTCTTCCGAGGGGGCCGCTTCGCCACCGG TATTCTCCAGATCTTACGCAATTCACCGTACACCTGG AATTACCCCCCTACGAGACTCAAGCTTGCAGTATC AGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGATTACATCT GACTTAACAAACCGCTGCGTGGCTTTACGCCAGTAA TTCCGATTAACGCTTGCACCCCTCCGATTAACCGCGGCT CTGGCAGGAGTTA	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella flexneri</i>
							Länge (F): 148	Länge (R): 953	
135	Campylobacter Agar, 30 °C, Probe 5, (Entenkeule)	11,37	1,93	18,01			>135_Forward (17-950) CCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTT TGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAATGTCTGGGAA ACTGCCTGATGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGC TAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGACCT TCGGCCTCTTGCATCGGATGTCCGAGATGGGATTAG CTTGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGCGACGATCCC TAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA GACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGGGA ATATTGCACAATGGCGCAAGCCTGATGACGCAATGCCG CGTGTATGAAGAAGGCCCTCGGGTTGAAAGTACTTTCCAG CGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG ACGTTACCCGAGAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA GCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGTTTGTAAAG TCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACTGGGAACTGCAT CTGATACTGGCAAGCTTGTAGTCTGTAGAGGGGGTGA ATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG AATACCGGTGGCAAGGGCGGCCCTGGACGAAGACTG ACGCTCAGGTGGCAAGCGTGTGGAGCAACAGGATTAG ATACCCCTGGTGTCCAGGCCGTAAACGATGTGCACTTGG AGTTGTGCCCTTGGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC GTTAAGTCCAGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA AACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCAACGCGTGGGA GCATGTGGTTAATTCGATGCAACGGCAAGAACCTTACCT G	>135_Reverse (18-970) GCCTCGAAGGTTAAGGTACCTACTCTTTTGAACCCAC TCCCAGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCGGGA ACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCAGCATTAAGCGA TTCCGACTTCATGGAGTGGAGTGCAGACTCCAAATCCGG ACTACGACGCACTTATGAGTCCCGTTGCTCTCGCGAG GTCCGTTCTTGTATGCGCCATGTAGACGCTGTGATG CCCTGGTCTGAAGGGCCATGATGACTTACGCTATCCCC ACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTC CCGGCCGACCCGCTGGCAACAAGGATAAGGGTTGCCG TCGTTGCCGGACTTAACCAACATTCACAACACGAGCT GACGACAGCCATGACGACCTGTCTCACGTTCCCGAAG GCACATTCATCTCTGAAAACCTCCGTTGATGTAAGAC CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCAACAT CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGCAATTCATTGAGT TTAAACCTTCCGCGCTACTCCCCAGCGGCTCGACTAA CGCGTTAGTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCT CCAAGTGCACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAGGAT CTAATCCTGTTTGTCCCGCAGCTTTCGCACTGAGCGTC AGTCTTCGTTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATTC TCCAGATCTCTACGCAATTCACCGCTACACTGGAATTC ACCCCCCTACGAGACTCAAGCTTGGCAGTATCAGATG CAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTCACATCTGACTT AACAAACCGCTGCGTGGCTTTACGCCAGTAAATCCG ATTAACGCTTGCACCTCCGATTAACCGCGGCTGTGGCA CGGAGTTAGG	<i>Escherichia fergusonii</i> <i>Shigella flexneri</i>
							Länge (F): 933	Länge (R): 952	

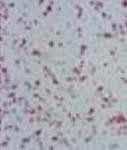
Nr.	Platten-Beschreibung	DNA Konz.- (ng/ µL)-	260/ 280	Ct-Werte	Kolonien	Gramfärbung	Sequenz (Forward)	Sequenz (Reverse)	BLAST-Ergebnisse
136	Campylobacter Agar, 30 °C, Probe 6, (Wachtel)	11,02	2,19	14,65			>136_Forward (676-779) GGCAGCCATCGGCCTAACTACTGACGCTGAGGTACGAAA GCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCA TGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGT Länge (F): 103	>136_Reverse (199-376) TAGCATCACATCGCTGTAGCAACCCCTTGTACCGACCA TTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGCCATGAT GACTTGACGTGTCGCCCGCTTCTCCAGTTTGTCACTG GCAGAACTCCTTAAAGTTCCGGCCGAAATGCTGGGAAGA AAGGAAAAGGGGTGCGGTCTG Länge (R): 177	<i>Acinetobacter junii</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter radioresistens</i> <i>Acinetobacter townieri</i> <i>Acinetobacter soli</i>
61	MRS Agar, 30 °C, Probe 2, (Hähncheninnenfilet)	0,94	0,52	14,65			>61_Forward (16-1036) TACATGCAAGTCGAACGAACTTTCTTACACCGAATGCTT GCATTACCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTA ACACGTGGGTAACTCGCTAAAGAAGGGGATAACACTT GGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTAAGGATCGCAT GATCCTTAGATGAAAGTGGTCTGCTATCGCTTTTAGAT GGACCCGCGCGTATTAAGTGGTGGGTAACGGC CTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAAGTGAAGTTGA TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAA GTCTGATGGAGCAACGGCCGTGAGTGAAGAAGTCTTC GGATCGTAAACTCTGTTGTAGAGAAGAACACGAGTGA GAGTAACTGTTTATTGATGACGGTATCTAACGCAAGT CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAACGTTAG GTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGCGTAAAGGGAA CGCAGCGGCTTTTAAAGTGTGATGTAAGCCCTTCGGC TTAACCGGAGTAGTCATTGAAACTGGAAGACTTTGAGT GCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGAGCGGTGAAA TGCGTAGATATAGGAAGAACCAGTGGCGAAAGCGGC TCTCTGGTCTGTAAGTACGCGTGAAGTTCGAAAGCGTGG GTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGT AAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC AGTCCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCTGGGGAG TACGACCGCAAGTTGAAACTCAAGGAATGACGGGGCC CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTTTGACCAC CTAAGAGATTAGGCTTTCCCTTCCGGGACAAGTGACAGG TGGTG Länge (F): 1020	>61_Reverse (13-1028) TTAGACGGCTGGCTCCTTGGCGTTACCCACCGGCTTTG GGTGTACAACTCTCATGGTGTGACGGGGCGGTGTGAC AAGGCCCGGAAACGTATTCACCGCGACATGCTGATTCCG GATTACTAGCGATTCCGACTTCATGAGGCGAGTTGCAG CCTACAATCCGAAGTGAAGCCGGCTTAAAGATTAGCTA AACCTCGCGGCTTTCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTA GCACGTGTGAGCCAGGTGATAAGGGGCATGATGACTT GACGTCTGCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGT CTCGCCAGAGTGCCCAACTTAAATGCTGGCAACTGACAA AAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAAGCAATCTCA CGACACGAGCTGACGACGCAATGACACCTGTCACTT TGTCCCGAAGGAAAGCCTAATCTTAAAGTGGTCAAA GGATGTCAAGACTGTAAGTTCCTCCGTTGCTTGA ATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCCGGGCCCGCTC AATCTTTGAGTTCAACCTTGGCGTCTACTCCCGAGG CGGAATGCTTATTGCGTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGG AAACCTCCAACACTAGCATTATCGTTTACGGCGTGA CTACCAGGATCTAATCTGTTTGTACCCACGCTTTGG AACCTCAGCGTCACTACAGACAGAGCGGCTTTCCG CACTGGTGTCTTCCATATATCTACGGATTTACCAGTCA ACATGGAGTTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTTCC AGTTTTCAATGCACTACTCCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCA CATCAGACTTAAAGACCGCTCGCTTCCCTTACGCCCA ATAAATCCGGACAACCTTCCACACTACGATTTACCGCG GCTGCTGGCAGTGTAGCCGTGACTTGTGTTAGT ACCGTCACTCGAATGAACGATTACTCTCACTCGT	<i>Lactobacillus salivarius</i>

Tabelle 51: Bakterienstämme und *rpoB* Gensequenzen , die in das Alignment bezogen wurden (blau: Komplettes Genom, grau: >500 bp, **Fett**: *rpoB*-Sequenzen von zusätzlichen Bakterienstämmen)

Nr.	Online-Datenbank-Nr.	Stamm	Sequenzierter Umfang	Sequenzlänge
1	gij 213155370	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB0057 chromosome	komplettes Genom (388660-392748)	4088 bp
2	gij 215481761	<i>Acinetobacter baumannii</i> AB307-0294	komplettes Genom (3464497-3460409)	4088 bp
3	gij 184156320	<i>Acinetobacter baumannii</i> ACICU chromosome	komplettes Genom (326400-330488)	4088 bp
4	gij 169794206	<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE chromosome	komplettes Genom (3547925-3543837)	4088 bp
5	gij 169632029	<i>Acinetobacter baumannii</i> SDF chromosome	komplettes Genom (3000208-2996120)	4088 bp
6	gij 385235550	<i>Acinetobacter baumannii</i> TCDC-AB0715	komplettes Genom (358311-362336)	4025 bp
7	ENA ABB20861 ABB20861.1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Location:1..1000	1000 bp
8	ENA ABB20862 ABB20862.1	<i>Acinetobacter junii</i>	Location:1..1000	1000 bp
9	ENA ABB20859 ABB20859.1	<i>Acinetobacter junii</i>	Location:1..1000	1000 bp
10	ENA ABB20857 ABB20857.1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Location:1..1000	1000 bp
11	ENA ABB20865 ABB20865.1	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Location:1..1000	1000 bp
12	ENA ABB20869 ABB20869.1	<i>Acinetobacter townneri</i>	Location:1..1000	1000 bp
13	ENA ABU95099 ABU95099.1	<i>Acinetobacter townneri</i>	Location:1..801	801 bp
14	ENA AEQ67301 AEQ67301.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	Location:1..468	468 bp
15	ENA AFA85149 AFA85149.1	<i>Aeromonas molluscorum</i>	Location:1..426	426 bp
16	ENA ABD94220 ABD94220.1	<i>Aeromonas molluscorum</i>	Location:1..517	517 bp
17	ENA ABO88471 ABO88471.1	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	Location:1..1000	1000 bp
18	ENA ABA54511 ABA54511.1	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Location:1..487	487 bp
19	ENA EFE05379 EFE05379.1	<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220	Location:1..1000	1000 bp
20	ENA AER09146 AER09146.1	<i>Clostridium botulinum</i>	Location:1..283	283 bp
21	gij 110798562	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	komplettes Genom (2988116-2984412)	3704 bp
22	gij 18308982	<i>Clostridium perfringens</i> str. 13	komplettes Genom (2765472-2761768)	3704 bp
23	ENA JEU16718 JEU16718.1	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4200	Location:1..1000	1000 bp
24	ENA EDS89940 EDS89940.1	<i>Escherichia albertii</i> TW07627	Location:1..1000	1000 bp
25	gij 218547440	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469 chromosome	komplettes Genom (3867031-3863003)	4028 bp
26	ENA AAD09607 AAD09607.1	<i>Hafnia alvei</i>	Location:1..512	512 bp
27	ENA EHM48152 EHM48152.1	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 51873	Location:1..1000	1000 bp
28	ENA AAF24992 AAF24992.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	Location:1..512	512 bp
29	gij 148543243	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016 chromosome	komplettes Genom (1544567-1540959)	3608 bp
30	gij 184152655	<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112	komplettes Genom (1583992-1580375)	3617 bp
31	ENA AEI56814 AEI56814.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	Location:1..1000	1000 bp
32	gij 81427616	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K chromosome	komplettes Genom (1751271-1747662)	3609 bp
33	ENA ADJ78519 ADJ78519.1	<i>Lactobacillus salivarius</i> CECT 5713	Location:1..1000	1000 bp

Nr.	Online-Datenbank-Nr.	Stamm	Sequenzierter Umfang	Sequenzlänge
34	gij90960990	<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118	komplettes Genom (235025-238624)	3599 bp
35	ENA EEJ40160 EEJ40160.1	<i>Lactobacillus vaginalis</i> ATCC 49540	Location:1..1000	1000 bp
36	ENA ACN86289 ACN86289.1	<i>Obesumbacterium proteus</i>	Location:1..287	287 bp
37	ENA ACN86296 ACN86296.1	<i>Obesumbacterium proteus</i>	Location:1..275	275 bp
38	ENA ACI96287 ACI96287.1	<i>Obesumbacterium proteus</i>	Location:1..501	501 bp
39	ENA ABW23937 ABW23937.1	<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>betae</i>	Location:1..637	637 bp
40	ENA ABV45531 ABV45531.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	Location:1..964	964 bp
41	ENA ABV45532 ABV45532.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	Location:1..958	958 bp
42	gij386014600	<i>Pantoea ananatis</i> AJ13355	komplettes Genom (4034948-4038976)	4028 bp
43	gij378764971	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 5342	komplettes Genom (4454332-4450304)	4028 bp
44	gij332139403	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20103	komplettes Genom (250573-254601)	4028 bp
45	ENA EHT98615 EHT98615.1	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> DC283	Location:1..1000	1000 bp
46	ENA ABA19203 ABA19203.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Location:1..250	250 bp
47	ENA CAG30609 CAG30609.1	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	Location:1..1000	1000 bp
48	ENA CAG38013 CAG38013.1	<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	Location:1..1000	1000 bp
49	ENA CAG30593 CAG30593.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Location:1..780	780 bp
50	ENA AET51057 AET51057.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Location:1..650	650 bp
51	ENA AFA25732 AFA25732.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Location:1..628	628 bp
52	ENA AFA25733 AFA25733.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	Location:1..732	732 bp
53	ENA CAG30650 CAG30650.1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>chlororaphis</i>	Location:1..978	978 bp
54	ENA CAG30648 CAG30648.1	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	Location:1..944	944 bp
55	ENA CAG30644 CAG30644.1	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	Location:1..951	951 bp
56	ENA CBG27571 CBG27571.1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Location:1..915	915 bp
57	ENA AFI26160 AFI26160.1	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Location:1..674	674 bp
58	ENA CAG30600 CAG30600.1	<i>Pseudomonas lundensis</i>	Location:1..1000	1000 bp
59	ENA CAG30618 CAG30618.1	<i>Pseudomonas migulae</i>	Location:1..1000	1000 bp
60	ENA CAG30627 CAG30627.1	<i>Pseudomonas monteillii</i>	Location:1..1000	1000 bp
61	ENA CBG27577 CBG27577.1	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Location:1..915	915 bp
62	ENA AEO86632 AEO86632.1	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Location:1..848	848 bp
63	ENA AFI26158 AFI26158.1	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Location:1..674	674 bp
64	ENA CBG27578 CBG27578.1	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Location:1..915	915 bp
65	ENA AEO86639 AEO86639.1	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Location:1..613	613 bp
66	ENA CAG30642 CAG30642.1	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Location:1..959	959 bp
67	ENA CAG30628 CAG30628.1	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Location:1..1000	1000 bp
68	ENA AFC40956 AFC40956.1	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Location:1..896	896 bp

Nr.	Online-Datenbank-Nr.	Stamm	Sequenzierter Umfang	Sequenzlänge
69	ENA CAG30636 CAG30636.1	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	Location:1..957	957 bp
70	ENA CBG27588 CBG27588.1	<i>Pseudomonas reinekei</i>	Location:1..915	915 bp
71	ENA CAH19194 CAH19194.1	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Location:1..981	981 bp
72	ENA CAG30595 CAG30595.1	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Location:1..1000	1000 bp
73	gi 387891255	<i>Pseudomonas fluorescens A506 chromosome</i>	kompletes Genom (5311166-5307093)	4073 bp
74	gi 378947941	<i>Pseudomonas fluorescens F113 chromosome</i>	kompletes Genom (5850662-5849556)	1106 bp
75	gi 255961261	<i>Pseudomonas fluorescens Pf0-1 chromosome</i>	kompletes Genom (5718667-5714594)	4073 bp
76	gi 229587578	<i>Pseudomonas fluorescens SBW25 chromosome</i>	kompletes Genom (6061953-6057880)	4073 bp
77	ENA CAH19200 CAH19200.1	<i>Pseudomonas fragi</i>	Location:1..948	984 bp
78	ENA CAG30616 CAG30616.1	<i>Pseudomonas fragi</i>	Location:1..1000	1000 bp
79	ENA CAG37982 CAG37982.1	<i>Pseudomonas fragi</i>	Location:1..1000	1000 bp
80	ENA AEF20611 AEF20611.1	<i>Pseudomonas fulva 12-X</i>	Location:1..1000	1000 bp
81	ENA ACT98622 ACT98622.1	<i>Pseudomonas putida</i>	Location:1..310	310 bp
82	ENA AEX54004 AEX54004.1	<i>Rahnella aquatilis CIP 78.65 = ATCC 33071</i>	Location:1..1000	1000 bp
83	gi 384255905	<i>Rahnella aquatilis HX2 chromosome</i>	kompletes Genom (4607263-4603235)	4028 bp
84	ENA ACO51074 ACO51074.1	<i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis</i>	Location:1..1000	1000 bp
85	ENA ADN88409 ADN88409.1	<i>Serratia fonticola</i>	Location:1..512	512 bp
86	gb EU010102.1 :1-501	<i>Serratia liquefaciens strain ATCC 27592</i>	partielle cds	
87	ENA AEF43396 AEF43396.1	<i>Serratia plymuthica AS9</i>	Location:1..1000	1000 bp
88	gi 157368249	<i>Serratia proteamaculans 568 chromosome</i>	kompletes Genom (313487-317515)	4028 bp
89	ENA AEG09528 AEG09528.1	<i>Shewanella baltica BA175</i>	Location:1..1000	1000 bp
90	ENA AEH15986 AEH15986.1	<i>Shewanella baltica OS117</i>	Location:1..1000	1000 bp
91	gi 152998555	<i>Shewanella baltica OS185 chromosome</i>	kompletes Genom (232795-236826)	4031 bp
92	gi 160873126	<i>Shewanella baltica OS195 chromosome</i>	kompletes Genom (236074-240042)	3968 bp
93	gi 217971216	<i>Shewanella baltica OS223 chromosome</i>	kompletes Genom (4825955-4821924)	4031 bp
94	ENA ADV52647 ADV52647.1	<i>Shewanella putrefaciens 200</i>	Location:1..1000	1000 bp
95	gi 146291111	<i>Shewanella putrefaciens CN-32 chromosome</i>	kompletes Genom (4375101-4371070)	4031 bp
96	gi 82775382	<i>Shigella dysenteriae Sd197</i>	kompletes Genom (3477434-3473406)	4028 bp
97		<i>Shigella flexneri 2a str. 301 Chromosome</i>	Region: 4200999 – 4205027	4028 bp
98	gi 30061571	<i>Shigella flexneri 2a str. 2457T</i>	kompletes Genom (3572221-3568193)	4028 bp
99	gi 384541581	<i>Shigella flexneri 2002017 chromosome</i>	kompletes Genom (4240657-4244685)	4028 bp

Nr.	Online-Datenbank-Nr.	Stamm	Sequenzierter Umfang	Sequenzlänge
100	ENA ABD29672 ABD29672.1	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325</i>	Location:1..1000	1000 bp
101	ENA AAZ99145 AAZ99145.1	<i>Staphylococcus fleurettii</i>	Location:1..485	485 bp
102	ENA ACH89076 ACH89076.1	<i>Staphylococcus lentus</i>	Location:1..696	696 bp
103	gi 73661309	<i>Staphylococcus saprophyticus subsp. saprophyticus ATCC 15305</i>	kompletes Genom (2277486-2273935)	3551 bp
104	ENA AAZ99156 AAZ99156.1	<i>Staphylococcus sciuri subsp. carnaticus</i>	Location:1..485	485 bp
105	ENA ACH89091 ACH89091.1	<i>Staphylococcus sciuri subsp. rodentium</i>	Location:1..696	696 bp
106	ENA ACH89092 ACH89092.1	<i>Staphylococcus sciuri subsp. sciuri</i>	Location:1..696	696 bp
107	ENA AAZ99160 AAZ99160.1	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	Location:1..485	485 bp
108	gnl HPY HP1198	<i>Helicobacter pylori</i>	1277049-1268377	8672 bp
109	gi 123440403	<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081 chromosome</i>	kompletes Genom (329960-333988)	4028 bp

Danksagung

Bei Frau Univ.-Prof. Dr.-Ing. Brita Maria Watkinson bedanke ich mich sehr für die Aufnahme in ihr Team, als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung im Fachbereich Lebensmittelsicherheit- und -qualität. Das besonders gute und kollegiale Arbeitsklima untereinander und die umsichtige und erfahrene Führung hat mir immer sehr geholfen. Besonders bedanken möchte ich mich für die Betreuung meiner Dissertation und die Bewilligung der finanziellen Mitteln für die zahlreichen Testreihen und Kits im Labor.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. Günter Klein vom Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit an der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich sehr, für seine Bereitschaft meine Dissertation als Koreferent zu beurteilen. Besonders gefreut hat mich die Einladung einen Fachartikel im Journal of Food Safety and Food Quality der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. für Lebensmittelhygiene publizieren zu können.

Herrn Dr. rer. nat. Hans-Dieter Werlein danke ich für die sehr kollegiale Zusammenarbeit und besonders für die Unterstützung und das Mentoring bei der Wahl des sehr interessanten Themas meiner Dissertation.

Bei Frau Dipl. Trophologin Maike Ehler bedanke ich mich sehr für die kontinuierliche Begleitung bei meiner Arbeit, vielen themenbezogenen Ratschlägen und die Ausdauer und Genauigkeit beim Korrekturlesen.

Bei Frau Claudia Helle bedanke ich mich für die Unterstützung bei zahlreichen Tests und Auswertungen im Labor.

Frau Dipl.-Ing. (FH) Gundula Wirries danke ich für das professionelle Design bei Postern für Fachtagungen und Symposien und Frau Rebecca Voßberg M.Ed. für die Korrekturen.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für die Möglichkeit dieses Studienfach zu wählen und in Deutschland studieren zu können. Besonders für Ihren Optimismus, Ihre Geduld und auch den Ausgleich zu meiner wissenschaftlichen Tätigkeit danke ich Ihnen, meinem Ehemann Joachim und meiner Schwester Zoha ganz herzlich.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Vatanparast
Vorname Raha
Geburtsdatum 23.3.1980
Geburtsort Teheran, Iran

Schulische Ausbildung

1998 – 1999 Shahid Beheshti Vor-Universität in Teheran
Abschluss der allgemeinen Hochschulreife
1995 – 1998 Farasat Gymnasium in Teheran

Studium

2006 – 2010 Friedrich Schiller Universität Jena
Studium der Ernährungswissenschaften
Abschluss als Diplom Trophologin
Diplomarbeit: Einfluss von Ernährung auf Transkriptom, Proteom und Metabolom. Bekommen wir individuelle diätetische Empfehlungen in Zukunft?
2000 – 2004 Science and Research Branch of the Azad University in Teheran
Faculty of Food Sciences and Engineering
Abschluss Bachelor of Science
2000 – 2005 Allameh Tabataba'i University , Faculty of Persian Literature and Foreign Languages in Teheran, Department of English Language and Literature
Abschluss Bachelor of Science

Wissenschaftliche Tätigkeit

Seit 10/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abteilung Lebensmittelsicherheit und –qualität

Wissenschaftliche Beiträge und Publikationen

Vatanparast R., Steckhan M., Werlein H.-D., (2016): Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* im VBNC-Zustand mittels der q-PCR, 16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, 30. März bis 01. April 2016, in Hohenheim., Deutschland.

Vatanparast R., Werlein H.-D., Watkinson B. M. (2015): Development of a quantitative real-time PCR method to determine the total bacterial count in fresh poultry meat, Journal of Food Safety and Food Quality, Archiv für Lebensmittelhygiene 66., Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V., No. 1, S 33-40.

Vatanparast R., Rademacher A, Riecke L., Werlein H.-D. (2015): Eignung des GreenLight® Systems zur Keimzahlbestimmung in Milch, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, 29. September bis 02. Oktober 2015, in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

H.-D. Werlein, Rademacher A, Riecke L, **Vatanparast R.** (2015): Bestimmung der bakteriologischen Belastung von ESL-Milch mit dem GreenLight® System, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, 29. September bis 02. Oktober 2015 in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Vatanparast R., Werlein H.-D. (2015): Quantification of total bacterial count in Poultry meat using real-time PCR, 67th Annual Meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology (DGHM), 27. bis 30. September 2015, in Münster, Deutschland.

Vatanparast R., Fishan A, Werlein H.-D. (2015): Suitability of GreenLight® System for determination of microbiological contamination in ready-to-eat salad, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, 29. September bis 02. Oktober 2015, in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Werlein H.-D., Hische J, **Vatanparast R.** (2015): Determination of microbiological contamination in poultry meat products using GreenLight® System, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, 29. September bis 02. Oktober 2015, in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Werlein H.-D., **Vatanparast R.** (2015): *Pseudomonas aeruginosa* - Determination of contamination in water flow meter using GreenLight® System, 67th Annual Meeting of the German Society of Hygiene and Microbiology (DGHM), 27. bis 30. September 2015, in Münster, Deutschland.

Vatanparast R., Werlein H.-D., Watkinson B. M. (2015): Enumeration of total bacterial count on poultry meat by quantitative real-time PCR, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhygiene, 23. bis 26. September 2015, in Garmisch-Partenkirchen, Deutschland.

Vatanparast R., Werlein H.-D., Watkinson B. M. (2014): Determination of total bacterial count on fresh poultry meat by quantitative real-time PCR, Gesellschaft Deutscher Lebensmitteltechnologien e. V., GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie 2014, 16. bis 18. Oktober 2014, in Konferenzhotel Rodgau (bei Frankfurt/Main), Deutschland.

Vatanparast R., Werlein H.-D., Watkinson B. M. (2014): Effektivität molekularbiologischer Methoden zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl; (Entwicklung eines Real-time PCR Verfahrens zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl in Geflügel- und Schweinefleisch), Symposium „Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelmikrobiologie“, 01. bis 02. Juli 2014 in Lemgo, Deutschland (Posterpräsentation und Vortrag).