

DOI 10.17590/20200707-110852

## Schutz vor lebensmittelbedingten Erkrankungen beim Heißhalten von Speisen

Stellungnahme Nr. 029/2020 des BfR vom 07. Juli 2020

In Lebensmitteln können Bakterien vorkommen, die stabile Dauerformen (Sporen) bilden, welche beim Kochen, Braten oder Backen der Lebensmittel nicht abgetötet werden. Werden zubereitete Speisen in Privat- und Großküchen bei zu niedrigen Temperaturen warmgehalten, können sich aus den Sporen, die die Zubereitung überlebt haben, wieder wachstumsfähige Bakterien entwickeln, welche sich im Lebensmittel vermehren. Einige dieser Bakterien sind in der Lage, gesundheitsschädliche Stoffwechselprodukte (Toxine) zu bilden. Der Verzehr von mit Toxinen oder hohen Bakterienzahlen belasteten Speisen kann zu einer lebensmittelbedingten Erkrankung mit Durchfall oder Erbrechen führen. Deshalb müssen Speisen so heiß gehalten werden, dass eine Vermehrung von Krankheitserregern unterbunden wird.

Das BfR hat sich wissenschaftlich damit auseinandergesetzt, welche Temperaturen mindestens eingehalten werden müssen, um lebensmittelbedingte Erkrankungen zu verhindern. Im Fokus der Analyse standen die sporenbildenden Bakterien der *Bacillus (B.) cereus-Gruppe* und *Clostridium (C.) perfringens*, die bei hohen Temperaturen wachsen können und häufig Auslöser von Krankheiten im Zusammenhang mit erhitzten Speisen sind.

Bisher hat das BfR zum Heißhalten von Speisen eine Temperatur von mindestens 65 °C empfohlen. Eine aktuelle Literaturrecherche sowie mathematische Simulationen zeigten, dass bei Temperaturen ab 57 °C ein Wachstum von *B. cereus*, *B. cytotoxicus* oder *C. perfringens* unwahrscheinlich ist. Einzelne Studien deuten jedoch darauf hin, dass selbst bei höheren Temperaturen bis 60 °C ein geringes Wachstum in Lebensmitteln möglich ist. Auf Basis dieser Ergebnisse rät das BfR jetzt, erhitzte Speisen bis zum Verzehr so heiß zu halten, dass sie an allen Stellen eine Temperatur von mindestens 60 °C aufweisen. Auch das EFSA BIOHAZ Panel (2016) stellt fest, dass die meisten lebensmittelbedingten Krankheiten verursacht durch *B. cereus* in Verbindung mit rohen oder gekochten Lebensmitteln stehen, die nicht unterhalb von 4 °C oder oberhalb von 60 °C aufbewahrt wurden.

## 1 Gegenstand der Bewertung

Bei der ausreichenden Erhitzung von Speisen durch Kochen, Braten oder Backen werden die vegetativen Zellen von bakteriellen Krankheitserregern abgetötet. Die Sporen von Erregern, wie z. B. *Bacillus cereus* oder *Clostridium perfringens*, können diese Art der Zubereitung jedoch überleben und unter bestimmten Bedingungen wieder zu vegetativen Zellen auskeimen und sich vermehren. Deshalb stellt der Umgang mit zubereiteten Speisen eine große Herausforderung für Lebensmittelunternehmen sowie im Privathaushalt dar. Um zu unterbinden, dass sich aus Sporen wieder vegetative Bakterien entwickeln, die sich dann vermehren und Toxine im Lebensmittel oder Darm produzieren, sind zubereitete Speisen entweder schnell zu kühlen oder bis zur Abgabe bzw. zum Verzehr ausreichend heiß zu halten.

Das BfR hat im Jahr 2008 in einer Stellungnahme empfohlen, bei der Heißhaltung von Speisen mindestens 65 °C einzuhalten oder 65 °C als Grenze für den oberen kritischen Temperaturbereich zu wählen. Diese Empfehlung fand Eingang in mehrere DIN-Normen (Deutsche Industrienorm) und Hygiene-Leitlinien von Wirtschaftsbeteiligten.

In dieser Arbeit setzt sich das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) mit den Temperatur- und Zeit-Vorgaben zur Heißhaltung von Speisen auseinander, welche die US-Lebensmittelüberwachungsbehörde „U.S. Food and Drug Administration“ (FDA) in den Kapiteln 3-501.16 und 3-501.19 seines Food Code 2017 angibt. Das BfR erörtert, ob diese Vorgaben als Alternative zu seinen eigenen Vorgaben zur permanenten Heißhaltung oberhalb einer vorgegebenen kritischen Mindesttemperatur im Rahmen von Einzelhandelstätigkeiten oder Versorgungsvorgängen durch Großküchen angesehen werden kann.

## 2 Auseinandersetzung

### Einleitung

Der Food Code 2017 der FDA beschreibt im Kapitel 3-5 „Limitation of growth of organisms of public health concern“ Vorgaben, die ein Wachstum (= Vermehrung) von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln verhindern sollen. Das BfR beschränkt sich in seiner auf Basis vorhandener Literatur sowie mathematischer Modellierungen durchgeführten Bewertung auf die Vorgaben des Kapitels 3-5 des FDA Food Code 2017, die sich auf eine Warmhaltung von Speisen beziehen.

Kapitel 3-501.16 (A1) schreibt vor, dass erhitzte Lebensmittel, in denen prinzipiell ein Wachstum von Krankheitserregern möglich ist („Time/Temperature Control for Safety Food“), bei einer kontrollierten Temperatur von mindestens 57 °C warmgehalten werden müssen. Eine Ausnahme davon bilden Braten, die bei einer bestimmten Temperatur-Zeit-Kombination erhitzt oder wiedererhitzt wurden (von 54,4 °C für 112 Minuten bis 69,4 °C für 14 Sekunden; siehe Kapitel 3-401.11(B) und 3-403.11(E) des FDA Food Code 2017). Solche Braten können auch bei einer Temperatur von 54 °C warmgehalten werden. Eine Zeitbegrenzung für die Dauer der Warmhaltung enthält Kapitel 3-501.16 nicht.

Kapitel 3-501.19 (B) besagt, dass erhitzte Lebensmittel, in denen prinzipiell mikrobielles Wachstum möglich ist und die zum direkten Verzehr bestimmt sind („Ready-To-Eat Time/Temperature Control for Safety Food“), bis zur Abgabe für maximal vier Stunden ohne Temperaturkontrolle aufbewahrt werden können, vorausgesetzt die Lebensmittel hatten eine Temperatur von mindestens 57 °C zu dem Zeitpunkt, an dem sie die kontrollierte Warmhaltung verlassen haben.

Bei der Beurteilung dieser Vorgaben des FDA Food Code 2017 trifft das BfR folgende Annahmen:

- die Hitzebehandlung des Lebensmittels vor der anschließenden Lagerung hat die vegetativen Zellen bakterieller Krankheitserreger im Lebensmittel abgetötet
- nach der Erhitzung des Lebensmittels kommt es zu keiner Re-Kontamination mit Krankheitserregern
- im Lebensmittel vorhandene bakterielle Sporen werden aufgrund der hohen Hitzeresistenz nicht sicher inaktiviert.

Zu den sporenbildenden Bakterien, die in der Lage sind, lebensmittelbedingte Krankheiten auszulösen und bei relativ hohen Temperaturen zu wachsen, gehören vor allem Spezies der *Bacillus (B.) cereus*-Gruppe (*B. cereus sensu lato (s.l.)*) und *Clostridium (C.) perfringens*. Folglich sind diese Erreger häufig an Krankheitsausbrüchen im Zusammenhang mit erhitzten Speisen beteiligt (EFSA BIOHAZ Panel, 2005a, b, 2016). Im Lebensmittel vorhandene bakterielle Sporen können unter geeigneten Bedingungen auskeimen. Aufgrund der reduzierten Begleitmikrobiota ist das Wachstum der durch Auskeimung entstandenen vegetativen Zellen begünstigt.

Das BfR fokussiert bei der Bewertung der Temperatur/Zeit-Vorgaben des FDA Food Code 2017 (3-501.16 (A1), 3-501.19 (B)) daher auf das Wachstum dieser Organismen-Gruppen. Ein Wachstum im Lebensmittel auf hohe Keimzahlen erhöht das Risiko von lebensmittelbedingten Erkrankungen des Menschen.

## Lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *B. cereus (s.l.)* und *C. perfringens*

### a) Erkrankungen durch *B. cereus (s.l.)*

Der Verzehr von mit *B. cereus (s.l.)* kontaminierten Lebensmitteln kann zu Magen-Darm-Erkrankungen beim Menschen führen. Es wird davon ausgegangen, dass in den meisten Fällen ein Keimgehalt von mindestens  $10^5$  KbE/g (koloniebildende Einheiten pro Gramm) Lebensmittel notwendig ist, um eine Krankheit auszulösen. Es sind aber auch Erkrankungsfälle beschrieben, bei denen geringere Gehalte von *B. cereus (s.l.)* im Lebensmittel nachgewiesen wurden (Ceuppens et al., 2013; EFSA BIOHAZ Panel, 2016; Rouzeau-Szynalski et al., 2020). Es werden zwei Erkrankungsformen unterschieden, eine emetische Erkrankung (Erbrechenstyp; Intoxikation) und eine Durchfallerkrankung (Diarrhoetyp; Toxiko-Infektion). Es können auch Mischformen beider Erkrankungstypen auftreten.

Bei der **emetischen Erkrankung** wird das im Lebensmittel von vegetativen Zellen gebildete Säure-, Hitze- und Proteolyse-stabile Toxin Cereulid aufgenommen. Cereulid verursacht bereits innerhalb von sechs Stunden nach Aufnahme Erbrechen und Übelkeit, wobei die Symptome meist innerhalb von 24 Stunden von selbst abklingen. Bei schweren Intoxikationen kann Cereulid außerdem Leberschäden und Hirnödeme verursachen, welche selten auch zu Todesfällen geführt haben (Dierick et al., 2005; Naranjo et al., 2011; Shiota et al., 2010). Eine Intoxikation durch Cereulid steht häufig im Zusammenhang mit dem Verzehr von stärkehaltigen Lebensmitteln wie Reis und Nudeln. In der Literatur sind jedoch auch emetische Krankheitsfälle in Verbindung mit Milch- und Fleischprodukten beschrieben (Messelhäußer et al., 2014). Es wird angenommen, dass die Cereulid-Produktion während der späten exponentiellen Wachstumsphase einsetzt und während der stationären Wachstumsphase fortbesteht (Ceuppens et al., 2011; Delbrassinne et al., 2011; Dommel et al., 2011; Häggblom et al., 2002; Lücking et al., 2009; Rouzeau-Szynalski et al., 2020). Bei welcher Zellzahl die

späte exponentielle Wachstumsphase erreicht ist, hängt von den Umgebungsbedingungen ab. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Cereulid-Produktion erst ab Zellzahlen von mindestens  $10^5$  KbE/g einsetzt (Agata et al., 2002; Bursova et al., 2018; Delbrassinne et al., 2012; Jääskeläinen et al., 2003; Phat et al., 2017; Rouzeau-Szynalski et al., 2020). Im Lebensmittel gebildetes Cereulid wird selbst durch eine Erhitzung bei 100 °C für 150 min (pH 8,6 bis 10,6) bzw. eine Erhitzung bei 121 °C für 120 min (pH 7) nicht zerstört (Rajkovic et al., 2008).

Beim **Diarrhoetyp** werden (i) Sporen und/oder (ii) vegetative Zellen und/oder (iii) möglicherweise bereits im Lebensmittel gebildete Enterotoxine von *B. cereus* (s.l.) über das Lebensmittel aufgenommen.

Zu i) Aufgenommene Sporen überleben größtenteils die Magen-Darm-Passage und können dann nahe bzw. in direktem Kontakt mit dem Dünndarm-Epithel auskeimen und vegetative Zellen bilden. Diese können dann Enterotoxine bilden (Jessberger et al., 2017; Wijnands et al., 2007).

Zu ii) Aufgenommene vegetative Zellen werden bei der Magen-Darm-Passage zu einem großen Teil inaktiviert. Wie hoch dieser Anteil ist, hängt jedoch von verschiedenen Faktoren ab (z. B. Wachstumsphase der Bakterien, Eigenschaften des Lebensmittels, Magen-Darm-Milieu), sodass auch vegetative Zellen am Krankheitsgeschehen beteiligt sein könnten (Bertold-Pluta et al., 2015). Bei einer simulierten Magen-Darm-Passage von vegetativen *B. cereus*-Zellen überlebten in einem Experiment von Ceuppens et al. (2012) 14 % ( $\pm 9$  %).

Zu iii) Möglicherweise bereits im Lebensmittel gebildete Enterotoxine spielen bei der Ausbildung von Durchfallssymptomen wahrscheinlich keine Rolle, da sie bei der Magen-Darm-Passage größtenteils inaktiviert werden, denn die Enterotoxine sind gegenüber Proteinasen und niedrigen pH-Werten empfindlich. Die Enterotoxine sind außerdem hitzelabil und werden durch eine Erhitzung bei 55 °C für 20 min inaktiviert (Ceuppens et al., 2013; Ceuppens et al., 2011).

Die Krankheitssymptome der Durchfall-Erkrankung setzen meist innerhalb von acht bis 24 Stunden nach Aufnahme des kontaminierten Lebensmittels ein und umfassen meist wässrigen Durchfall und Bauchschmerzen. In der Regel ist die Erkrankung selbstlimitierend (Messelhäuser and Ehling-Schulz, 2014).

Angaben über *B. cereus*-Gehalte in Lebensmitteln, die mit Durchfallerkrankungen assoziiert wurden, variieren stark. Bei *B. cereus*-bedingten Ausbrüchen mit Durchfallssymptomatik, die im Zeitraum von 2007 bis 2014 an die EFSA berichtet wurden, enthielten die ursächlichen Lebensmittel in den meisten Fällen Keimzahlen von mehr als  $10^5$  KbE/g. Jedoch gab es auch Ausbrüche, bei denen *B. cereus*-Gehalte von nur  $10^3$  KbE/g nachgewiesen wurden (EFSA BIOHAZ Panel, 2016). Allerdings kann der *B. cereus*-Gehalt in dem untersuchten Lebensmittel vom *B. cereus*-Gehalt des verzehrten Lebensmittels zum Zeitpunkt des Verzehrs abweichen. Die Bestimmung eines konkreten Keimgehalts im Lebensmittel, der ein gesundheitliches Risiko darstellt, ist schwierig, da das pathogene Potenzial stark von den Eigenschaften des Stammes abhängt. An der Ausbildung des pathogenen Potenzials sind vor allem folgende Faktoren beteiligt: i) die Fähigkeit der Sporen/Zellen, die Magen-Darm-Passage zu überstehen, ii) die Fähigkeit, an Enterozyten anzuheften und auszukeimen und iii) die Fähigkeit, relevante Mengen Enterotoxine zu bilden.

## b) Erkrankung durch *C. perfringens*

Voraussetzung für eine lebensmittelbedingte Erkrankung durch *C. perfringens* sind hohe vegetative Zellzahlen im Lebensmittel von  $10^6$ - $10^7$  KbE/g. Ein Teil der vegetativen Zellen überlebt das saure Magenmilieu und erreicht den Dünndarm. Im Dünndarm sporulieren die Bakterienzellen und bilden dabei ein Enterotoxin (CpE), welches bei der Lyse der vegetativen Zellen freigesetzt wird. Nach einer proteolytischen Aktivierung des Toxins bildet es Poren in der Zellmembran der Enterozyten. In der Folge treten nach einer Inkubationszeit von acht bis 24 Stunden Symptome wie Durchfall und Bauchkrämpfe auf, die etwa einen Tag anhalten. Die Erkrankung verläuft in der Regel mild und ist selbstlimitierend (EFSA BIOHAZ Panel, 2005b; Labbe and Juneja, 2017; Taormina and Dorsa, 2004).

*C. perfringens* wächst besonders gut in proteinhaltigen Lebensmitteln. Entsprechend stehen lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *C. perfringens* häufig im Zusammenhang mit erhitzten Fleischgerichten (Braten, Soßen, Suppen und Eintöpfe) oder auch Erbsensuppe, welche nach Zubereitung nicht ausreichend heiß oder kühl gelagert wurden (EFSA BIOHAZ Panel, 2005b).

Eine Enterotoxinbildung bereits im Lebensmittel spielt für Erkrankungen wahrscheinlich keine Rolle, da die nötige Zeit bis zur Sporulation und Toxinfreisetzung zu deutlichen sensorischen Veränderungen des Lebensmittels führen würde (Labbe and Juneja, 2017). Das Enterotoxin von *C. perfringens* ist hitzelabil und wird bei Temperaturen von 60 °C inaktiviert, wobei die nötigen Einwirkzeiten je nach Medium, in dem sich das Toxin befindet, zwischen einer Minute und mehr als 20 Minuten variieren (Bradshaw et al., 1982; Granum and Skjelkvale, 1977; Naik and Duncan, 1978).

## Sporenceimung von *B. cereus* (s.l.) und *C. perfringens* in heißgehaltenen Speisen

Es gibt verschiedene Faktoren, die das Auskeimen von Sporen, das Wachstum der vegetativen Zellen und die Hitzeresistenz von *B. cereus* (s.l.) und *C. perfringens* im Lebensmittel beeinflussen. Dazu zählen einerseits die Eigenschaften des Bakterien-Stammes und andererseits die Bedingungen im Lebensmittel, wie die Wasseraktivität ( $a_w$ ), der Salzgehalt, der pH-Wert, der Sauerstoffgehalt, vorhandene Nährstoffe und die Temperaturen, die bei der Zubereitung und anschließenden Aufbewahrung vorherrschen (Doyle, 2002; Wells-Bennik et al., 2016). Die Hitzeresistenz der Sporen unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Stämmen (van Asselt and Zwietering, 2006). Je nach Höhe der Temperatur und der Dauer einer Hitzebehandlung des Lebensmittels können vorhandene Sporen inaktiviert, geschädigt oder aktiviert werden. Eine Schädigung von Sporen kann zu einer Verzögerung des Auskeimens führen. Die Aktivierung von Sporen, beispielsweise durch eine Hitzebehandlung bei 70 °C bis 80 °C für 10 min, beschleunigt dagegen die Sporenceimung (Laurent et al., 1999; Samapundo et al., 2014; Doyle, 2002). Unter geeigneten Bedingungen kann die Auskeimung von Sporen in weniger als 30 Minuten erfolgen (Doyle, 2002; Tegiffel et al., 1995; Warda et al., 2015).

Generell erlauben Temperaturen, in denen sich vegetative Zellen vermehren können (siehe 4.4), auch das Auskeimen der Sporen. Jedoch ist die Keimung von Sporen auch bei Temperaturen oberhalb der maximalen Wachstumstemperaturgrenze möglich. Für *B. cereus*-Sporen beschreiben Johnson et al. (1983) bei 55 °C noch eine geringe Auskeimung in Reis, jedoch ohne anschließendes Wachstum der entstandenen vegetativen Zellen. Ähnlich beschreibt Knaysi (1964) eine maximale Temperatur von 59 °C für den Beginn des Auskei-

mens, jedoch auch hier ohne anschließendes Wachstum der Zellen im Medium. In einer Studie von Ellerbroek (2008) wird ein Auskeimen von Sporen bei 60 °C in Reis berichtet. Bei Inaktivierungsversuchen haben Wei et al. (2009) für *B. cereus* gezeigt, dass bei Anwendung von moderatem Druck als Keimförderer eine Sporenkeimung noch bei 65 °C stattfinden kann. Auch für *C. perfringens* berichten Akhtar et al. (2009) eine Sporenkeimung bis 65 °C in Anwesenheit von keimfördernden Nährstoffen.

### **Wachstum vegetativer Zellen von *B. cereus* (s.l.) und *C. perfringens* in heißgehaltenen Speisen**

Sowohl bei *B. cereus* (s.l.) als auch bei *C. perfringens* unterscheiden sich die Wachstumstemperaturgrenzen zwischen einzelnen Stämmen stark. Die Wachstumsraten nahe der Wachstumstemperaturgrenzen sind deutlich niedriger als beim Temperaturoptimum.

In einer umfassenden Studie von Guinebretiere et al. (2008) wurden 75 *B. cereus* (s.l.)-Stämme aus sieben unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen (*panC*-Gruppen I bis VII) hinsichtlich ihres Wachstums bei verschiedenen Temperaturen charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Wachstumstemperaturgrenzen einiger Gruppen unterscheiden. Mit Blick auf ein mögliches Wachstum in heißgehaltenen Lebensmitteln, haben die sogenannten mesophilen und thermotoleranten Vertreter besondere Relevanz und werden daher im Folgenden genauer betrachtet.

#### **a) Wachstum mesophiler *B. cereus* (s.l.)**

Die mesophilen *B. cereus* (s.l.)-Stämme gehören zu den phylogenetischen Gruppen III und IV, die in der Studie von Guinebretiere et al. (2008) bei einer Temperatur von 45 °C noch Wachstum zeigten, nicht jedoch bei 50 °C. Innerhalb der Gruppe III befinden sich auch die Stämme mit der Fähigkeit zur Cereulid-Bildung (sog. emetische Stämme).

Auger et al. (2008) haben das Wachstum für die mesophilen *B. cereus*-Stämme ATCC 14579 (Gruppe IV) und ATCC 10987 (Gruppe III) näher charakterisiert (Tabelle 2). Für den Stamm ATCC 14579 wurde im Labor ein Wachstum bis 46 °C und für ATCC 10987 bis 47 °C nachgewiesen. Über die Beziehung zwischen der Wachstumsrate und der Temperatur wurde für die Stämme mit Hilfe des Ratkowsky-Modells (Ratkowsky et al., 1983) eine theoretische Wachstumstemperaturgrenze von 51 °C und 53 °C errechnet. Basierend auf den Daten von Auger et al. (2008) haben Afchain et al. (2008) auf Grundlage des „Cardinal temperature model with inflection point“ (CTMI) (Rosso et al., 1993) eine maximale bzw. optimale Wachstumstemperatur von 46,5 °C bzw. 39,9 °C für Stamm ATCC 14579 sowie 46,9 °C bzw. 39,8 °C für Stamm ATCC 10987 errechnet.

In einer neueren Studie von Carlin et al. (2013) wurden erneut die Wachstumstemperaturgrenzen für den Stamm ATCC 14579 ermittelt. Auch hier wurde ein Wachstum im Labor bis 46 °C festgestellt. Mit Hilfe des CTMI wurde hier ein Wachstumstemperaturmaximum von 48 °C (48,4 °C bei Berücksichtigung des 97,5 Perzentils) errechnet. Das Wachstumstemperaturoptimum lag bei 37,4 °C (38,2 °C bei Berücksichtigung des 97,5 Perzentils). Für einen weiteren mesophilen Stamm (F4810) wurden sehr ähnliche Werte erzielt (Tabelle 2). Diese Angaben decken sich mit früheren Arbeiten von Carlin et al. (2006), in denen ein Wachstumstemperaturmaximum von 48 °C für emetische Stämme ermittelt wurde.

Hingegen zeigten verschiedene Arbeiten zur Inaktivierung von vegetativen *B. cereus* (s.l.), zum Teil unter Verwendung derselben Stämme wie in den oben genannten Studien, dass

bereits bei Temperaturen ab 50 °C auch mit einer Inaktivierung mesophiler Stämme zu rechnen ist (Antolinos et al., 2011; Becker et al., 2011; den Besten et al., 2006; den Besten et al., 2010; Desai and Varadaraj, 2010) (Tabelle 3).

Einige mesophile *B. cereus*-Stämme sind in der Lage, in bestimmten Lebensmitteln das hitzestabile emetische Toxin Cereulid zu bilden. Eine Übersicht zu Faktoren und Lebensmitteln, welche die Cereulid-Bildung begünstigen, findet sich bei Messelhäußer et al. (2014). Der Temperaturbereich, in dem die Cereulid-Bildung durch diese Stämme prinzipiell möglich ist, liegt wahrscheinlich zwischen 10 °C und 48 °C (Carlin et al., 2006; Finlay et al., 2000; Guinebretiere et al., 2010, Wang et al., 2014), wobei das Optimum zwischen 20 °C und 40 °C liegen dürfte (Agata et al., 2002; Apetroaie-Constantin et al., 2008; Häggblom et al., 2002; Kranzler et al., 2016; Rajkovic et al., 2006).

In einer Studie von Agata et al. (2002) wurde Reis mit ca.  $10^3$  KbE/g einer Übernachtskultur inokuliert und es wurde bei einer Temperatur von 35 °C innerhalb von 4 h eine Zunahme der Zellen auf über  $10^6$  KbE/g sowie Cereulid-Bildung beobachtet (höhere Temperaturen als 35 °C wurden nicht getestet). In einer Studie von Wang et al. (2014) wurde Reis mit ca.  $10^3$  KbE/g vegetativen *B. cereus*-Zellen inokuliert und bei einer Temperatur von 45 °C wurde innerhalb von 6 h eine Zunahme der Zellen auf ca.  $10^7$  KbE/g sowie Cereulid-Bildung nachgewiesen (höhere Temperaturen als 45 °C wurden nicht getestet). Phat et al. (2017) konnten eine Cereulid-Bildung nach 12 h bei 30 °C beobachten (Übernachtskultur in LB Medium). Auch Rajkovic et al. (2006) haben innerhalb von 12 h bei 28 °C Cereulid-Bildung in Kartoffelpüree, Milch und Reis festgestellt, wobei das Inokulum (24 h-Kultur) ca.  $10^6$  KbE/g betrug. Bei einem Inokulum von 150 KbE/g einer Übernachtskultur in gekochtem Reis haben Bauer et al. (2010) eine Cereulid-Produktion erst nach 24 h Inkubation bei 24 °C festgestellt (zuvor wurde nach 12 h getestet). Ähnlich haben auch Bursova et al. (2018) bei einem Inokulum von ca.  $10^3$  KbE/g einer Sporensuspension Cereulid-Bildung in gelöstem Milchpulver nach 24 h Inkubation bei 24 °C festgestellt, nicht jedoch nach 12 h.

#### **b) Wachstum thermotoleranter *B. cereus* (s.l.) (*B. cytotoxicus*)**

Die thermotoleranten Stämme der *B. cereus*-Gruppe gehören zur phylogenetischen Gruppe VII, in der sich ausschließlich die Spezies *B. cytotoxicus* befindet. *B. cytotoxicus* wurde erst 2013 als eigenständige Spezies beschrieben (Guinebretiere et al., 2013). Der Typstamm der Spezies (NVH391-98) wurde bei einem Krankheitsausbruch mit Durchfallsymptomatik bei 44 Erkrankten (davon drei Todesfälle und sechs Fälle mit blutigem Durchfall) in einem Altenheim in Frankreich isoliert. Das Isolat wurde aus Gemüsepüree gewonnen, welches mit  $3 \times 10^5$  KbE/g *B. cereus* (s.l.) kontaminiert war (Lund et al., 2000). Die Spezies *B. cytotoxicus* bildet die außergewöhnliche CytK-1-Variante des Enterotoxins Zytotoxin K. CytK-1 zeigt eine deutlich höhere Zytotoxizität als die in der *B. cereus*-Gruppe weit verbreitete CytK-2 Variante (Fagerlund et al., 2004; Guinebretiere et al., 2013). Aufgrund unterschiedlich hoher Toxinbildung sind jedoch nicht alle *B. cytotoxicus*-Stämme stark zytotoxisch (Fagerlund et al., 2007; Heini et al., 2018).

In der Studie von Guinebretiere et al. (2008) zeigten die *B. cytotoxicus*-Stämme bei 50 °C Wachstum, nicht jedoch bei 55 °C. Auger et al. (2008) haben den Typstamm der Spezies *B. cytotoxicus* (NVH391-98) genauer untersucht und im Labor ein Wachstum bis 53 °C nachgewiesen. Aufgrund von Berechnungen mittels Ratkowsky-Modell wurde in dieser Studie ein theoretisches Wachstumslimit von 58 °C ermittelt (Tabelle 2). Basierend auf den Daten von Auger et al. (2008) haben Afchain et al. (2008) auf Grundlage des CTMI eine maximale und optimale Wachstumstemperatur von 56,5 °C bzw. 41,4 °C für *B. cytotoxicus* errechnet. Auch in der Studie von Carlin et al. (2013) wurde der Stamm NVH391-98 untersucht. Hier wurde

ein Wachstum im Labor bis 52 °C nachgewiesen. Über das CTMI wurde ein Wachstumstemperaturmaximum von 55 °C errechnet (55,9 °C bei Berücksichtigung des 97,5 Perzentils). Das Wachstumstemperaturoptimum lag bei 43,1 °C (44,3 °C bei Berücksichtigung des 97,5 Perzentils). Für einen weiteren *B. cytotoxicus* Stamm (NVH883/00) wurden ähnliche Werte erzielt (Tabelle 2). Bei Berücksichtigung des 97,5 Perzentils lag das theoretische Wachstumstemperaturmaximum dieses Stammes mit 56,8 °C sogar noch etwas höher.

Im Widerspruch zu diesen theoretischen, maximalen Wachstumstemperaturgrenzen berichten Guerin et al. (2017) bereits eine leichte Inaktivierung von Stamm NVH391-98 bei 53 °C (Tabelle 3). Bei 55 °C wurde hingegen eine deutliche Abnahme der Zellzahl gemessen. Bei einem weiteren *B. cytotoxicus* Stamm wurde in dieser Studie ebenfalls eine leichte Reduktion bei 53 °C und 54 °C und eine deutliche Reduktion bei 55 °C beobachtet.

Der Widerspruch zwischen den theoretischen, maximalen Wachstumstemperaturgrenzen und Inaktivierungstemperaturen kann sich aus verschiedenen Gründen ergeben. Erstens ist die Schätzung der Modellparameter – insbesondere der Wachstumsgrenzen – auf Grund der vergleichsweise geringeren Anzahl relevanter Messwerte mit einer höheren Unsicherheit verbunden. Zweitens können Unterschiede im experimentellen Versuchsaufbau der Studien zur Ermittlung des mikrobiellen Wachstums und der Inaktivierung sowie Unterschiede in der Zellhistorie zu abweichenden Ergebnissen führen. Zudem ist bekannt, dass selbst innerhalb einer Population desselben Stammes eine signifikante Heterogenität bezüglich der Hitzeresistenz bzw. der spezifischen Wachstumsrate auftreten kann, sodass die unterschiedlichen experimentellen Daten auch durch die biologische Variabilität erklärbar sind (Aryani et al., 2015; Wells-Bennik et al., 2016).

Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass die oben genannten Wachstumstemperaturgrenzen und -optima unter experimentellen Laborbedingungen erzeugt wurden. Die Eigenschaften eines Lebensmittels umfassen jedoch viel mehr Parameter, als unter kontrollierten Bedingungen getestet werden können. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich Wachstumsparameter im Lebensmittel von den im Labor ermittelten unterscheiden. Beispielsweise können bei ähnlichen Ausgangsbedingungen lebensmittelabhängig die Lag-Phasen und Wachstumsraten stark variieren (Carlin et al., 2000; Warda et al., 2015; Ziane et al., 2014).

Mit Blick auf ein mögliches Wachstum von *B. cereus* (s.l.) in heißgehaltenen Lebensmitteln konnten Gilbert et al. (1974) ein Wachstum von drei verschiedenen *B. cereus*-Stämmen in Reis bis 43 °C nachweisen, während bei 55 °C die Zellen bereits inaktiviert wurden. In einer Studie von Kim et al. (2018) wurde Wachstum von *B. cereus* in Reis bei 45 °C nachgewiesen, bei der nächsthöheren getesteten Temperatur von 60 °C wurde jedoch bereits eine Inaktivierung von Zellen festgestellt. Von Johnson et al. (1983) wurde in Reis für vier verschiedene Stämme (darunter ein emetischer Stamm) Wachstum bis 50 °C detektiert. In einer Studie von Ellerbroek (2008) nimmt der *B. cereus*-Gehalt in abkühlendem Reis bereits in einem Temperaturbereich von 60,2 °C bis 58,8 °C zu (natürliche *B. cereus*-Kontamination in Reis).



Tabelle 2. Maximale und optimale Wachstumstemperaturen und Wachstumsraten von mesophilen und thermotoleranten Stämmen der *B. cereus*-Gruppe (*panC*-Gruppen III, IV und VII)

Stamm ( <i>panC</i> -Gruppe)	T <sub>opt</sub> (°C)	μ <sub>opt</sub> (h <sup>-1</sup> )	Theoretisches T <sub>max</sub> (°C)	Maximale T (°C) bei der Wachstum im Medium nachgewiesen wurde	Referenz
<i>B. cytotoxicus</i> <sup>a</sup> NVH391-98 (VII)	46	n.b.	58 <sup>b</sup>	53	Auger et al., 2008
<i>B. cereus</i> ATCC14579 (IV)	35 - 40	n.b.	51 <sup>b</sup>	46	
<i>B. cereus</i> ATCC10987 (III)	35 - 40	n.b.	53 <sup>b</sup>	47	
<i>B. cytotoxicus</i> <sup>a</sup> NVH391-98 (VII)	41,4	n.b.	56,5 <sup>c</sup>	n.b.	Afchain et al., 2008 (basierend auf den Daten von Auger et al., 2008)
<i>B. cereus</i> ATCC14579 (IV)	39,9	n.b.	46,5 <sup>c</sup>	n.b.	
<i>B. cereus</i> ATCC10987 (III)	39,8	n.b.	46,9 <sup>c</sup>	n.b.	
<i>B. cytotoxicus</i> <sup>a</sup> NVH391-98 (VII)	43,1 (44,3)	3,89 (4,29)	55 (55,9) <sup>c</sup>	52	Carlin et al., 2013
<i>B. cytotoxicus</i> <sup>a</sup> NVH883/00 (VII)	37,6 (38,6)	2,31 (2,54)	55 (56,8) <sup>c</sup>	52	
<i>B. cereus</i> ATCC14579 (IV)	37,4 (38,2)	2,76 (2,91)	48 (48,4) <sup>c</sup>	46	
<i>B. cereus</i> F4810 (III)	38,7 (39,3)	3,12 (3,30)	48 (48,4) <sup>c</sup>	46	

<sup>a</sup>Die Spezies *B. cytotoxicus* wurde erst 2013 beschrieben. Die Stämme NVH391-98 und NVH883/00 werden in den genannten Publikationen als Stämme der *B. cereus*-Gruppe bezeichnet.

T<sub>opt</sub>: Optimale Wachstumstemperatur

μ<sub>opt</sub>: Wachstumsrate bei optimalen Wachstumsbedingungen

T<sub>max</sub>: theoretische maximale Wachstumstemperatur, <sup>b</sup>berechnet über das Ratkowsky-Modell;

<sup>c</sup>berechnet über das Cardinal temperature model with inflection point (CTMI)

n.b.: nicht bestimmt

Angaben in Klammern sind Werte für das 97,5 Perzentil.

Tabelle 3: Inaktivierung vegetativer Zellen von mesophilen und thermotoleranten Stämmen der *B. cereus*-Gruppe (Zeit in Minuten für eine 3 log-Reduktion bei unterschiedlichen Inaktivierungstemperaturen)

Stamm ( <i>panC</i> -Gruppe)	48 °C	50 °C	53 °C	54 °C	55 °C	Referenz
<i>B. cytotoxicus</i> NVH391-98 (VII)	n.b.	n.b.	44,1 ± 7,0	n.b.	9,1 ± 1,1	Guerin et al., 2017
<i>B. cytotoxicus</i> AFSSA 08CEB 44BAC (VII)	n.b.	n.b.	25,5 ± 5,1	15,5 ± 3,0	12,9 ± 1,1	
<i>B. cereus</i> ATCC14579 (IV)	n.b.	ca. 55	n.b.	n.b.	n.b.	den Besten et al., 2010
<i>B. cereus</i> ATCC10987 (III)	ca. 160	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	

n.b.: nicht bestimmt

### c) Wachstum vegetativer Zellen von *C. perfringens*

Auf Basis von Übersichtsarbeiten (Doyle, 2002; Labbe and Juneja, 2017; Taormina and Dorsa, 2004) ist anzunehmen, dass sich *C. perfringens* bei Temperaturen bis 50 °C vermehren kann, wobei die optimale Wachstumstemperatur bei 43 °C bis 45 °C liegt. In diesem opti-

malen Temperaturbereich können die Generationszeiten unter 10 Minuten betragen. In Annex 3 des FDA Food Code 2017 wird angenommen, dass sich *C. perfringens* sogar bis 52 °C vermehren kann, dies aber nur unter anaeroben Bedingungen und bei langen Lag-Phasen. Taormina and Dorsa (2004) haben eine Vielzahl von Studien ausgewertet, die sich mit dem Wachstum von *C. perfringens* in erhitzten, fleischhaltigen Lebensmitteln in der Abkühlphase befassen. Ausgehend von Sporen ist je nach Abkühlbedingung in den meisten Fällen ein Wachstum von mehr als einer log-Stufe erst nach sechs Stunden zu erwarten. Einige Studien zeigen jedoch auch ein deutliches Wachstum von 1,5 bis 4 log-Stufen innerhalb von sechs Stunden (Blankenship et al., 1988; Kalinowski et al., 2003; Shigehisa et al., 1985) oder sogar innerhalb von nur vier Stunden (Shigehisa et al., 1985). Ein deutlich stärkeres Wachstum wurde von Naik and Duncan (1977) ausgehend von vegetativen Zellen und 37 °C Lagertemperatur gefunden. Dabei nahm die Zellzahl in den künstlich kontaminierten Hackfleischproben innerhalb von vier Stunden unter aeroben Bedingungen von  $5,5 \times 10^4$  auf  $2,2 \times 10^7$  KbE/g und unter anaeroben Bedingungen von  $2 \times 10^5$  auf  $3 \times 10^7$  KbE/g zu.

Abhängig vom Bakterien-Stamm, dessen Wachstumsbedingungen und dem Lebensmittel, in dem sich die Zellen befinden, kann die Hitzeresistenz stark schwanken. Ab Temperaturen von 55 °C aufwärts ist eine Inaktivierung von vegetativen Zellen möglich (Doyle, 2002; Jaloustre et al., 2012; Roy et al., 1981; Smith et al., 1981).

### **Modellierung des Wachstums von *B. cereus* (s.l.), *B. cytotoxicus* und *C. perfringens* in Lebensmitteln**

Um die Veränderung der Keimzahlen unter bestimmten Temperaturbedingungen zu veranschaulichen, wurde das mikrobielle Wachstum ausgewählter Pathogene mit verschiedenen modelbasierten Programmen simuliert. Dabei wurde von folgenden konservativen (Worst Case) Annahmen ausgegangen:

- Aktivierung der Sporenkeimung durch vorherige Hitzebehandlung des Lebensmittels
- optimale pH-,  $a_w$ - und Nährstoffbedingungen für Sporenkeimung und Zellwachstum
- die Lag-Phase ist sehr kurz und wird bei der Modellierung nicht berücksichtigt

Ausgehend von den Vorgaben des FDA Food Code 2017 wurden für die Modellierung unterschiedliche Szenarien der Heißhaltung betrachtet.

#### **a) Modellierung zu Vorgaben des Kapitels 3-501.16 (A1) des FDA Food Code 2017**

Mit Blick auf die Vorgaben des Kapitels 3-501.16 (A1) des FDA Food Code 2017 (kontrollierte Heißhaltung bei 57 °C bzw. 54 °C für Braten) wurde das mögliche Wachstum des thermotoleranten *B. cytotoxicus*-Stammes NVH-883-00 bei einer Heißhaltung über einen Zeitraum von 10 Stunden bei konstanter Temperatur in einem Bereich von 50 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C und 57 °C betrachtet (Abbildung 1).

Dazu wurde das CTMI-Modell und jeweils das in der Studie von Carlin et al. (2013) ermittelte 97,5%-ige Perzentil der maximalen Wachstumstemperatur  $T_{max}$  und der maximalen Wachstumsrate  $\mu_{opt}$  für NVH-883-00 genutzt (siehe Tabelle 2).

50 °C

54 °C

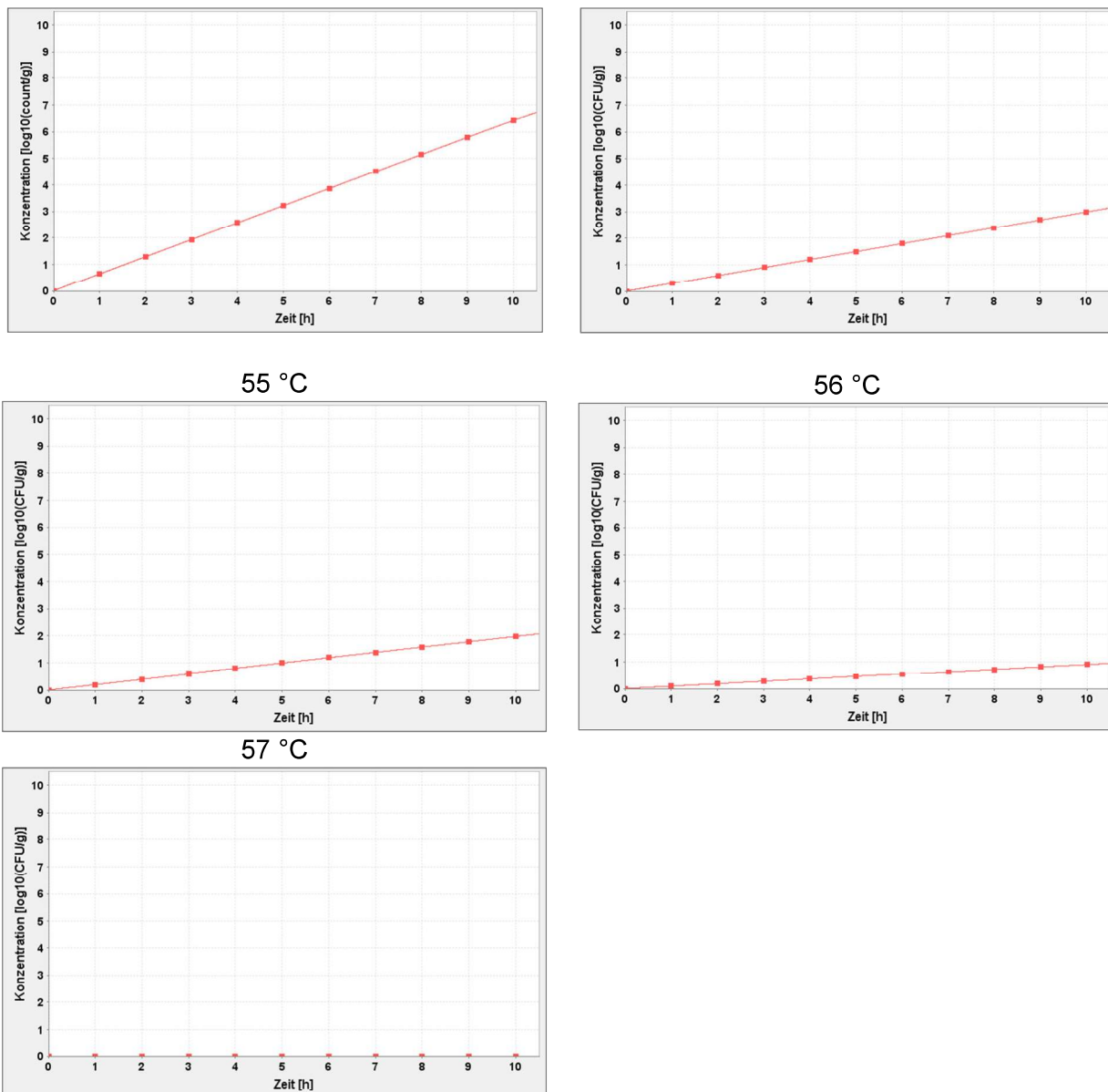


Abbildung 1: Vorhersage des Wachstums von *B. cytotoxicus*-Stamm NVH-883-00 über einen Zeitraum von 10 Stunden Heißhaltung bei 50 °C, 54 °C, 55 °C, 56 °C und 57 °C unter konservativen Modellannahmen

Für das hier verwendete Prognosemodell wurden für die zwei relevanten Modellparameter  $T_{max}$  und  $\mu_{opt}$  jeweils der Parameterwert verwendet, der als oberer Schätzer des 95 %-igen Vertrauensintervalls in der Carlin et al. 2013 Publikation angegeben wurde. Es ist daher davon auszugehen, dass das prognostizierte Wachstum von *B. cytotoxicus* NVH-883-00 Zellen unter den jeweils angenommenen Temperaturbedingungen nur in weniger als 2,5 % der Fälle in der Praxis erreicht wird (ansonsten ist das Wachstum geringer).

Bei den Prognosen für Temperaturen über 55 °C ist zudem zu berücksichtigen, dass diese nur rein mathematisch darstellbar sind, da der Anwendungsbereich des Modells auf den tatsächlich experimentell untersuchten Temperaturbereich (bis einschließlich 55 °C) begrenzt ist. Die Kernaussage dieser Simulation, dass ab 57 °C kein Wachstum von *B. cytotoxicus* in Lebensmitteln zu erwarten ist, bleibt davon unberührt. Auch in keinem anderen der etablier-

ten Softwaretools aus dem Bereich der prädiktiven Mikrobiologie finden sich Wachstumsmodelle für Temperaturen über 55 °C (siehe dazu <https://foodrisklabs.bfr.bund.de/openfsmr>). Auch gibt es in der weltweit größten öffentlich zugänglichen Datensammlung zu mikrobiellen Wachstums- und Inaktivierungsexperimenten (ComBase) keinerlei Daten, die Wachstum bei 57 °C oder höher zeigen.

Im Endergebnis ist aufgrund der hier dargelegten Modelle und Simulationsergebnisse zwar nicht restlos auszuschließen, dass im Einzelfall auch bei 56 °C ein geringes Wachstum von *B. cytotoxicus* (z. B. *B. cytotoxicus* NVH-883-00) möglich ist. Bei 57 °C ist nach den aktuell vorliegenden Daten hingegen nicht mehr mit Wachstum zu rechnen.

### b) Modellierung zu Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) des FDA Food Code 2017

Hinsichtlich der Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) des FDA Food Code 2017 (Aufbewahrung ohne Temperaturkontrolle für maximal vier Stunden) wurde das mögliche Wachstum eines mesophilen, emetischen *B. cereus*-Stammes, eines thermotoleranten *B. cytotoxicus*-Stammes und von *C. perfringens* betrachtet. Dabei wurden beispielhaft zwei verschiedene Abkühlungszenarien betrachtet:

- eine Abnahme der Temperatur um 6 °C pro Stunde ausgehend von 57 °C (siehe Abbildung 2a)
- eine Abnahme der Temperatur innerhalb von 30 Minuten auf 37 °C und dann konstante Temperatur bei 37 °C (Worst Case, siehe Abbildung 2b)

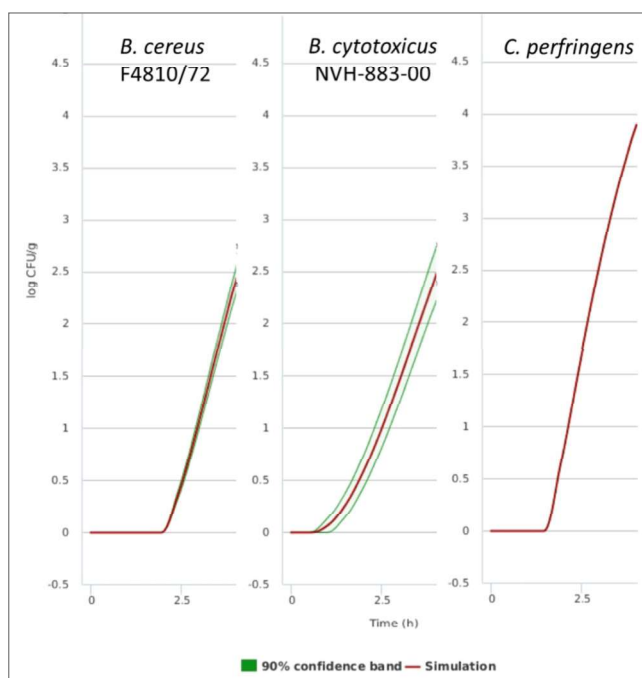


Abbildung 2a: Prognostiziertes Wachstum mesophiler, emetischer *B. cereus* (Stamm F4810/72), thermotoleranter *B. cytotoxicus* (Stamm NVH-883-00) sowie *C. perfringens* Zellen bei Abkühlung von 57 °C um 6 °C/h für 4 h bei einem angenommenen initialen Keimgehalt von 1 CFU/g (0 log CFU/g). CFU: colony forming units

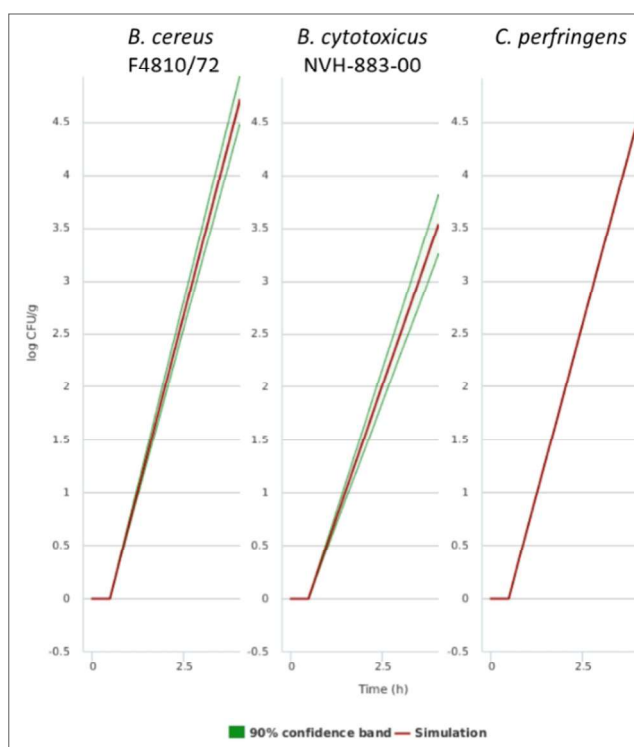


Abbildung 2b: Prognostiziertes Wachstum mesophiler, emetischer *B. cereus* (Stamm F4810/72), thermotoleranter *B. cytotoxicus* (Stamm NVH-883-00) sowie *C. perfringens* Zellen bei Abkühlung von 57 °C auf 37 °C in 30 min und danach Lagerung für 3,5 h bei 37 °C bei einem angenommenen initialen Keimgehalt von 1 CFU/g (0 log CFU/g). CFU: colony forming units

Die dargestellten modellbasierten Prognosen wurden unter Verwendung eines Modellierungswerkzeugs erstellt. Im Falle der oben beschriebenen Simulationen für den mesophilen, emetischen *B. cereus*-Stamm F4810/72 sowie zu dem thermotoleranten *B. cytotoxicus*-Stamm NVH-883-00 wurden eigene Modelle auf Basis der in der Carlin et al. 2013 Veröffentlichung abgeleiteten Modellparameter (mittlere Schätzer, die Standardabweichungen wurden rechnerisch aus dem angegebenen 97,5-igen Perzentil abgeleitet) erstellt und verwendet. Alle Simulationsrechnungen sind konservativ, da sie keine Lag-Phase und optimale pH und  $a_w$ -Werte annehmen (Worst Case). Im Falle des beschriebenen Modells zu *C. perfringens* basieren die genutzten Modellparameter auf Angaben in Microorganisms in Food 5 (ICMSF, 1996) sowie Willardsen et al. (1979).

Die Kernaussage dieser Analyse ist, dass bei einer unkontrollierten Abkühlung von Lebensmitteln unter 57 °C bereits innerhalb von vier Stunden mit signifikantem mikrobiellen Wachstum zu rechnen ist. Dies wird auch durch experimentelle Daten in der Combase sowie modellbasierte Prognosen mit anderen Vorhersagetools (z. B. „Perfringens Predictor“ <https://www.combase.cc/>, „Pathogen Modeling Program (PMP) Online“ <https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>) gestützt.

### 3 Schlussfolgerungen aus den Literaturdaten und der Modellierung

Mit Blick auf die Vorgaben des Kapitels 3-501.16 (A1) des FDA Food Code 2017 (kontrollierte Heißhaltung bei 57 °C bzw. 54 °C für Braten) ist festzustellen, dass nicht mit einem Wachstum von *C. perfringens* und mesophilen *B. cereus* zu rechnen ist, und somit auch die Cereulid-Bildung ausgeschlossen ist.

Hinsichtlich thermotoleranter *B. cytotoxicus* ist aufgrund der Berechnungen von Carlin et al. (2013) und den damit im Zusammenhang stehenden Simulationsergebnissen des BfR theo-

retisch auch bei 56 °C ein bakterielles Wachstum möglich. Ab 57 °C und höheren Temperaturen ist auf Basis der Daten von Carlin et al. (2013) und den Simulationsergebnissen des BfR nicht mehr mit Wachstum zu rechnen. Einzelne Studienergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass in Lebensmitteln auch bei höheren Temperaturen noch ein Wachstum möglich ist (Ellerbroek 2008).

Hinsichtlich der Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) des FDA Food Code 2017 (Aufbewahrung ohne Temperaturkontrolle für maximal vier Stunden) ist ein Wachstum von thermotoleranten *B. cytotoxicus* ( $\leq 56$  °C), *C. perfringens* ( $\leq 50$  °C) und mesophilen *B. cereus* ( $\leq 48$  °C) möglich. In Abhängigkeit davon, wie hoch der ursprüngliche Gehalt an Sporen und vegetativen Zellen zu Beginn der Heißhaltung (Ausgangskeimgehalt) ist und welche Temperaturen im Lebensmittel über die vier Stunden tatsächlich herrschen, können dabei Keimgehalte erreicht werden, die lebensmittelbedingte Erkrankungen verursachen können (Abbildungen 2a und 2b).

#### 4 Fazit

Nachfolgend wird Stellung genommen, ob die Temperatur/Zeit-Vorgaben der Kapitel 3-501.16 (A1) und 3-501.19 (B) des Food Code 2017 der FDA als eine Alternative angesehen werden können zu den Vorgaben des BfR aus dem Jahr 2008 zur permanenten Heißhaltung von Gerichten im Rahmen von Einzelhandelstätigkeiten oder Verpflegungsvorgängen durch Großküchen.

#### **Vorgaben des Kapitels 3-501.16 (A1) des FDA Food Code 2017 (kontrollierte Heißhaltung bei 57 °C bzw. 54 °C für Braten)**

Da das Risiko einer lebensmittelbedingten Erkrankung mit zunehmender Keimzahl von *B. cereus* (s.l.) und *C. perfringens* im Lebensmittel steigt, sollten nach Auffassung des BfR die gewählten Lagerbedingungen von erhitzten Lebensmitteln das Wachstum dieser Organismen verhindern. Wie ausgeführt, ist bei 57 °C nicht mit einem Wachstum von *B. cereus* (s.l.), *B. cytotoxicus* oder *C. perfringens* zu rechnen. Dieses Ergebnis deckt sich überwiegend mit Angaben aus der Literatur. Einzelne Studienergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass in Lebensmitteln auch bei höheren Temperaturen noch ein geringes Wachstum möglich ist (Ellerbroek 2008). Deshalb sollten nach Auffassung des BfR beim Heißhalten erhitzter Speisen an keiner Stelle des Produktes Temperaturen von 60 °C unterschritten werden. Aus dem gleichen Grund sind die Vorgaben des Kapitels 3-501.16 (A1) des FDA Food Code 2017 nach Ansicht des BfR keine generell geeignete Alternative.

Auch das EFSA BIOHAZ Panel (2016) stellt fest, dass die meisten lebensmittelbedingten Krankheiten verursacht durch *B. cereus* (s.l.) in Verbindung mit rohen oder gekochten Lebensmitteln stehen, die nicht unterhalb von 4 °C oder oberhalb von 60 °C aufbewahrt wurden (als Wachstumstemperatur für *B. cereus* (s.l.) wird hier der Bereich zwischen 4 °C und 55 °C angegeben). In seiner früheren Scientific Opinion empfahl das EFSA BIOHAZ Panel (2005a) 63 °C als Heißhaltetemperatur. Eine empfohlene Heißhaltetemperatur von mindestens 60 °C findet sich auch bei Labbe and Juneja (2017) und von über 60 °C bei Kramer and Gilbert (1989).

Basis der Vorgaben des FDA Food Code 2017 ist die Annahme, dass mit der Kontrolle des Wachstums von *C. perfringens* auch das Wachstum von *B. cereus* kontrolliert wird (3-501.16, Annex 3, FDA Food Code 2017). Diese Annahme gilt jedoch nur für mesophile

*B. cereus*. Vor dem Hintergrund neuer Erkenntnisse zu den Wachstumstemperaturgrenzen von thermotoleranten Vertretern der *B. cereus*-Gruppe (*B. cytotoxicus*), müsste die Annahme lauten: Temperaturen, die das Wachstum von *B. cytotoxicus* kontrollieren (d.h. verhindern), kontrollieren auch ein Wachstum von anderen Spezies der *B. cereus*-Gruppe und von *C. perfringens*.

### **Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) des FDA Food Code 2017 (Aufbewahrung ohne Temperaturkontrolle für maximal vier Stunden)**

Wie ausgeführt, können sich thermotolerante *B. cytotoxicus*, *C. perfringens* und mesophile *B. cereus* (s.l.) innerhalb von vier Stunden vermehren, wenn die Temperaturen im Lebensmittel unterhalb bestimmter Werte sinken ( $\leq 56\text{ °C}$ ,  $\leq 50\text{ °C}$  bzw.  $\leq 48\text{ °C}$ ). Wie schnell das Wachstum ist und ob dadurch kritische Keimgehalte erreicht werden, hängt u. a. davon ab, wie hoch der Ausgangskeimgehalt des Lebensmittels ist und wie hoch die Temperaturen in allen Teilen des Lebensmittels in den vier Stunden tatsächlich sind.

In einem Positionspapier unter 3-501.19, Annex 3 des FDA Food Code 2017 werden die Annahmen ausgeführt, die den Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) zugrunde liegen. Diese Annahmen sind: i) der Ausgangskeimgehalt von *B. cereus* bzw. *C. perfringens* beträgt im Lebensmittel maximal  $10^3$  Kbe/g, ii) ein Wachstum um eine log-Stufe ist somit hinnehmbar und iii) das Lebensmittel kühlt bei einer Lagerung bei Raumtemperatur schnell genug ab, um das Wachstum von *B. cereus* bzw. *C. perfringens* zu begrenzen. Diese Annahme zur Abkühlung wird dabei eingeschränkt auf Braten, Rouladen, Produkte, die gerührt werden und Produkte, die schneller abkühlen als Braten. Grundlage dieser Annahme ist laut Positionspapier eine Bewertung des Abkühlverhaltens von Braten ab einer Ausgangstemperatur von  $54\text{ °C}$  auf Basis von veröffentlichten Studien und Daten der FDA.

Nach Ansicht des BfR bezieht sich Kapitel 3-501.19 (B) jedoch nicht nur auf die oben genannten Lebensmittel. Es ist fraglich, inwiefern sich die Annahme einer ausreichenden Abkühlung auf sämtliche erhitzte Speisen übertragen lässt. Die Ergebnisse der Literaturlauswertung und der Modellierung durch das BfR legen nahe, dass je nach Temperaturbedingung ein Wachstum von *B. cereus*, *B. cytotoxicus* und *C. perfringens* von deutlich mehr als einer log-Stufe innerhalb von vier Stunden möglich ist. Unter der Annahme eines Worst-Case-Szenarios kann man davon ausgehen, dass innerhalb von vier Stunden sogar eine Cereulid-Bildung möglich wäre (siehe Abbildung 2b und Agata et al., 2002). Deshalb stellen die Vorgaben des Kapitels 3-501.19 (B) des FDA Food Code 2017 aus Sicht des BfR keine akzeptable Alternative zur Heißhaltung erhitzter Speisen mit Einhaltung einer Temperatur von mindestens  $60\text{ °C}$  an allen Stellen des Lebensmittels dar.

### **Weitere Informationen auf der BfR-Website zum Thema Lebensmittelhygiene:**

Übersichtseite zu allen Publikationen zu Lebensmittelhygiene:

[https://www.bfr.bund.de/de/a-z\\_index/lebensmittelhygiene-4549.html](https://www.bfr.bund.de/de/a-z_index/lebensmittelhygiene-4549.html)



„Stellungnahmen-App“ des BfR



## 5 Referenzen

- Afchain, A.L., Carlin, F., Nguyen-The, C., Albert, I., 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology* 128, 165-173.
- Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23-27.
- Antolinos, V., Munoz, M., Ros-Chumillas, M., Aznar, A., Periago, P.M., Fernandez, P.S., 2011. Combined effect of lysozyme and nisin at different incubation temperature and mild heat treatment on the probability of time to growth of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 28, 305-310.
- Apetroaie-Constantin, C., Shaheen, R., Andrup, L., Smidt, L., Rita, H., Sallinoja-Salonen, M., 2008. Environment driven cereulide production by emetic strains of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 127, 60-67.
- Aryani, D.C., den Besten, H.M., Hazeleger, W.C., Zwietering, M.H., 2015. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 208, 19-29.
- Auger, S., Galleron, N., Bidnenko, E., Ehrlich, S.D., Lapidus, A., Sorokin, A., 2008. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1276-1280.
- Bauer, T., Stark, T., Hofmann, T., Ehling-Schulz, M., 2010. Development of a stable isotope dilution analysis for the quantification of the *Bacillus cereus* toxin cereulide in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1420-1428.
- Becker, B., Schillinger, U., Bohringer, B., Untucht, T., Izykovski, N., Franz, C., 2011. Presence of bacilli in pasteurized packaged foods and determination of heat resistance of vegetative cells and spores of selected *Bacillus* isolates. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* 62, 205-211.
- Berthold-Pluta, A., Pluta, A., Garbowska, M., 2015. The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial Pathogenesis* 82, 7-14.
- Blankenship, L.C., Craven, S.E., Leffler, R.G., Custer, C., 1988. Growth of *Clostridium perfringens* in cooked chili during cooling. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1104-1108.
- Bradshaw, J.G., Stelma, G.N., Jones, V.I., Peeler, J.T., Wimsatt, J.C., Corwin, J.J., Twedt, R.M., 1982. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* enterotoxin in buffer and in chicken gravy. *Journal of Food Science* 47, 914-916.
- Bursova, S., Necidova, L., Harustiakova, D., 2018. Growth and toxin production of *Bacillus cereus* strains in reconstituted initial infant milk formula. *Food Control* 93, 334-343.
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M.-H., Couvert, O., Nguyen-the, C., 2013. Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation



in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiology* 33, 69-76.

Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salonen, M.S., Svensson, B., Nguyen-The, C., Ehling-Schulz, M., 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* 109, 132-138.

Carlin, F., Girardin, H., Peck, M.W., Stringer, S.C., Barker, G.C., Martinez, A., Fernandez, A., Fernandez, P., Waites, W.M., Movahedi, S., Leusden, F.v., Nauta, M., Moezelaar, R., Torre, M.D., Litman, S., 2000. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. *International Journal of Food Microbiology* 60, 117-135.

Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology* 84, 433-450.

Ceuppens, S., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Tsilia, V., van De Wiele, T., Boon, N., Uyttendaele, M., 2011. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology* 37, 188-213.

Ceuppens, S., Uyttendaele, M., Drieskens, K., Rajkovic, A., Boon, N., Wiele, T.V., 2012. Survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores during in vitro simulation of gastric passage. *J Food Prot* 75, 690-694.

Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C., Schmitt, P., 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *Journal of Applied Microbiology* 97, 214-219.

Delbrassinne, L., Andjelkovic, M., Rajkovic, A., Botteldoorn, N., Mahillon, J., Van Loco, J., 2011. Follow-up of the *Bacillus cereus* emetic toxin production in penne pasta under household conditions using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Food Microbiology* 28, 1105-1109.

Delbrassinne, L., Andjelkovic, M., Rajkovic, A., Dubois, P., Nguessan, E., Mahillon, J., Van Loco, J., 2012. Determination of *Bacillus cereus* Emetic Toxin in Food Products by Means of LC-MSA(2). *Food Analytical Methods* 5, 969-979.

den Besten, H.M., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., Zwietering, M.H., 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5884-5894.

den Besten, H.M.W., van der Mark, E.-J., Hensen, L., Abee, T., Zwietering, M.H., 2010. Quantification of the Effect of Culturing Temperature on Salt-Induced Heat Resistance of *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4286-4292.

Desai, S.V., Varadaraj, M.C., 2010. Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of Indian traditional foods. *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 47, 549-556.

Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M., Mahillon, J., 2005. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4277-4279.

Dommel, M.K., Lucking, G., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2011. Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* 28, 284-290.

Doyle, E., 2002. Survival and Growth of *Clostridium perfringens* during the Cooling Step of Thermal Processing of Meat Products A Review of the Scientific Literature.

EFSA BIOHAZ Panel, 2005a. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp in foodstuffs. *EFSA Journal* 175, 1-48.

EFSA BIOHAZ Panel, 2005b. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. *EFSA Journal* 199, 1-65.

EFSA BIOHAZ Panel, 2016. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal* 14, 93.

Ellerbroek, L., 2008. Hot holding period of dishes in food holding equipment. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* 59, 137-141.

Fagerlund, A., Brillard, J., Fürst, R., Guinebretiere, M.H., Granum, P.E., 2007. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group. *Bmc Microbiology* 7.

Fagerlund, A., Ween, A., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E., 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology-Sgm* 150, 2689-2697.

Feijoo, S.C., Cotton, L.N., Watson, C.E., Martin, J.H., 1997. Effect of storage temperatures and ingredients on growth of *Bacillus cereus* in coffee creamers. *Journal of Dairy Science* 80, 1546-1553.

Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland, A.D., 2000. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Letters in Applied Microbiology* 31, 385-389.

Gilbert, R.J., Stringer, M.F., Peace, T.C., 1974. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *Journal of Hygiene* 73, 433-444.

Gounina-Allouane, R., Broussolle, V., Carlin, F., 2008. Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination. *Food Microbiology* 25, 202-206.

Granum, P.E., Skjelkvale, R., 1977. Chemical modification and characterization of enterotoxin from *Clostridium perfringens* type-a. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica Section B-Microbiology* 85, 89-94.

Guerin, A., Dargaignaratz, C., Clavel, T., Broussolle, V., Nguyen-the, C., 2017. Heat-resistance of psychrotolerant *Bacillus cereus* vegetative cells. *Food Microbiology* 64, 195-201.

Guinebretiere, M.H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A., 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 31-40.

Guinebretiere, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.

Guinebretiere, M.H., Velge, P., Couvert, O., Carlin, F., Debuyser, M.L., Nguyen-The, C., 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3388-3391.

Hägglom, M.M., Apetroaie, C., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2002. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2479-2483.

Heini, N., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., Johler, S., 2018. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *International Journal of Food Microbiology* 283, 59-64.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1996. *Microorganisms in foods 5 : Characteristics of microbial pathogens*. Blackie Academic & Professional, London.

Jääskeläinen, E.L., Hägglom, M.M., Andersson, M.A., Vanne, L., Salkinoja-Salonen, M.S., 2003. Potential of *Bacillus cereus* for producing an emetic toxin, cereulide, in bakery products: quantitative analysis by chemical and biological methods. *Journal of Food Protection* 66, 1047-1054.

Jaloustre, S., Guillier, L., Morelli, E., Noel, V., Delignette-Muller, M.L., 2012. Modeling of *Clostridium perfringens* vegetative cell inactivation in beef-in-sauce products: a meta-analysis using mixed linear models. *Int J Food Microbiol* 154, 44-51.

Jessberger, N., Rademacher, C., Krey, V.M., Dietrich, R., Mohr, A.K., Bohm, M.E., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., Martlbauer, E., 2017. Simulating Intestinal Growth Conditions Enhances Toxin Production of Enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in Microbiology* 8.

Johnson, K.M., Nelson, C.L., Busta, F.F., 1983. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. *Journal of Food Science* 48, 286-287.

Kalinowski, R.M., Tompkin, R.B., Bodnaruk, P.W., Pruett, W.P., 2003. Impact of cooking, cooling, and subsequent refrigeration on the growth or survival of *Clostridium perfringens* in cooked meat and poultry products. *Journal of Food Protection* 66, 1227-1232.

Kim, H.S., Choi, S.J., Yoon, K.S., 2018. Efficacy Evaluation of Control Measures on the Reduction of *Staphylococcus aureus* in Salad and *Bacillus cereus* in Fried Rice Served at Restaurants. *Foodborne Pathogens and Disease* 15, 198-209.

Knaysi, G., 1964. Effect of temperature on the rate of germination in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* 87, 619-622.

Kranzler, M., Stollewerk, K., Rouzeau-Szynalski, K., Blayo, L., Sulyok, M., Ehling-Schulz, M., 2016. Temperature Exerts Control of *Bacillus cereus* Emetic Toxin Production on Post-transcriptional Levels. *Frontiers in Microbiology* 7.

Labbe, R.G., Juneja, V.K., 2017. *Clostridium perfringens*, *Foodborne Diseases*. Elsevier, pp. 235-242.

Laurent, Y., Arino, S., Rosso, L., 1999. A quantitative approach for studying the effect of heat treatment conditions on resistance and recovery of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 48, 149-157.

Lovdal, I.S., Hovda, M.B., Granum, P.E., Rosnes, J.T., 2011. Promoting *Bacillus cereus* Spore Germination for Subsequent Inactivation by Mild Heat Treatment. *Journal of Food Protection* 74, 2079-2089.

Lücking, G., Dommel, M.K., Scherer, S., Fouet, A., Ehling-Schulz, M., 2009. Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology-Sgm* 155, 922-931.

Messelhäußer, U., Ehling-Schulz, M., 2014. *Bacillus cereus* - Vorkommen, Nachweis und Präventionsstrategien. B. Behr's Verlag, Hamburg.

Messelhäußer, U., Ehling-Schulz, M., 2018. *Bacillus cereus* - a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports* 5, 120-125.

Messelhäußer, U., Frenzel, E., Blochinger, C., Zucker, R., Kampf, P., Ehling-Schulz, M., 2014. Emetic *Bacillus cereus* are more volatile than thought: Recent foodborne outbreaks and prevalence studies in Bavaria (2007-2013). *Biomed Research International*.

Naik, H.S., Duncan, C.L., 1977. Enterotoxin formation in foods by *Clostridium perfringens* type A. *Journal of Food Safety* 1, 7-18.

Naik, H.S., Duncan, C.L., 1978. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Journal of Food Protection* 41, 100-103.

Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R.B., Sipido, K.R., Mahillon, J., Dierick, K., 2011. Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 4379-4381.

Phat, C., Kim, S., Park, J., Lee, C., 2017. Detection of Emetic Toxin Genes in *Bacillus cereus* Isolated from Food and their Production of Cereulide in Liquid Culture. *Journal of Food Safety* 37.

Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F., 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiology* 28, 291-297.

Quintavalla, S., Parolari, G., 1993. Effects of temperature, aw and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study. *International Journal of Food Microbiology* 19, 207-216.

Raevuori, M., Genigeorgis, C., 1975. Effect of pH and Sodium Chloride on Growth of *Bacillus cereus* in Laboratory Media and Certain Foods. *Applied Microbiology* 29, 68-73.

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Ombregt, S.A., Jaaskelainen, E., Salkinoja-Salonen, M., Debevere, J., 2006. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin. *Journal of Food Protection* 69, 847-852.

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R., Debevere, J., 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* 46, 536-541.

Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E., 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.

Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610-616.

Rosso, L., Lobry, J.R., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial-growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447-463.

Rouzeau-Szynalski, K., Stollewerk, K., Messelhausser, U., Ehling-Schulz, M., 2020. Why be serious about emetic *Bacillus cereus*: Cereulide production and industrial challenges. *Food Microbiology* 85.

Roy, R.J., Busta, F.F., Thompson, D.R., 1981. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. *Journal of Food Science* 46, 1586-1591.

Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., de Baenst, I., Devlieghere, F., 2014. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *International Journal of Food Microbiology* 181, 10-18.

Setlow, P., 2013. Summer meeting 2013-when the sleepers wake: the germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 115, 1251-1268.

Shigehisa, T., Nakagami, T., Taji, S., 1985. Influence of heating and cooling rates on spore germination and growth of *Clostridium perfringens* in media and in roast beef. *Japanese Journal of Veterinary Science* 47, 259-267.

- Shiota, M., Saitou, K., Mizumoto, H., Matsusaka, M., Agata, N., Nakayama, M., Kage, M., Tatsumi, S., Okamoto, A., Yamaguchi, S., Ohta, M., Hata, D., 2010. Rapid Detoxification of Cereulide in *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Pediatrics* 125, E951-E955.
- Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Altieri, C., Massa, S., 2002. Response surface model for effects of temperature, water activity and pH on germination of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Food Safety* 22, 121-133.
- Smith, A.M., Evans, D.A., Buck, E.M., 1981. Growth and survival of *Clostridium perfringens* in rare beef prepared in a water bath. *Journal of Food Protection* 44, 9-14.
- Taormina, P.J., Dorsa, W.J., 2004. Growth potential of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked meats. *Journal of Food Protection* 67, 1537-1547.
- Tegiffel, M.C., Beumer, R.R., Hoekstra, J., Rombouts, F.M., 1995. Germination of bacterial spores during sample preparation. *Food Microbiology* 12, 327-332.
- Valero, M., Leontidis, S., Fernández, P., Martínez, A., Salmerón, M.C., 2000. Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5–30°C. *Food Microbiology* 17, 605-612.
- van Asselt, E.D., Zwietering, M.H., 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 107, 73-82.
- van der Voort, M., Abee, T., 2013. Sporulation environment of emetic toxin-producing *Bacillus cereus* strains determines spore size, heat resistance and germination capacity. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1201-1210.
- van Melis, C.C., Almeida, C.B., Kort, R., Groot, M.N., Abee, T., 2012. Germination inhibition of *Bacillus cereus* spores: impact of the lipophilic character of inhibiting compounds. *International Journal of Food Microbiology* 160, 124-130.
- Wang, J., Ding, T., Oh, D.H., 2014. Effect of temperatures on the growth, toxin production, and heat resistance of *Bacillus cereus* in cooked rice. *Foodborne Pathogens and Disease* 11, 133-137.
- Warda, A.K., den Besten, H.M., Sha, N., Abee, T., Nierop Groot, M.N., 2015. Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 201, 27-34.
- Wei, J., Setlow, P., Hoover, D.G., 2009. Effects of moderately high pressure plus heat on the germination and inactivation of *Bacillus cereus* spores lacking proteins involved in germination. *Letters in Applied Microbiology* 49, 646-651.
- Wells-Bennik, M.H.J., Eijlander, R.T., den Besten, H.M.W., Berendsen, E.M., Warda, A.K., Krawczyk, A.O., Groot, M.N.N., Xiao, Y.H., Zwietering, M.H., Kuipers, O.P., Abee, T., 2016. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth, in: Doyle, M.P., Klaenhammer, T.R. (Eds.), *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 7, pp. 457-482.
- Wijnands, L.M., Dufrenne, J.B., van Leusden, F.M., Abee, T., 2007. Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated caco-2 cells, a human cell line

mimicking the epithelial cells of the small intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5052-5054.

Ziane, M., Desriac, N., Le Chevalier, P., Couvert, O., Moussa-Boudjemaa, B., Leguerinel, I., 2014. Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control* 45, 16-21.

### **Über das BfR**

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist eine wissenschaftlich unabhängige Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Es berät die Bundesregierung und die Bundesländer zu Fragen der Lebensmittel-, Chemikalien- und Produktsicherheit. Das BfR betreibt eigene Forschung zu Themen, die in engem Zusammenhang mit seinen Bewertungsaufgaben stehen.