

Schnelle Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS

Antje Fröhling, Marcel Erhard, Peter Muranyi, Oliver Schlüter

Sichere Lebensmittel von hoher Qualität stellen besonders bei leicht verderblichen Frischeprodukten eine Herausforderung für die Gestaltung der Nacherntekette dar. Da die Beprobung von Lebensmittelchargen in der Praxis meist anhand ausgewählter Indikatororganismen erfolgt, bleiben unerwartete, potenziell gefährliche Mikroorganismen häufig unentdeckt. Die Detektion dieser Bakterien ist jedoch von Interesse, um potenzielle Gefahren für den Verbraucher zu vermeiden. Am Beispiel von Mungobohnensprossen wurde die mikrobielle Diversität mittels Plattenzählverfahren und MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry) ermittelt. Bei einer Gesamtkeimzahl zwischen 8 und 9 log KbE/g Sprossen konnten unter anderem Bakterien der *Bacillus cereus* Gruppe, *Yersinia* sp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp. und *Pseudomonas* spp. identifiziert werden.

Schlüsselwörter

Sprossen, Fresh-cut-Salat, Lebensmittelsicherheit, Bakterien-Monitoring

FrISCHE und verzehrfähige Convenience-Produkte, vor allem geschnittene Obst- und Salatmischungen (Fresh-Cut), sind mit einem Marktvolumen von 3,4 Mrd. € (2008) und einem prognostizierten jährlichen Wachstum von 4% ein interessantes Segment im europäischen Lebensmittelmarkt (VAN RIJSWICK 2010). Dabei handelt es sich um Erzeugnisse, die – lediglich gewaschen und vorgeschnitten – verzehrfertig in den Handel kommen. Die minimale Verarbeitung dieser Erzeugnisse (minimally processed foods) bedingt einen hohen Frischegrad und Naturbelassenheit. Allerdings sind diese Produkte aufgrund einer originären Mikroflora auf der Oberfläche und Sekundärkontaminationen im Herstellungsprozess besonders anfällig gegenüber mikrobiellem Verderb. Nach FRANCIS et al. (1999) liegt die originäre Keimbelastung von frischem Gemüse zwischen 10^5 und 10^7 KbE/g, mit einem Schwerpunkt auf Vertretern der Gattung *Erwinia* und *Pseudomonas*. Relevant für die Sicherheit sind pathogene Bakterien wie zum Beispiel *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* (FRANCIS et al. 1999, OLIVEIRA et al. 2011), da die Produkte gewöhnlich im rohen Zustand verzehrt werden. Trotz der hohen Hygienestandards bei der Herstellung von geschnittenen Salaten und Obst mit einer aufwendigen Kühllogistik und dem Einsatz von Schutzgasverpackungen kommt es immer wieder zu Krankheitsausbrüchen nach dem Verzehr dieser Erzeugnisse. Bei Untersuchungen vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) zur Keimbelastung von Mischsalaten im Jahre 2008 wurden 5 % der Proben positiv auf *Listeria monocytogenes* getestet (BfR 2011).

Die industrielle Produktion von Sprossen erfolgt in der Regel in speziellen Behältnissen bei mesophilen Temperaturen (37 °C) und einer hohen Feuchte. Dieses Milieu stellt ideale Bedingungen für das Wachstum von Mikroorganismen dar und erfordert eine gute Betriebshygiene mit regelmäßigen Reinigungs- und Desinfektionsschritten. Auch hier sind die Rohstoffe häufig kontaminiert und Ursache für die hohen mikrobiellen Belastungen dieser Erzeugnisse. In einer Studie vom BfR im Jahre

2009 konnte gezeigt werden, dass die Gesamtkeimzahl von Mungobohnen innerhalb von 4 Tagen Kühlungsbereits einen Wert von 10^9 KbE/g erreichen kann und Sprossen häufig mit pathogenen Keimen kontaminiert sind (BfR 2011). Eine gesundheitliche Bedrohung der Verbraucher resultiert besonders aus der Kontamination und Vermehrung unerwarteter Krankheitserreger in der Lebensmittelwarenkette. Lebensmittelchargen werden oft hinsichtlich ausgewählter Leitkeime beprobt, so dass unerwartete Erreger unerkannt bleiben können. Darüber hinaus ist die Entwicklung bakterieller Kontaminanten entlang der Prozesskette derzeit nicht ausreichend erforscht.

Im Rahmen des SAFEFRESH-Teilprojektes „Gefahrenfrüherkennung auf Basis der produktionsübergreifenden Identifizierung pflanzenassoziierter Mikroorganismen entlang der Warenkette frischer pflanzlicher Lebensmittel“ wird die Entwicklung des mikrobiellen Besatzes auf der Oberfläche von Obst und Gemüse während der industriellen Aufarbeitung detailliert analysiert, um die Grundlage für eine Gefahrenfrüherkennung im Hinblick auf humanpathogene Bakterien zu erarbeiten. Dabei werden die pflanzenassozierten Mikroorganismen durch Kultivierung auf Standard-Nährböden und nachfolgend auf Basis der Erfassung des Zellproteinspektrums mittels MALDI-TOF-MS-Analyse identifiziert, und es wird eine Datenbank mit Referenz-MALDI-TOF-MS-Spektren für eine schnelle kulturbasierte Diagnostik aufgebaut. MALDI-TOF MS wurde erstmals Ende der achtziger Jahre zur Analyse von Biomolekülen wie Proteinen eingesetzt (KARAS und HILLENKAMP 1988, HILLENKAMP et al. 1991). Nicht nur einzelne Biomoleküle, sondern auch ganze Zellen, wie zum Beispiel Bakterien oder Pilze, können mit MALDI-TOF MS untersucht werden (MADONNA et al. 2000, FENSELAU und DEMIREV 2001). Innerhalb kurzer Zeit (Messdauer 15–45 s) kann damit eine Differenzierung von bakteriellen wie auch pilzlichen Isolaten erfolgen. Über den Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit Referenzspektren kann unmittelbar eine Identifizierung des Testkeims erfolgen. In erster Linie wird MALDI-TOF MS zur Identifikation pathogener Erreger im medizinischen Bereich eingesetzt (WEILE und KNABBE 2009, HO und REDDY 2010). Die Technik wurde ebenfalls erfolgreich zur Differenzierung typischer lebensmittelassoziierter Bakterien wie *Salmonellen* (MAZZEO et al. 2006, DIECKMANN et al. 2008), *Listerien* (BARBUDDHE et al. 2008), *Enterokokken* (GIEBEL et al. 2008) und *Escherichia coli* (MAZZEO et al. 2006, SIEGRIST et al. 2007, OCHOA und HARRINGTON 2005) angewendet. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Mikroflora von leichtverderblichen Frischeprodukten am Beispiel von Mungobohnensprossen mittels MALDI-TOF MS sowie der Aufbau einer Datenbank für Referenzspektren.

Material und Methoden

Mungobohnensprossen wurden in einem lokalen Supermarkt gekauft und anschließend mikrobiologisch untersucht. Es wurden drei Sprossenpackungen mit unterschiedlichen Verfallsdaten gekauft und damit die mikrobielle Diversität der Sprossen 2 Tage vor dem Verfallsdatum, 1 Tag vor dem Verfallsdatum sowie am Tag des Verfallsdatums erfasst. Die Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 4833-2 (2014), L00.00-88. Hierfür wurden Mungobohnensprossen an drei verschiedenen Stellen der Verpackung unter sterilen Bedingungen entnommen und mit steriler Kaseinpeptonsalzlösung 1:10 verdünnt, sodass jede Packung in Dreifachbestimmung beprobt wurde. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der einzelnen Proben in einem Bag Mixer® (Interscience, Frankreich) für 2 min bei höchster Geschwindigkeit. Im nächsten Schritt wurden in Mikrotiterplatten (96er U-Profil, Carl Roth GmbH, Deutschland) Verdünnungsreihen bis 10^{-7} in Doppelbestimmung erstellt. Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf Plate Count Agar (Carl Roth GmbH, Deutschland) ausgestrichen und für 72 h bei 30 °C inkubiert. Die Nachweisgrenze

betrug $2 \log \text{KbE/g}$. Für die Analyse mittels MALDI-TOF MS wurde von jeder Probe eine gut auszählbare Nährbodenplatte ausgewählt und alle gewachsenen Kolonien analysiert; insgesamt wurden für alle Proben 269 Kolonien in Doppelbestimmung analysiert. Hierzu wurde etwas Zellmaterial von den Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze auf ein Metalltarget überführt und mit CHCA-Matrix (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid, RIPAC-LABOR GmbH, Deutschland) überschichtet. Nach dem Trocknen erfolgte die Analyse mittels MALDI-TOF MS (Axima Confidence, Shimadzu Deutschland GmbH). Für die Identifikation der Bakterien wurden die gemessenen Spektren mit der Anagnostec SARAMISTM-Datenbank (Spectral ARchive And Microbial Identification System, bioMérieux, Deutschland) abgeglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Die aerobe Gesamtkeimzahl der untersuchten Mungobohnensprossen lag zwischen 8 und 9 $\log \text{KbE/g}$ (Abbildung 1). Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Gesamtkeimzahl der Sprossen zwei Tage vor dem Verfallsdatum, einem Tag vor dem Verfallsdatum und der Gesamtkeimzahl der Sprossen am Tag des Verfallsdatums festgestellt werden. Die ermittelte Gesamtkeimzahl ist im Einklang mit verfügbaren Literaturdaten, nach denen Sprossen zwischen 8 und 9 $\log \text{KbE/g}$ Mikroorganismen enthalten können bevor sie verzehrt werden (NACMCF 1999). Allerdings sagt die Gesamtkeimzahl nichts darüber aus, ob es sich bei den Bakterien um Krankheitserreger oder nicht-pathogene Mikroorganismen handelt. Für die Überwachung von Lebensmitteln bzw. der Lebensmittelproduktion werden daher vorrangig klassische Verfahren der mikrobiologischen Diagnostik eingesetzt, die auf der Kultur ausgewählter Zielkeime unter standardisierten Bedingungen (Standardnährböden, Selektivnährböden) und anschließenden biochemischen und serologischen Tests basieren. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass es sich um gut etablierte und bewährte Verfahren handelt, welche zudem mit verhältnismäßig geringen Kosten umsetzbar sind. Bekannte Pathogene lassen sich kulturbasiert zu-

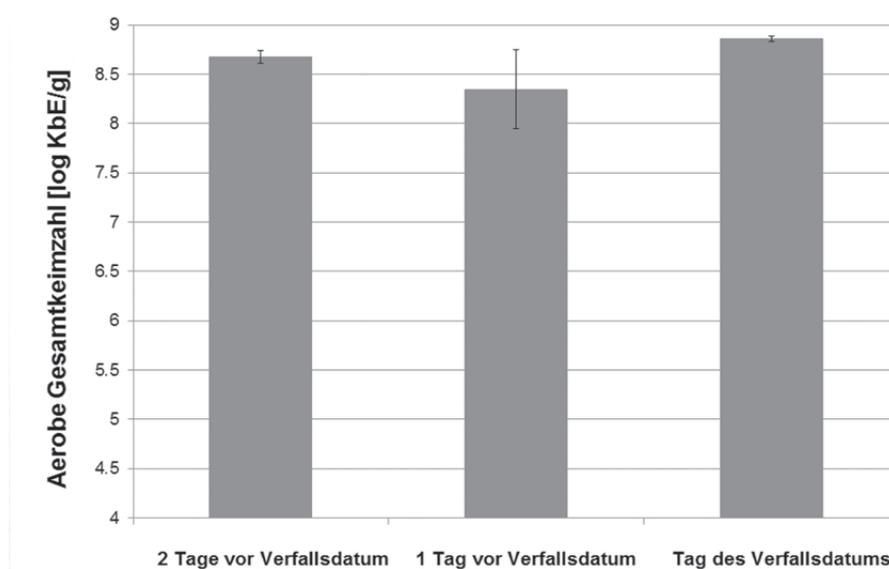


Abbildung 1: Aerobe Gesamtkeimzahl von Mungobohnensprossen. Die Gesamtkeimzahl ist dargestellt als Mittelwert aus sechs Werten mit Standardabweichung (drei unabhängige Experimente, die in Doppelbestimmung analysiert wurden).

verlässig nachweisen. Gleichzeitig kann deren Lebendkeimzahl erfasst werden. Indem vor der Analyse selektive Anreicherungskulturen angelegt werden, können auch in geringen Konzentrationen auftretende Keime oder Mikroorganismen mit besonderen Anforderungen an die Kulturbedingungen nachgewiesen werden. Nachteil dieser Methode ist jedoch der hohe Zeitaufwand bis zu einer Woche oder länger, der für die Untersuchungen benötigt wird. Zur Identifizierung der gewachsenen Kolonien sind anschließend aufwendige biochemische und serologische Tests notwendig. Außerdem kann innerhalb der kultivierbaren Gruppen ohne weitere Analysen häufig nicht zwischen engverwandten Arten und Stämmen unterschieden werden. So ist z. B. im Falle von coliformen Enterobakterien oder Listerien die Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Varianten meist nicht ohne weitere molekulare Analysen möglich. Die Identifizierung von kultivierten Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS besitzt daher eine Reihe von Vorteilen (Weile und Knabbe 2009, Ho und Reddy 2010, Mazzeo et al. 2006) gegenüber alternativen Ansätzen, wie z. B. biochemische oder serologische Tests:

- Schnelligkeit (Messdauer etwa 1 min)
- vergleichsweise einfach auszuwertende Spektren
- hohe Toleranz gegenüber Kontaminationen
- Unterscheidung von Mikroorganismen bis zur Stamm- und Unterart-Ebene
- hohe Genauigkeit und Treffsicherheit
- Potenzial zur weitestgehenden Automatisierung
- Potenzial zur Hochdurchsatzanalyse
- hohe Kosteneffizienz in der Routine

Zur Identifizierung der einzelnen Bakterienkolonien von den Sprossen wurde daher die MALDI-TOF-MS-Technik genutzt. Dabei konnten Bakterien der Gattung *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Pantoea* spp., *Klebsiella* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Rahnella* spp., *Herbaspirillum* sp., *Leuconostoc* spp., *Yersinia* sp. und der *Bacillus cereus* Gruppe mithilfe der SARAMIS™-Datenbank nachgewiesen werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Detektierte Bakterienspezies auf Mungobohnensprossen (Konfidenzniveau ≥ 90 %)

2 Tage vor Verfallsdatum	1 Tag vor Verfallsdatum	Tag des Verfallsdatums
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Leuconostoc</i> sp.
<i>Enterobacter cowanii</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	<i>Bacillus cereus</i> group
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Pseudomonas poae</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Yersinia</i> sp.	<i>Herbaspirillum huttiense</i>

Dabei ist auffällig, dass die potenziell humanpathogenen Bakterien *Yersinia* sp. und Bakterien der *Bacillus-cereus*-Gruppe nur in den Sprossen einen Tag vor dem Verfallsdatum bzw. am Tag des Verfallsdatums detektiert wurden. Dies steht im Gegensatz zu den Vermutungen, dass eine hohe Keimdichte ein Wachstum von pathogenen Bakterien limitieren könnte (EFSA 2011). Die Quantifizierung

der Ergebnisse ergab, dass alle Bakteriengattungen mit mindestens 7 log KbE/g auf den Sprossen vertreten waren. Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) hat für Keimlinge und Sprossen einen Warnwert von 3 log KbE/g für präsumtive *Bacillus cereus* herausgegeben (DGHM 2011). Damit lag die Sprossenprobe am Tag vor dem Verfallsdatum deutlich über dem angegebenen Warnwert. Neben den identifizierten Bakterien konnte ein großer Anteil an Bakterien nicht über die SARAMIS™-Datenbank identifiziert werden. Es ist somit nicht auszuschließen, dass es sich bei den unerkannten Bakterien um potenziell humanpathogene Bakterien handelt. Um unbekannte Isolate anhand ihres MALDI-TOF-MS-Spektrums identifizieren zu können, ist eine gut strukturierte Datenbank mit den Spektren der Zielorganismen erforderlich (WILKES et al. 2002). Je größer die Anzahl der in der Datenbank hinterlegten habitatspezifischen Spektren ist, umso eher können Krankheitserreger erkannt werden. Da die MALDI-TOF-MS-Technik hauptsächlich im medizinischen Bereich für die Identifizierung von Bakterien verwendet wird, fehlen in den verfügbaren Datenbanken Referenzspektren für lebensmittelassoziierte Bakterien. Aus diesem Grund werden im Rahmen des SAFEFRESH-Projektes unerkannte Bakterien über molekularbiologische Methoden identifiziert und die Spektren in die Datenbank eingefügt, sodass sie in Zukunft schneller identifiziert werden können.

Schlussfolgerungen

Um die Sicherheit von leichtverderblichen Frischeprodukten zu gewährleisten, ist ein gesamtheitliches Konzept zur Reduzierung der mikrobiologischen Gefahren entlang der Prozesskette nötig. Ein detailliertes Wissen über die mikrobielle Diversität auf den Produkten und deren Veränderung während der Verarbeitung ist dabei von grundlegender Bedeutung, um Dekontaminationsstrategien in die Prozesskette zu integrieren. Der Aufbau einer diagnostischen Datenbank soll die Grundlage für eine spätere Anwendung in der Lebensmittelkontrolle bilden. Indem kultivierungsunabhängige Ansätze zur Diagnose von nicht- oder schwerkultivierbaren Erregern einbezogen werden, können die Einsatzmöglichkeiten der zu entwickelnden Monitoringsysteme abgeschätzt werden. Außerdem können Mikroorganismen evaluiert werden, welche durch bisherige Monitoringsysteme nicht erfasst werden.

Literatur

- Barbuddhe, S. B.; Maier, T.; Schwarz, G.; Kostrzewa, M.; Hof, H.; Domann, E.; Chakraborty, T.; Hain, T. (2008): Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 74, pp. 5402–5407
- BfR (2011): Hohe Keimbelastung in Sprossen und küchenfertigen Salatmischungen. Information Nr. 017/2011 des BfR vom 9. Mai 2011
- DGHM (2011): Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln (Stand: November 2011). 29. Keimlinge und Sprossen zur Abgabe an den Verbraucher (Erstveröffentlichung 11.11.2010), http://www.dghm.org/m_275, Zugriff am 5.12.2014
- Dieckmann, R.; Helmuth, R.; Erhard, M.; Malorny, B. (2008): Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* 74, pp. 7767–7778
- DIN EN ISO 4833-2 (2014): Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen - Teil 2: Koloniezählung bei 30 °C mittels Oberflächenverfahren (ISO 4833-2:2013 + Cor. 1:2014); Deutsche Fassung EN ISO 4833-2:2013 + AC:2014, Beuth Verlag
- EFSA (2011): Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds. *EFSA Journal* 9(11), p. 2424

- Fenselau, C.; Demirev, P. A. (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20, pp. 157–171
- Francis, G. A.; Thomas, C.; O’beirne, D. (1999): The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science & Technology* 34(1), pp. 1–22
- Giebel, R. A.; Fredenberg, W.; Sandrin, T. R. (2008): Characterization of environmental isolates of *Enterococcus* spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Water Research* 42, pp. 931–940
- Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. (1991): Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Analytical Chemistry* 63, pp. 1193A–1203A
- Ho, Y. P.; Reddy, P. M. (2010): Identification of pathogens by mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 56, pp. 525–536
- Karas M.; Hillenkamp, F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry* 60, pp. 2299–2301
- Madonna, A. J.; Basile, F.; Ferrer, I.; Meetani, M. A.; Rees, J. C.; Voorhees, K. J. (2000): On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, pp. 2220–2229
- Mazzeo, M. F.; Sorrentino, A.; Gaita, M.; Cacace, G.; Di Stasio, M.; Facchiano, A.; Comi, G.; Malorni, A.; Siciliano, R. A. (2006): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 72, pp. 1180–1189
- NACMCF (1999): Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. *International Journal of Food Microbiology* 52, pp. 123–153
- Ochoa, M. L.; Harrington, P. B. (2005): Immunomagnetic isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and database searches. *Analytical Chemistry* 77, pp. 5258–5267
- Oliveira, M.; Usall, J.; Vinas, I.; Solsona, C.; Abadias, M. (2011): Transfer of *Listeria innocua* from contaminated compost and irrigation water to lettuce leaves. *Food Microbiology* 28(3), pp. 590–596
- Rijswick, C. van (2010): EU Fresh-cut Fruits and Vegetables Market Update. Rabobank Industry Note 246
- Siegrist, T. J.; Anderson, P. D.; Huen, W. H.; Kleinheinz, G. T.; McDermott, C. M.; Sandrin, T. R. (2007): Discrimination and characterization of environmental strains of *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Journal of Microbiological Methods* 68, pp. 554–562
- Weile, J.; Knabbe, C. (2009): Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394(3), pp. 731–742
- Wilkes, J. G.; Glover, K. L.; Holcomb, M.; Rafii, F.; Cao, X. X.; Sutherland, J. B.; McCarthy, S. A.; Letarte, S.; Bertrand, M. J. (2002): Defining and using microbial spectral databases. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13, pp. 875–887

Autoren

Dr.-Ing. Antje Fröhling ist wissenschaftliche Mitarbeiterin und **Dr.-Ing. Oliver Schlüter** ist Koordinator des Forschungsprogrammes „Qualität und Sicherheit von Lebens- und Futtermitteln“ am Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V., Max-Eyth-Alle 100, 14469 Potsdam, E-Mail: afroehling@atb-potsdam.de.

Dr. Marcel Erhard ist Mitarbeiter bei der RIPAC-LABOR GmbH, Am Mühlenberg 11, 14476 Potsdam-Golm.

Dr.-Ing. Peter Muranyi ist Geschäftsfeldmanager für den Bereich „Lebensmittelqualität und sensorische Akzeptanz“ am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV, Giegenhauser Straße 35, 85354 Freising.

Hinweis

Das Projekt SAFEFRESH (FKZ 13N12427) wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Programms „Forschung für die zivile Sicherheit“ der Bundesregierung gefördert.