

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

# Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora von vier handelsüblichen Tiefkühlprodukten

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

vorgelegt von  
**Marion Reinartz**  
Tierärztin aus Bonn

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3500

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Goetz Hildebrandt  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Fries

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):  
microorganisms, bacterial count, freezing, frozen foods, frozen storage

Tag der Promotion: 09.11.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-101-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Coverbild vorne © helkat - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

## Abkürzungsverzeichnis

- *A.* *Aeromonas*
- Abb. Abbildung
- AFPs antifreeze proteins (Frostschutzproteine)
- ATP Adenosintriphosphat
- $a_w$ -Wert „Wasseraktivität“ (Maß für das frei verfügbare Wasser in Lebensmitteln)
- *B.* *Bacillus*
- bzw. beziehungsweise
- *C.* *Citrobacter, Clostridium*
- ca. circa
- CAMP-Test Christie, Atkins, Munch-Peterson-Test
- CAPs cold acclimation proteins (Kälteakklimationsproteine)
- cm Zentimeter
- CO<sub>2</sub> Kohlendioxid
- COOH Carboxygruppe
- CSPs cold shock proteins (Kälteschockproteine)
- DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
- d.h. das heißt
- DNA desoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
- *E.* *Enterobacter, Enterococcus, Escherichia*
- et al. et alii
- evtl. eventuell
- g Gramm
- GKZ Gesamtkeimzahl
- HSPs heat shock proteins (Hitzeschockproteine)
- h Stunde
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods
- IfL Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin
- *K.* *Klebsiella*
- K<sup>+</sup> Kaliumionen
- KbE Kolonie bildende Einheiten
- kg Kilogramm
- l Liter
- *L.* *Leuconostoc, Listeria*
- LFGB Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
- log<sub>10</sub> Logarithmus zur Basis 10

- mg            Milligramm
- Mg<sup>2+</sup>        Magnesiumionen
- MgSO<sub>4</sub>       Magnesiumsulfat
- min          Minute
- ml            Milliliter
- MPN         Most Probable Number
- mRNA        Messenger RNA
- NaCl         Natriumchlorid
- nm            Nanometer
- NH<sub>2</sub>         funktionelle Gruppe der primären Amine und meisten Aminosäuren
- *P.*            *Pseudomonas*
- pH            potentia Hydrogenii
- RNA         ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
- RpoS         alternativer Sigmafaktor
- *S.*            *Saccharomyces, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus*
- s              Sekunde
- spp.         Spezies
- T              Temperatur
- Tab.         Tabelle
- TK            Tiefkühl
- TS-Agar      Trypton-Soja-Agar
- TSYEA-Agar Trypton-Soja-Hefe-Extrakt-Agar
- u.a.         unter anderem
- *V.*            *Vibrio*
- v.a.         vor allem
- VRBL-Agar  Violett Rot Galle Laktose Agar
- *Y.*            *Yersinia*
- z.B.         zum Beispiel
- %            Prozent
- °C            Grad Celsius

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung.....	1
2 Literatur .....	3
2.1 Gefrieren von Lebensmitteln.....	3
2.1.1 Gefrierpunkt .....	3
2.1.2 Gefriergeschwindigkeit.....	4
2.1.3 Eisbildung.....	4
2.1.4 Gewebeschäden .....	6
2.2 Einwirken von niedrigen Temperaturen auf die Mikroorganismen.....	7
2.2.1 Minimale Vermehrungstemperaturen der Mikroorganismen .....	7
2.2.2 Antworten der Bakterien auf thermalen Stress .....	8
2.3 Einwirken von Gefriertemperaturen auf die Mikroorganismen.....	12
2.3.1 Verhalten mikrobieller Zellen während des Gefrierens von Lebensmitteln .....	12
2.3.2 Schäden mikrobieller Zellen und mögliche Gründe für ihren Kältetod .....	13
2.3.3 Höhe der Abtötungsrate .....	20
2.3.4 Einflussfaktoren auf Überleben oder Absterben von Mikroorganismen .....	21
2.3.5 Subletale Schädigung durch das Gefrieren .....	39
2.3.6 Reparaturmöglichkeiten und Wiederbelebung .....	42
2.4 Mikrobiologische Parameter für gefrorene Lebensmittel .....	46
2.4.1 Gesamtkeimzahl .....	46
2.4.2 Grampositive Mikroorganismen .....	47
2.4.3 Gramnegative Keime .....	54
2.4.4 Hefen und Schimmelpilze .....	63
3 Materialien und Methoden.....	67
3.1 Material und Umfang der Vorversuche .....	67
3.2 Probenmaterial .....	67
3.2.1 Angaben zum Herstellungsprozess der ausgewählten Produkte.....	68
3.2.2 Probenumfang.....	69
3.3 Methoden.....	70
3.3.1 Probenversand.....	70
3.3.2 Bakteriologische Untersuchungen .....	70
4 Ergebnisse und Diskussion .....	82
4.1 Vorversuche.....	82
4.2 Mikrobiologischer Status der frischen, ungefrorenen Rohgemüseprodukte .....	82
4.3 Mikrobiologischer Status der Rohgemüseprodukte nach dem Einfrierprozess und vierwöchiger Tiefkühlagerung .....	85

## Inhaltsverzeichnis

---

4.4 Mikrobiologischer Status der TK-Fertiggerichte nach Produktion und vierwöchiger Tiefkühlagerung .....	92
4.5 Einjährige Tiefkühlagerung der vier Erzeugnisse .....	96
4.5.1 Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien und Laktobazillen.....	97
4.5.2 Enterobakteriazeen, coliforme Keime incl. <i>E. coli</i> sowie Enterokokken <sup>1</sup> .....	103
4.5.3 Pseudomonaden .....	113
4.5.4 Hefen und Schimmelpilze .....	115
4.5.5 Bewertung der unterschiedlichen Lebensmittel als umgebende Matrix während der einjährigen Gefrierlagerung.....	120
4.6 Wiederbelebungsstufen vor der quantitativen Untersuchung .....	121
5 Schlussfolgerung .....	129
6 Zusammenfassung .....	131
7 Summary .....	133
8 Literaturverzeichnis .....	135
9 Anhang .....	167
9.1 Ergebnistabellen .....	167
9.2 Nährmedien und Substanzen für die mikrobiologische Untersuchung .....	190
9.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial für die Herstellung der Nährmedien .....	203
9.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien für die bakteriologische Untersuchung .....	204
9.5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	205
9.5.1 Abbildungsverzeichnis .....	205
9.5.2 Tabellenverzeichnis .....	207
10 Publikationsverzeichnis .....	212
11 Danksagung .....	213
12 Selbständigkeitserklärung .....	215

# 1 Einleitung

Das Tiefgefrieren von Lebensmitteln und die Lagerung bei unter  $-18^{\circ}\text{C}$  gehören heute zu einer der Standardkonservierungsmethoden in der Lebensmitteltechnologie, und die Tiefkühlindustrie in Deutschland stellt einen stetig wachsenden Wirtschaftszweig dar.

Laut Angaben des Deutschen Tiefkühlinstitutes erzielte die Branche der tiefgefrorenen Lebensmittel (ohne Speiseeis) im Jahr 2009 im Lebensmittelhandel (einschließlich Heimdienste und Discounter) sowie im Außer-Haus-Markt einen Umsatz von 11,275 Milliarden Euro. Die Steigerung der Gesamtabsatzmenge im Jahre 2009 betrug 0,7 % zum Vorjahreswert. Über einen längeren Zeitraum betrachtet stieg der Pro-Kopf-Verbrauch von Tiefkühlkost (ohne Speiseeis) von 13,7 kg im Jahr 1978 auf 39,3 kg im Jahr 2009.

Unter den verschiedenen Möglichkeiten der Konservierung bietet das Tiefgefrieren eine sehr lange Haltbarkeit mit gleichbleibend hoher Qualität, ohne dass der Gefrierprozess die Beschaffenheit des Lebensmittels maßgeblich verändert. Diese Methode der Haltbarmachung eignet sich vor allem für Lebensmittel mit einem hohen Feuchtigkeitsgehalt, da die Kristallisation des gefrierbaren Wassers zusammen mit den niedrigen Temperaturen für mikrobielles Wachstum und die meisten qualitätsmindernden physikalischen und chemischen Prozesse ungünstige Bedingungen schafft (FARKAS 2007).

Mit der stetig steigenden Nachfrage an tiefgefrorenen Lebensmitteln wächst auch die Notwendigkeit, eine größtmögliche Qualität und Sicherheit dieser Produkte zu gewährleisten. Der mikrobiologische Status tiefgefrorener Lebensmittel wird in erster Linie durch den Gehalt an Mikroorganismen vor dem Einfrieren bestimmt, denn bei einer Temperatur von  $-18^{\circ}\text{C}$  und tiefer ist eine Vermehrung von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen nicht mehr möglich. Durch den Gefrierprozess und die anschließende Tiefgefrierlagerung kommt es zwar zum Absterben eines Teils der im frischen Produkt vorhandenen Mikroorganismen, einige Bakterienarten aber werden lediglich subletal geschädigt, andere wiederum nur für die Dauer der Gefrierlagerung inaktiviert. So besitzt qualitativ hochwertige und hygienisch einwandfreie Rohware als Ausgangsmaterial von Tiefkühlkost besondere Bedeutung, da Mikroorganismen beim Auftauprozess oder unsachgemäßer Handhabung der Produkte ihre ursprüngliche Aktivität und eventuelle Pathogenität zurückerlangen können.

Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, Erkenntnisse über das Verhalten der in handelsüblichen Tiefkühlprodukten vorhandenen mikrobiellen Flora während einer Tiefgefrierlagerung über ein Jahr zu erlangen. Durch quantitative mikrobiologische Untersuchung des für den Endverbraucher bestimmten Produkts vor dem Tiefgefrierprozess und monatliche Untersuchungen während der Tiefkühlagerung bei einer konstanten Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  sollte der Einfluss des Gefrierprozesses sowie der Temperatur und Lagerdauer - unter Berücksichtigung der Art des Produktes und seiner

## Einleitung

---

Vorbehandlung - auf den Keimstatus erfasst sowie Rückschlüsse auf Absterberate und Überlebensfähigkeit der verschiedenen Bakterienarten gezogen werden.

Darüber hinaus wurde die Notwendigkeit des Einsatzes einer Wiederbelebungsstufe vor der routinemäßigen quantitativen Untersuchung tiefgefrorener Lebensmittel überprüft. Werden Mikroorganismen durch Stressfaktoren, wozu auch Gefrierprozess und Tiefgefrierlagerung von Lebensmitteln gehören, subletal geschädigt, kann ihre Vermehrung bei der mikrobiologischen Analyse aufgrund der Anwesenheit selektiver Stoffe in den Untersuchungsmedien gestört sein (ARCHER 2004). Deshalb können das zur Untersuchung benutzte Kulturmedium und die Inkubationstemperatur die Wiederfindungsrate von Mikroorganismen nach Gefrieren und Auftauen beeinträchtigen (LUND 2000). Die vermuteten Zahlen lebensfähiger Bakterien in tiefgefrorenen Lebensmitteln sind wahrscheinlich unterschätzt (ICMSF 1980 a), sofern subletal geschädigte Keime nicht durch einen Resusziationsprozess in die Lage versetzt werden, die defekten Komponenten zu reparieren (WU 2008). In der Praxis wird bei der mikrobiologischen Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel jedoch auf einen solchen Resusziationsschritt verzichtet, während bei der gezielten Suche nach pathogenen Keimen vorgeschlagen wird, die mit der neunfachen Menge an Kochsalz-Pepton-Lösung angesetzte Ausgangsverdünnung eine Stunde bei Zimmertemperatur ruhen zu lassen (ZSCHALER 2004). Ziel dieses Teils der Versuche war es, zu erkennen, ob durch eine Wiederbelebungsstufe vor der quantitativen Untersuchung tiefgefrorener Lebensmittel ein signifikanter Unterschied der Keimzahlen im Vergleich zu den direkt untersuchten Erzeugnissen sichtbar wird, und daher ein Resusziationsschritt bei der Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel empfohlen wird.



---

## 2 Literatur

### 2.1 Gefrieren von Lebensmitteln

Das Gefrieren von Lebensmitteln bezeichnet einen Prozess des kontinuierlichen Wärmeentzugs mit dem Ergebnis der Umwandlung von Wasser zu Eis. Je schneller die Lebensmittel eingefroren werden, desto besser fällt die Produktqualität aus (FEHLHABER 2000). Der Gefriervorgang stellt eine physikalische Konservierungsmethode zum Zwecke der Verderbnisverhinderung und Qualitätsbewahrung für wasserhaltige Lebensmittel dar. Man unterscheidet zwischen gefrorenen Lebensmitteln mit Höchsttemperaturen von  $-12^{\circ}\text{C}$  (DIN 2002) und tiefgefrorenen Lebensmitteln (TLMV 2007). Tiefgefrierlagerung definiert sich durch Anwendung von Temperaturen unter  $-18^{\circ}\text{C}$ , wobei die Lebensmittel je nach Art und Zusammensetzung über einen längeren Zeitraum (einige Monate bis über ein Jahr) gelagert werden können, ohne dass es zu wesentlichen Veränderungen in den Produkteigenschaften kommt (FEHLHABER 2000). In der heutigen industriellen Herstellung von Tiefkühlerzeugnissen kommen verschiedene Gefriertechnologien - wie z.B. Luft- oder Kontaktgefrierverfahren, kryogene Tiefgefrierverfahren oder das Gefrieren in tiefgekühlten Flüssigkeiten - zum Einsatz.

#### 2.1.1 Gefrierpunkt

Unter physikalischem Gesichtspunkt können Lebensmittel als verdünnte wässrige Lösungen betrachtet werden, die einen Gefrierpunkt unterhalb des Wertes für reines Wasser besitzen. Die Bezeichnung „Gefrierpunkt“, d.h. die Grenze zwischen den Aggregatzuständen „fest“ und „flüssig“, ist für reines Wasser klar definiert und wird durch eine Gefrieretemperatur von  $0^{\circ}\text{C}$  charakterisiert. Bei Lebensmitteln kann dieser Punkt nicht so eindeutig fixiert werden; er hängt hier von der Konzentration gelöster Moleküle in der wässrigen Phase ab, und die Gefrierpunktserniedrigung beträgt  $1 \times 86^{\circ}\text{C mol}^{-1}\text{Liter}^{-1}$ . Somit hängt sie nicht unmittelbar vom Wassergehalt des Lebensmittels ab. Nach Erreichen des anfänglichen Gefrierpunktes mit beginnender Eiskristallbildung (kryostatischer Punkt) gefriert mit gleichzeitig stetig sinkenden Temperaturen nach und nach eine immer größere Menge Wasser, wodurch die gelösten Stoffe in der noch verbleibenden wässrigen Phase stärker konzentriert werden. Es verlangt schrittweise eine immer niedrigere Temperatur, um das restliche noch vorhandene Wasser zu gefrieren (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985) bis hin zum vollständigen Ausfrieren allen Wassers (eutektischer oder kryohydratischer Punkt). Somit findet das Gefrieren von Lebensmitteln nicht bei einer fest definierten Temperatur statt, sondern über einen Temperaturbereich (FARKAS 2007). Es setzt meist im Bereich zwischen  $-1$  bis  $-3^{\circ}\text{C}$  ein, und zwar abhängig von den Konzentrationen der gelösten Stoffe und der Zusammensetzung des Lebensmittels (CHATTOPADHYAY 2000, FARKAS 2007). So liegt z.B. der kryostatische

Gefrierpunkt von Porree bei  $-0,7^{\circ}\text{C}$  und von Champignons bei  $-0,9^{\circ}\text{C}$  (FRANCIS 2000), während er für Blumenkohl  $-1,1^{\circ}\text{C}$  sowie für Zwiebeln und Erbsen  $-1,2^{\circ}\text{C}$  beträgt. Der Gefrierpunkt von Fisch bewegt sich zwischen  $-0,6^{\circ}\text{C}$  und  $-2,0^{\circ}\text{C}$  (HEISS und EICHNER 1995); Fleisch beginnt bei ca.  $-1,5^{\circ}\text{C}$  zu gefrieren, und ungefähr die Hälfte des Fleischsaftes ist bei  $-2,5^{\circ}\text{C}$  gefroren (ICMSF 2005).

### 2.1.2 Gefriergeschwindigkeit

Die Gefriergeschwindigkeit kann als Temperaturveränderung pro Zeiteinheit (z.B.  $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ ) beschrieben werden. Da jedoch die Veränderungen der Temperatur an der Oberfläche nicht mit gleicher Geschwindigkeit wie im Kern ablaufen, ist diese Definition für das Gefrieren von Lebensmitteln weniger geeignet (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985). Ihr Gefrieren beginnt an der äußeren Oberfläche und setzt sich nach innen fort (SINGHAL und KULKARNI 2000). In diesem Fall kann die Gefriergeschwindigkeit passender als die Zeit beschrieben werden, die für die Absenkung der Temperatur im Lebensmittel von der Oberfläche bis zum thermischen Mittelpunkt benötigt wird, bzw. die Geschwindigkeit, mit der die Eisfront von der Oberfläche zum thermischen Mittelpunkt des Produktes vorrückt (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985). Dieser Parameter wird in Zentimetern pro Stunde gemessen ( $\text{cm h}^{-1}$ ) und ist abhängig von der Größe und dem Oberflächenbereich des einzufrierenden Gutes, seiner thermischen Leitfähigkeit und dem Temperaturgradienten innerhalb des Lebensmittels. Die Gefriergeschwindigkeit lässt sich in ultraschnell ( $>100 \text{ cm h}^{-1}$ ), sehr schnell ( $5-100 \text{ cm h}^{-1}$ ), schnell ( $0,5-5 \text{ cm h}^{-1}$ ), langsam ( $0,1-0,5 \text{ cm h}^{-1}$ ) und sehr langsam (unter  $0,1 \text{ cm h}^{-1}$ ) einteilen (HEISS und EICHNER 1995, KURZHALS 2004). Die industriell gebräuchlichen Schnell- bzw. Schockgefrierverfahren weisen alle eine Gefriergeschwindigkeit von mehr als  $1,0 \text{ cm h}^{-1}$  auf (KRÄMER 2007).

### 2.1.3 Eisbildung

Die überwiegende Menge der Lebensmittel besteht aus tierischen oder pflanzlichen Zellen oder beinhaltet diese. Der Wassergehalt derartiger Gewebe ist zwischen den Zellen als interzelluläre sowie innerhalb der Zellen als intrazelluläre Flüssigkeit gespeichert. Wenn das Produkt unter  $0^{\circ}\text{C}$  abgekühlt wird, beginnt ab Erreichen des Gefrierpunktes die Eisbildung, und das in den Lebensmitteln vorhandene Wasser wird von einem flüssigen in einen festen Zustand überführt. Weil innerhalb der Zellen höhere Konzentrationen an gelösten Stoffen als extrazellulär vorliegen, entstehen während des Gefrierens die ersten Eiskristalle außerhalb der Zelle. Der Gefrierpunkt ist dort, aufgrund des vermehrten Anteils wässriger Flüssigkeit im Vergleich zum intrazellulären Milieu, bereits bei höheren Temperaturen erreicht (FRANCIS 2000). Während des Gefrierprozesses wird mit fallender Temperatur stufenweise eine immer größere Menge des außerhalb der Zellen vorhandenen Wassers gefroren. Währenddessen

konzentrieren sich die gelösten Stoffe im noch nicht ausgefrorenen Wasser, wodurch der Gefrierpunkt der Lösung weiter herabgesenkt wird. Gleichzeitig vermindert sich auch der  $a_w$ -Wert weiterhin, da der größte Teil des noch nicht gefrorenen Wassers von den darin gelösten Stoffen gebunden ist. Somit besitzt die noch ungefrorene Lösung einen sehr niedrigen  $a_w$ -Wert (SCHMIDT-LORENZ 1970). Die weiter abfallende Temperatur wird von einer ansteigenden Konzentration gelöster Feststoffe im ungefrorenen Wasser begleitet. Diese Konzentrierung setzt sich solange fort, bis – wie bereits kurz dargestellt - der „eutektische Punkt“ erreicht ist und die verbleibende Lösung erstarrt (CHATTOPADHYAY 2000). Der „eutektische oder kryohydratische Punkt“ bezeichnet während des Gefrierens demnach jene Temperatur, an der die Konzentration der gelösten Stoffe das Löslichkeitslimit erreicht, wodurch diese ausfallen und auch das restliche Wasser gefriert. Das Eutektikum ist somit in einen anderen Aggregatzustand übergegangen. Ein komplett gefrorener Zustand mit einem komplexen System von Eiskristallen und kristallisierten löslichen Stoffen ergibt sich bei Früchten und Gemüse schon bei einer Temperatur von  $-15^{\circ}\text{C}$  (bzw.  $-16^{\circ}\text{C}$ ) bis  $-20^{\circ}\text{C}$ , bei Fleisch und Fisch erst unter  $-40^{\circ}\text{C}$  bzw. im Bereich von  $-50^{\circ}$  bis  $-70^{\circ}\text{C}$  (FARKAS 2007, SINGHAL und KULKARNI 2000). Ein gewisser Anteil des Wassers ist nicht ausfrierbar, denn ca. 0,2 bis 0,4 g Wasser pro Gramm Eiweißtrockenmasse oder Stärke sind fest gebunden (HEISS und EICHNER 1995).

Während des Einfrierprozesses kommt es zur Bildung von Eiskristallen, was als „Kristallisation“ von Wasser bezeichnet wird. Diese Kristallisation beinhaltet zwei Schritte, die oftmals gleichzeitig ablaufen: Die Bildung von sehr kleinen angeordneten Anhäufungen von Wassermolekülen, den sogenannten „Kristallisationskernen“, und das Wachstum der Kristalle. Bei sehr niedrigen Temperaturen bilden sich die Kristallisationskerne schnell in einer hohen Anzahl; bei höheren Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt läuft diese Kernbildung meist weniger rasch ab. Im Gegensatz dazu kann das Wachstum der entstandenen Eiskristalle bereits bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt stattfinden. Die Eiskristalle nehmen an Masse zu, indem sich weitere Wassermoleküle an die vorhandenen Kerne anlagern. Die Größe der einzelnen Eiskristalle hängt von der Anzahl der Kristallisationskerne ab. Sind nur wenige Kerne vorhanden, werden sich daraus zum Ende des Gefrierprozesses sehr große Eiskristalle gebildet haben, wohingegen viele Kerne zu zahlreichen kleinen Eiskristallen führen. Diese Vorgänge wiederum richten sich nach der Geschwindigkeit und damit nach der Temperatur, die zum Einfrieren verwendet wird. Bei sehr niedrigen Temperaturen, wie sie heute bei der industriellen Tiefkühlkostherstellung zur Anwendung kommen, bilden sich leicht viele Kristallisationskerne und somit kleine Eiskristalle (FENNEMA 1966). Langsame Gefriergeschwindigkeiten aufgrund höherer Temperaturen verursachen die Bildung von großen Eiskristallen (FARKAS 2007), welche sich langsam in dem zu gefrierenden Lebensmittel ausbreiten (SINGHAL und KULKARNI 2000).

### 2.1.4 Gewebeschäden

Die Gefriereschwindigkeit gilt als kritischer Parameter in Bezug auf die Gewebeschäden des Lebensmittels (FARKAS 2007). Bei niedrigen Gefriereschwindigkeiten ( $0,1 - 0,3 \text{ cm h}^{-1}$ ) bilden sich vor allem in den Interzellularräumen große Eiskristalle. Die extrazelluläre Kristallisation erfolgt bei langsamem Einfrieren im Bereich von  $-1$  bis  $-5^\circ\text{C}$ , während das Zellzytoplasma unterkühlt wird (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985, FARKAS 2007). Die großen Eiskristalle führen zu einer Erhöhung der Osmolarität des noch nicht ausgefrorenen Wassers, und derartige Konzentrationsgefälle bedingen einen Wasseraustritt aus den Zellen des Lebensmittels, wodurch die intrazelluläre Konzentration gelöster Stoffe stark ansteigt. Dieser Vorgang kann eine Denaturierung von Eiweißstoffen zur Folge haben, was wiederum bewirkt, dass die Wasserbindungsfähigkeit des Gewebes abnimmt und beim Auftauen Tropfverluste entstehen. Des Weiteren kommt es durch das Aufkonzentrieren der Restlösung zu einer Veränderung ihres pH-Wertes, woraus ebenfalls Proteinschädigungen resultieren können (HEISS und EICHNER 1995). Auch schrumpft das Zellvolumen durch den Wasseraustritt, was einen Kollaps der Zellmembran verursachen kann. Zu beachten ist ebenfalls, dass während des Gefrierens sich das Volumen des zu gefrierenden Stoffes ausdehnt. Allerdings fällt die Volumenzunahme aufgrund der vorhandenen Lösungsreste in den Lebensmitteln geringer als beim Gefrieren von reinem Wasser aus. Dennoch können diese Ausdehnungen zu mechanischen Beschädigungen an den Zellen führen (HEISS und EICHNER 1995). Die Wirkungen der aufkonzentrierten Lösungen, die Folgen der Ausdehnung des Wassers sowie die Größe der Eiskristalle lassen sich als Hauptfaktoren von Qualitätsveränderungen an tiefgefrorenen Lebensmitteln identifizieren.

Durch Schnell- bzw. Schockgefrierverfahren mit Geschwindigkeiten von über  $1,0 \text{ cm h}^{-1}$ , wie sie heute in den Tiefkühlkost produzierenden Betrieben ausschließlich verwendet werden, erfolgt eine rasche Bildung von kleinen Eiskristallen, die gleichmäßig im Extra- und Intrazellularräum verteilt sind. Die Wärme wird so schnell entzogen, dass für eine Dehydrierung der Zellen (bzw. einen Wasseraustritt aus diesen) keine Zeit bleibt und somit Eiskristalle ebenfalls innerhalb der Zellen gebildet werden. Dadurch kommt es nicht zu einer Aufkonzentrierung von gelösten Substanzen, und die Zellen behalten ihre normale Größe (KRÄMER 2007). Vor allem ist es wichtig, dass der Temperaturbereich von  $-1$  und  $-5^\circ\text{C}$  zügig durchschritten wird, da dort das Ausfrieren des größten Wasseranteils bzw. das Wachstum der Eiskristalle stattfinden (HEISS und EICHNER 1995). Das Resultat hoher Gefriereschwindigkeiten sind zahlreiche kleine Kristalle zwischen und innerhalb der Zellen und ein äußeres Erscheinungsbild des gefrorenen Gewebes, welches dem des ungefrorenen sehr nahe kommt (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985).

Ein langsam eingefrorenes Produkt wird beim Auftauen eine bestimmte Menge Wasser verlieren, wohingegen ein schnell eingefrorenes Produkt kaum Drip abgibt und somit eine

bessere Produktqualität besitzt (BOEGH-SOERENSEN und JUL 1985). Steigen die Gefriereschwindigkeiten jedoch zu stark an (über 5 cm/h), so kann dies wiederum zu Zerreißen an den Zellen führen und dadurch die Qualität der Erzeugnisse mindern (KRÄMER 2007).

## 2.2 Einwirken von niedrigen Temperaturen auf die Mikroorganismen

Die Konservierung von Lebensmitteln durch niedrige Temperaturen basiert auf dem Prinzip, dass die Aktivitäten lebensmittelassoziierter Mikroorganismen bei Temperaturen um bzw. über dem Gefrierpunkt verlangsamt und bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt gestoppt werden können. Das Einwirken niedriger Temperaturen kann zu Störungen im Stoffwechsel der Mikroorganismen und zu einem Erliegen des Wachstums und der Vermehrung führen (ROSE 1968). Kühl- und Gefriertemperaturen stellen somit Stressfaktoren für die Keime dar. Stress lässt sich als jede Modifikation von Umgebungsparametern definieren, welche zu Reaktionen des lebenden Organismus führt (THAMMAVONGS et al. 2008). Abhängig von der Intensität der jeweiligen Modifikation kommt es zu einer passiven oder aktiven Antwort des Organismus. Niedrige Temperaturen über 0°C sind für gewöhnlich mit einer aktiven Antwort der Bakterien verbunden, typischerweise mit der Synthese von bestimmten Proteinen (JONES und INOUE 1994), woraus eine vorübergehende metabolische Adaptation resultiert (PANOFF et al. 1998).

### 2.2.1 Minimale Vermehrungstemperaturen der Mikroorganismen

Thermophile und mesophile Organismen stellen ihr Wachstum bereits bei Temperaturen über 0°C ein; die minimale Temperatur, bei welcher eine Reproduktion von kältetoleranten Bakterien in Lebensmitteln stattfinden kann, liegt zwischen -5°C bis -8°C (GEIGES 1996). Beobachtungen von GEIGES und SCHULER (1988) zeigen, dass im Intervall von -2,5°C bis -5°C, abhängig vom Spektrum und der Komposition der initialen Flora, ein Wachstum von Bakterien in einem Bereich von 3-5 log<sub>10</sub> KbE/g möglich ist. Dies bestätigen Studien von SCHMIDT-LORENZ (1963) und SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT (1968). In ihren Experimenten beobachteten sie über den Zeitraum von einem Jahr mehrheitlich einen Anstieg der aeroben Gesamtkeimzahl um ca. 3 log<sub>10</sub> KbE/g bei einer Temperatur von -7,5°C. Bei -10°C hingegen wurde kein Wachstum mehr beobachtet. Die Autoren vertraten die Meinung, dass im Bereich um -10°C auch keine Vermehrung von psychrophilen Bakterien mehr zu erwarten sei, während WEINZIRL und GERDEMAN (1929) jedoch bakterielle Reproduktion bei Temperaturen von -10°C in Eiscreme nachwiesen.

Mikrobielle Vermehrung bei Gefriertemperaturen findet nur statt, wenn noch ausreichend freies Wasser im umgebenden Substrat vorhanden ist und die Zellen selbst nicht gefroren

sind. Durch das Einwirken niedriger Temperaturen kommt es zu einer Verlängerung der Latenzphase und der Generationszeit. Unter 0°C kann die Generationszeit bis zu 100 Stunden oder mehr betragen (ICMSF 1980 a). Die Latenzphase von Mikroorganismen in gemischtem Gemüse beläuft sich bei -5°C auf ca. 20 Wochen (GEIGES und SCHULER 1988). MICHENER und ELLIOTT (1964) berichteten über eine Verlängerung der Latenzphase von *Cladosporium herbarum*, einem sehr kältetoleranten Schimmelpilz, von einem Tag bei Zimmertemperatur auf 18 Tage bei -5°C. Die Generationszeit von *Bacillus (B.) psychrophilus* beträgt bei -5°C bis -7°C 204 Stunden (SINGHAL und KULKARNI 2000). Extrem psychrophile Spezies, die an das Überleben in sehr kalter Umgebung angepasst sind, vermehren sich allerdings noch bei weit niedrigeren Temperaturen. Doch auch hier laufen die Stoffwechselfvorgänge stark verlangsamt ab. So ergibt sich für die Vermehrungszeit einer sibirischen Bakterienspezies bei 5°C ein Tag, bei 0°C drei Tage, bei -10°C 20 Tage und bei -20°C 160 Tage (RIVKINA et al. 2000). Das Bakterium *Psychromonas ingrahamii* der arktischen See ist in der Lage, bei -12°C mit einer Generationszeit von 240 Stunden zu wachsen; bei 5°C beträgt diese nur 12 Stunden (BREEZE et al. 2004). Die Transkriptions- und Translationsapparate eines arktischen Stammes von *Pseudomonas (P.) syringae* sind in der Lage bei 0°C zu arbeiten, obgleich mit geringerer Effizienz im Vergleich zur Optimaltemperatur von 15-20°C. Im Gegensatz dazu wird die Transkription und Translation in Zellen von *E. coli* bei 0°C eingestellt (RAY et al. 1998). Auch nicht an extreme Kälte angepasste Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, sich noch bei Minustemperaturen zu vermehren, so einige psychrotrophe Spezies der Gattung *Pseudomonas* bei -7°C. Für Hefen wird eine Temperatur von -10°C bis -12°C beschrieben und einige Schimmelpilze sind in der Lage im Bereich von -15°C bis -18°C zu wachsen (KRÄMER 2007, SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968, SCHMIDT-LORENZ, 1970). Von MCCORMACK (1950) wurde das Wachstum einer speziellen Hefespezies auf gefrorenen Austern bei -18°C beobachtet; für diese Hefen wurden sogar Wachstumstemperaturen bis -34°C beschrieben (SINGHAL und KULKARNI 2000).

## 2.2.2 Antworten der Bakterien auf thermalen Stress

### 2.2.2.1 Messfühler der Umgebungstemperatur

Durch Untersuchungen mit dem antarktischen Bakterium *P. syringae* wurde deutlich, dass ein Erkennen der Umgebungstemperatur wahrscheinlich durch Phosphorylierungsreaktionen von Membranproteinen und Lipopolysacchariden (RAY et al. 1994 a, b) sowie über Ribosome vermittelt wird (RAY et al. 1998). In dem Cyanobakterium *Synechocystis* Stamm PCC 6803 wurde eine Histidinkinase als Messfühler für niedrige Temperaturen identifiziert (Suzuki et al. 2001).

### 2.2.2.2 Erhalt der Membranfluidität

Das Absenken der Umgebungstemperatur führt zu Veränderungen in der Lipidzusammensetzung sowie im Grad der Fettsäuresättigung der mikrobiellen Zellen (PANOFF et al. 1998). So steigt der Anteil ungesättigter Fettsäuren an, wenn die für das Wachstum benötigte Temperatur herabgesenkt wird (MARR und INGRAHAM 1962). Diese Veränderungen im Fettsäureprofil der Bakterienzellmembran finden statt, um ein Optimum an Fluidität zu gewährleisten (CHATTOPADHYAY 2006). Die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran hängen nämlich vom Grad der Fettsäuresättigung ab, denn dieser beeinflusst seinerseits den transmembranalen Übergang von Molekülen sowie weitere Funktionen der membrangebundenen Proteine. Eine Entsättigung der Fettsäuren bewirkt eine ansteigende Fluidität der Membran, was für ihre uneingeschränkte Aktivität bei niedrigen Temperaturen notwendig ist (MURATA und WADA 1995). Dieses Phänomen lässt sich z.B. sehr gut in Cyanobakterien wie *Synechocystis* PCC 6803 und *Anabaena variabilis* nachvollziehen (SATO und MURATA 1981, WADA und MURATA 1990). Des Weiteren wird durch diese Veränderungen die Temperatur herabgesetzt, bei der die Membranlipide gefrieren. So kann der höhere Anteil ungesättigter Fettsäuren die Fähigkeit der Zelle mitbestimmen, bei niedrigen Temperaturen ihre Aktivität zu behalten (ICMSF 1980 a), und aus diesem Grund weisen die Cytoplasmamembranen sowie Lipide psychrophiler Mikroorganismen einen höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren auf (MADIGAN und MARTINKO 2006).

### 2.2.2.3 Enzymaktivität

Die metabolischen Reaktionen der Mikroorganismen werden durch Enzyme katalysiert, deren Temperaturabhängigkeit die Geschwindigkeit fermentativer Prozesse verlangsamen lässt, sobald die Temperatur unter das Optimum der Enzyme sinkt (CHATTOPADHYAY 2000). Allerdings gibt es Beobachtungen, dass die verringerte Enzymaktivität ausgeglichen werden kann. In der antarktischen Hefespezies *Candida humicola* wurde eine Protease nachgewiesen, welche bei niedrigen Temperaturen vermehrt entsteht (RAY et al. 1992). Auf diese Weise helfen die gesteigerten Aktivitäten von Abbaureaktionen bei niedrigen Temperaturen dem Organismus, die knappen Nährstoffe zu verwenden (RAY et al. 1998). So berichteten auch ALFORD und PIERCE (1961), FRANK et al. (1963) sowie PETERSON und GUNDERSON (1960 a), dass die Enzymsynthese psychrophiler Bakterien im Bereich tiefer Temperaturen weitaus höher ausfallen kann als bei höheren Temperaturen. Im Bereich um 0°C und sehr wahrscheinlich auch bei Temperaturen darunter wird die verringerte Enzymaktivität durch eine gesteigerte Enzymproduktion ausgeglichen (GEIGES 1996). PETERSON und GUNDERSON (1960 b) machten die Entdeckung, dass ein bestimmter Stamm von *P. fluorescens*, welcher im Bereich von 0°C bis 30°C wächst, ein Maximum an proteolytischen Enzymen bei 0°C aufweist und sich dieser Wert vermindert, wenn die

Temperatur zunimmt. Die Tendenz zu ansteigender Enzymproduktion zeigte einen direkten Bezug zu der stark verminderten Enzymaktivität bei diesen niedrigen Temperaturen (ALFORD und PIERCE 1961, FRANK et al. 1963). Die kälteaktiven Enzyme psychrophiler Organismen weisen u.a. einen größeren Anteil von  $\alpha$ -Helix- und einen geringeren Anteil von  $\beta$ -Faltblattsekundärstruktur auf, wodurch sie höhere Flexibilität besitzen (MADIGAN und MARTINKO 2006).

### 2.2.2.4 Kälteschockproteine (Cold shock proteins, CSPs)

Kälteschockproteine (Cold shock proteins, CSPs) sind vorübergehend induzierte Stress-Proteine, die in mesophilen und psychophilen Bakterien auftreten können (CHATTOPADHYAY 2006). Wenn die Wachstumstemperatur vom Optimum auf eine niedrigere Temperatur über 0°C, welche trotzdem noch Wachstum erlaubt, sinkt, besteht die Stressantwort in einer sofortigen und zugleich vorübergehenden Synthese von sogenannten Kälteschockproteinen (JONES et al. 1987). Die Produktion von CSPs geht einher mit einem Abfall der Synthese von Eiweißen, die der Zelle ständig zur Verfügung gestellt werden (sogenannte „housekeeping proteins“) (GRAUMANN et al. 1996, JONES et al. 1987, PANOFF et al. 1997). CSPs sind u.a. in den Spezies *Escherichia (E.) coli* und *B. subtilis* isoliert worden (GRAUMANN et al. 1996, JONES et al. 1987). Die Funktionen einiger dieser Proteine stehen in Verbindung mit DNA- und RNA-Struktur und -Funktion sowie mit der Translation. Das „Haupt-Kälteschock-Protein“ von *E. coli* stellt das CspA dar (GOLDSTEIN et al. 1990). Es wird sehr stark durch niedrige Temperaturen induziert und kann bei 37°C nicht nachgewiesen werden (PANOFF et al. 1998). CspA fungiert als ein transkriptioneller Aktivator oder als ein m-RNA-Chaperone. „Chaperones“ bezeichnet eine Gruppe von Eiweißen, die neu synthetisierten Proteinen helfen, sich zu falten (CHATTOPADHYAY 2006). In *B. subtilis* wurde vor allem das CspB nachgewiesen und eindeutig mit der Kryoprotektion in Verbindung gebracht (PANOFF et al. 1998). Ebenfalls wurde eine ansteigende Ausbildung von 11 CSPs in *Enterococcus (E.) faecalis* beim Transfer des Bakteriums für 4 bis 30 Stunden in einen Temperaturbereich von 8°C beobachtet. Während dieser Zeit fand ein kontinuierliches Wachstum des Bakteriums statt (PANOFF et al. 1997). Es wird angenommen, dass CSPs Transkription und Translation in mesophilen Bakterien bei niedrigen Temperaturen ermöglichen bzw. erleichtern (CHATTOPADHYAY 2006).

### 2.2.2.5 Kälteakklimationsproteine (Cold acclimation proteins, CAPs)

Eine zweite Klasse von Proteinen, die Kälte-Akklimationsproteine (Cold acclimation proteins, CAPs), werden ausschließlich in psychophilen Bakterien produziert. Bei niedrigen Temperaturen werden sie von kältetoleranten Bakterien in großem Maße während der verlängerten Wachstumsphase gebildet (CHATTOPADHYAY 2006) und sind wahrscheinlich der



Schlüssel, der Leben bei sehr niedrigen Temperaturen erlaubt (HÉBRAUD und POTIER 1999). Allerdings waren PANOFF et al. (1997) in der Lage, die Synthese von derartigen Proteinen auch in einem mesophilen Bakterium (*E. faecalis* JH2-2) nachzuweisen. Einem Kälteakklimationsprotein von *Pantoea ananas* gelang es, Enzyme wieder zu falten, welche u.a. durch Hitze oder Kälte denaturiert waren; seine Affinität zu Kälte-denaturierten Enzymen überwog jedoch (KAWAHARA et al. 2000).

### 2.2.2.6 Hitzeschockproteine (Heat shock proteins, HSPs)

Hitze-Schock-Proteine (Heat shock proteins, HSPs) stellen eine Gruppe von Proteinen dar, von denen angenommen wird, dass sie die produzierenden Organismen vor thermalem Stress schützen. Einige HSPs scheinen jedoch auch bei Überleben und Wachstum von Bakterien bei niedrigen Temperaturen unterstützend zu wirken. Es wurde gezeigt, dass sich die hohe Absterberate von *E. coli*-Zellen in einer bei -80°C für 24 Stunden gelagerten Suspension wesentlich reduzierte, wenn die Keimsuspension vor der Kältelagerung bei 42°C für 30 min erhitzt wurde (CHOW und TUNG 1998). Viele der HSPs sind molekulare „Chaperones“, die den korrekten Zustand der Faltung von zellulären Proteinen während Stressbedingungen stabilisieren. Sie helfen auch bei der erneuten Faltung missgefalteter Proteine und einer Auflösung von aggregierten Proteinanhäufungen. Diese korrektiven Funktionen werden sowohl bei Hitze- als auch bei Kältestress beschrieben (CHATTOPADHYAY 2006).

### 2.2.2.7 Frostschutzproteine (Antifreeze proteins, AFPs)

Frostschutzproteine (Antifreeze proteins, AFPs) kommen natürlicherweise in Fischen, Insekten und Pflanzen vor (GILBERT et al. 2004). In Fischen bewirken sie bei Minustemperaturen ein Unterkühlen der Körperflüssigkeiten, wodurch ein Gefrieren vermieden wird (sog. „Thermische Hysterese“). Bei einigen gefriertoleranten Pflanzen und Insekten hemmen die AFPs die Rekristallisation von extrazellulären Eiskristallen. DUMAN und OLSEN (1993) haben die Anwesenheit von AFPs in Bakterien dokumentiert; z.B. werden diese in einer antarktischen *Moraxella* sp. produziert. Die AFPs scheinen von Wichtigkeit für das Überleben von Bakterien in extrem kalter Umgebung zu sein. Ob sie eine Gefriertoleranz bewirken oder das Gefrieren verhindern, ist noch nicht vollständig geklärt (CHATTOPADHYAY 2006).

### 2.2.2.8 Bildung von lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zellen

Von vielen Bakterien ist bekannt, dass sie einen ruhenden Zelltyp ausbilden können, welcher weiterhin Atmungsaktivität und Substanzaufnahme zeigt, sich aber unter den angewendeten Laborbedingungen nicht vermehren kann. Dieser Zustand wird als „viable but non culturable“

(VBNC) bezeichnet. Einige Wissenschaftler sehen darin eine Strategie der Bakterien, unter feindlichen Umgebungsbedingungen zu überleben (CHATTOPADHYAY 2006).

## 2.3 Einwirken von Gefriertemperaturen auf die Mikroorganismen

### 2.3.1 Verhalten mikrobieller Zellen während des Gefrierens von Lebensmitteln

Auf Einwirken von Temperaturen im Gefrierbereich reagieren die meisten Bakterien mit einer passiven Stressantwort. Ihre Vermehrung kann durch die sehr niedrigen Umgebungstemperaturen sowie den deutlich verminderten  $a_w$ -Wert des umgebenden Substrates beeinträchtigt bzw. gestoppt werden (SCHMIDT-LORENZ 1970). Zu einem Erliegen der mikrobiellen Stoffwechselprozesse kommt es dann, wenn aufgrund von Ausfrierung des Zellplasmas kein Stofftransport mehr stattfindet (MÜLLER und MÜLLER 1996). Kryogene Beschädigungen, wie z.B. Zellmembran- oder DNA-Destruktionen, können dann zu einem langsamen Absterben der Bakterien führen (HAINES 1938, WEISER und OSTERUD 1945). Während des Gefrierprozesses werden die Mikroorganismen, welche sich im zu gefrierenden Lebensmittel befinden, ebenso wie die sie umgebende Matrix durch das Einwirken der niedrigen Temperaturen beeinflusst. Ihr flüssiger Anteil, der Zellsaft, besteht aus einer kolloidalen Lösung von organischen Salzen und Mineralien, wodurch der Gefrierpunkt unter  $0^{\circ}\text{C}$  sinkt. Da verschiedene Stoffe gelöst sind, ergibt sich die Gefrierpunktserniedrigung einer Zelle aus der Summe der einzelnen Gefrierpunktserniedrigungen der in ihr enthaltenen Substanzen (TUCHSCHNEID und EMBLIK 1959). Das intrazelluläre Wasser bleibt vorerst ungefroren, bis die Temperatur unter  $-10$  bis  $-15^{\circ}\text{C}$  fällt, da die Zellmembran die Bildung von Eiskristallen bis zu diesen Temperaturen verhindert; demnach ist oberhalb dieses Temperaturbereiches nur mit einer extrazellulären Eiskristallisation zu rechnen (DAVIES und OBAFEMI 1985). Es findet aber eine Unterkühlung des Zellzytoplasmas statt, ein Vorgang, der auch als „Supercooling“ bezeichnet wird (MAZUR 1980). Während der extrazellulären Eisbildung konzentrieren sich die mikrobiellen Zellen im ungefrorenen Teil der Lösung (CHATTOPADHYAY 2000, LUND 2000). In diesem ist auch die Konzentration der extrazellulär gelösten Stoffe sehr hoch, wodurch sich ein osmotisches Konzentrationsgefälle zwischen Extra- und Intrazellularraum der Bakterienzelle ergibt. Um diesen Unterschied auszugleichen, gibt es zwei Möglichkeiten: Wasser kann entweder aus der Bakterienzelle herausdiffundieren und extrazellulär gefrieren, oder das intrazellulär vorhandene Wasser gefriert. Beide Vorgänge führen zu einer Konzentrierung der intrazellulären Lösung (MAZUR 1977, 1980). Wie der Ausgleich des osmotischen

Konzentrationsgefälles abläuft, hängt im Wesentlichen von der Geschwindigkeit des Tiefgefrierens ab (s. 2.3.4.1.1 und 2.3.4.1.2).

### **2.3.2 Schäden mikrobieller Zellen und mögliche Gründe für ihren Kältetod**

Das Gefrieren kann infolge morphologischer und struktureller Veränderungen der Zellhüllen und Zellinhaltsstoffe sowie durch Beeinflussung von Zellfunktionen zum Tod der Mikroorganismen führen. Über die Gründe für das Inaktivieren von Keimen nach Einwirken niedriger Temperaturen gibt es seit jeher verschiedene Theorien. WEISER und OSTERUD (1945), STILLE (1948) sowie BORGSTROM (1955) haben in ihren Studien unterschiedliche Hypothesen aus der Literatur zusammengetragen. 1758 wurde von DU HAMEL und 1800 von SENNEBIER (STILLE 1948) die Auffassung vertreten, dass es zur Eisbildung in den Zellen kommt und aufgrund der Ausdehnung des Wassers beim Gefrieren ein mechanisches Zerplatzen der Zellen erfolgt. MÜLLER-THURGAU stellte 1880 eine These auf, wonach die Zelle durch das Gefrieren Wasser verliert. Die daraus folgende Aufkonzentration gelöster Stoffe im Zellinneren würde das Gleichgewicht der Kolloide stören und eine schädliche Wirkung auf die Zelle ausüben. Ähnlich äußerten sich HARVEY (1918) sowie SCHANDER und SCHAFFNIT (1919). Eine andere Vermutung lautete, dass ein sofortiger Tod der Bakterien durch das Gefrieren eintritt, wenn sie durch die Bildung von extrazellulären Eiskristallen zerstört werden, also ein mechanisches Einwirken ihren Tod verursacht (KEITH 1913). Der Autor kam zu diesen Schlussfolgerungen, nachdem er die Ergebnisse von Studien mit Bakterien, welche er in unterschiedlichen Medien einfro, verglich und die größte Absterberate mit Wasser als Medium feststellte. Der schützende Effekt von Stoffen wie Zucker, Glycerin, Milch, Pepton etc. beruht seiner Meinung nach darauf, dass die Bakterien davor bewahrt werden, zwischen den sich bildenden Eiskristallen zerdrückt zu werden. Die gleiche Auffassung vertraten HILLIARD und DAVIS (1918), ebenso wie WEISER und OSTERUD (1945), welche den sofortigen Tod der Mikroorganismen mit den mechanischen Auswirkungen der extrazellulären Eisbildung erklärten. Auch HOLLANDER und NELL (1954) formulierten die These, dass der Bakterientod während des Gefrierens eine Folge der mechanischen Kompression durch sich ausdehnendes Wasser bildet. Die Hypothese des Zelltodes durch mechanische Beschädigung wurde durch Studien von HAINES (1938) widerlegt. In seinen Experimenten ergaben sich bei Einfriertemperaturen von  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $-70^{\circ}\text{C}$  die gleiche Absterberate der Zellen von *P. aeruginosa*. Demnach wirkte die geringere Gefriereschwindigkeit, welche größere Eiskristalle hervorbringt, nicht stärker letal als die höhere Geschwindigkeit. Die Temperatur der anschließenden Lagerung nahm jedoch einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben: Während einer Gefrierlagerung der Zellen bei variierenden Temperaturen von  $-1$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$  trat die größte Absterberate im Bereich der

## Literatur

---

höheren Temperaturen auf, und bei  $-2^{\circ}\text{C}$  erreichte die Letalität ihr Maximum. Bei dieser Temperatur war eine sehr schnelle Koagulation der zellulären Proteine von *P. aeruginosa* zu beobachten. Auch VAN DEN BROEK (1949) sah die Proteindenaturierung als einen wesentlichen Faktor für den Mikroorganismen Tod an. STILLE (1948) räumte die Möglichkeit ein, dass der Kältetod der Organismen primär durch ein einzelnes Trefferereignis im Zellkern ausgelöst werden könnte.

Wahrscheinlicher kommt es jedoch durch das Gefrieren zu einer Summe unterschiedlicher Beschädigungen. Von CALCOTT und MACLEOD (1974) wurden verschiedene Gründe für die Kälteschäden der Mikroorganismen aufgelistet: Thermischer Schock, Einfluss der Konzentration von extrazellulär gelösten Substanzen, Toxizität von konzentrierten intrazellulären Substanzen, Dehydratation, interne Eisbildung und Erreichen eines minimalen Zellvolumens. Die Beschädigungen der Mikroorganismen durch das Gefrieren äußern sich in einem Verlust der Lebensfähigkeit, Auslaufen von zellulärem Material, zunehmender Empfindlichkeit gegenüber oberflächenaktiven Substanzen und anderen Verbindungen, gesteigertem Nährstoffbedarf, verlängerter lag-Phase und angestiegener Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung (MACLEOD und CALCOTT 1976, RAY und SPECK 1973 b). Es können sowohl strukturelle als auch funktionelle Komponenten des Organismus betroffen sein. Dazu gehören z.B. Zellwand, cytoplasmatische oder innere Membran, Ribosomen, DNA, RNA sowie Enzyme (RAY 1979, 1993) und andere Proteine. Fermente werden inaktiviert bzw. Proteine denaturiert, aber auch DNA- und RNA-Funktionen sowie die Tätigkeit von zellulären Organellen behindert (FARKAS 2007). Schäden an funktionellen Komponenten, welche mit Stoffwechselaktivitäten verbunden sind, äußern sich in einer metabolischen Beschädigung des Organismus (JAY et al. 2005, RAY 1979). Des Weiteren verändert eine stärkere Konzentration der zellulären Flüssigkeiten den pH-Wert und die Ionenstärke, was zu irreversiblen Schädigungen der chemischen und physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas und seiner kolloidalen Struktur führt (MÜLLER und MÜLLER 1996). TABATABAIE und MORTAZAVI (2008) setzten Milchsäurebakterien für zwei Stunden unterschiedlichen Kühl- und Gefriertemperaturen aus. Dabei kam es mit fortlaufender Temperaturerniedrigung zu einem Absinken des pH-Wertes und entsprechend ansteigendem Säuregehalt der Bakterien sowie gleichzeitiger Reduktion der Gesamtkeimzahl. Tabelle 1 zeigt die Veränderungen von pH-Wert, Säuregehalt und Gesamtkeimzahl bei diesen Versuchen.

Tabelle 1: pH-Wert, Säuregehalt und Gesamtkeimzahl bei verschiedenen Temperaturen (nach TABATABAIE und MORTAZAVI 2008)

	Kontrolle	4°C	0°C	-5°C	-10°C	-20°C
pH	6,40	6,16	6,16	6,13	6,03	6,06
Säuregehalt	0,20	0,20	0,21	0,28	0,28	0,29
Keimzahl	5,98	5,95	5,89	4,96	4,94	4,94

In Beschädigungen der Zellmembran und den damit verbundenen Störungen im Stoffwechsel, welche durch unzureichende Energiegewinnung nicht mehr ausgeglichen werden können, sowie dem Verlust von lebensnotwendigen Inhaltsstoffen liegt die Hauptursache für den Kältetod von Mikroorganismen (FARKAS 2007). Allerdings sind einige Veränderungen in gefrierbeschädigten Keimen reversibel. So ist es z.B. möglich, dass Wand- und Membranschäden an der Zelle repariert werden (CALCOTT et al. 1979).

### 2.3.2.1 Morphologische Veränderungen

In Abhängigkeit von der Gefriereschwindigkeit schrumpfen die Zellen aufgrund osmotischer Konzentrationsgefälle. Ab Erreichen eines minimalen Zellvolumens kann dieser Vorgang zu Membranzerreißen (BAUST 1973) und zum Tod der Mikroorganismen führen (CALCOTT und MACLEOD 1974). HANSEN und NOSSAL (1955) beobachteten in Gefrierversuchen mit drei Bäckerhefespezies ein Schrumpfen der Zellen sowie Verformungen der Zellbegrenzungen. Weiterhin stellten RAPATZ und LUYET (1963) fest, dass Zellen von *E. coli* schrumpften, wenn sie langsam eingefroren wurden (1°C/min). Bei hohen Gefriereschwindigkeiten (100°C/min) behielten die Zellen dagegen ihre normale Größe, wiesen aber viele intrazelluläre Hohlräume auf, die vermutlich von Eiskristallen besetzt waren (DAVIES und OBAFEMI 1985). Bei der Hefe *Saccharomyces (S.) cerevisiae* verschwand durch das Gefrieren die markante zentrale Zellvakuole, und das Zellvolumen sank ungefähr um die Hälfte ab (HANSEN und NOSSAL 1955, MAZUR 1961). Auch MEYER et al. (1975) wiesen bei einer psychophilen und einer mesophilen Hefespezies den Verlust ihrer großen charakteristischen Zellvakuolen nach. Die morphologischen Veränderungen variieren sehr stark, und die Zellen können durch das Gefrieren auch andere Abnormalitäten zeigen, wie z.B. Anschwellen und verändertes Anfärbeverhalten (NEI 1960, SATO 1958). TABATABAIE und MORTAZAVI (2008) stellten an verschiedenen Milchsäurebakterien bei Einwirkung von Temperaturen unter -20°C für zwei Stunden Gefrieränderungen in Form von feinsten Rissen und Poren fest. Im Gegensatz dazu fand ARPAI (1962) über 40 Jahre zuvor keine signifikanten morphologischen Unterschiede an durch Gefrieren beschädigten und unbeschädigten Zellen.

### 2.3.2.2 Schäden an der Zellmembran und der Zellwand

Unter allen Komponenten scheinen die Zellbegrenzungen durch das Gefrieren am stärksten beeinträchtigt zu werden (HURST 1977, JAY et al. 2005). So weisen die meisten verletzten Zellen Beschädigungen an Oberflächenstrukturen und cytoplasmatischer Membran auf (WU 2008). Die schnellen Übergänge des Membranzustandes beim Gefrieren von flüssig zu gelartig bewirken einen Kontrollverlust der Permeabilität von Zytoplasma- und anderen Membranen (MACLEOD und CALCOTT 1976). Die interzelluläre Eiskristallbildung verursacht zudem ihre mechanische Beschädigung (FARKAS 2007). SOUZU (1973) kam durch Studien mit Hefen zu dem Schluss, dass viele kovalente Bindungen der Membranfette wahrscheinlich zerrissen werden und die Lipidform sich von der gebundenen in eine ungebundene Form umwandelt. Auch ALVES-ARAÚJO et al. (2004) sahen in ihren Studien mit Hefezellen die Plasmamembran als das primäre Ziel von Gefrierstress an, wobei Hydroxylradikale die für solche Membranschäden verantwortlichen Agentien darstellen. Die große Gefrierresistenz der Hefe *Torulasporea delbrueckii* führten sie auf eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativen Reaktionen der Lipide zurück. In gramnegativen Bakterien werden die Lipopolysaccharide der Zellwand durch das Gefrieren aufgrund von Destabilisierung der Ionenbindungen beeinträchtigt (RAY 1986). SCHMIDT-LORENZ (1974) sah bei diesen Mikroorganismen die Möglichkeit einer Denaturierung der Zellwand-Lipoproteine, welche kovalent mit dem Murein verbunden sind. Diese Zellwandschäden manifestieren sich in einem Resistenzverlust der Zellen gegenüber verschiedenen Agentien wie Gallensalzen (TAKANO et al. 1979) oder Natriumlaurylsulfat und Lysozymen (RAY und SPECK 1972 a). Des Weiteren kam SOUZU (1980) durch Versuche mit *E. coli* zu der Erkenntnis, dass die Art der Membranschäden von der Geschwindigkeit des Einfrierens abhängt. So verursachen sehr schnelles Gefrieren ( $200^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) und Auftauen sowohl Schäden an der zytoplasmatischen als auch an der äußeren Membran, wohingegen langsames Gefrieren ( $3\text{-}10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) und Auftauen hauptsächlich die äußere Membran beschädigen. Temperaturen unter  $-20^{\circ}\text{C}$  zeigen im Vergleich zu Temperaturen von  $-10^{\circ}\text{C}$  geringere Auswirkungen auf die Zellwand der Bakterien (GORMLEY et al. 2002). LEE et al. (1977) stellten während des Gefrierens einen Zusammenhang zwischen der Salzeempfindlichkeit der Zellen und einer ganz bestimmten Cytochromzusammensetzung fest. Bindungen zwischen Cytochromen und anderen Membranbestandteilen wurden durch die Anwesenheit von Natriumchlorid während des Gefrierens zerrissen, was sich in einem Verlust der Unversehrtheit der Membran und ihrer Funktion äußerte.

### 2.3.2.3 Verlust zellulärer Stoffe

Die Schäden an der Zellmembran erlauben ein Entweichen von lebensnotwendigen Komponenten wie Proteinen, Phospholipiden und Lipopolysacchariden aus der Zelle (SOUZU 1980), und ebenso kann es zu einem Verlust von  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ , Amino- und Nucleinsäuren kommen (HURST 1977, PALUMBO 1989). Gefrorene Zellen von *E. coli* gaben z.B. Aminosäuren, Ribonucleinsäuren und Peptide frei (WU 2008). Ihr Tod traf umso früher ein, je mehr Nucleinsäuren und proteinähnliche Substanzen verloren gingen sowie ATP aus den Zellen entwich (SINGHAL und KULKARNI 2000). Außerdem wurde die Freisetzung von Malat, Glucose-6-Phosphat, mehreren Dehydrogenasen (SOUZU 1980), zyklischer Phosphodiesterase und  $\beta$ -Galactosidase (CALCOTT und MACLEOD 1975) beobachtet. Nach BUSTA (1976) beeinträchtigt der Verlust von intrazellulären Komponenten das Wachstum und die Replikation der Zelle. Eine höhere Freisetzung von Zellbestandteilen sowie eine geringere Überlebensrate der Keime wurde eher während des langsamen als des schnelleren Gefrierens und Auftauens festgestellt (SOUZU 1980).

### 2.3.2.4 Gesteigerte Empfindlichkeit der Zellen

Die Beeinträchtigung der Barrieren, welche die Zelle normalerweise schützen, führt zum Anstieg der Empfindlichkeit bzw. zur Verringerung der Resistenz u. a. gegenüber oberflächenaktiven Substanzen, Antibiotika (SINGHAL und KULKARNI 2000) sowie gegenüber Bestrahlung (WU 2008). So wurden in Studien mit *E. coli* ansteigende Empfindlichkeiten gegenüber Kochsalz (LEE et al. 1977), Gallensalzen, Desoxycholaten, Lysozymen, Laurylsulfat (RAY und SPECK 1972 b) und Actinomycin D (RAY et al. 1976) festgestellt. Das veränderte Verhalten resultiert aus der Beschädigung der Zellwände (RAY et al. 1976), wodurch es Lysozymen, oberflächenaktiven Substanzen und anderen Agentien erleichtert wird, in Kontakt mit ihren entsprechenden Substraten zu kommen (RAY und SPECK 1972 b). Auch für *Listeria (L.) monocytogenes* wurde eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Lysozymen und Lipasen nach Einwirkung von Gefrier- und Auftauprozessen festgestellt (ARCHER 2004).

### 2.3.2.5 Schäden an Proteinen

Durch das Gefrieren kommt es zu einer Denaturierung der bakteriellen Proteine (FARKAS 2007) sowie zu ihrem Auslaufen aus den Zellen (DAVIES und OBAFEMI 1985). BAUST (1973) erwähnte die Möglichkeit einer Verringerung des Abstandes zwischen einzelnen Proteinen, gefolgt von der Bildung abnormer Disulfidbrücken. Es scheint durch das Gefrieren zu einem Verschwinden einiger SH-Gruppen sowie zu einem Auseinanderbrechen von Lipoproteingruppen zu kommen. Dieser Zustand der Proteine wird u. a. durch den verringerten Wassergehalt und die Konzentration von Elektrolyten in der Zelle bewirkt (JAY

1978). Darüber hinaus werden intramolekulare Bindungen in Proteinmolekülen zerrissen, was ebenfalls zu ihrer Denaturierung beiträgt. Die genannten Veränderungen bewirken z.B. einen Aktivitätsverlust der Enzyme. Da für die Stabilität von Proteinmolekülen Wasserstoffbrücken essentiell sind, beugen Substanzen, welche diese Bindungen stabilisieren, einer Enzyminaktivierung vor. Zu diesen Verbindungen gehören z.B. Aminosäuren und ähnliche Stoffe mit einem niedrigen Molekulargewicht (CHATTOPADHYAY 2000).

Gefrier- und Auftauvorgänge gelten außerdem als ursächlich dafür, dass ein Entfalten der helikalen Struktur von faserförmigen Proteinen eintritt. Eine konformative Veränderung der globulären Proteine findet dagegen nicht statt, was in ihrer höheren Stabilität begründet liegt (HANAFUSA 1967). Aufgrund des Vorhandenseins großer Mengen freier Aminosäuren im Gefriermedium von *E. coli* zog GABIS (1970) die Schlussfolgerung, dass der Gefrierprozess einige ruhende proteolytische Enzyme aktiviert habe, woraus eine verstärkte Zerstörung von Proteinen resultierte. Außerdem nahm er aufgrund des höheren Anteils basischer Aminosäuren zusammen mit Glycin, Alanin und Leucin an, dass ribosomale Proteine, welche viele dieser Aminosäuren besitzen, in der gefrorenen Zelle hydrolysiert wurden.

### 2.3.2.6 Enzymaktivität

Das Einwirken von Gefriertemperaturen führt zu Veränderungen der mikrobiellen Enzymaktivitäten. COWMAN und SPECK (1965) konnten in milchsäurebildenden Streptokokken während der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über 60 Tage einen Verlust der Säurebildungsfähigkeit sowie der proteolytischen Aktivität feststellen. Bei  $-196^{\circ}\text{C}$  blieben sowohl die Fähigkeit zur Milchsäureproduktion als auch die Proteinaseaktivität während der Lagerzeit erhalten. Bereits im Lebensmittel vorhandene Fermente werden allerdings durch die niedrigen Temperaturen nicht beeinflusst. Diese Enzyme, ob mikrobiellen Ursprungs oder natürlicherweise im Lebensmittel vorkommend, können bei der Lagertemperatur gefrorener Produkte weiterhin aktiv bleiben. So verlieren die von abgetöteten Zellen in das Lebensmittel abgegebenen Enzyme auch nach dem Absterben der Keime ihre Wirksamkeit nicht (SCHMIDT-LORENZ 1970). Wenn enzymatische Aktivität einmal begonnen hat, vermag eine Befrostung diese nur zu verlangsamen, aber nicht zu beenden (ICMSF 1980 a). Über einen Zeitraum von mehreren Wochen beobachteten BRAUN et al. (1997), dass Gefriertemperaturen von  $-2^{\circ}\text{C}$  nicht in jedem Fall eine ausreichende Inhibition verschiedener Proteasen und Lipasen bewirkten. So können proteolytische Organismen die Lebensmittelqualität während der Gefrierlagerung vermindern (PETERSON und GUNDERSON 1960), da einige Proteasen noch bei Temperaturen unter  $-18^{\circ}\text{C}$  arbeiten (BALLS und LINEWEAVER 1938, CHRISTOPHERSEN 1968) und einige Lipasen noch bei  $-30^{\circ}\text{C}$  aktiv sind (KIERMEIER 1947, MÜLLER und MÜLLER 1996). In Versuchen mit einer Lipase von *Pseudomonas*



*fluorescens* dokumentierte ANDERSSON (1980) jedoch, dass die Reaktionen bei -20 sowie -30°C stagnierten, bei -10°C allerdings wieder einsetzten.

### 2.3.2.7 Schäden an Nucleinsäuren

Eine Zellbeschädigung durch Stressoren wie Gefriertemperaturen ist oftmals auch mit der Beeinträchtigung der DNA oder RNA in diesen Organismen verbunden. Die DNA kann durch Gefrieren sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche erleiden (GRECZ et al. 1980, GRECZ und EL-ZAWAHRY 1984). ASHWOOD-SMITH et al. (1972) waren hingegen nicht in der Lage, Brüche der DNA in gefrierbeschädigten Zellen von *E. coli* nachzuweisen. Durch die Zerstörungen in den Membranen der Zelle kann es weiterhin zu einem Austreten von Nucleinsäuren kommen, allerdings wurde lediglich über den Schwund von RNA berichtet (DAVIES und OBAFEMI 1985). Ein derartiger Verlust ist gleichzeitig mit einem ribosomalen Schaden der Zelle verbunden (BANWART 1989).

### 2.3.2.8 Atmungskette/Oxidative Phosphorylierung

Das Gefrieren reduziert die Phosphorylierungsaktivität, was wahrscheinlich in Veränderungen der Elektronentransportteilchen innerhalb der Membranstruktur begründet liegt (SINGHAL und KULKARNI 2000). So kommt es aufgrund von Zerreißen in der Elektronentransportkette zu einer verringerten Atmungsaktivität der Mikroorganismen (LEE et al. 1977). Gefrieren äußert sich außerdem in einem Verlust von cytoplasmatischen Gasen wie Sauerstoff oder Kohlendioxid. Die Sauerstoffreduzierung unterdrückt bei aerob lebenden Zellen die Atmungsreaktionen (JAY 1978).

Beim Gefrieren der Hefe *S. cerevisiae* wurde ein Abfall der Atmungsaktivität auf unter 20 % des normalerweise Üblichen beobachtet. Das Herauswaschen von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol dürfte dieses Phänomen bewirken (MORI et al. 1986).

### 2.3.2.9 Ernährungsansprüche

Als eine weitere Folge des Einwirkens niedriger Temperaturen gelten ansteigende Nährstoffbedürfnisse der Zellen, z.B. nach Aminosäuren oder Peptiden, zumal Mikroorganismen die Fähigkeit verlieren, essentielle Nährstoffe aus einfachen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu synthetisieren (RAY und SPECK 1973 b). So benötigen z.B. gramnegative Bakterien nach dem Gefrieren Peptide als Startmaterial für die Proteinsynthese (SINGHAL und KULKARNI 2000). Der gesteigerte Nährstoffbedarf der Zellen äußert sich in der Unfähigkeit, auf nährstoffarmen Medien Kolonien zu bilden. So waren durch Gefrieren beschädigte Zellen nicht in der Lage, auf einem einfachen Glucose-Salz-Agar zu wachsen, vermochten sich aber durchaus auf einem nährstoffreichen, komplexen Medium, wie z.B. Trypton-Soja-Agar, zu entwickeln (STRAKA und STOKES 1959). In einer

Kultur können bis zu 40 % der Keime von derart gestiegenen Nährstoffbedürfnissen betroffen sein (JAY 1978).

### 2.3.3 Höhe der Abtötungsrate

Es existieren in der Literatur unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Angaben über die letale Wirkung des Gefrierens und der Gefrierlagerung. Ein objektiver Vergleich der einzelnen Resultate, welche sich in der Art der Lebensmittel, der Einfrier- und der Lagerungstemperatur, der Lagerdauer sowie in den eingesetzten Mikroorganismen unterscheiden, ist aufgrund der recht variablen Rahmenbedingungen kaum möglich. SMART (1934) wies in gefrorenen Früchten und Gemüse nach über einjähriger Lagerung bei  $-10^{\circ}\text{C}$  mehr als  $10^6$  KbE/g von Bakterien und Pilzen (u.a. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* und *Cladosporium* spp.) nach; die durchschnittliche Reduktion der Bakterienanzahl gab die Autorin mit 99,3 % an. In Studien mit frischen, gewaschenen Champignons, die eine anfängliche mikrobielle Kontamination zwischen  $10^4$  und  $10^5$  KbE/g aufwiesen, beobachtete SMART (1939) während sechsmonatiger Lagerung bei  $-9^{\circ}\text{C}$  ein Absinken der Bakterienanzahl um ca. 2/3. GEER et al. (1933) stellten nach Gefrieren und einmonatiger Gefrierlagerung eine 84%ige Reduktion der Mikroorganismenzahlen fest. PROCTOR und PHILLIPS (1948) berichteten von einem „merklichen Rückgang“ der Keime während einer Gefrierlagerung in gekochtem Fleisch. Dass Gefrierprozesse, wie sie in der Lebensmittelindustrie üblich sind, die meisten Mikroorganismen im Substrat abtöten würden, postulierten MITSCHERLICH und MARTH (1984). Lediglich ein kleiner Anteil könne vor allem in proteinreichen Matrices wie Fleisch, Fisch und Eiern überleben, da Eiweißkomponenten nur wenige Bakterien gegen Beschädigung durch niedrige Temperaturen schützen. SCHMIDT-LORENZ (1970) konstatierte dagegen, dass man aufgrund der vielen protektiv wirkenden Bestandteile, durch Gefrieren und längere Gefrierlagerung in den meisten Lebensmitteln nur eine relativ geringe Reduzierung der Ausgangskeimzahl erreicht. Die Überlebensrate der Ausgangskeimzahl könne zwischen 1 und 100 % liegen, unter „normalen“ Umständen müsse allerdings mit dem Absterben von lediglich 90 bis 50 % der Mikroorganismen gerechnet werden. MOUNTNEY und GOULD (1988) berichteten ebenfalls, dass Gefriertemperaturen kein effektives Mittel seien, um Mikroorganismen in Lebensmitteln zu zerstören. Obwohl ihre Gesamtzahl normalerweise reduziert würde, würden noch sehr viele Spezies am Ende der Lagerungsperiode wie im ursprünglichen, ungefrorenen Lebensmittel vorhanden sein. Auch SPECK und RAY (1977) vertraten die Auffassung, dass der Großteil der Mikroorganismen nur beschädigt wäre und Behandlungen wie Gefrieren, Lagerung oder Auftauen überleben dürfte. Abhängig von verschiedenen Faktoren scheinen nur einige Mikroorganismen wirklich abgetötet zu werden. In Studien von BROWN und HILL (1984), die den Einfluss des Gefrierens auf die Gesamtkeimzahl sowie Anzahl verschiedener Pilzspezies in Gerste und Schweinefutter

überprüfen, ließ sich keine Veränderung durch das Tiefgefrieren nachweisen. Nach GEIGES (1996) beträgt die Reduktion der Keimzahl durch Gefrieren, Gefrierlagerung und Auftauen zwischen 20 % und 99 % bezogen auf die Originalflora. Allerdins sah er keine praktische Relevanz in einer Verringerung der Bakterienanzahl durch diese Prozesse. Laut ICMSF kommt es bei Lagertemperaturen von -20°C zu einer Reduktion der Keimzahlen von ca. 5 % pro Monat, woraus keine wesentliche Verbesserung der Produktqualität resultiert (KRÄMER 2007).

Da es in der amtlichen Überwachung von Lebensmittelproben aufgrund verschiedenster organisatorischer Zwänge oftmals zur gängigen Praxis gehört, Lebensmittel vor der mikrobiologischen Untersuchung einzufrieren, wurden von BÖHMLER et al. (2008) Untersuchungen zum Einflusses des Einfrierens auf den Keimgehalt durchgeführt. 71 % aller bei -20°C für ein bis drei Tage gelagerten Proben (Sahne sowie Backwaren mit nicht durcherhitzter Füllung) wiesen im Vergleich mit direkt untersuchten Proben einen Keimgehalt (Gesamtkeimzahl, Enterobakteriazeen und Pseudomonaden) auf, der innerhalb einer tolerierten Abweichung von +/- 0,5 log<sub>10</sub> KbE/g lag. Die Autoren kamen tendenziell zu dem Schluss, dass derartige Lebensmittel hinsichtlich der überprüften Keimgruppen eingefroren werden können, ohne dass Veränderungen in einem Maße stattfinden, welche die Beurteilung der Proben nachhaltig beeinträchtigen würden.

### 2.3.4 Einflussfaktoren auf Überleben oder Absterben von Mikroorganismen

Ob die Mikroorganismen durch das Gefrieren allerdings überhaupt beschädigt werden, hängt von verschiedenen Einflussgrößen ab, und die Höhe der Letalitätsrate kann in weiten Bereichen variieren. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Faktoren wirken auf das Ausmaß der Zellbeschädigung sowie mögliche Reparaturen während des Einfrierprozesses und der Tiefgefrierlagerung.

Tabelle 2: Einflussfaktoren auf Überleben und Absterben von Mikroorganismen (nach BEYER 1983)

Technologie	Lebensmitteleigenschaften	Mikroflora
Einfriergeschwindigkeit	Inhaltsstoffe/Zusammensetzung	Zusammensetzung
Lagerungstemperatur	a <sub>w</sub> -Wert, pH-Wert	Anzahl
Lagerungsdauer		Wachstumsphase
Verpackungsmaterial		Ernährungsstatus

Weitere Einflussfaktoren stellen Geschwindigkeit und Temperatur des Auftauens sowie die Untersuchungsmethode (z.B. Resus-zitation, Art des Kulturmediums, Inkubationstemperatur) dar (BEYER 1983).

### 2.3.4.1 Gefriergeschwindigkeit

#### 2.3.4.1.1 Langsames Gefrieren

Bei niedrigen Gefriergeschwindigkeiten ist Zeit genug, um Wasser aus der Mikroorganismenzelle herausdiffundieren zu lassen. Der Flüssigkeitsstrom folgt einerseits dem osmotischen Druckgradienten zwischen intra- und extrazellulärer Lösung und andererseits dem Dampfdruckunterschied zwischen dem unterkühlten intrazellulären Wasser und dem extrazellulären Eis, was gegebenenfalls zur Dehydrierung der Zellen bis hin zur Plasmolyse führt. Je langsamer der Abkühlungsprozess abläuft und je höhere Permeabilität die Zellen besitzen, desto größer fällt der Wasserverlust der Zellen aus (BANWART 1989). Da die Durchgängigkeit im Allgemeinen für Zellwasser größer ist als für gelöste Stoffe, wird das Konzentrationsgefälle überwiegend durch den Verlust von Wasser und nicht durch Eindringen von gelösten Stoffen in die Mikroorganismen ausgeglichen (FRIEDLER et al. 1988). Die Zellen schrumpfen und werden brüchig, und das Aufkonzentrieren der intrazellulär gelösten Stoffe bewirkt Strukturveränderungen an Molekülen sowie Zellmembranschädigungen. Mikroorganismen sind diesem osmotischen Stress bei niedrigen Gefriergeschwindigkeiten für eine relativ lange Zeit ausgesetzt, weshalb mit erhöhten Beschädigungen zu rechnen ist (FARKAS 2007).

#### 2.3.4.1.2 Schnelles Gefrieren

Mit steigenden Gefriergeschwindigkeiten nimmt die Dauer der geschilderten osmotischen Effekte ab, was ein besseres Überleben der Mikroorganismen bedingt (FARKAS 2007). Es findet nur eine sehr geringe Dehydrierung statt, und die Zellen gefrieren intrazellulär (MAZUR 1965). Die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen wird bei hohen Gefriergeschwindigkeiten im Bereich von 1-10°C pro Minute verbessert, hauptsächlich bedingt durch die geringere Kontaktzeit des empfindlichen Organismus mit den schädlichen hohen Konzentrationen der gelösten Stoffe im ungefrorenen Wasser. Außerdem kommt es zu einer gleichmäßigen intra- und extrazellulären Bildung von zahlreichen kleinen Eiskristallen, ohne dass eine Konzentrierung von gelösten Stoffen stattfindet. Dadurch behalten die Mikroorganismen ihre normale Größe, obwohl sie aufgrund der intrazellulären Eiskristallbildung auch Läsionen an ihrer Membran zeigen (SINGHAL und KULKARNI 2000). Allerdings beschädigen die kleineren intrazellulären Eiskristalle die Bakterienzelle insgesamt nur wenig. Schnelles Gefrieren wirkt also generell weniger letal für die Bakterienzellen als der langsame Prozess (SPECK und RAY 1977). Aufgrund von Anforderungen an die substantielle Qualität des Endproduktes ist schnelles Einfrieren aber hinsichtlich des Genuss- und Nährwertes unbedingt erforderlich (GEIGES 1996).

Innerhalb des Bereiches des ultraschnellen Abkühlens bei 10-100°C pro Minute sinkt die Lebensfähigkeit des Organismus wieder, denn eine derartige Technologie kann zu Zerreißen und verstärkter intrazellulärer Kristallbildung führen, was die Zellen und Zellmembranen stark beschädigt und die Überlebensrate senkt. In Studien von CALCOTT und MACLEOD (1974) zeigten Zellen von *E. coli* die höchste Überlebensfähigkeit, wenn sie mit einer Geschwindigkeit von 6°C/Minute eingefroren wurden. Die geringste Überlebensrate wurde bei 100°C/Minute beobachtet. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch MEYER et al. (1975). Sie untersuchten den Effekt der Abkühlungsgeschwindigkeiten auf mesophile sowie psychrophile Hefen und fanden für beide ein Überlebensoptimum bei Geschwindigkeiten zwischen 4,5 und 6,5°C/Minute. CALCOTT et al. (1976) erzielten in Versuchen mit *Streptococcus (S.) faecalis*, *Salmonella (S.) Typhimurium*, *Klebsiella (K.) aerogenes* und *Pseudomonas (P.) aeruginosa* ebenfalls ähnliche Resultate. Das Überlebensoptimum schwankte zwischen Geschwindigkeiten von 7 bis 11°C/Minute; bei allen Keimen lag die geringste Überlebensfähigkeit bei 100°C/Minute. Im Fall extrem hoher Gefriereschwindigkeiten im Bereich von über 100 bis 10.000°C/Minute, wie sie bei Gefrieren in flüssigem Stickstoff auftreten, ist die Bildung von Eiskristallen wieder reduziert, wodurch es in diesem Temperaturbereich zu einem Erhalt der bakteriellen Lebensfähigkeit kommt (SINGHAL und KULKARNI 2000). Diesen Befund bestätigten auch MA et al. (2007). Das schnelle Gefrieren von Cantaloupe-Melone in flüssigem Stickstoff führte nach 7-tägiger Lagerung bei -18°C zu einem Abfall der Gesamtkeimzahl um 0,5 log<sub>10</sub> KbE/ml, während langsames Einfrieren bei -18°C nach 7-tägiger Lagerung eine Reduktion um 1,5 log<sub>10</sub> KbE/ml bewirkte, welche nach 14 Tagen sogar 2 log<sub>10</sub> KbE/ml betrug. Ebenfalls brachte Gefrieren und einmonatige Lagerung von *L. monocytogenes* in gepufferten Peptonwasser bei -198°C in flüssigem Stickstoff keine Veränderung der Keimzahl, wohingegen eine Temperatur von -18°C eine Absterberate von 87 % bewirkte. 79 % der überlebenden Zellen erwiesen sich als subletal geschädigt (EL-KEST et al. 1991).

### 2.3.4.2 Lagerungstemperatur

Von vielen Autoren wird die Ansicht vertreten, dass für gewöhnlich höhere Gefrierlagertemperaturen einen schädlicheren Effekt auf die Zellen ausüben als niedrigere (SINGHAL und KULKARNI 2000). In einem Bereich von 0°C bis -10°C kommt es zu einer größeren Reduktion der Mikroorganismenzahl als bei Temperaturen unter -15°C (BANWART 1989, BORGSTROM 1955, GEORGALA und HURST 1963, HARTSELL 1949, HUCKER et al. 1952, SCHMIDT-LORENZ 1970). Ganz ähnliche Beobachtungen machte HAINES bereits 1938. Demnach überlebten weniger als 1 % der Mikroorganismen in Bohnen eine Lagerungstemperatur von -10°C, während bei -21°C 6 % vital blieben. Diesen Trend untermauerte auch der Versuch von FOSTER und MEAD (1976), die *Salmonella* spp. in

## Literatur

---

zerkleinerte Hühnerbrust inokulierten. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  überlebten 60-83 % über 126 Tage, während bei  $-2$  bis  $-5^{\circ}\text{C}$  nach 5 Tagen nur noch 1,3 – 5,8 % der Population nachgewiesen werden konnte. Ähnliches beobachtete SULZBACHER (1950): Coliforme Keime wurden durch Lagerung bei  $-4^{\circ}\text{C}$  stark in ihrer Anzahl vermindert, dagegen fand bei  $-18^{\circ}\text{C}$  nur eine geringe Reduktion statt. In Versuchen mit Eiscreme, welche mit Zellen von *E. coli* beimpft worden war, konnte FOSCHINO (2002) feststellen, dass der größte Abfall der Keimzahl während des Gefrierens von  $+4$  auf  $-9^{\circ}\text{C}$  auftrat. Das anschließende Erhärten der Eiscreme bei Temperaturen von  $-9$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  bewirkte kein signifikantes Absinken der Keimzahl.

Von einigen Autoren wurde die Meinung vertreten, dass ab Temperaturen unter  $-10^{\circ}\text{C}$  immer weniger Bakterien effektiv abgetötet werden, je stärker die Temperatur sinkt (BORGSTROM 1955, ICMSF 1980 a). GOTLIB (1951) ermittelte bei einem Vergleich von drei verschiedenen Gefriertemperaturen über einen Zeitraum von 220 Tagen die höchsten Absterberaten bei  $-10^{\circ}\text{C}$ ; bei  $-20^{\circ}\text{C}$  hingegen kam es nur zu einer geringen Reduktion (Tabelle 3). Diese Trends bestätigten auch Versuche von HALL (1969). In gefrorenen Erbsen blieb die Zahl von *Leuconostoc (L.) mesenteroides* bei Lagertemperaturen von  $-18^{\circ}\text{C}$  und  $-29^{\circ}\text{C}$  über ein Jahr konstant. Nach 24-monatiger Aufbewahrung von Erbsen konnte dieser Keim bei  $-18^{\circ}\text{C}$  noch zu 18 % und bei  $-29^{\circ}\text{C}$  noch zu 68 % nachgewiesen werden.

Von der Spezies *S. lactis* ließen sich nach 24 Monaten noch 48 % anzüchten, wohingegen bei  $-29^{\circ}\text{C}$  die Quote noch 98 % betrug (Tab. 4, 5) (HALL 1969). Bei Lagertemperaturen unter  $-30^{\circ}\text{C}$  bleibt die Mikroorganismenzahl relativ konstant, und der letale Effekt ist nur noch sehr gering (CHRISTOPHERSEN 1968, SCHMIDT-LORENZ 1970). Auch WEISER und OSTERUD (1945) berichteten, dass der Lagerungstod bei höheren Temperaturen sehr schnell eintritt und bei über  $-30^{\circ}\text{C}$  deutlicher ausfällt als bei niedrigeren Temperaturen. Ein Grund für die schnelle Reduktion bakterieller Populationen bei Temperaturen in der Nähe des Gefrierpunktes - vor allem bei  $-2^{\circ}\text{C}$  (ANANTA et al. 2002) -, dürfte die zwischen  $-1$  und  $-5^{\circ}\text{C}$  stattfindende extrazelluläre Kristallisation sein. In diesem Bereich kommt es zur Ausfrierung des größten Wasseranteils (HEISS und EICHNER 1995). Ebenfalls üben Temperaturen von  $-10^{\circ}\text{C}$  stärker schädigende Effekte auf die Zellwand der Mikroorganismen aus als Temperaturen unter  $-20^{\circ}\text{C}$  (GORMLEY et al. 2002). Bei noch tieferen Temperaturen von  $-70$  bis  $-195^{\circ}\text{C}$  sind die Todesraten sehr gering oder gleich null (WEISER und OSTERUD 1945). Diesen Effekt macht man sich in der Gefrierkonservierung von Mikroorganismen zu Nutze, bei welcher Bakterien über sehr lange Zeit bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert werden (MÜLLER und MÜLLER 1996).

Tabelle 3: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (nach GOTLIB 1951)

Lager-T°C	Tag 0	115 Tage	178 Tage	192 Tage	206 Tage	220 Tage
-10°C	100	6,1	3,6	2,1	2,1	2,5
-15°C	100	16,8	10,4	3,9	10,0	8,2
-20°C	100	50,7	61,0	57,4	55,0	53,2

Tabelle 4: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei -18°C in gefrorenen Erbsen (nach HALL 1969)

Mikroorganismen	24 Stunden	1 Monat	12 Monate	24 Monate
<i>E. coli</i>	116	49	14	15
<i>S. aureus</i>	99	101	30	8
<i>S. lactis</i>	53	37	41	48
<i>S. faecalis</i>	53	37	41	48

Tabelle 5: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei -29°C in gefrorenen Erbsen (nach HALL 1969)

Mikroorganismen	24 Stunden	1 Monat	12 Monate	24 Monate
<i>E. coli</i>	101	88	36	20
<i>S. aureus</i>	92	94	65	11
<i>S. lactis</i>	104	86	37	98
<i>S. faecalis</i>	112	57	53	24

#### 2.3.4.2.1 Schwankende Lagertemperaturen

Schwankungen der Lagertemperatur nehmen ebenfalls Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen. Bei stabilen Bedingungen wird ein geringerer Verlust der Lebensfähigkeit festgestellt als bei variierenden Temperaturen. Die Zusammensetzung der ungefrorenen, sehr konzentrierten Restlösungen, welche durch das Gefrieren entstehen, kann sich während der Lagerung verändern und die Eiskristalle nehmen gegebenenfalls an Größe zu, vor allem wenn die Lagerungstemperaturen Schwankungen unterworfen sind (ICMSF 1980 a). OLIVEIRA et al. (2009) beobachteten in ihren Versuchen bei konstanten Temperaturen von -21°C während der Lagerung ein Absinken der Gesamtkeimzahl um 2 log<sub>10</sub> KbE/g, während es bei schwankenden Temperaturen (zwischen -21°C und +25°C) zu einer Reduktion um 3 log<sub>10</sub> KbE/g kam. Die Überlebensdauer von *E. faecalis* und *P. aeruginosa* wurde durch die veränderlichen Temperaturen deutlich herabgesetzt und betrug hier nur zehn Tage. Demgegenüber lag sie bei konstanten -21°C im Bereich von zwei bzw. drei Monaten. Im Gegensatz dazu konnten GORMLEY et al. (2002) bei schwankenden Temperaturen zwischen -30°C und -10°C sowie anschließender Lagerung für acht Monate

bei  $-30^{\circ}\text{C}$  keine signifikante Veränderung der Gesamtkeimzahl in verschiedenen gefrorenen Lebensmitteln erkennen.

### 2.3.4.3 Lagerdauer und Zeitpunkt des Absterbens

WEISER und OSTERUD (1945) kamen in ihren Studien mit *E. coli* zu dem Ergebnis, dass während der Einwirkung niedriger Temperaturen zwischen verschiedenen Arten des Absterbens der Mikroorganismen zu differenzieren ist. Zum Einen handelt es sich um den unmittelbaren oder sofortigen Tod, der durch den Einfrierprozess verursacht wird, und zum Anderen um den Lagerungstod, welcher für sie eine direkte Funktion von Zeit und Temperatur darstellt. Von vielen Autoren wird die Ansicht vertreten, dass die hauptsächlichste Reduktion der Mikroorganismen während oder kurz nach dem Gefrieren der Lebensmittel stattfindet, indem die Zellen während der initialen Phase der Gefrierlagerung schnell und dann allmählich langsamer absterben (BANWART 1989, SPECK und RAY 1977, STRAKA und STOKES 1959, WEISER und OSTERUD 1945). Am Ende stabilisiert sich das Überlebensniveau. WALLACE und TANNER (1934, 1935) wiesen im Verlauf von Gefrierprozess und Lagerung zwar einen letalen Effekt auf Mikroorganismen in Gemüse und Früchten nach, allerdings wurde nach einem Jahr keine weitere Verringerung der mikrobiologischen Populationen mehr gefunden. Auch nach drei Jahren Tiefkühlagerung blieb der Anteil der kultivierbaren Mikroorganismen relativ unverändert.

Studien von JONES und LOCHHEAD (1939) mit gefrorenem Spargel, Erbsen, Bohnen und Mais zeigten einen merklichen Abfall in der Anzahl der Mikroorganismen während der ersten zwei Wochen der Lagerung bei  $-17,8^{\circ}\text{C}$ . Dann nahm die Keimdichte nur noch langsam ab oder blieb über einen Zeitraum von acht Monaten konstant. MA et al. (2007) beschrieben nach schnellem Einfrieren von Melone innerhalb der ersten Woche der Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  sowie nach langsamem Einfrieren innerhalb der ersten 14 Tage der Gefrierlagerung ein Absinken der Keimzahl. Während der weiteren Lagerzeit von insgesamt 35 Tagen blieben die Werte unverändert. Ebenso wurde von JOHNS und BERARD (1946) ein direkter Rückgang der Mikroorganismenanzahl in verquirltem Rohei (Melange) durch das Einwirken von Gefriertemperaturen beobachtet, und die anschließende Tiefkühlagerung für sechs Monate bei  $-15^{\circ}\text{C}$  zeigte keinen weiteren Einfluss auf das Überleben. In geschnittenen Tomaten, welche bei  $-40^{\circ}\text{C}$  gefroren und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über neun Monate gelagert wurden, kam es in den ersten drei Monaten zu einer Reduktion des größten Teils der Mikroorganismenpopulationen, jedoch wurde die Keimflora nicht vollständig abgetötet, und viele pathogene Spezies waren auch nach neun Monaten noch nachweisbar (ARROYO und PRESTAMO 1998). Während der Gefrierlagerung von Hybrid-Tilapia (Zahnkarpfen) verminderten sich die natürlicherweise im Fischverdauungstrakt vorhandenen Mikroorganismen nach einem Monat um  $2,0 \log_{10}$  KbE/g. Während weiterer Gefrierlagerung



über ein Jahr kam es lediglich zu einem langsamen Absinken der Keimzahlen um  $1,0 \log_{10}$  KbE/g (AL-HARBI und UDDIN 2005). FOSCHINO (2002) konnte im Fall von mit *E. coli* beimpftem Speiseeis während einer achtwöchigen Lagerung Schädigungen der Bakterien dokumentieren. Unmittelbar nach dem Einfrieren betrug die Keimzahl  $7,74 \times 10^4$  KbE/g, am Ende der Lagerung bei  $-22^\circ\text{C}$  konnten lediglich  $3,29 \times 10^2$  KbE/g nachgewiesen werden. Die quantitative Veränderung der Mikroflora während viermonatiger Lagerung von gefrorenen Chips bei  $-20^\circ\text{C}$  wurde von MALICKI und BRUZEWICZ (2007) untersucht. Sie stellten nach einem Monat der Lagerung kein signifikantes Absinken von Gesamtkeimzahl, coliformen Keimen, Hefen und Schimmelpilzen fest, und auch während der folgenden Monate blieben die Resultate konstant. Ebenso wenig fanden GORMLEY et al. (2002) während Gefrierlagerung bei Temperaturen von  $-60$  und  $-30^\circ\text{C}$  über acht Monate einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtkeimzahl.

### 2.3.4.4 Lebensmitteleigenschaften

#### 2.3.4.4.1 Protektive Substanzen

Die Zusammensetzung des Mediums, in welchem sich die Mikroorganismen während des Gefrierprozesses und der Gefrierlagerung befinden, nimmt großen Einfluss auf ihre Überlebensfähigkeit. Die Anwesenheit von sogenannten „kryoprotektiven Substanzen“ aus der Gruppe der Zucker, Fette, Kolloide oder Proteine (MOUNTNEY und GOULD 1988) besitzt eine besondere Bedeutung, da sie - ihrem Namen entsprechend - einen schützenden Effekt auf die Mikroorganismen ausüben. Zu diesen Substanzen zählt eine Vielzahl von einfachen und komplexeren chemischen Verbindungen, darunter Dimethylsulfoxid, Glycerol, Blutserum oder Serumalbumine, Magermilch, Pepton, Hefeextrakt, Saccharose, Glucose, Fructose, Methanol, Polyvinylpyrrolidon, Sorbitol und Malzextrakt (HUBÁLEK 2003) sowie Aminosäuren (Alanin, Prolin). Nach SPECK und RAY (1977) kann eine Steigerung der Überlebensfähigkeit durch visköse Lebensmittel und Inhaltsstoffe wie Proteine, einfache oder komplexe Kohlenhydrate und Triglyceride unterstützt werden. Auch Stoffe wie Glycerol, Saccharose und Gelatine besitzen laut FARKAS (2007) einen kryoprotektiven Effekt. Auf Grund ihrer Erfahrungen sprachen CALCOTT und MACLEOD (1975) Eiweiß, Kohlenhydraten, Peptiden, Serumalbuminen, Milch, Glutaminsäure, Hefeextrakt, Diethylenglycol, Tween 80, Äpfelsäure, Dextran, Natriumglutamat, Glucose, Polyethylenglycol, Erythritol, Polyvinylpyrrolidon, Ionophoren, Acetamiden und Harnstoff eine schützende Wirkung zu. Weiterhin wiesen die Autoren darauf hin, dass Glycerol sowohl Schäden an der Zellwand und den Membranen verringert, während Tween 80 nur den Membranschäden vorbeugt.

Aufgrund ihrer Eigenschaften lassen sich die Kryoprotektiva in schnell-zellpenetrierende Stoffe, in langsamer penetrierende Substanzen, wie z.B. Glycerol, sowie in nichtpenetrierende Stoffe, wie Oligo- und Polysaccharide, Mannitol, Sorbitol, Dextran,

## Literatur

---

Hydroxyethylstärke, Methylcellulose, Albumin, Gelatine, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglycol, Polyethylenoxid oder Polyvinylalkohol, einteilen. Dimethylsulfoxid und Glycerol penetrieren sowohl die Zellwand als auch die Cytoplasmamembran, wohingegen Mono- und Disaccharide, Aminosäuren und Polymere mit einem niedrigen Molekulargewicht nur die Zellwand aber nicht die Zellmembran passieren. Polymere mit höherem Molekulargewicht durchdringen weder Zellwand noch Cytoplasmamembran (HUBÁLEK 2003). Der Mechanismus des schützenden Effektes fällt je nach Substanzgruppe unterschiedlich aus. Permeable, kryoprotektive Stoffe bewirken eine biegsamere Struktur der Zellmembran und binden intrazellulär Wasser, was einer zu starken Austrocknung vorbeugt. Des Weiteren wird die Salzkonzentration und damit die Salztotoxizität herabgesenkt, indem sie durch Bindung die Summe des ausgefrorenen Wassers reduzieren (HUBÁLEK 2003). Außerdem wird die Bildung von großen Eiskristallen innerhalb der Zelle verhütet. Aufgrund der hohen Wasserbindungsfähigkeit der Kryoprotektiva verzögert sich folglich die Dehydrierung der Zelle, und das Ansteigen der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration erreicht erst bei niedrigeren Temperaturen einen kritischen Bereich. Dadurch können Zellschädigungen verzögert und die Zellmembranen stabilisiert werden (LOVELOCK 1954, MERYMAN et al. 1977). Auch erzeugen die kryoprotektiven Substanzen als Nicht-Elektrolyte eine Verdünnung der schädlichen Stoffkonzentration. Des Weiteren tragen sie dazu bei, die Verlagerung von Komponenten durch beschädigte Membranen zu minimieren und dabei Zeit für Reparaturmechanismen zu lassen (SINGHAL und KULKARNI 2000).

Glycerol, Dimethylsulfoxid und viele andere Kryoprotektiva senken durch Bindung den Gefrierpunkt von Wasser und biologischen Flüssigkeiten herab (HUBÁLEK 2003). So kommt es durch ihre Anwesenheit zu einer Verlagerung des Punktes, bei dem intrazelluläres Gefrieren stattfindet.

Polymere verändern die Eigenschaften des Mediums während des Abkühlens und sind in der Lage, das Wasser bis zu  $-35^{\circ}\text{C}$  im flüssigen Zustand zu halten. Es wird angenommen, dass die kryoprotektiven Stoffe der kälteinduzierten Aggregation von Proteinen vorbeugen und eine optimale Membranfluidität bei niedrigen Temperaturen aufrecht erhalten (CHATTOPADHYAY 2006). Semipermeable Substanzen konzentrieren sich zwischen Zellwand und Cytoplasmamembran wie eine Puffer-Schicht gegen das wachsende Eis und schützen die Zellwand mechanisch. Nichtpermeable Kryoprotektiva adsorbieren auf der mikrobiellen Oberfläche, wo sie eine visköse Schicht bilden. Allerdings interagieren sie nicht direkt mit der Zellwand oder der Zellmembran (ASHWOOD-SMITH und WARBY 1971, MERYMAN 1974). Nichtpenetrierende Agentien schützen hauptsächlich gegen die extrazelluläre Eisbildung (HUBÁLEK 2003).

Die Wirkungen von kryoprotektiven Substanzen wurden in vielen Studien untersucht. KEITH (1913) konnte nachweisen, dass durch Zugabe von Zucker, Milch und Glycerol in das

Gefriermedium die Bakterien teilweise vor den Gefrierschäden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  geschützt werden. Auch HOLLANDER und NELL (1954) bewahrten mit Glycerol die Mikroorganismen vor Schaden durch Gefrieren oder Auftauen, allerdings wurde während der Gefrierlagerung kein protektiver Nutzen nachgewiesen. Die höchste Überlebensrate von Zellen der Hefespezies *Kluyveromyces fragilis* wurde bei Gefrierlagerung über drei Wochen bei  $-19$  und  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff ermittelt, wenn sie in 30%iger Glucoselösung eingefroren waren. Mit 10%iger und 20%iger Glucoselösung wurden etwas geringere Effekte erreicht (BOSTIAN und GILLILAND 1979). In Orangensaft wurden 97 % der Mikroorganismen nach 48 Stunden Gefrierlagerung zerstört, wohingegen eine große Anzahl der Zellen nach 26 Wochen noch lebensfähig waren, wenn dem Saft 40-50 % Saccharose zugesetzt wurde (MCFARLANE und GORESLINE 1943, WALLACE und BAUMGARTNER 1936). BORGSTROM (1955) fand, dass mit einer 20%igen Saccharose-Lösung das Überleben von Bakterien bei unterschiedlichen Gefriertemperaturen weitaus mehr gesteigert werden konnte als mit einer 2%igen Saccharose-Lösung. Ebenfalls einen schützenden Einfluss durch Zusatz von 20 % Saccharose konnten FLESSA et al. (2005) auf Zellen von *L. monocytogenes* für das Einfrieren und Lagern bei  $-20^{\circ}\text{C}$  von Erdbeeren nachweisen. Im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe ohne Saccharosezusatz blieben die Keimzahlen über eine vierwöchige Lagerdauer konstant. LI et al. (2010) dokumentierten einen schützenden Effekt von Saccharose auf die Überlebensfähigkeit und Membraneigenschaften von *Lactobacillus casei* während des Gefriertrocknens. So stieg durch den Zusatz von 2 %, 4 % und 8 % Saccharose die Membranfluidität der Zellen und ihre Überlebensrate während des Gefriertrocknens mit steigender Konzentration an. Im Gegensatz dazu fanden KNUDSEN et al. (2001) bei Erdbeeren mit und ohne Saccharosezusatz während 30-tägiger Gefrierlagerung keine Unterschiede in der Reduktion einer *E. coli* O157:H7-Population.

STILLE (1948) verglich die Überlebensraten von Mikroorganismen, welche in Nährböden mit einem gewissen Gehalt an organischen Stoffen, v.a. Zucker, Kolloiden (Pepton, Gelatine) und verschiedenen Salzen, bei  $-24^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden mit dem Gefrieren von Mikroorganismen in physiologischer Kochsalzlösung. Die mittlere Abnahme der Zellzahlen während des Gefrierens betrug bei einer Hefespezies 12 % im komplexen Medium und 29,2 % in physiologischer Kochsalzlösung. *P. pyocyanea* zeigte eine Letalitätsrate von 34,4 % bzw. 93,6 % im vergleichbaren Versuchsansatz. So kam der Autor zu dem Schluss, dass die Resistenzlage der Mikroorganismen in Anwesenheit eines reichlichen Nährstoffangebotes optimal beeinflusst wird. In Studien von STRAKA und STOKES (1959) wurde durch Zusatz von 10%iger Magermilch während einer Lagerzeit von 13 Tagen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  ein 100%iger Schutz auf die Bakterienflora erreicht, wohingegen 1%iges Pepton keine protektive Wirkung zeigte und alle Mikroorganismen abgetötet wurden. Rindfleisch- und Hefefextrakt (0,5%ig und 1%ig) ließen einige Beschädigungen und Absterbevorgänge zu (STRAKA und STOKES 1959).

## Literatur

---

Diese Ergebnisse wurden durch ABADIAS et al. (2001) bestätigt, weil sich durch Zusatz von 10%iger Magermilch bei einer Lagerungstemperatur von -20°C ebenfalls die beste Lebensfähigkeit von *Candida sake* ergab. Für die Reduktion von *E. coli* u.a. Mikroorganismen während einer Kurzzeitlagerung bei -22°C wurden die höchsten Überlebensraten in Milch registriert, danach folgten in absteigender Reihenfolge 10%ige Saccharose-Lösung, 0,1%ige Salzlösung und abschließend Wasser (GEIGES 1996). Ähnliches beobachteten auch RAY und SPECK (1973 a). Nach Gefrieren von *E. coli*-Zellen in verschiedenen Medien fand sich in Wasser eine Absterberate von 55 %, in flüssigem Vollei, Fleischbrühe und Krabbenfleisch lag diese bei ca. 40 % und in Milch betrug sie lediglich 15 %.

In Studien von CASARIN et al. (2009) zeigten sich deutlich höhere Absterberaten von *E. coli*, *Staphylococcus (S.) aureus* und *S. Enteritidis*, wenn diese in 0,1%igem Peptonwasser bei -18°C gelagert wurden, als bei der Aufbewahrung unter gleichen Bedingungen in Hamburgern aus Hühnerfleisch. Sie nahmen eine kryoprotektive Wirkung des Fettgehaltes (10,7 %) in dem Hackfleischerzeugnis an. Ebenso beschrieb SHERIDAN (1997) eine schützende Wirkung von Fett in verschiedenen Hackfleischsorten. Die größte Überlebensfähigkeit von *S. aureus* und *S. Kentucky* wurde bei Fettstufen von 20 und 30 % erreicht, wohingegen sich ein gegenteiliger Effekt mit Fettgehalten von 50 % einstellte. Letzterer erzeugte ungefähr die gleiche Absterberate wie mageres Hackfleisch mit einem Fettgehalt von nur 5 %.

WOODBURN und HUSSEMAN STRONG (1960) berichteten über die protektive Wirkung von gekochtem Reismehl (4%ig), Maissirup und Eiweiß in gepuffertem Phosphat während einer Gefrierlagerperiode von 10 Wochen bei -11, -21 und -30°C. Der Zusatz dieser Substanzen bewirkte einen Anstieg der lebensfähigen Mikroorganismen bei allen Temperaturen im Vergleich zu gepuffertem Phosphat ohne Zusatz.

Weitere protektive Wirkungen wurden durch Fischfleisch (RAJ und LISTON 1961) und Pferdefleischextrakt beschrieben (KITCHELL und INGRAM 1959). GEORGALA und HURST (1963) stellten fest, dass rohes Fleisch mehr Schutz vor dem Gefrieren bietet als gekochtes Fleisch, was sie auf die während der Erhitzung denaturierten Proteine zurückführten. Sehr wichtig für die Stabilität von Proteinmolekülen sind Wasserstoffbrückenbindungen, wie bereits unter 2.3.2.5 dargestellt. Substanzen, die in der Lage sind diese Bindungen zu stabilisieren, beugen demnach der Inaktivierung von Eiweiß während des Gefrierens vor. Zu diesen Verbindungen gehören z.B. Aminosäuren und ähnliche Stoffe mit einem niedrigen Molekulargewicht. Folglich stabilisieren Proteine und proteinähnliche Verbindungen aus Fleisch und Fleischzubereitungen zelluläre Proteine und erlauben die Reparatur metabolischer Schäden, indem sie essentielle Stoffwechselprodukte bereitstellen. Außerdem können chemische Verbindungen, welche der Glutaminsäure in ihrer chemischen Struktur

ähneln, den Tod der Bakterien durch das Gefrieren verhindern. Bedeutsamer Schutz wird demnach durch Asparaginsäure, Äpfelsäure, Cysteinsäure, Alpha-Aminopimelinsäure, Acetylglycin und DL-Threonin geboten. Die Effektivität dieser Verbindungen beim Schutz gegen Gefrierschäden liegt in der Anwesenheit einer COOH-Gruppe an der  $\alpha$ - und  $\omega$ -Position sowie einer elektronegativen Gruppe (wie z.B.  $\text{NH}_2$  am  $\alpha$ -Kohlenstoff) (CHATTOPADHYAY 2000). FOSCHINO (2002) vermochte durch Gefrierprozess und Gefrierlagerung bei  $-22^\circ\text{C}$  über acht Wochen keinen schützenden Effekt von Speiseeis auf Zellen von *E. coli* nachweisen. Obwohl die Keime sich in einer zucker- und fetthaltigen Matrix befanden, kam es zu einer Reduktion der Keimzahlen um fast  $3 \log_{10}$ .

### 2.3.4.4.2 Letalitätsteigernde Substanzen

Nicht alle in Lebensmitteln vorhandenen Inhaltsstoffe üben einen positiven Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen aus. Viele Substanzen sind in der Lage, die Letalitätsrate während des Tiefgefrierens zu erhöhen, insbesondere die steigende Konzentration von extrazellulär gelösten Stoffen im Gefriermedium kann die Gefrierschäden in einigen Bakterien verstärken (LUND 2000). So wirkt z.B. Natriumchlorid in geringen Anteilen durchaus wachstumsfördernd auf Bakterienpopulationen, höhere Gehalte, wie sie oftmals in Lebensmitteln vorliegen, steigern jedoch stetig die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dem Gefrieren (CHATTOPADHYAY 2000). CALCOTT und MACLEOD (1974) stellten fest, dass Zellen von *E. coli* bei Anwesenheit von NaCl empfindlicher auf den Einfrierprozess reagieren. Eine konzentrationsabhängige Wirkung verschiedener Stoffe wie Salze oder Säuren bestätigte auch GEIGES (1996). So ergibt sich in Lebensmitteln eine reduzierte Gefrierresistenz der Mikroorganismen durch die Anwesenheit bestimmter Ionen, anorganischer Salze, Säuren, oberflächenaktiver Substanzen und verschiedener Enzyme, wie z.B. Lysozymen oder Proteasen (JANSSEN und BUSTA 1973 a, b, RAY und SPECK 1973 a, b, RAY et al. 1976, WARSECK et al. 1973).

Bei einem Vergleich der Wirkungen verschiedener Ionen auf die Überlebensfähigkeit der Hefespezies *S. cerevisiae* während des Gefrierens ließ sich in der Gruppe der Kationen die stärkste Reduktion der Keimzahl bei Anwesenheit von Magnesium- und Calcium-, aber vor allem bei Lithiumionen beobachten (STILLE 1948). Eine geringere Abnahme der Zellzahl fand unter dem Einfluss von Natriumionen statt; die niedrigste Letalitätsrate wurde bei Anwesenheit von Kaliumionen festgestellt. In der Gruppe der Anionen besaß nach Sulfat das Chlorid den größten abtötenden Effekt; Nitrat reduzierte die Keimzahl am wenigsten. Auf Grund einer Summierung der Kationen- und Anionenwirkungen erbrachte Lithiumsulfat den stärksten schädigenden Effekt auf die Zellen. Den geringsten Einfluss eine Verminderung der Hefezellen zeigten Kalium- und Natriumnitrat. Auch freie Fettsäuren besitzen einen antimikrobiellen Effekt (BEUCHAT und GOLDEN 1989, GREENWAY und DYKE 1979), welcher vor allem bei grampositiven Keimen ausgeprägt ist. Durch ihre Penetration in die

Bakterienzellen verursachen sie letale Veränderungen der Membran (GREENWAY und DYKE 1979, SHEU und FREESE 1973). Gramnegative Bakterien verhalten sich aufgrund ihrer Zellwandlipide, welche die Membran vor der bakteriziden Aktion der Fettsäuren schützen, weniger empfindlich (BEUCHAT und GOLDEN 1989). So besteht die Möglichkeit eines synergistischen Effekts von Zellwandschäden an gramnegativen Bakterien aufgrund des Gefrierens und der Anwesenheit von Fettsäuren. Diese könnten aufgrund von Beschädigungen der Zellmembran eindringen und zum Tod der eigentlich weniger empfindlichen gramnegativen Zellen führen (SHERIDAN 1997).

### 2.3.4.4.3 pH-Wert

Der pH-Wert tiefgefrorener Lebensmittel stellt einen entscheidenden Faktor für die Überlebensfähigkeit der vorhandenen Mikroorganismen dar. Bei Anwesenheit von Säuren in Lebensmitteln während des Gefrierens und der Gefrierlagerung ergibt sich eine zusätzliche Belastung für die Mikroflora. So wurde festgestellt, dass der prozentuale Anteil der Mikroorganismen, welche das Gefrieren überleben, am größten in neutralen oder schwach alkalischen pH-Bereichen ist (SINGHAL und KULKARNI 2000) und sich eine höhere Gefrierempfindlichkeit in sauren Medien ergibt. Bei ihren Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* in verschiedenen Lebensmitteln während des Gefrierens und der Gefrierlagerung konnten PALUMBO und WILLIAMS (1991) einen Einfluss des pH-Wertes bestätigen. In allen Lebensmitteln, die einen pH-Wert von 5,80 oder darüber aufwiesen, überlebte das Bakterium sehr gut. Lediglich in Tomatensuppe mit einem niedrigen pH-Wert von 4,74 kam es zu einer sehr deutlichen Reduktion. Ebenso differierte die Letalitätsrate der Mikroorganismen in Speiseeissorten mit unterschiedlichen pH-Werten (Zitronen- und Orangeneis: bis 3,2; Vanilleeis: bis 7,8) deutlich (BROADHURST und GILPIN 1926). In Versuchen mit der Hefe *S. cerevisiae*, die abgestuften Wasserstoffionenkonzentrationen ausgesetzt wurde, bestätigte STILLE (1948) die Beeinflussung der Gefrierresistenz durch den pH-Wert des Substrates. Bei einem pH-Wert von 9,20 kam es zu einer Absterbequote von 23,6 %, während sie bei einem Wert von 4,50 immerhin 77,6 % betrug. Mit anderen Mikroorganismenspezies wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wobei festzuhalten ist, dass mit einem Anstieg der Wasserstoffionenkonzentration vor allem bei den kälteempfindlichen Keimen die Absterbequote ansteigt. Die Überlebensfähigkeit von *S. Typhimurium*-Kolonien in Rindfleisch während der Gefrierlagerung war sehr gering, wenn der pH-Wert des Fleisches bis auf 4,5 sank. Am höchsten fiel die Überlebensrate bei einem pH-Wert von 7,5 aus (GEORGALA und HURST 1963). Dass sich das Ausmaß der Letalität während des Gefrierens durch den pH-Wert verändern lässt, berichteten auch DEMCHICK et al. (1982). Zellen von *S. aureus*, welche wiederholtem Gefrier-Auftau-Stress ausgesetzt waren, überlebten in Rinderhackfleisch bei einem pH-Wert von 4,2 weniger gut als bei höheren pH-Werten im Bereich von 4,3-6,3. ARPAI (1962) wies in Versuchen mit *P.*

*fluorescens* bei Gebrauch eines stärker sauren Mediums eine verringerte Anzahl an unbeschädigten Zellen nach. Bei Versuchen mit *E. coli* stellte er allerdings einen gegenteiligen Effekt fest. Hier kam es bei einem pH-Wert von 8 zu einer geringeren Prozentzahl unbeschädigter Zellen als bei pH-Werten von 5-7. Dagegen machten HAHN und APPLEMAN (1952 a, b) bei Studien mit pathogenen enterischen Mikroorganismen in gefrorenem Orangensaftkonzentrat den Säuregehalt teilweise für den schnellen Tod von *E. coli*-Zellen verantwortlich (MCFARLANE 1942). Darüber hinaus wiesen AEA und BUSHNELL (1962 b) nach, dass die Temperatur einen modifizierenden Faktor für die schädigende Wirkung des pH-Wertes bildet. Zellen von *E. coli*, *Shigella (S.) flexneri* und verschiedenen *Salmonella* Serovaren überlebten in Passionsfruchtnektar mit einem pH-Wert von 3,0 bei Raumtemperatur (25°C) zwischen 30-60 Minuten. Dagegen variierte bei -20°C die Überlebensdauer zwischen 0-7 Stunden; bei *S. Enteritidis* sogar zwischen 48 Stunden und 90 Tagen. Weiterhin blieben trotz eines hohen Säuregehaltes des Passionsfruchtnektars (2,8 bis 3,2) verschiedene Mikroorganismen wie *Bacillus* spp., Hefen und Schimmelpilze während der Lagerung bei -20°C über ein Jahr nachweisbar (AEA und BUSHNELL 1962 a).

#### 2.3.4.4.4 $a_w$ -Wert

Der niedrige  $a_w$ -Wert geforener Lebensmittel schränkt die Aktivität der enthaltenen Mikroorganismen ein (SPECK und RAY 1977). Durch die Eisbildung während des Gefrierens wird den Mikroorganismen das frei verfügbare Wasser entzogen, und im Bereich der Gefriertemperaturen bildet somit nicht die Kälte den eigentlichen limitierenden Faktor, sondern die starke Trockenheit bzw. der Wassermangel der Mikroorganismen (HEISS und EICHNER 1995, SCHMIDT-LORENZ 1970). Gefrorene Lebensmittel haben demnach auch als sehr trockene Medien zu gelten (SCHMIDT-LORENZ 1970). Der  $a_w$ -Wert für Fleisch liegt bei einer Temperatur von 25°C bei 0,993, bei -25°C fällt er auf lediglich 0,784 und bei -30°C auf nur noch 0,746 (SINGHAL und KULKARNI 2000). Aus diesem Grund können in gefrorenen Lebensmitteln allein Mikroorganismen wachsen, die als kryo- oder xerotolerant bezeichnet werden (FARKAS 2007) bzw. eine Osmotoleranz aufweisen. So weisen Pilze, zu denen Organismen mit der höchsten Trockenresistenz gehören, auch die niedrigsten Minimaltemperaturen für ihre Vermehrung auf. Bakterien, welche für Wachstum und Vermehrung einen höheren  $a_w$ -Wert benötigen, werden demgemäß auch durch höhere Minimaltemperaturen charakterisiert (BORGSTROM 1955). In Studien von SIEGEL et al. (1968) bildeten *Penicillium*-Konidien in einer wasserfreien Mischung von Glycerin, Nährstoffen und flüssigem, reinem Ammoniak bei -40°C über vier Monate hinweg Keimschläuche aus. Organismen, die sich in gefrorenen Systemen vermehren, vorausgesetzt dass andere Umgebungsfaktoren das Wachstum unterstützen, gehören eher austrocknungsresistenten Arten wie den Hefen und Schimmelpilze als den Bakterien an (INGRAM und MACKEY 1976).

### 2.3.4.5 Mikroflora

Mikroorganismen reagieren unterschiedlich empfindlich auf die niedrigen Temperaturen des Einfrierens und der anschließenden Gefrierlagerung, was zu einem großen Teil mit den Eigenschaften der jeweiligen Bakterienart zusammenhängt. Des Weiteren nehmen Populationsdichte, Alter, Ernährungszustand sowie Wachstumsphase und –rate Einfluss (MACLEOD und CALCOTT 1976). MAZUR (1966) teilte die Mikroorganismen aufgrund ihres Verhaltens bei Stresseinwirkung durch Gefrieren und Auftauen in verschiedene Kategorien ein:

- Mikroorganismen, die alle Bedingungen von Gefrieren und Auftauen nahezu unbeschadet überleben, z.B. sporenbildende Bakterien, Pilzsporen und einige grampositive Kokken;
- Mikroorganismen, welche den unmittelbaren Einflüssen des Gefrierens widerstehen, aber empfindlich auf die Gefrierlagerung reagieren;
- Mikroorganismen, welche unter bestimmten Bedingungen sowohl auf die unmittelbaren als auch auf die Lagerungseinflüsse des Gefrierens empfindlich reagieren;
- Mikroorganismen, welche immer empfindlich auf Gefrieren und Gefrierlagerung reagieren, z.B. parasitäre Organismen wie Nematoden, Amöben und Protozoen.

#### 2.3.4.5.1 Sporenbildende Bakterien

Oft beschrieben wurde die hohe Widerstandsfähigkeit bakterieller Sporen gegenüber Gefrieren und Gefrierlagerung (BANWART 1989, BORGSTROM 1955, ICMSF 1980 a, SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968), vor allem von *Bacillus*- und *Clostridium* spp. (SPECK und RAY 1977). Die ausgeprägte Resistenz wird der Tatsache zugeschrieben, dass in dem dehydrierten Sporenprotoplasten das meiste Wasser in einem ungefrierbaren Zustand innerhalb der ausgedehnten Rinde gebunden ist (CHATTOPADHYAY 2000, GOULD und DRING 1975). Clostridiale Sporen sollen die Gefrierlagerung fast 20 Jahre überleben können (SINGHAL und KULKARNI 2000), während die vegetativen Zellen von *B. cereus* (WHITE und HALL 1984 b) und auch *Clostridium (C.) perfringens* sehr empfindlich auf Gefrieren und Gefrierlagerung reagieren (CANADA et al. 1964, STRONG und CANADA 1964, TRAKULCHANG und KRAFT 1977). Die meisten nicht-sporenbildenden Organismen verhalten sich deutlich sensibler gegenüber einem oder mehreren Stufen des Gefrierprozesses (FENNEMA et al. 1973).

#### 2.3.4.5.2 Gramnegative und grampositive Bakterien

Die meisten grampositiven Mikroorganismen werden durch Gefrieren weniger geschwächt als gramnegative Keime (BANWART 1989, BROWN und HILL 1984, BURTON 1949 a, ICMSF



1980 a, LUND 2000, SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968, SCHMIDT-LORENZ 1970, SINGHAL und KULKARNI 2000). Das jeweilige Ausmaß variiert jedoch innerhalb der Gruppen (SPECK und RAY 1977). Die Anwesenheit von Mucoproteinkomplexen und Diaminopimelinsäure in den Zellwänden grampositiver Keime scheint die Membranproteine gegen Denaturierung zu schützen. Grampositive Kokken sollen sich jedoch resistenter verhalten als grampositive Stäbchen (SINGHAL und KULKARNI 2000), und vor allem einige *Micrococcus*-, *Staphylococcus*- und *Streptococcus* spp. besitzen eine hohe Widerstandsfähigkeit (SPECK und RAY 1977). So konnte z.B. bei *Staphylococcus*- und *Streptococcus* spp. im Darm frischer Hybrid-Tilapia über eine zwölfmonatige Lagerung bei -20°C kein Absinken der Keimzahlen beobachtet werden (AL-HARBI und UDDIN 2005). Verschiedene Autoren ermittelten eine hohe Kälteresistenz auch bei *Enterococcus* spp. (ICMSF 1980 a).

Gramnegative Bakterien reagieren empfindlicher (ICMSF 1980 a), und besonders die coliformen Keime werden als sehr sensibel gegenüber Gefrieren und Gefrierlagerung beschrieben (LARKIN et al. 1955 b). Die geringere Resistenz kann auf einer Denaturierung der Zellwand-Lipoproteine beruhen (SCHMIDT-LORENZ 1974), doch auch hier variiert die Letalitätsrate mit den verschiedenen Einflussfaktoren (LUND 2000).

PARTMANN (1975) stellte in seinen Studien ein Verschieben des Profils der Mikroflora fest. So enthielt rohes Rind- und Hackfleisch vor dem Gefrierprozess bei -30°C 15 % bzw. 22 % grampositive und 85 % bzw. 78 % gramnegative Bakterienspezies. Nach dem Gefrieren hatte sich das Verhältnis zugunsten der grampositiven Keime (70 % bzw. 75 %) im Vergleich zu den gramnegativen (30 % bzw. 23 %) verändert. Ebenso ermittelten SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT (1968) bei der Untersuchung tiefgefrorener Lebensmittel nach langfristiger Lagerung im Bereich von -2,5 bis -3,5°C bzw. von -4,0 bis -10,0°C für verschiedene Gemüseprodukte im Bereich der höheren Gefriertemperaturen vor allem gramnegative Bakterien (++) und in geringer Menge (+) grampositive Keime. Im niedrigeren Temperaturbereich wurden verstärkt grampositive (++) an der Stelle von gramnegativen Bakterien festgestellt. Hefen blieben sowohl im höheren als auch im niedrigeren Temperaturbereich die dominierende Mikroorganismengruppe (+++).

### 2.3.4.5.3 Schimmelpilze und Hefen

Über das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen gibt es widersprüchliche Aussagen. Von verschiedenen Autoren wurde ihre Sensitivität mit der gramnegativer Keime gleichgesetzt (FRAZIER und WESTHOFF 1978), und in Studien mit Pilzreinkulturen konnte eine hohe Gefrierempfindlichkeit beobachtet werden (STEVENSON und GRAUMLICH 1978). Auch BORGSTROM (1955) fand, dass Hefen und Schimmelpilze empfindlich gegenüber niedrigen Temperaturen reagieren. Laut WALLACE und TANNER (1934, 1935) werden Hefezellen durch Gefrieren und Gefrierlagerung schneller in ihrer Anzahl reduziert als Schimmelpilze, und

Bakterienzellen zeigen die langsamste Absterbequote. Andere Wissenschaftler berichten, dass die Sporen und vegetativen Zellen von Hefen und Schimmelpilzen im Allgemeinen resistenter gegenüber Gefrieren und Gefrierlagerung reagieren als Bakterien (BURTON 1949 a, HOBBS 1976, SCHMIDT-LORENZ 1970). TROLLER und CHRISTIAN (1978) beschrieben die vegetativen Zellen von Hefen und Schimmelpilzen als genauso empfindlich wie die gramnegativen Bakterien. Nur die Sporen der Pilze erwiesen sich als mäßig resistent. Die Erklärung dafür, dass Pilze widerstandsfähiger erscheinen, könnte mit ihrer höheren Toleranzschwelle gegenüber niedrigen  $a_w$ -Werten und Dehydrierung (Xero- und Osmotoleranz) erklärt werden (CHATTOPADHYAY 2000).

### 2.3.4.5.4 Alter und Wachstumsphase

Die Absterberate durch das Gefrieren steht auch in engem Zusammenhang mit der jeweiligen Wachstumsphase der Mikroorganismen. Oftmals wird in der Literatur festgestellt, dass Zellen, welche sich in der stationären Wachstumsphase befinden, unempfindlicher auf Stresseinwirkung durch Gefrieren und Auftauen reagieren als solche in der exponentiellen Phase (GEIGES 1996, MAZUR 1966, RAY und SPECK 1973 b). In Studien von MEYER et al. (1975) mit der psychrophilen Hefespezies *Leucosporidium stokesii* und der mesophilen Spezies *Candida utilis* ergab sich für beide eine Überlebensrate von 71 %, wenn die Zellen in der stationären Phase eingefroren wurden. Gesah dies in der exponentiellen Phase, betrug dagegen die Überlebensraten der psychrophilen Hefe 5 % und der mesophilen Spezies 47 %. Im Falle von *Pseudomonas* spp. reagierten Zellen der exponentiellen Phase während des Gefrierens empfindlicher als solche der stationären Phase, wenn die Abkühlungsgeschwindigkeiten im Bereich von 10°C/min lagen. Das Gegenteil wurde bei Gefriereschwindigkeiten über 100°C/min beobachtet. Während der exponentiellen Wachstumsphase erwiesen sich Zellen von *E. coli* bei Lagerung über acht Wochen bei -22°C in Eiscreme weitaus empfindlicher gegenüber Gefrierbeschädigungen und ihre Zahl sank von anfänglichen  $3,18 \times 10^5$  KbE/g nach Gefrieren und anschließender Lagerung auf  $3,29 \times 10^2$  KbE/g ab. Die Zellen der stationären Phase fielen unter gleichen Bedingungen nur auf einen Wert von  $3,66 \times 10^4$  KbE/g ab (FOSCHINO 2002). In Versuchen mit *E. coli* wurde eine Auswirkung der Wachstumsphase speziell auf die Membranstabilität während des Gefrierens nachgewiesen (SOUZU 1982). Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zeigten eine merkliche Steigerung der Permeabilität sowohl in der äußeren als auch in der cytoplasmatischen Membran. Bei Keimen, welche sich in der stationären Phase befanden, waren solche Veränderungen nicht zu beobachten. Offensichtlich stellt die organisierte Stabilität der Zellmembranen in der stationären Phase eine fundamentale Basis der Membranresistenz gegenüber Gefrierschäden dar.

Andere Autoren erklärten die Unterschiede der Kälteempfindlichkeit mit der Aktivität des alternativen Sigmafaktors RpoS. Dieser Faktor wird maximal in der frühen stationären Phase

erzeugt und kontrolliert die Expression von über 40 Genen und Operons. Sie beinhalten u.a. Gene, welche für die Stressresistenz Bedeutung besitzen.

Weiterhin laufen in Keimen der exponentiellen Phase viele Stoffwechselfvorgänge ab. Gelangen diese Zellen unter Einfluss von subletalem Stress, stoppt zwar ihr Wachstum, der Stoffwechsel läuft aber für einige Zeit weiter. Als eine Konsequenz der Entkoppelung von Energieproduktion und –verwertung entstehen in großem Umfang freie Radikale, und diese wirken dann letal auf die Zelle, nicht jedoch der eigentliche Stressfaktor an sich (sog. „Suicide response hypothesis“). Zellen in der exponentiellen Phase sind demnach empfindlicher und erleiden mehr Schaden, da sie eine größere metabolische Aktivität aufweisen. Stationäre-Phase-Zellen sind aufgrund ihrer anderen Stoffwechselsituation und wegen der Expression von Resistenzfaktoren unter der Kontrolle der RpoS gegen dieses Phänomen geschützt (DODD et al. 2007).

### 2.3.4.5.5 Populationsdichte und mikrobielle Interaktionen

Von einigen Autoren wird die Populationsdichte ebenfalls als ein wichtiger Faktor für das Überleben von Mikroorganismen in gefrorenen Lebensmitteln angesehen. RUTSCH (1987) beschrieb eine Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit von *S. sonnei* und *S. flexneri*-Zellen in Shrimps und Eiscreme bei -20°C-Lagerung vom initialen Keimgehalt. STELZNER und URBACH (1969) konnten allerdings diesen Anstieg der Überlebensfähigkeit mit steigender Populationsdichte nicht bestätigen. Sie beimpften mageres Rindfleisch mit drei verschiedenen *Shigella* spp. in einer Höhe von  $3,0 \times 10^4$ ,  $3,0 \times 10^6$  sowie  $3,0 \times 10^8$  KbE/g und lagerten die Proben bei -16°C. Nach 360 Tagen waren alle eingesetzten Spezies unabhängig von ihrem Ausgangskeimgehalt noch lebensfähig. Auch STRAKA und STOKES (1959) fanden keine Beziehung zwischen dem Ausmaß der Absterberate von *P. fluorescens* während Gefrierlagerung für fünf Tage bei -18°C in Rindfleischextrakt einerseits und der Zellkonzentration andererseits, wobei die Keimzahlen einem Bereich von  $10^5$  bis  $10^6$  lagen. Der Einfluss der Höhe des Keimgehaltes wurde auch von OYARZÁBAL et al. (2003) untersucht. Sie konnten für eingesetzte Zellzahlen von  $1,95 \log_{10}$  und  $3,00\text{--}4,00 \log_{10}$  KbE/g hinsichtlich *E. coli* in verschiedenen Saftkonzentraten über eine vierwöchige Lagerdauer bei -23°C keinen deutlichen Unterschied der Überlebensfähigkeit feststellen. Allerdings wurde die Mortalität von *E. coli* vermindert, wenn die Zellen in einem *E. coli*-Lysat eingefroren wurden. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass Bestandteile der Zellen eine protektive Aktivität aufweisen (CHATTOPADHYAY 2000).

Des Weiteren gibt es Berichte über den Einfluss von sogenannten „Konkurrenz-Zellen“. Wurden zu einer Bakteriensuspension von *S. Typhimurium* ( $10^5$  KbE/ml), welche sich in der exponentiellen Phase befand, eine Mischkultur aus *E. coli*-, *P. fluorescens*- und *Citrobacter* (*C.*) *freundii*-Zellen in einer Größenordnung von  $10^8$  KbE/ml zugegeben, erbrachte die *Salmonella* sp. nach Gefrieren und Auftauen eine höhere Wiederfindungsrate, welche der

von Zellen in der stationären Phase entsprach. Die Konkurrenzkeime können möglicherweise einen Zustand reduzierter Sauerstoffspannung um die Zellen von *Salmonella* aufbauen und so eine Umstellung des Stoffwechsels von einer aeroben Atmung zur anaeroben Fermentation bewirken. Auf diese Weise reduziert sich das Risiko einer Produktion von freien Radikalen, welche die Zelle beschädigen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass derartige Mikroorganismen die *Salmonella*-Zellen durch eine Erniedrigung des Redoxpotentials schützen (DODD et al. 2007).

### 2.3.4.5.6 Wachstumstemperatur und Kälteschockbehandlung

Über den Einfluss der vor dem Gefriervorgang vorherrschenden Wachstumstemperatur auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen existieren unterschiedliche Angaben. So stellten sich Zellen von *S. Typhimurium*, die bei 25°C bebrütet worden waren, resistenter gegenüber dem Gefrieren dar als bei 37°C gewachsene Zellen. Dieser Befund lässt sich als Folge von Veränderungen der Membraneigenschaften in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur interpretieren (CHATTOPADHYAY 2000). So könnte der Anstieg des Anteils ungesättigter Fettsäuren bei sinkenden Temperaturen einen wichtigen Faktor bilden (MARR und INGRAHAM 1962). Andererseits konnte in Versuchen mit verschiedenen Wachstumstemperaturen (4, 25 und 37°C) bei 14 Stämmen von *L. monocytogenes* der gegenteilige Effekt beobachtet werden. Nach dem Anzüchten bei unterschiedlichen Temperaturen wurden die Keime bei -20°C gefroren und wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt. Eine ausgeprägte Kryotoleranz zeigten diejenigen Zellen, welche bei 37°C gewachsen waren. Sie wiesen nach 18 Zyklen lediglich einen Abfall von unter 1 log<sub>10</sub> auf. Im Gegensatz dazu wurden Zellen, die bei 4° oder 25°C angezüchtet worden waren, signifikant in ihrer Anzahl reduziert und verringerten sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm um 2 bis 4 log<sub>10</sub> (AZIZOGLU et al. 2009).

Eine gesteigerte Resistenz von Mikroorganismen gegenüber Gefriertemperaturen ruft der sogenannte „Kälteschock“ hervor. So verbesserte sich die Überlebensfähigkeit von *Vibrio (V.) parahaemolyticus* während Gefrierlagerung bei -18°C, wenn die Zellen vorher bei 20°C oder 15°C für zwei bis vier Stunden gelagert worden waren (LIN et al. 2004). Sofern sich Kulturen von *V. vulnificus* an 15°C-Temperaturen angepasst hatten, konnten sie das Gefrieren bei -78°C besser überleben als solche Keime, die unmittelbar nach Lagerung bei 35°C eingefroren wurden (BRYAN et al. 1999). Entsprechendes ließ sich bei Temperaturen von 8-16°C für *E. faecalis* (THAMMAVONGS et al. 1996) und *S. thermophilus* bei 20°C für zwei bis vier Stunden (WOUTERS et al. 1999) beobachten. Ebenfalls eine größere Überlebensfähigkeit nach Kälteschockbehandlung für eineinhalb Stunden bei 10°C gegenüber der nachfolgenden Gefrierlagerung für 28 Tage bei -20°C wiesen BOLLMAN et al. (2001) für den pathogenen *E. coli*-Stamm O157:H7 in Abhängigkeit des verwendeten Lebensmittels nach. In Milch, flüssigem Ei und Rohwurst nahm die Überlebensfähigkeit

signifikant zu, jedoch nicht in Rinder- und Schweinehackfleisch. Allerdings beobachteten ANSAY et al. (1999) mit Zellen von *E. coli* O157:H7 einen gegenteiligen Effekt. Patties aus Rinderhackfleisch wurden mit diesem Serovar beimpft und bei -2°C für vier Wochen aufbewahrt. Während der Lagerzeit kam es zu einem Keimzahlabfall um 1,5 log<sub>10</sub> KbE/g. Wurden die Patties vor der Lagerung für vier Stunden bei 15°C aufbewahrt, resultierte daraus eine beschleunigte Keimzahlreduktion von 2,7 log<sub>10</sub> KbE/g am Ende der vierwöchigen Lagerzeit.

### 2.3.4.5.7 Ernährungsstatus

Die vorausgegangenen Nährstoffbedingungen während des Wachstums stellen ebenfalls einen Einflussfaktor auf die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber verschiedenen Stressfaktoren dar. In Studien von OBAFEMI (1983) reagierten Zellen von *S. Typhimurium*, die sich während der exponentiellen Phase in tryptischer Sojabouillon vermehrten, sehr viel empfindlicher auf Gefrieren bei -30°C als Zellen, für die ein Minimalmedium (mit Salz und Glucose) als Substrat diente. Auch Glucose-unterernährte Zellen von *V. parahemolyticus* zeigten eine größere Resistenz gegenüber thermalem, osmotischem und oxidativem Stress als nicht-hungernde Zellen (KOGA und TAKUMI 1995).

### 2.3.4.5.8 Kreuztoleranzen

Die Belastung von Mikroorganismen mit Stressfaktoren, wie z.B. schwachen Säuren, kann Zellen hervorbringen, welche eine gesteigerte Resistenz gegenüber einem sauren Milieu aufweisen (BANG und DRAKE 2005). Säureadaptierte Bakterien können aber nicht nur gegenüber Säurestress resistent werden, sondern auch gegenüber anderen subletalen Belastungen, was als Kreuzschutz bezeichnet wird (LEYER und JOHNSON 1993, RYU und BEUCHAT 1998). Im Allgemeinen steigerte sich die Gefrier/Auftau-Toleranz von *V. vulnificus* mit dem Ausmaß der Säureadaptation; zwei Stämme bildeten eine gesteigerte Resistenz nach drei und fünf Stunden der Säureanpassung aus (BANG und DRAKE 2005).

Auch KOGA und TAKUMI (1995) demonstrierten, dass viele Stress-Signale, welche Mikroorganismen wahrnehmen, sogenannten Kreuzschutz gegenüber anderen Stressfaktoren bieten.

## 2.3.5 Subletale Schädigung durch das Gefrieren

Mikroorganismen können durch Stressfaktoren wie Hitze, Gefrieren, Trocknung, Bestrahlung, hydrostatischen Druck, Säuren, Salze, ätherische Öle, Desinfektionsmittel und andere Chemikalien oder natürliche antimikrobielle Substanzen in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (BOZOGLU et al. 2004, MCFETERS 1989, RAY 1989). Nach Einwirkung derartiger Stressoren ist es möglich, dass einige Keimpopulationen abgetötet sind, während andere völlig intakt bleiben oder subletal beschädigt werden (RAY 1979, 1993, SPECK und

## Literatur

---

RAY 1977). Auch innerhalb einer Population müssen nicht alle Zellen das gleiche Maß an Beschädigung aufweisen (JAY et al. 2005).

Unbeschädigte und beschädigte Mikroorganismen unterscheiden sich aufgrund ihrer Fähigkeit, auf verschiedenen Arten von festen Nährböden Kolonien zu bilden (RAY und SPECK 1973 b). STRAKA und STOKES (1959) untersuchten Ausmaß und Natur von nichtletalen Beschädigungen der Mikroorganismen während einer Lagerung in 0,5%igem Rindfleischextrakt bei verschiedenen Gefriertemperaturen. Zur Anzucht verwendeten sie ein nährstoffarmes Kulturmedium sowie nährstoffreichen Trypticase-Soja-Agar, welcher einen hohen Gehalt an Aminosäuren, Peptiden, Vitaminen, Purinen und Pyrimidinen enthält. Sie nahmen an, dass die durch Gefrieren entstehenden metabolischen Schäden die Fähigkeit der Bakterien beeinflussen, notwendige zelluläre Komponenten zu synthetisieren. So könnten die Keime daran gehindert werden, auf dem nährstoffarmen Agar zu wachsen. Anhand ihres Wachstumsverhaltens nach der Belastung durch niedrige Temperaturen definierten STRAKA und STOKES (1959) drei verschiedene Zustandsformen der Mikroorganismen:

- 1) Unbeschädigte Zellen: Sie zeigten sowohl Wachstum auf dem nährstoffarmen als auch auf dem nährstoffreichen Medium.
- 2) Beschädigte Zellen: Sie zeigten Wachstum auf dem nährstoffreichen Medium, nicht aber auf dem nährstoffarmen.
- 3) Tote Zellen: Sie zeigten auch auf dem nährstoffreichen Medium kein Wachstum mehr.

Aufgrund derartiger Beobachtungen bedeutet subletale Beschädigung von Mikroorganismen, dass diese nicht in der Lage sind, auf speziellen selektiven Nährböden zu wachsen, obgleich sie sich nach dem Auftauen im Lebensmittel wieder vermehren und Kolonien auf nicht-selektiven nährstoffreichen Nährmedien bilden können (WHITE und HALL 1985). Mit anderen Worten lassen sich beschädigte Mikroorganismen als Zellen definieren, die einen Stress überleben, aber dabei einige ihrer charakteristischen Eigenschaften verloren haben (BUSTA 1976). Das Ausmaß der Beschädigung von Keimen kann variieren, doch sind die Zellen stets in ihrer Zellstruktur angegriffen und damit „strukturell geschädigt“. Fällt die Läsion aber stärker aus, werden auch Stoffwechselsysteme in Mitleidenschaft gezogen, und die Mikroorganismen sind „metabolisch geschädigt“ (SPECK und RAY 1977).

Die genannten Zustandsformen wurden von RAY und SPECK (1973 b) näher beschrieben: Lediglich strukturell beschädigte Zellen sind zur Vermehrung auf einem nicht-selektiven, nährstoffreichen Nährboden fähig, können aber nicht auf einem nährstoffhaltigen Agar mit selektiven Stoffen wachsen. Offensichtlich erlaubt eine Beschädigung der Zellbarrieren das Eindringen von Hemmstoffen. Metabolisch beschädigte Zellen sind ebenfalls in der Lage, sich auf einem nicht-selektiven nährstoffreichen Agar zu vermehren, können aber nicht mehr auf einem nährstoffarmen Salz-Glucose-Agar Kolonien ausbilden. Dieser Zustand dürfte

durch den Verlust der Fähigkeit bedingt sein, essentielle Nährstoffe aus einfachen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu synthetisieren, welche für Wachstum und Vermehrung benötigt werden. Daraus resultiert ein angestiegenes Nährstoffbedürfnis nach Aminosäuren oder Peptiden. GUNDERSON und ROSE (1948) sowie HARTSELL (1951) beobachteten u.a. bei coliformen Keimen und Salmonellen in Lebensmitteln, welche mehrere Monate bei unter 0°C gelagert wurden, dass die Mikroorganismen im Vergleich zum Wachstum auf nicht-selektiven, nährstoffreichen Medien schrittweise immer weniger in der Lage waren, sich auf Selektiv-Nährböden zu vermehren. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von GOLDEN et al. (1988) unterstützt. Bei ihren Versuchen traten höhere Verluste der Lebensfähigkeit von *L. monocytogenes* nach Gefrieren in Tryptosebouillon auf, wenn das zur Untersuchung benutzte Plattenmedium statt 0 % nunmehr 8 % NaCl enthielt. Bei der Untersuchung gefrorener Erdbeeren wurden ebenfalls auf dem neutraleren Agar deutlich höhere Keimzahlen von *L. monocytogenes* erreicht als auf dem modifizierten Oxford-Agar mit Nalidixinsäurezusatz, woraus auf die Anwesenheit subletal beschädigter Zellen geschlossen wurde (FLESSA et al. 2005). Auch BARRELL (1988) erreichte bei Stämmen von *S. Typhimurium* in gefrorenen Würstchen und Rinderhackfleisch eine höhere Wiederfindungsrate mit nicht-selektiven als mit selektiven Medien. Entsprechendes berichtete FOSCHINO (2002) über seine Versuche mit *E. coli*-Zellen, welche in Eiscreme gefroren waren. Durch den Gefrierprozess konnte er auf nicht-selektivem Trypticase-Soja-Agar ein Absinken der anfänglichen Keimzahl um lediglich 0,5 log<sub>10</sub> KbE/g feststellen, während die Untersuchung auf dem VRBL-Agar (Violett Rot Galle Laktose-Agar) eine Reduktion von über 1 log<sub>10</sub> KbE/g erbrachte.

RAY (1979) listete einige selektive Agentien auf, die hemmend auf subletal beschädigte Zellen wirken. Dazu gehören oberflächenaktive Substanzen, Salze, Sulfonamide, toxische Chemikalien, Antibiotika, Farbstoffe und Säuren. Weiterhin zählen dazu auch Agentien, welche den Nährmedien zur Anzucht bestimmter Mikroorganismen zugesetzt werden, wie z.B. Gallensalze für die Isolierung von Enterobakteriazeen (WARSECK et al. 1973) und Antibiotika für den selektiven Nachweis von *C. perfringens* (APILUKTIVONGSA und WALKER 1980). Insgesamt erlauben es viele der anerkannten Methoden zur Isolierung und numerischen Erfassung von Mikroorganismen in Lebensmitteln nicht, dass sich beschädigte Organismen beim Anzüchten vermehren (WU 2008). Damit nehmen das zur Untersuchung benutzte Kulturmedium und die Inkubationstemperatur signifikante Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate von Mikroorganismen nach dem Gefrieren und Auftauen (LUND 2000), denn der Einsatz von Selektivmedien ohne vorangegangene Resuszitiation erbringt zumeist verminderte Anzahlen koloniebildender Einheiten (GEIGES 1996). Wenn es subletal geschädigten Mikroorganismen bei Anwesenheit von selektiven Stoffen in den Untersuchungsmedien unmöglich gemacht wird sich zu vermehren, kann das

Untersuchungsergebnis zu einem falschen Schluss über die Letalitätsrate führen (ARCHER 2004). Als besonders problematisch gilt, dass pathogene Keime bei der mikrobiologischen Untersuchung von tiefgefrorenen Lebensmitteln unentdeckt bleiben können, in der Praxis jedoch unter günstigen Bedingungen ihre ursprüngliche Lebensfähigkeit und Pathogenität wiedererlangen.

Definitionsgemäß sind die subletalen Schäden an Mikroorganismen reversibel, und die Keime besitzen die Fähigkeit innerhalb von Stunden ihre ursprünglichen Charakteristika wiederzuerlangen, wenn geeignete Temperaturen herrschen und Nährstoffe zur Verfügung stehen (PALUMBO 1989, SINGHAL und KULKARNI 2000). So sind beschädigte Mikroorganismen auch durch die Fähigkeit charakterisiert, während eines Wiederherstellungsprozesses, bei dem die beschädigten Komponenten repariert werden, ihren normalen Status wieder zu erreichen (WU 2008). Diese Tatsache birgt ein potentielles Risiko für die menschliche Gesundheit und erlangt z.B. praktische Relevanz, wenn Lebensmittel im Haushalt unsachgemäß gelagert oder über eine lange Zeit bei hohen Temperaturen aufgetaut werden. Ebenso können geschädigte Verderbserreger wieder aktiv werden, sofern sie in die Lage versetzt wurden, sich zu regenerieren (SPECK und RAY 1977). Beschädigte Zellen können durchaus mehr als 40 % der in einem Lebensmittel vorhandenen Bakterienpopulation ausmachen; der Anteil variiert mit Zeit und Temperatur der Lagerung sowie mit dem pH-Wert und anderen intrinsischen Faktoren des Mediums (STRAKA und STOKES 1959).

### **2.3.6 Reparaturmöglichkeiten und Wiederbelebung**

Die verminderte Anwachsrate subletal geschädigter Keime auf Selektivmedien lässt sich auf zwei Arten beheben. Zum Einen handelt es sich um das Einbringen bestimmter Zusätze in das Selektivmedium, welche die Reparatur anregen und dazu beitragen, die Effekte der Hemmstoffe zu überwinden (BAIRD-PARKER und DAVENPORT 1965). Zum Anderen kann die Probe in speziellen festen (POWERS und LATT 1979) oder flüssigen (MOSSEL et al. 1980) Wiederbelebungsmethoden inkubiert werden. Diese Substrate sind imstande, die Vitalität der beschädigten Organismen wiederherzustellen, bevor sie selektiven Agentien ausgesetzt werden (WHITE und HALL 1985). Durch Gefrieren geschädigte Zellen, die eine Empfindlichkeit gegenüber selektiven Stoffen erworben haben, verlieren diese stufenweise wieder, wenn sie sich in einem Reparatur- oder Resuszitationsmedium befinden (RAY und SPECK 1973 b, RAY et al. 1976).

Das Wiedergewinnen verlorener Fähigkeiten beschädigter Zellen wird als „Resuszitiation“ bezeichnet, da die Zellen aus einem scheinbaren Todeszustand wiederbelebt werden (HURST 1984). Heutzutage gilt diese Bezeichnung für eine bestimmte Inkubationszeit unter optimalen Bedingungen, welche Reparaturvorgänge erlaubt (HURST 1984, JAY et al. 2005).



Die Beschädigungen werden beseitigt, wenn die Zellen in in einer angemessenen Umgebung, wie z.B. einem nährstoffreichem, nicht-selektiven Medium, inkubiert werden, wobei die optimale Temperatur und Zeit mit der Natur der Stresseinwirkung differieren (WU 2008). Während dieser Reparaturen findet die Wiederherstellung von Wachstumsfähigkeiten statt, bevor die eigentliche Vermehrung einsetzt. Viele zelluläre Modifikationen müssen rückgängig gemacht werden und Verluste von Zellbestandteilen ausgeglichen werden, bis der Normalzustand erreicht ist (BUSTA 1976). Beschädigungen an pathogenen Bakterien können ebenfalls eliminiert und ihre pathogenen Eigenschaften vollständig wiederhergestellt werden (MEYER und DONNELLY 1992). Nach einer derartigen Wiederbelebungsstufe können beschädigte Zellen mit Selektivmedien isoliert oder quantitativ erfasst werden, denn komplett reparierte Keime erlangen ihre ursprüngliche Resistenz gegenüber selektiven Agentien in den Untersuchungsmedien zurück und sind wieder in der Lage sich zu vermehren (WU 2008). Die Genesung subletal beschädigter Bakterien findet zumeist während der lag-Phase statt, wenn intensive metabolische Aktivität mit RNA- und ATP-Synthese sowie Neuordnung von Membranbestandteilen wie Lipopolysacchariden vorherrschen (SINGHAL und KULKARNI 2000). Aus diesem Grund können beschädigte Zellen eine verlängerte lag-Phase aufweisen, um Schäden zu reparieren und für das Wachstum notwendige Proteine sowie Nucleinsäuren zu synthetisieren (BUSTA 1976, RAY 1989). Ebenfalls werden Phospholipide gebildet, und darüber hinaus scheint die Wiederherstellung von Zellribosomen und -membranen essentiell zu sein (JAY et al. 2005).

In metabolisch geschädigten *E. coli*-Zellen wurden Reparaturen durch den Zusatz von niedermolekularen Peptiden unterstützt. Essentiell für die Wiederbelebung scheint die ATP-Synthese zu sein, jedoch zeigten sich diese Vorgänge unabhängig von de novo Proteinsynthese, RNA, DNA oder Mucopeptiden (RAY und SPECK 1973 b). Die Notwendigkeit der Energiesynthese für Reparaturmechanismen wurde auch durch die Beobachtung deutlich, dass 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, die Beseitigung der Schäden hemmte (SINGHAL und KULKARNI 2000). FOSCHINO (2002) fand in seinen Versuchen durch Zusatz von Antibiotika, welche in die DNA-Replikation oder RNA-Translation eingreifen, keinen negativen Effekt auf die Reparaturen.

Da vielfältige Schäden durch das Gefrieren verursacht werden und verschiedene Faktoren für die jeweiligen Reparaturen notwendig sind, fällt eine generelle Festlegung von optimalen Bedingungen für die Wiederfindung von Organismen in einzelnen Lebensmitteln schwer. Unter Praxisbedingungen zu berücksichtigen ist auch die nicht-uniforme Verteilung der Mikroorganismen unterschiedlicher Schädigungsstufen im Substrat, was beim quantitativen Nachweis eine große Schwankungsbreite nach sich ziehen kann. Die Wirkung verschiedener Arten von Wiederbelebungsmidien wie gepuffertem Pepton, mineralisch-modifiziertem Glutamat und Trypticase-Soja-Agar auf die Resusztation der natürlichen Mikroflora von

## Literatur

---

gefrorenem Rinderhack ergab eine weite Spannbreite in der Wiedergewinnung von +178 % bis zu -50 %. Rückschlüsse auf die bestmögliche Methode sind deshalb nur bei exaktem Versuchsaufbau unter Berücksichtigung der großen Variation möglich (SINGHAL und KULKARNI 2000).

RAY und SPECK (1972 a, 1973 b) beobachteten, dass die Reparatur von Gefrierschäden in *E. coli*-Zellen am schnellsten in komplexen Nährmedien ablief. Generell eignen sich Nährstoffe wie Trypticase-Soja-Bouillon, Kaliumdihydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ) (RAY et al. 1976), Pyruvat und ATP (SINGHAL und KULKARNI 2000, WU 2008). Zur Verfügung gestellte Nährstoffe, Energiequellen und bestimmte Ionen (vor allem  $Mg^{2+}$  und Phosphat) sowie ein wieder einsetzender Stoffwechsel unterstützen die Wiederbelebung (FARKAS 2007). Ebenfalls kann anorganisches Phosphat, mit oder ohne  $MgSO_4$ , die Reparaturen erleichtern (RAY und SPECK 1972 a). Die Wiederherstellung von beschädigten Zellen auf Trypticase-Soja-Agar wird durch enthaltene Peptide unterstützt, da sie von den beschädigten Zellen für die Resynthese von essentiellen Proteinen, welche ihrerseits durch die Minustemperaturen denaturiert wurden, benötigt werden (STRAKA und STOKES 1959).

OSCROFT et al. (1987) erreichten eine optimale Wiederfindung von Mikroorganismen, wenn die Salzkonzentration des Wiederbelebungsmediums derjenigen des Lebensmittels glich. Sie führten diesen Befund auf die Tatsache zurück, dass Lebensmittel eine bestimmte Mikroflora aufweisen, die sich an ihren spezifischen Salzgehalt angepasst hat. Eine Wiederbelebung in einer hypertonischen oder hypotonischen Umgebung würde damit einen Stress für die Keime bedeuten und zu geringeren Wiederfindungsraten führen.

Die zur Wiederbelebung optimale Temperatur und Zeit differieren mit der Natur der Stresseinwirkung (WU 2008). Allerdings sind die meisten beschädigten Zellen innerhalb von zwei bis vier Stunden bei einer geeigneten Inkubationstemperatur in einem nährstoffreichen, nicht-selektiven Medium zur Reparatur befähigt (FUNG und VANDEN BOSCH 1975, RAY 1986). Für eine solche Resus-zitation lassen sich generell Wiederbelebungsstufen mit flüssigen und festen Nährmedien unterscheiden. Im Fall der flüssigen Medien wird die Lebensmittelprobe beispielsweise in nicht-selektiver Bouillon inkubiert. Die Zeit und Temperatur der Bebrütung richten sich nach der Methode der anschließenden Wiederfindung. Als Faustregel wird eine Inkubationszeit von einer bis fünf Stunden sowie eine Temperatur von 25 bis 37°C (für die meisten mesophilen Keime) empfohlen (WU 2008). OSCROFT et al. (1987) konnten aufgrund ihrer Versuche keine optimale Inkubationszeit für die Wiederfindung festlegen, aber bei einer Dauer von bis zu vier Stunden ließen sich sowohl bei 20 als auch bei 30°C vergleichbare Reparaturvorgänge beobachten. FOSCHINO (2002) vertrat die Meinung, dass der Hauptteil der Wiederbelebung innerhalb von 30 Minuten erfolgt. Ähnliche Resultate publizierten SPECK und RAY (1973 a), denn mindestens 90 % der Zellen wurden innerhalb von 30 Minuten in Trypticase-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt bei einer Temperatur zwischen 20 und 45°C

repariert. Die Inkubation der Probe in einem flüssigen Wiederbelebungsmedium kann als der initiale Schritt einer selektiven Differenzierung dienen, dem eine quantitative Erfassung auf Platten oder die MPN-Technik folgen (FOSCHINO 2002). Laut WU (2008) ist die flüssige Resusztation am besten für einen sich anschließenden Presence/Absence Test oder die Zählung mittels MPN-Verfahren geeignet. Allerdings gab FOSCHINO (2002) zu bedenken, dass die nachgewiesenen Keimzahlen auf den selektiven festen Nährmedien nicht ausschließlich eine Folge der Reparatur von beschädigten Zellen darstellen müssen, sondern ebenso von der bereits erfolgten Vermehrung unbeschädigter Zellen herrühren können. Er kam zu dieser Aussage auf Grund von Studien, bei denen er mit Zellen von *E. coli* beimpftes Speiseeis zum Einen direkt im tiefgefrorenen Zustand untersuchte sowie zum Anderen während einer zweistündigen Wiederbelebungsphase bei 30°C in Trypton-Soja-Hefe-Bouillon und zwar jeweils in 30-minütigen Abständen. Die quantitative Untersuchung führte er auf einem nicht-selektiven (Trypticase-Soja-Agar, TS-Agar) sowie einem selektiven Nährboden (Violet-Rot-Galle-Laktose-Agar, VRBL-Agar) durch. Bei allen Versuchen konnte er bereits nach 30 Minuten sowohl auf dem TS-Agar als auch auf dem VRBL-Agar eine erhöhte Keimzahl nachweisen, welche sich im Laufe der zwei Stunden weiter steigerte. Er führte diesen Befund auf eine bereits zu Beginn der Wiederbelebungsstufe einsetzende Vermehrung von unbeschädigten oder bereits reparierten Mikroorganismen zurück. Durch diese Ergebnisse sah der Autor die Genauigkeit einer Wiederbelebungs-technik in flüssigen Medien vor dem Aufbringen auf feste Selektivmedien in Frage gestellt. Vor allem bei einer Verlängerung der Inkubationszeit in Verbindung mit nachfolgender quantitativer Erfassung der Keimzahlen empfahl er eine kritische Bewertung der Resultate. WU (2008) hingegen vertrat die Ansicht, dass Reparaturprozesse immer vor der Zellvermehrung ablaufen würden. Auch MOSSEL et al. (1980) beobachteten bei zweistündiger Inkubation von Trypton-Soja-Bouillon mit durch Gefrieren bei -22°C in verschiedenen Lebensmitteln subletal geschädigten Enterobakteriäzen bei 17-25°C eine nahezu vollständige Reparatur der Zellen ohne signifikante simultane Vermehrung. RAY und SPECK (1973 a) wiesen andererseits bei coliformen Keimen bereits den Beginn einer Vermehrung innerhalb einer zweistündigen Inkubation bei 25°C nach. Um jegliche Verzerrung bei der Keimzahlbestimmung zu vermeiden, empfahlen sie daraufhin für die Resusztation eine einstündige Inkubation in Trypticase-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt bei 25°C.

## 2.4 Mikrobiologische Parameter für gefrorene Lebensmittel

### 2.4.1 Gesamtkeimzahl

Die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl gibt Auskunft über die hygienisch-mikrobiologische Beschaffenheit eines Lebensmittels, ohne die Flora näher zu differenzieren.

Die mikrobiologische Qualität tiefgefrorener Lebensmittel hängt zu einem großen Teil von der bakteriellen Besiedlung des Ausgangsmaterials vor dem Einfrierprozess ab (SCHMIDT-LORENZ 1976). Durch das Tiefgefrieren ändert sich der mikrobiologische Status meist wenig und entspricht somit im Wesentlichen dem des rohen Erzeugnisses (KRÄMER 2007). Eine Verallgemeinerung in Form einer „typischen Mikroorganismenflora“ tiefgefrorener Lebensmittel ist aus diesem Grund kaum möglich. Trotzdem überstehen einige Keimgruppen den Gefrierprozess und die anschließende Gefrierlagerung besser als andere, wodurch die mikrobielle Flora gefrorener Lebensmittel vor allem die am stärksten resistenten Mikroorganismen der Ausgangskontamination umfasst (ICMSF 1980 a). Das Ausmaß der Überlebens- und Letalitätstrategie hängt weiterhin von Faktoren wie Gefriereschwindigkeit, Lagerdauer und -temperatur, Zusammensetzung des Lebensmittels (ICMSF 1980 b) sowie Populationsdichte, Alter, Ernährungszustand und Wachstumsphase der Mikroorganismen ab (MACLEOD und CALCOTT 1976).

Der Gesamtkeimgehalt von rohem, zu verarbeitendem Gemüse liegt meist in einem Bereich von  $5,0-6,0 \log_{10}$  KbE/g (WEISS und HAMMES 2007), kann aber auch höhere Werte aufweisen wie z.B.  $5,3-8,9 \log_{10}$  KbE/g in geschnittenen Champignons (SWANSON 1990). Bei gefrorenem Gemüse sind dann Koloniezahlen zwischen  $1,0$  und  $5,0 \log_{10}$  KbE/g zu erwarten (ICMSF 1980 b). In Studien mit verschiedenen handelsüblichen Tiefkühlprodukten wiesen KLEER und HILDEBRANDT (2000) in tiefgefrorenem Porree und Pilzen eine obere 80er bzw. 95er Perzentilgrenze für die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl von  $5,6-6,3 \log_{10}$  KbE/g (Pilze) bzw.  $5,8-6,7 \log_{10}$  KbE/g (Porree) nach. Für verschiedene Sorten von gefrorenem Gemüse (u.a. Okraschoten, grüne Erbsen, Erbsen und Möhren, Artischocken) wurde ein mesophiler aerober Gesamtkeimgehalt zwischen  $3,4$  und  $7,3 \times 10^5$  KbE/g ermittelt (GOMAA et al. 2002). Der mikrobiologische Status gefrorener Rohgemüseprodukte hängt nicht nur vom Ausgangskeimgehalt der frischen Ware ab, sondern auch von der Vorbehandlung - wie z.B. Blanchieren - sowie gegebenenfalls von einer Kontaminationen durch Luft, Geräte und Oberflächen während der Herstellung der Erzeugnisse (HUCKER et al. 1952, VAUGHN et al. 1946).

Die Mikroorganismenflora tiefgefrorener Fertiggerichte, welche bereits bei der Herstellung einen Erhitzungsprozess durchlaufen haben, wird jedoch aufgrund dieser keimtötenden Maßnahme weniger vom Ausgangsmaterial beeinflusst. Kommt es durch die eingesetzten Temperaturen zu einer Abtötung der Bakterien, spiegelt die mikrobielle Belastung derartiger

Produkte vorwiegend die hygienischen Bedingungen während des Produktionsprozesses wider. Allerdings sind diese Tiefkühlfertiggerichte oftmals aus gegarten Komponenten einerseits wie z.B. Fleisch und Teigwaren, und rohen Anteilen andererseits wie z.B. Gemüse oder Kräutern, zusammengesetzt, wodurch die Gesamtkeimzahl relativ hohe Werte annehmen kann. In rohen bzw. teilgegarten Gemüfefertiggerichten wurde eine obere 80er bzw. 95er Perzentilgrenze für die aerobe Gesamtkeimzahl von 6,0 bzw. 7,1  $\log_{10}$  (95er Perzentil) KbE/g erreicht. In gegarten Fertiggerichten mit zerkleinertem rohem Fleisch lag die obere 80er bzw. 95er Perzentilgrenze für die Gesamtkeimzahl bei 4,3  $\log$  bzw. 5,3  $\log_{10}$  KbE/g (KLEER und HILDEBRANDT 2000). Die deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM 2009) gibt für „gegarte TK-Fertiggerichte bzw. Teile davon, die nur noch auf Verzehrtemperatur erhitzt werden müssen“, einen Richtwert für die mesophile aerobe Koloniezahl von  $1,0 \times 10^6$  KbE/g an, wobei dieses Limit allerdings überschritten werden darf, wenn rohe Produkte wie Käse oder Petersilie mitverwendet werden (DGHM 2009).

### 2.4.2 Grampositive Mikroorganismen

#### 2.4.2.1 Aerob wachsende Milchsäurebakterien inkl. säuretolerante Laktobazillen

Zu den Milchsäurebakterien gehören u.a. die Genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Paralactobacillus* und *Weissella* (BAUMGART 2004), welche für das Wachstum  $a_w$ -Werte im Bereich von 0,96 bis 0,90 benötigen (SINGHAL und KULKARNI 2000). Milchsäurebakterien, vor allem Spezies der Gattungen *Leuconostoc* und *Lactobacillus*, gehören zur normalen Flora von rohen Gemüseprodukten (WEISS und HAMMES 2007) und können auch in gefrorener Ware häufig nachgewiesen werden, wie z.B. *L. mesenteroides* (MUNDT et al. 1967; SPLITTSTOESSER 1970). Auch GEIGES und SCHULER (1988) fanden bei Studien mit Erbsen (Lagertemperatur  $-2,5^\circ\text{C}$ ) neben den Pseudomonaden als dominierende Gattung vor allem *Lactobacillus* spp.. Und auch KLEER und HILDEBRANDT (2000) wiesen in tiefgefrorenem Porree und Pilzen sowie in roh und teilgegarten Gemüfefertiggerichten und gegarten Fertiggerichten mit Fleischanteil säuretolerante Laktobazillen nach. Die obere 80er bzw. 95er Perzentilgrenze reichte von 2,4 bzw. 3,7 (Pilze), über 3,6 bzw. 4,4 (Porree) bis hin zu 5,3 bzw. 6,3  $\log_{10}$  KbE/g (rohe/teilgegartete Gemüfefertiggerichte).

Von anderen Genera der Milchsäurebakterien unterscheidet sich die acidotolerante Gruppe dadurch, dass sie sich auf Agar mit Säurezusatz vermehren kann, jedoch nicht mehr bei einem pH-Wert von 9,0. Der niedrigste pH-Wert, bei dem Wachstum stattfindet, beträgt 3,6; das Optimum liegt zwischen 5,5 und 6,2 und der maximale pH-Wert ist bei 7,2 erreicht. Die

## Literatur

---

säuretoleranten Milchsäurebakterien besitzen eine minimale Wachstumstemperatur von 1°C und ein Maximum von 55°C; das Optimum für Wachstum und Vermehrung beträgt 30-40°C (BAUMGART 2004). Einige Stämme gehören der Gruppe der psychrotrophen Mikroorganismen an (FEHLHABER 2004).

In Studien mit verschiedenen *Lactobacillus* und *Streptococcus* spp. wurden die Keime bei unterschiedlichen Gefriereschwindigkeiten von 0,4°C bis 6°C/min auf Temperaturen von -20, -30 und -40°C sowie bei -196°C in flüssigem Stickstoff gefroren. Unabhängig von Geschwindigkeit und Temperatur konnten alle Spezies ihre charakteristischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften bewahren, jedoch gingen hohe Gefriereschwindigkeiten mit der besten prozentualen Überlebensfähigkeit einher. Eine Gefrier- und Lagertemperatur von -196°C ergab die niedrigsten Verluste. *S. lactis* und *S. thermophilus* erwiesen sich resistenter als *Lactobacillus (L.) casei* und *Lactobacillus (L.) bulgaricus*, wobei Stämme von *L. casei* bei gleichen Gefrierbedingungen eine bessere Lebensfähigkeit als solche von *L. bulgaricus* zeigten (TSVETKOV und SHISHKOVA 1982). Eine etwas höhere Resistenz von *Bifidobacterium (B.) bifidum* im Vergleich zu *Lactobacillus (L.) acidophilus* konnten HEKMAT und MCMAHON (1992) feststellen. Ihr Ausgangskeimgehalt von  $1,5 \times 10^8$  KbE/ml (*L. acidophilus*) bzw.  $2,5 \times 10^8$  KbE/ml (*B. bifidum*) sank nach Gefrierlagerung in Speiseeis über 17 Wochen bei -29°C auf  $4,0 \times 10^6$  KbE/ml bzw.  $1,0 \times 10^7$  KbE/ml ab. LOPEZ et al. (1998) stellten dagegen bei der Gefrierlagerung von Joghurt keine verminderte Überlebensfähigkeit der *Lactobacillus* sp. fest; eine *Streptococcus* sp. und eine *Lactobacillus* sp. blieben über eine Lagerdauer von 60 Wochen bei -23°C in ihrer Keimzahl nahezu unverändert bzw. reduzierte sich die Bakteriendichte nur sehr wenig. Während einer sechsmonatigen Gefrierlagerung eines Sojadesserts fand keine Reduktion der Zellzahlen von darin enthaltenen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* spp. statt (HEENAN et al. 2004). Zu dem gleichen Ergebnis kamen DAVIDSON et al. (2000) bei der Ermittlung der Überlebensfähigkeit von *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* spp. während elfwöchiger Lagerdauer bei -20°C in Joghurt. Der Einsatz von *L. reuteri* als Probiotikum ist in gefrorenen Lebensmitteln allerdings aufgrund seiner geringen Überlebensfähigkeit bei Gefrieren und Gefrierlagerung begrenzt (TSEN et al. 2007).

Weitere Untersuchungen zu Überlebensfähigkeit von Milchsäurebakterien und *Lactobacillus* spp. galten gefrorenen Konzentraten von Käse-Starterkulturen aus *S. cremoris* und *S. lactis*. Sie behielten ihre volle Lebensfähigkeit und Aktivität über 70-84 Tage, wenn sie bei -110°C gelagert wurden. Bei einer Aufbewahrung bei -40°C waren die Zellen nur 28 Tage lebensfähig und besaßen lediglich 94 % ihrer ursprünglichen Aktivität (LLOYD und PONT 1973). Zellsuspensionen von *S. agalactiae*, welche in 1 ml Magermilch bei -20°C eingefroren worden waren, zeigten sich nach 70-tägiger Lagerung noch lebensfähig, ihre Zahl nahm jedoch während der Lagerung deutlich ab. Vom ersten bis zum 14. Tag kam es zu einer

Reduktion von ca.  $3,8 \times 10^1$  KbE, vom 21. bis zum 70. Tag von ca.  $2,3 \times 10^2$  KbE (LUEDECKE et al. 1972). Während der Gefrierlagerung von Manchegokäse blieben die darin enthaltenen Milchsäurebakterien über neun Monate bei  $-20^\circ\text{C}$  mengenmäßig unverändert (PRADOS et al. 2006). Ein geringer Abfall um  $0,75 \log_{10}$  KbE/g einer Milchsäurebakterienmischkultur konnte bei Gefrierlagerung von Joghurt über 150 Tage bei bis zu  $-18^\circ\text{C}$  beobachtet werden. Den Einfrierprozess selbst überlebten nur 1/5 der Milchsäurebakterien; nach siebenwöchiger Lagerung waren weiterhin ca. 10 % der Bakterien abgestorben (KIM et al. 2009). Bei Lagerung von Speiseeis mit darin befindlichen *Bifidobacterium* oder *Lactobacillus* sp. bei  $-25^\circ\text{C}$  über 60 Tage kam es ebenfalls zu einem Absinken der Zellzahlen um ca. 10 %. Im Fall einer gemeinsamen Lagerung beider Keimarten betrug die Überlebensrate ca. 86 % (MAGARIÑOS et al. 2007).

Im Allgemeinen erweisen sich Milchsäurebakterien als relativ stabil gegenüber dem Einwirken sehr niedriger Temperaturen (TSEN et al. 2007). Resistenzunterschiede zwischen Stämmen von milch-assoziierten *Streptococcus* spp. wurden Differenzen in zellulären Inhalten wie Fettsäuren und Polyglucoseverbindungen zugeschrieben (GILLILAND und SPECK 1974).

### 2.4.2.2 Koagulase-positive Staphylokokken

*Staphylococcus* (*S.*) *aureus* stellt den bedeutendsten Vertreter der koagulasepositiven Staphylokokken dar, obwohl auch *S. intermedius* und *S. hyicus* in der Lage sind, Koagulase zu bilden. Lebensmittelhygienisch liegt die Bedeutung v.a. in der Fähigkeit, Enterotoxine zu produzieren, und es sind mindestens 13 verschiedene Toxine (Staphylokokken-Enterotoxine A bis E sowie G bis O) bekannt. *S. aureus* vermehrt sich bei Temperaturen nicht unter  $7^\circ\text{C}$  (ANGELOTTI et al. 1961), wobei die minimale Grenze für die Toxinproduktion  $10^\circ\text{C}$  beträgt (ICMSF 1996). In bei  $5^\circ\text{C}$  gelagerter Eiscrème überlebte der Keim allerdings zwei Jahre (MOUNTNEY und GOULD 1988). Die maximale Temperatur für Wachstum, Vermehrung und Toxinbildung liegt bei  $48^\circ\text{C}$ , das Optimum bei  $37^\circ\text{C}$ .

Der optimale  $a_w$ -Wert beläuft sich sowohl für Vermehrung als auch für die Bildung des Toxins auf 0,98. Unter aeroben Bedingungen beträgt der minimale  $a_w$ -Wert für eine Vermehrung 0,83, für die Toxinbildung 0,87. *S. aureus* ist in der Lage, in einem weiten pH-Bereich zu wachsen (pH 4-10; Toxinbildung 4,5-9,6), wobei das Optimum zwischen pH 6-7 (Toxinbildung pH 7-8) liegt (ICMSF 1996).

In Versuchen mit gefrorenem Gemüse zeigten *Staphylococcus* spp. eine höhere Resistenz als andere Bakterien und bildeten nach neunmonatiger Lagerung die dominierende Mikroorganismengruppe (MOUNTNEY und GOULD 1988). Auch die Spezies *S. aureus* wird als sehr resistent gegenüber Gefrierprozessen (GEORGALA und HURST 1963) und mäßig resistent gegenüber Gefrierlagerung beschrieben (RAJ und LISTON 1961). PROCTOR und

PHILLIPS (1947) konnten in vorgegarten Lebensmitteln (Hühnereintopf, Rindfleisचेintopf, gekochte Shrimps und Lachs) eine Überlebensrate von mindestens 10 % pathogener Staphylokokken-Stämme während Gefrierlagerung über sechs Monate bei -18°C feststellen. Eine Aufbewahrung bei -18°C über 28 Tage in Hamburgerpatties aus Hühnerfleisch erbrachte einen Abfall der Keimzahl um 0,73 log<sub>10</sub> KbE/g (CASARIN et al. 2009).

In Rindfleischproben, welche bei -26°C gefroren wurden, kam es bei einer Lagertemperatur von -9°C zu einem Absinken der Keimanzahl um 43,7 % in 240 Tagen; bei -17,8°C dagegen betrug die Reduktion 59,7 % (HARTSELL 1951). WHITE und HALL (1984 a) beobachteten in rohem Rind- und Hühnerfleisch während sechsmonatiger Lagerung bei -18°C eine Überlebenszeit von 168 Tagen. Beim Gefrieren verschiedener Lebensmittel (Vollmilch, Hackfleisch, Rindfleisch und Huhn) und anschließender Lagerung zwischen -18 und -22°C zeigte *S. aureus* nach einigen Monaten eine Reduktion von ungefähr 1 log<sub>10</sub> (LUND 2000). LUEDECKE et al. (1972) konnten bei Zellen von *S. aureus*, welche einer 70-tägigen Gefrierlagerung bei -20°C in Magermilch unterworfen waren, eine Verminderung von 1,4 x 10<sup>1</sup> KbE feststellen. In Vanilleeis, welches bei -18,4°C gelagert wurde, ließ sich der Keim noch nach 126 Tagen nachweisen (PIJCK und SCHUTZYER 1972). MCCLESKEY und CHRISTOPHER (1941) konnten aus Erdbeeren nach 14-monatiger Lagerung bei -18°C noch Zellen des Keimes anzüchten. In gefrorenen Erbsen waren vom anfänglichen *S. aureus*-Gehalt bei einer Temperatur von -18°C nach zwölf Monaten 30 % und nach 24 Monaten lediglich 8 % nachweisbar. Bei einer Lagertemperatur von -29°C überlebten nach zwölf Monaten 65 % und nach 24 Monaten 11 % (HALL 1969). HARTSELL (1951) wies *S. aureus* in Versuchen mit Erbsen, die bei -25°C eingefroren und bei -9°C 84 Tage gelagert worden waren nach, bei -17,8°C auch noch nach 270 Tagen.

Die DGHM gibt für „rohe oder teilgegart TK-Fertiggerichte, die vor dem Verzehr gegart werden müssen“, sowie für „gegart TK-Fertiggerichte, die nur noch auf Verzehrttemperatur erwärmt werden müssen“, für koagulase-positive Staphylokokken einen Richtwert von 1,0 x 10<sup>2</sup> KbE/g sowie einen Warnwert von 1,0 x 10<sup>3</sup> KbE/g an (DGHM 2009).

Bereits gebildetes Toxin von *S. aureus* wird durch Gefrieren nicht beeinflusst (ARCHER 2004), wodurch die Möglichkeit von Vergiftungen durch die Aufnahme gefrorener bzw. aufgetauter Enterotoxin enthaltener Produkte besteht (ICMSF 1980 a).

### 2.4.2.3 *Bacillus (B.) cereus*

Zu der *B. cereus*-Gruppe gehören die Spezies *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* und *B. weihenstephanensis*, letzterer zu den psychrotrophen Formen mit einer minimalen Wachstumstemperatur von 4°C bis 7°C zählend (LECHNER et al. 1998). Da *B. cereus* ubiquitär verbreitet ist, wird der Erreger häufig auf rohen Lebensmitteln



pflanzlichen Ursprungs wie Gewürzen, Kräutern, Getreide, Obst und Gemüse nachgewiesen, wobei Zerealien an erster Stelle stehen (BÜLTE 2008).

Die mesophilen *B. cereus*-Stämme können in einem Temperaturbereich von 10°C bis 50°C wachsen, und die optimale Temperatur für die Vermehrung liegt zwischen 28 und 35°C (30 und 40°C). Für Wachstum und Vermehrung werden  $a_w$ -Werte zwischen 0,91 und 0,95 sowie pH-Werte zwischen 4,40 und 9,30 benötigt (BAUMGART 2004, KRAMER und GILBERT 1989).

Vegetative Zellen von *B. cereus* verhalten sich empfindlich gegenüber Gefrieren und Tiefkühlagerung, aber die Sporen sind resistent und bleiben für mindestens sechs Monate bei -18°C lebensfähig (WHITE und HALL 1984 b). Nicht näher identifizierte *Bacillus* spp., welche im Darm von frischen Hybrid-Tilapia (Zahnkarpfen) nachgewiesen wurden, blieben über die gesamte zwölfmonatige Lagerdauer bei -20°C in ihrer Anzahl nahezu unverändert (AL-HARBI und UDDIN 2005). Bei im Supermarkt (Wuhan, China) erworbenem und bei -20°C gelagertem Speiseeis konnte in 24 von 40 Proben *B. cereus* nachgewiesen werden (ZHOU et al. 2010).

Die DGHM gibt für „rohe oder teilgegart TK-Fertiggerichte, die vor dem Verzehr gegart werden müssen“ sowie für „gegart TK-Fertiggerichte, die nur noch auf Verzehrstemperatur erwärmt werden müssen“, für präsumtive *B. cereus* einen Richtwert von  $1,0 \times 10^3$  KbE/g sowie einen Warnwert von  $1,0 \times 10^4$  KbE/g an (DGHM 2009).

#### 2.4.2.4 Sulfitreduzierende anaerob wachsende Sporenbildner

Wegen potentieller Pathogenität und eines hohen Verderbnispotentials besitzt *C. perfringens* unter den sulfitreduzierenden anaerob wachsenden Sporenbildnern die größte Bedeutung für den Menschen. Der Keim ist ubiquitär verbreitet und kann infolge dessen in einem weiten Spektrum von Lebensmitteln vorhanden sein. Vor allem erfolgt eine Kontamination mit Sporen aus Erdboden oder Staub. Weiterhin findet sich das Bakterium im Intestinaltrakt des Menschen sowie vieler Tiere, weshalb auch eine fäkale Belastung in Betracht gezogen werden muss. Aufgrund der Bildung von fünf verschiedenen Toxinen werden die Typen A-E unterschieden, wobei den Typen C und insbesondere A für den Menschen die größte Bedeutung zukommt. *C. perfringens* vermag sich in einem weiten Temperaturbereich von 12 bis 50°C zu vermehren, jedoch ist das Wachstum unter 15°C stark verlangsamt. Ein Auskeimen der Sporen lässt sich allerdings auch schon bei 5°C beobachten (MICHENER und ELIOTT 1964, ROBERT und HOBBS 1968). Das Temperaturoptimum liegt zwischen 43 und 47°C mit Generationszeiten von acht Minuten. Vegetative Zellen sowie das gebildete Enterotoxin sind allerdings sehr hitzeempfindlich. Wachstum und Vermehrung der vegetativen Zellen finden in einem pH-Bereich von ca. 5,0 bis 9,0 statt, das Optimum befindet sich zwischen 6,0 und 7,5. Von BARNES et al. (1963) wurde bei gleicher Temperatur in Medien mit einem pH-Wert von 5,8 langsames Wachstum als bei einem pH-Wert von

7,2 beobachtet. Versporung kann bei pH-Werten zwischen 6,0 und 7,0 stattfinden. Für die Vermehrung sind minimale  $a_w$ -Werte von 0,95 (0,93) notwendig; eine Versporung findet nicht unterhalb eines  $a_w$ -Wertes von 0,98 statt. *C. perfringens* ist im Gegensatz zu vielen anderen Arten dieser Gattung nicht obligat anaerob, sondern aerotolerant, da Redoxpotentiale von +350 mV toleriert werden (BAUMGART 2004, BÜLTE 2008, ICMSF 1996). Je nach Inkubationstemperatur kann *C. perfringens* in Anwesenheit von 2 bis zu 5 % Natriumchlorid wachsen (ICMSF 1996, MITSCHERLICH und MARTH 1984). Einige Autoren halten eine Tolerierung von bis zu 8 % NaCl für möglich (ICMSF 1996).

Vegetative Zellen von *C. perfringens* gelten als empfindlich gegenüber Gefrieren und Gefrierlagerung, die Sporen verhalten sich jedoch sehr resistent. So konnten nur ungefähr 6 % der vegetativen Zellen in Fleisch bei -23°C für 14 Tage überleben (FRUIN und BABEL 1977). Ähnliches konstatierten STRONG und CANADA (1964) bei der Gefrierlagerung von *C. perfringens* in Bratensoße vom Huhn bei -17,7°C. Von den vegetativen Zellen überlebten 4,29 % für 90 Tage und 3,69 % für 180 Tage. Hinsichtlich der Sporen blieben 37,9 % für 90 Tage und 10,9 % für 180 Tage aktiv. Allerdings berichtete LILLARD (1977) bei Gefrierlagerung von Hühnerfleisch bei -23°C über 4-6 Wochen über einen signifikanten Abfall sowohl der vegetativen Zellen als auch der Sporen von *C. perfringens*. TRAKULCHANG und KRAFT (1977) ermittelten in verschiedenen Fleischerzeugnissen einen Anfangskeimgehalt von ungefähr  $10^6$  KbE/g. Nach dem Einfrieren bei -29°C wurde einen Tag später das Absterben von 38 bis 75 % der Zellen dokumentiert. Die anschließende Keimreduktion verlief sehr langsam. Nach 42 Tagen waren noch ungefähr  $10^5$  KbE/g nachweisbar, die lebensfähigen Zellen wurden um ca. 89,5 % reduziert. Im Gegensatz dazu blieb die Menge der Sporen über die gesamte Dauer in allen Lebensmitteln konstant (TRAKULCHANG und KRAFT 1977). Jedoch wurde auch von vegetativen Zellen berichtet, die eine längere Gefrierlagerung überlebten und in der Lage waren, im aufgetauten Produkt zu wachsen (WHITE and HALL 1984 b). KLEER und HILDEBRANDT (2000) konnten für anaerob wachsende sulfitreduzierende Sporenbildner in tiefgefrorenen gegarten Fertiggerichten mit zerkleinertem rotem Fleisch eine obere 95er Perzentilgrenze von  $1,3 \log_{10}$  KbE/g sowie von  $1,6 \log_{10}$  KbE/g in rohen/teilgegarten Fertiggerichten mit rotem Fleischanteil und von  $1,5 \log_{10}$  KbE/g in Gemüsefertiggerichten nachweisen.

### 2.4.2.5 *Listeria (L.) monocytogenes*

Die weit verbreitete Spezies *L. monocytogenes* kommt vor allem im Erdboden und Kot von Tieren, auf Pflanzen sowie in Abwässern und Silagen vor. Dadurch ist eine Übertragung auf viele verschiedenartige Lebensmittel, wie z.B. Milch, Käse, Gemüse, Früchte, Fisch und Geflügel, wahrscheinlich. Von 1750 gefrorenen Rohgemüseprodukten wurden jedoch lediglich 31 positiv auf *L. monocytogenes* getestet (VITAS et al. 2004).

Das Bakterium ist in der Lage, sich in einem weiten Temperaturbereich zu vermehren, welcher von 1-3°C bis 45°C reicht. Damit besitzt der Keim psychrotrophe Eigenschaften; für ein Wachstum in Milch wurde sogar ein Temperaturminimum von -0,4°C angegeben. Die Vermehrungsquote variiert deutlich mit der Umgebungstemperatur. Bei 4°C beträgt die Generationszeit in Milch 1,2-1,7 Tage, während sie sich bei 8°C auf lediglich 8,7-14,6 Stunden verringert (BAUMGART 2004). Die Optimaltemperatur liegt bei 37°C. Wachstum und Vermehrung benötigen einen minimalen pH-Wert von 4,4 sowie einen  $a_w$ -Wert von mindestens 0,92. Der optimale pH-Wert beträgt 7,0 (BAUMGART 2004, ICMSF 1996). Zugleich ist das Bakterium in der Lage, eine Toleranz gegenüber Säurestress (pH 3,5) auszubilden. Diese entwickelt sich nach einstündiger Anpassung an eine milde Säure (pH 5,5) (O'DRISCOLL et al. 1996).

*L. monocytogenes* stellt sich gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen resistenter dar als viele andere nicht sporenbildende Lebensmittelinfektionserreger und kann oftmals auch bei Kühl- und Gefriertemperaturen nachgewiesen werden (BARTELT 2007). Allerdings variiert die Empfindlichkeit gegenüber dem Gefrieren innerhalb der Stämme von *L. monocytogenes* deutlich (ARCHER 2004). Gefrierlagerung in kontaminiertem Fleisch widerstand der Keim über 545 Tage bei -10°C (SIELAFF 1968), und bei Lagerung von mit *L. monocytogenes* ( $10^5$ /g) kontaminiertem Hackfleisch konnte über 6 Monate bei -18°C keine Veränderung der Keimdichte festgestellt werden (KAYA und SCHMIDT 1989). FLESSA et al. (2005) untersuchten die Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* auf geschnittenen Erdbeeren bei einer Lagertemperatur von -20°C. Der größte Effekt des Gefrierens wurde nach 24 Stunden mit einer Verminderung um fast 1  $\log_{10}$  deutlich. Während der weiteren vierwöchigen Lagerdauer kam es insgesamt lediglich zu einer Keimreduktion um 1,2  $\log_{10}$ . In vakuumverpacktem Fisch und Shrimps fand bei -20°C-Lagerung eine Verringerung von weniger als 1  $\log_{10}$  in drei Monaten statt (HARRISON et al. 1991). Ebenso sank die Keimzahl um ca. 1  $\log_{10}$  KbE/g während 14-wöchiger Lagerung in gekochtem Speck bei -20°C (TAORMINA und DORSA 2010). Indessen variiert die Überlebensfähigkeit während der Gefrierlagerung mit dem pH-Wert des umgebenden Lebensmittels. Bei Gefrieren und Gefrierlagerung von Substraten mit höheren pH-Werten (5,8 oder mehr), wie Rinder- und Truthahnhackfleisch, Frankfurter Würstchen, Dosenmais und Eiscreme, zeigten sich die Zellen von *L. monocytogenes* sehr resistent, und die Anzahl der lebensfähigen Keime blieb konstant. Im Gegensatz sank die Menge der Mikroorganismen in Tomatensuppe (pH 4,74) nach längerer Lagerdauer ab und sie konnten quantitativ nicht mehr auf Selektivmedien nachgewiesen werden (PALUMBO und WILLIAMS 1991). Einen gegenteiligen Befund publizierten jedoch OYARZÁBAL et al. (2003). In Saftkonzentraten von Apfel, Banane, Orange, Ananas und weißer Traube, welche einen pH Wert von 3,6 bzw. 3,7 aufwiesen und bei -23°C gelagert wurden, überlebte *L. monocytogenes* mit nur geringen Abfällen in der Keimzahl über 12 Wochen. In

Bananenkonzentrat mit einem pH von 5,5 sanken die Keimzahlen dagegen sehr schnell ab, und Voranreicherungsmedien waren nötig, um *Listeria* nachzuweisen.

In Studien von EL-KEST und MARTH (1992) wurde berichtet, dass höhere Gefriertemperaturen (-18°C) einen stärker letalen Einfluss auf *L. monocytogenes* besitzen als niedrigere Temperaturen (-198°C). Nach dem Gefrieren in flüssigem Stickstoff bei -198°C von in gepuffertem Peptonwasser gelösten *L. monocytogenes*-Zellen und anschließender einmonatiger Lagerung kam es zu keiner Veränderung der Keimdichte. Bei Temperaturen von -18°C starben 87 % der Zellen nach Gefrieren und einem Monat Lagerzeit; bei Gebrauch von Tryptose-Bouillon waren dies 54 % (EL-KEST et al. 1991).

Die DGHM gibt für „gegarte TK-Fertiggerichte, die nur noch auf Verzehrstemperatur erhitzt werden müssen“, einen Warnwert von  $1,0 \times 10^2$  KbE/g für *L. monocytogenes* an (DGHM 2009).

### 2.4.3 Gramnegative Keime

#### 2.4.3.1 Aeromonaden

*Aeromonas* spp. besitzen mesophil-psychrotrophe Eigenschaften mit Ausnahme von *Aeromonas (A.) salmonicida*, welcher als pathogener Erreger bei Süßwasserfischen bekannt ist und einen psychrophilen Charakter aufweist (KLEER 2004). *Aeromonas* spp. können häufig aus rohem Gemüse, wie z.B. Petersilie, Spinat, Sellerie, Brokkoli und Salat, isoliert werden (CALLISTER und AGGER 1987). Die optimale Temperatur für Wachstum und Vermehrung liegt bei 28-35°C, das Maximum zwischen 42 und 45°C. Die minimale Wachstumstemperatur für diese Keimgattung wird mit >0°C bis 4°C angegeben, und viele *Aeromonas* spp. sind in der Lage, sich bei Temperaturen von 4-5°C zu vermehren (ICMSF 1996). So zeigten *A. hydrophila* Wachstum in Spargel, Blumenkohl und Brokkoli, wenn sie bei 4°C gelagert wurden (BERRANG et al. 1989). Die große Mehrheit dieser Bakterien stellt jedoch unterhalb einer Temperatur von 4°C die Vermehrung ein (ABEYTA et al. 1986).

Die Salztoleranz der Aeromonaden variiert mit der Umgebungstemperatur. Bei 5°C werden nahezu alle Stämme entweder durch 4 % Natriumchlorid oder einen pH von 5,3 in ihrem Wachstum gehemmt, aber nahe der optimalen Wachstumstemperatur tolerieren einige Stämme 6 % Natriumchlorid (KNØCHEL 1990). Der maximale NaCl-Gehalt liegt zwischen 5 und 6 %; das Optimum bei 1-2 % (ICMSF 1996). Ebenso vertragen viele Isolate bei Temperaturen von 28°C einen höheren Säuregehalt (PALUMBO et al. 1985). *A. hydrophila* wurde aus natürlichen, wasserreichen Habitaten isoliert, die einen pH-Wert im Bereich von 5,2 bis 9,8 aufwiesen (HAZEN et al. 1978). Der minimale pH-Wert wird mit 4,5 angegeben, das Optimum liegt bei 7,2 (ICMSF 1996).

Bei Untersuchung des Einflusses verschiedener Temperaturen auf die Virulenzfaktoren von *A. hydrophila*, *A. caviae* und *A. sobria* wurde festgestellt, dass die pathogenen Eigenschaften

bei allen überprüften Temperaturen (+37°C, +25°C, +4 °C) exprimiert wurden, ein Vorgang, der jedoch bei + 4°C langsamer ablief (KARIPTAS et al. 2010). Im Darm von frischen Hybrid-Tilapia betrug der Anteil der Spezies *A. hydrophila* 14,6 % vom Gesamtmikroorganismengehalt, wovon nach Lagerung über ein Jahr bei -20°C noch 9,9 % wiederentdeckt werden konnten (AL-HARBI und UDDIN 2005). Des Weiteren wurde von Zellen von *A. hydrophila* berichtet, die über 18 Monate in bei -72°C gelagerten Austern lebensfähig blieben (ABEYTA et al. 1986). Diese Schalentiere wurden 1982 mit 472 Fällen von Gastroenteritis in Verbindung gebracht (BEUCHAT 1991).

#### 2.4.3.2 Pseudomonaden

Die Gattung *Pseudomonas* weist viele psychrotrophe Spezies auf, wie z.B. *P. syringae*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* und *P. putida* 9BW (KAANAN et al. 1998), von denen einige in der Lage sind, sich sogar bei Temperaturen von bis zu -7°C zu vermehren. Die minimale Wachstumstemperatur für *P. fluorescens* beträgt -1°C.

Diese Keimgruppe zeigt geringe Nährstoffansprüche, sie ist allerdings auf eine hohe Wasseraktivität in einer Größenordnung  $> 0,98$  angewiesen (KLEER 2004). Einige Stämme wachsen jedoch auch bei  $a_w$ -Werten von 0,95-0,96 (SINGHAL und KULKARNI 2000). *Pseudomonas* spp. verhalten sich strikt aerob und können sich unterhalb eines pH-Wertes von 4,5 nicht vermehren. Sie sind häufig in Wasser, auf Pflanzen und eiweißreichen, frischen Lebensmitteln zu finden (BAUMGART 2004). Des Weiteren werden sie als eine der vorherrschenden Mikroorganismengattungen sowohl auf rohem (ICMSF 1980 b) als auch auf gefrorenem Gemüse beschrieben. Demgemäß sahen auch GEIGES und SCHULER (1988) in Erbsen, gemischtem Gemüse sowie Rosenkohl bei -2,5°C die Pseudomonaden als dominierende Keimgruppe an. Aus allen von ARROYO und PRESTAMO (1998) untersuchten geschnittenen Tomatenproben konnte *P. aeruginosa* isoliert werden. KLEER und HILDEBRANDT (2000) wiesen in tiefgefrorenem Porree und Pilzen diese Mikroorganismengattung als dominante Florakomponente nach. Die oberen 80er/95er Perzentilgrenzen lagen bei 4,1/5,3  $\log_{10}$  KbE/g (Porree) sowie 5,2/6,1  $\log_{10}$  KbE/g (Pilze).

Allerdings beschränkt sich das Vorkommen der Pseudomonaden nicht auf Gemüse; viele Publikationen über die Mikroflora gefrorener Erzeugnisse bezeichnen diese Gattung als das am häufigsten in TK-Kost nachzuweisende Bakterium (GEIGES 1996; GEIGES (unveröffentlichte Daten)), darunter auch *P. maltophilia* (DOUDOROFF und PALLERONI 1974). KLEER und HILDEBRANDT (2000) isolierten *Pseudomonas* spp. aus rohen/teilgegartem Gemüfefertiggerichten sowie gegarten Fertiggerichten mit Fleischanteil. Die oberen 80er bzw. 95er Perzentilgrenzen lagen bei 3,3/4,3  $\log_{10}$  KbE/g (Gemüfefertiggerichte) und 4,8/5,4  $\log_{10}$  KbE/g (Fertiggerichte mit Fleischanteil).

## Literatur

Über die Resistenz bei Gefrierlagerung liegen verschiedene, z.T. widersprüchliche Angaben vor. In Wasserkresse, welche bei einer Temperatur von  $-21^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde, konnten nach zwei Monaten keine überlebenden Zellen von *P. aeruginosa* nachgewiesen werden. Bei schwankenden Lagertemperaturen waren die Mikroorganismen bereits nach zehn Tagen bei  $-15^{\circ}\text{C}$  abgestorben (OLIVEIRA et al. 2009). *P. putrefaciens* dagegen überlebte die Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  in Fisch, Austern, Muscheln und Shrimps über 210 Tage (LHULLIER et al. 1977). *P. fluorescens*, welche im Darm von frischen Hybrid-Tilapia gefunden wurde, konnte nach neunmonatiger Gefrierlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nicht mehr nachgewiesen werden (AL-HARBI und UDDIN 2005). Dagegen überlebten Zellen dieser Spezies in Erdbeeren in verschlossenen Konservendosen bei  $-9,4^{\circ}\text{C}$  über drei Jahre (SMART 1934). Von *P. fluorescens*, die in 0,5%igem Rindfleischextrakt eingefroren waren, überlebten bei  $-29^{\circ}\text{C}$  nach einem Tag 52 %, nach einer Woche 46 % und nach 15 Tagen 41 %. Bei  $-18^{\circ}\text{C}$  lagen die Wiedergewinnungsraten etwas niedriger, nämlich bei 49, 37 und 13 % (STRAKA und STOKES 1959). In Versuchen von PARTMANN (1975) mit rohem Rind- und Hackfleisch, welche er vor dem Gefrierprozess bei  $-30^{\circ}\text{C}$  sowie im Anschluss daran untersuchte, konnte er bei *Pseudomonas* spp. im Rindfleisch eine Reduktion der Keimzahl von  $2,9 \times 10^5$  auf  $1,7 \times 10^4$  nach dem Gefrieren, sowie im Hackfleisch einen Abfall von  $2,8 \times 10^5$  auf  $1,1 \times 10^4$  feststellen. HALL (1969) untersuchte in gefrorenen Erbsen bei Gefrierlagerung über 2 Jahre mit verschiedenen Temperaturen das Verhalten einer mesophilen sowie einer psychrotrophen *Pseudomonas*-Spezies und ermittelte Differenzen in der Empfindlichkeit, wie in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Überlebensraten (%) zweier *Pseudomonas* spp. während Lagerung von Erbsen bei unterschiedlichen Temperaturen (nach HALL 1969)

	$-18^{\circ}\text{C}$ 1 Monat	$-18^{\circ}\text{C}$ 12 Monate	$-18^{\circ}\text{C}$ 24 Monate	$-29^{\circ}\text{C}$ 1 Monat	$-29^{\circ}\text{C}$ 12 Monate	$-29^{\circ}\text{C}$ 24 Monate
Psychrotrophe Spezies	39	0	0	109	3	0,3
Mesophile Spezies	78	33	0	111	56	43

ARPAI (1962) stellte in Versuchen mit *P. fluorescens* fest, dass besonders dieser Keim empfindlich auf einen niedrigen pH-Wert im Medium reagiert und es zu einer verringerten Anzahl von überlebenden Organismen während des Gefrierens und der Gefrierlagerung kommt.

### 2.4.3.3 Enterobakteriaseen

Zu den Enterobakteriaseen zählen u.a. die Genera *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* und *Yersinia* (HOLT et al. 1994), von denen einige der Gruppe der coliformen Keime angehören (s. 2.4.3.4.1). Enterobakteriaseen sind Bewohner des Darmkanals von Mensch und Tier. Oftmals bilden sie auch eine Komponente der Normalflora von Pflanzen sowie rohen Gemüseprodukten. Dort können häufig Spezies von *Serratia*, *Klebsiella* und *Enterobacter* identifiziert werden (WEISS und HAMMES 2007); außerdem kommen *Proteus*, *Hafnia*, *Pantoea* und *Erwinia* im Erdboden sowie auf Pflanzen vor (BAUMGART 2004). *Serratia* und *Erwinia* spp. sind ebenfalls in gefrorenem Gemüse nachzuweisen (HUCKER et al. 1952, HUCKER 1954, SANDERSON und FITZGERALD 1940). GEIGES und SCHULER (1988) fanden bei -5°C in gefrorenen Erbsen und gemischtem Gemüse vor allem *Erwinia* spp., und SCHMIDT-LORENZ (1976) isolierte *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Erwinia* spp. in tiefgefrorenem Gemüse. Er sah die Möglichkeit, dass bestimmte Stämme oder Spezies dieser Gattungen während längerer Lagerzeit bei -5°C wachsen. MOSSEL et al. (1980) erreichten durch Gefrieren von neun Enterobakteriaseen-Stämmen (u.a. *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia*) in unterschiedlichen Lebensmitteln sowie in Trypton-Soja-Bouillon bei -22°C und anschließende Gefrierlagerung über sieben Tage einen Abfall um ein bis zwei log<sub>10</sub> Stufen. *Proteus (P.) vulgaris* konnte die Gefrierlagerung in Kirschen, welche vakuumverschlossen in Konservendosen tiefgefroren wurden, bei -17,8°C 98 Tage überleben, war jedoch nach 112 Tagen abgestorben (WALLACE und PARK 1933). Von KLEER und HILDEBRANDT (2000) wurden für die Enterobakteriaseen obere 80er/95er Perzentilgrenzen von 3,9/4,7 log<sub>10</sub> KbE/g (TK-Porree) und 3,0/3,9 log<sub>10</sub> KbE/g (TK-Pilze) bestimmt. In rohen bzw. teilgegarten Gemüfefertiggerichten lagen diese bei 3,3/4,1 log<sub>10</sub> KbE/g sowie bei 4,3/4,5 log<sub>10</sub> KbE/g in gegarten Fertiggerichten mit Fleischanteil.

Die Gattungen *Hafnia*, *Klebsiella* und *Serratia*, ebenso wie *Yersinia (Y.) enterocolitica*, besitzen psychrotrophe Eigenschaften (FEHLHABER 2004, KLEER 2004). *Y. enterocolitica*-artige Organismen wurden u.a. aus vakuumverpacktem Fleisch, welches bei 1-3°C gelagert worden war, isoliert (HANNA et al. 1977), und diese Spezies vermochte noch bei Temperaturen von bis zu -2°C zu wachsen (SINGHAL und KULKARNI 2000). *Pantoea agglomerans*, welche bei vielen kühl gelagerten pflanzlichen und tierischen Produkten vorkommt, zeigt Wachstum und Vermehrung bis +4°C (BAUMGART 2004). In der Literatur existieren unterschiedliche Angaben über die Überlebensfähigkeit dieser Gattungen während der Gefrierlagerung. Durch Gefrieren bei -18°C und -75°C für eine Stunde fand bei einer Zellpopulation von *Y. enterocolitica* eine Inaktivierung von 7 bzw. 42 % statt und 55 bzw. 83 % der Mikroorganismen wurden beschädigt (EL-ZAWAHRY und GRECZ 1981). *Serratia (S.) liquefaciens* im Darm von frischen Hybrid-Tilapia ließ sich nach sechsmonatiger Lagerung

bei -20°C nicht mehr anzüchten (AL-HARBI und UDDIN 2005). In frisch hergestelltem Passionsfruchtsaft, welcher einen pH-Wert von 3,0 aufwies, war *S. flexneri* bei -20°C-Lagerung in der Lage, ein bzw. zwei Stunden zu überleben (AEA und BUSHNELL 1962 b). Dagegen konnten Zellen von *S. flexneri* sowie *S. sonnei* aus magerem Rindfleisch bei -16°C Lagertemperatur noch nach 360 Tagen isoliert werden (STELZNER und URBACH 1969). In Shrimps überlebte *S. sonnei* während der Aufbewahrung bei -20°C 35-60 Tage und in Eiscreme mehr als 49 Tage, während *S. flexneri* in Shrimps 60 Tage und in Eiscreme in Abhängigkeit ihrer initialen Keimzahl sieben bzw. 28-49 Tage anzuzüchten war (RUTSCH 1987).

### 2.4.3.4 Indikatororganismen in tiefgefrorenen Lebensmitteln

*E. coli*, coliforme Bakterien, Enterobakteriaceen und Enterokokken stellen bei der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln sogenannte „Markerorganismen“ dar. Diese sind entweder Indexorganismen, welche eine potenzielle Gesundheitsgefährdung anzeigen, oder Indikatororganismen, die eine nicht ausreichende Verarbeitungs- oder Betriebshygiene signalisieren sollen (SCHMIDT-LORENZ und SPILLMANN 1988). Diese Markerfunktion gilt auch für die Untersuchung von gefrorenen Lebensmitteln, wobei hier allerdings zu beachten ist, dass die ursprünglich im Produkt vorhandene Keimflora durch den Gefrierprozess reduziert und modifiziert sein kann. Bei gefrorenen Lebensmitteln stehen coliforme Keime, *E. coli* sowie Enterokokken im Fokus der Diskussion über den aussagekräftigsten Indikatorkeim.

#### 2.4.3.4.1 Coliforme Keime

Als coliforme Keime werden Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* bezeichnet, welche Lactose unter Gas- und Säurebildung innerhalb von 48 Stunden bei 30 bis 37°C abbauen. Zu ihnen gehören die Spezies der Genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*, welche zum Teil im Darmkanal von Mensch und Tier zu finden sind, zum Teil aber auch bei vielen pflanzlichen Produkten zur Normalflora gehören. Vor allem *Klebsiella* und *Enterobacter* spp. wurden sehr häufig auf rohen Gemüseprodukten nachgewiesen (WEISS und HAMMES 2007). Spezies dieser Gattungen sind in der Lage, bei Temperaturen bis zu 0°C zu wachsen (ICMSF 1980 a) und wurden oftmals auch aus gefrorenen Erzeugnissen isoliert (GEIGES 1996). So wurden in gefrorenem Gemüse nachgewiesene Keime u.a. der Gattung *Enterobacter* zugeordnet (BANWART 1989). GEIGES und SCHULER (1988) identifizierten in gefrorenen Erbsen und gemischtem Gemüse bei -5°C neben weiteren Keimgruppen vor allem *Enterobacter (E.) agglomerans*. Auch MUNDT et al. (1967) und SPLITTSTOESSER (1970) fanden hohe Zahlen von coliformen Keimen, ohne die Spezies zu differenzieren. BURTON (1949 a), welcher ebenfalls in gefrorenem Gemüse coliforme Keime nachwies, konnte 53 % der Spezies *Aerobacter aerogenes (E. aerogenes)* zuordnen.



KLEER UND HILDEBRANDT (2000) wiesen für coliforme Keime in tiefgefrorenem Porree eine obere 80er/95er Perzentilgrenze von  $3,0/3,5 \log_{10}$  KbE/g nach. In Pilzen lag diese bei  $2,3/2,6 \log_{10}$  KbE/g, in rohen/teilgegarten Tiefkühlfertiggerichten mit rotem Fleischanteil betrug sie  $3,3/4,1 \log_{10}$  KbE/g sowie in Gemüse-Fertiggerichten  $2,6/3,3 \log_{10}$  KbE/g. In verschiedenen Sorten von gefrorenem Gemüse (u.a. Okraschoten, grüne Erbsen, Erbsen und Möhren, Artischocken) wurde für die coliformen Keime ein Gehalt zwischen  $3,9$  und  $6,6 \times 10^1$  KbE/g ermittelt (GOMAA et al. 2002).

Die coliformen Keime werden immer wieder als sehr sensibel in Bezug auf die Einwirkung niedriger Temperaturen beschrieben (LARKIN et al. 1955 b, c). So starben diese nach Lagerung von Champignons bei  $-9,4^{\circ}\text{C}$  nach sechs Monaten (SMART 1939) ab, und in einer Eimischung waren bei  $-15^{\circ}\text{C}$  nach drei Monaten alle coliformen Keime inaktiviert (JOHNS und BERARD 1946). Allerdings variiert die Letalitätsrate auch hier in Abhängigkeit von den Einflussfaktoren (LUND 2000). MARCY und ADAM (1979) konnten nach Lagerung von Vanilleeis bei  $-28^{\circ}\text{C}$  über 35 Monate von der anfänglichen Zahl an *Enterobacter (E.) cloacae* ( $6,0 \times 10^3$  KbE/g) noch  $2,2 \times 10^3$  KbE/g nachweisen.

Die Zuordnung der coliformen Keime zu den Indikatorbakterien wird kritisch gewertet. Da coliforme Keime zum Teil zur pflanzlichen Normalflora gehören, eignen sie sich mit Ausnahme von *E. coli* nicht als Hinweis auf eine fäkale Kontamination. Wegen dieser Tatsache und aufgrund der ungenauen taxonomischen Definition bleibt der Sinn einer Bestimmung von coliformen Keimen umstritten (BAUMGART 2004).

#### 2.4.3.4.2 *Escherichia (E.) coli*

*E. coli* ist den coliformen Keimen zuzuordnen und kann aufgrund seines Vorkommens im Darmkanal von Mensch und Tier bei der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln als Indikatorkeim zur Anzeige einer fäkalen Kontamination dienen. Der Keim ist in der Lage, bei Umgebungstemperaturen von  $7^{\circ}/8^{\circ}\text{C}$  bis  $44^{\circ}/46^{\circ}\text{C}$  zu wachsen, das Optimum liegt bei  $35-40^{\circ}\text{C}$ . Wachstum und Vermehrung sind in einem weiten pH-Bereich von 4,4 bis 9,0 möglich. Der optimale pH-Wert liegt zwischen 6,0 und 7,0. Weiterhin benötigt dieses Bakterium einen minimalen  $a_w$ -Wert von 0,95 (ICMSF 1996).

Die Angaben in der Literatur zu Überlebensfähigkeit und Absterberaten während des Gefrierens und der Gefrierlagerung unterscheiden sich zum Teil sehr und variieren mit den jeweiligen Bedingungen. Für die Matrix Fleisch konnten GUNDERSON und ROSE (1948) in gefrorenem Hühnchen teilweise noch nach 5,5 Monaten Lagerung bei  $-25$  bis  $-30^{\circ}\text{C}$  einen hohen Zellgehalt an *E. coli* nachweisen. In Hamburgern aus Hühnerfleisch zeigte *E. coli* während der Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  über 28 Tage einen Abfall der Zellzahl von  $0,63 \log_{10}$  KbE/g (CASARIN et al. 2009). DOYLE und SCHOENI (1984) beimpften Rinderhackfleisch mit *E. coli* O157:H7, froren dieses in Form von Hamburgerpatties bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten ein und lagerten das Material bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für maximal neun Monate. Der Keim überlebte die

## Literatur

---

Gefrierlagerung mit einer geringen Reduktion der Zellzahl von  $6,7 \times 10^3$  auf  $6,2 \times 10^3$  KbE/g. Die Resistenz des pathogenen *E. coli*-Stammes O157:H7 und eines nichtpathogenen Kontrollstammes wurde in zu Hamburgerpatties geformtem, rohem Rinderhack bei verschiedenen Temperaturen überprüft. Eine Lagerung bei  $-2^\circ\text{C}$  für vier Wochen führte zu einem Absinken der Keimzahlen von beiden Stämmen um 1,5 bzw. 2,8  $\log_{10}$  CFU/g. Während der Aufbewahrung bei  $-20^\circ\text{C}$  kam es nach einem Jahr bei den zwei Stämmen zu einer Reduktion von 1 bis 2  $\log_{10}$  KbE/g. Es gab keine Anzeichen, dass enteropathogene *E. coli*-Stämme bei niedrigeren Temperaturen wachsen könnten als nicht pathogene Stämme (ANSAY et al. 1999, PARK et al. 1973). So fanden MACKEY et al. (1980) nach 220tägiger Gefrierlagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  in Schweine- und Lammfleisch eine ähnliche Überlebensrate für einen enteropathogenen und einen nichtpathogenen Stamm, in Rindfleisch erreichte der enteropathogene Stamm eine etwas höhere Überlebensrate. Im Darm von Hybrid-Tilapia, welche bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert worden war, überlebte der Keim neun Monate. Nach zwölf Monaten war er jedoch nicht mehr nachweisbar (AL-HARBI und UDDIN 2005). Einige Ergebnisse liegen auch für Speiseeis vor. Bei diesem Lebensmittel beobachtete FOSCHINO (2002) eine deutliche Beeinträchtigung der Koloniezahlen von *E. coli* nach Gefrierprozess und acht-wöchiger TK-Lagerung bei  $-22^\circ\text{C}$ . Der Anfangskeimgehalt von  $3,18 \times 10^5$  KbE/g sank auf  $3,29 \times 10^2$  KbE/g ab. Dagegen stellten MARCY und ADAM (1979) nach Lagerung von Vanilleeis bei  $-28^\circ\text{C}$  über 35 Monate lediglich ein geringes Absinken von  $2,0 \times 10^3$  auf  $0,3 \times 10^3$  KbE/g fest. In flüssigem Ei überlebten Zellen von *E. coli* bei  $-18^\circ\text{C}$  für ca. zehn Monate (HARTSELL 1949).

Für pflanzliche Substrate liegen zahlreiche Berichte zum Verhalten von *E. coli* vor. Gefrierlagerung des Keimes für 24 und 168 h in Gemüsebrühe reduzierte die lebensfähige Population um 56 % und 96 %, wobei 22 % und 45 % der Überlebenden beschädigt waren (RACCACH et al. 2002). Bei Lagerung gefrorener Erbsen über 24 Monate konnte HALL (1969) bei einer Lagertemperatur von  $-18^\circ\text{C}$  nach einem Monat noch 49 %, nach zwölf Monaten 14 % und nach 24 Monaten 15 % der Zellen von *E. coli* nachweisen. Bei  $-29^\circ\text{C}$  bestand eine höhere Überlebensfähigkeit, denn nach einem Monat erreichten die Keimzahlen noch 88 %, nach zwölf Monaten 36 % und nach 24 Monaten 20 %. Bei den zwei Temperaturen ergab sich 24 Stunden nach dem Einfrieren keine Reduktion der Keimzahl. Die Mikroorganismen überstanden in Kirschen, welche unter Vakuum in Konservendosen abgepackt und anschließend tiefgefroren wurden, eine Gefrierlagerung für 84 Tage bei  $-17,8^\circ\text{C}$ , aber nicht für 98 Tage (WALLACE und PARK 1933). In geschnittenen Mangos und Papayas blieben Zellen von *E. coli* O157:H7 bei  $-20^\circ\text{C}$ -Lagerung für mindestens 180 Tage lebensfähig. Nach sieben Tagen waren die Keimzahlen in den Mangos um  $0,4 \log_{10}$  KbE/g abgesunken und hatten sich am 14. Tag der Gefrierlagerung um weitere  $0,4 \log_{10}$  KbE/g reduziert. Von 14. bis zum 28. Tag blieb die Anzahl konstant bei  $3,7 \log_{10}$  KbE/g. Ein weiterer signifikanter Abfall

um  $0,6 \log_{10}$  KbE/g wurde am Untersuchungszeitpunkt des 60. Lagerungstages beobachtet. Zwischen dem 90. und 180. Lagerungstag blieb die Bakteriendichte bei ungefähr  $2,5 \log_{10}$  KbE/g. In den geschnittenen Papayas kam es innerhalb der ersten Lagerungswoche zu einem signifikanten Abfall um  $1,1 \log_{10}$  KbE/g. Vom siebten bis zum 180. Lagerungstag traten nur geringe Änderungen der Keimzahl auf, welche während dieser Zeit ungefähr bei  $3,0 \log_{10}$  KbE/g lagen (STRAWN und DANYLUK 2010).

In Saftkonzentraten von Apfel, Banane, Orange, Ananas und weißer Traube, die bei  $-23^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden und mit Ausnahme der Banane einen pH Wert von 3,6 bis 3,7 aufwiesen, überlebte *E. coli* O157:H7 über zwölf Wochen (OYARZÁBAL et al. 2003). LARKIN et al. (1955 c) beobachteten in Versuchen mit *E. coli*-Kulturen in Orangensaftkonzentrat, dass die Mikroorganismen bei  $-23,4^{\circ}\text{C}$  für 147 Tage überlebten, jedoch merkliche Schwankungen in ihrer Zellzahl zeigten. In Studien von HAHN und APPLEMAN (1952 a, b) dagegen fand sich in Orangensaftkonzentraten ein starker letaler Effekt, und der Keim konnte nach 24-stündiger Lagerung bei  $-17^{\circ}\text{C}$  nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Phänomen führten die Verfasser auf den niedrigen pH-Wert und die organische Säure zurück.

Die recht widersprüchlichen Ergebnisse erlauben keine eindeutige Antwort auf die Frage nach der Eignung von *E. coli* als Indikatorkeim bei Tiefkühlkost. Von LARKIN et al. (1955 b, c) wurde die Meinung vertreten, dass *E. coli* in gefrorenen Lebensmitteln aufgrund ihrer zum Teil hohen Absterberate während Gefrieren und Gefrierlagerung nicht als Indikatorkeim dienen sollte. In grünen Bohnen, welche mit *E. coli* und fäkalen Streptokokken beimpft waren, sank die Anzahl ersterer über die Lagerdauer signifikant ab, wohingegen letztere ab dem dritten Lagerungstag über 217 Tage eine konstante Dichte aufwiesen. Auch SCHMIDT-LORENZ (1970) vertrat die Ansicht, dass eine Verwendung der coliformen Keime bzw. von *E. coli* als Indikatorkeime im Rahmen der Hygieneüberwachung bei tiefgefrorenen Lebensmitteln nur bei kurzfristiger Aufbewahrung Sinn ergibt, da nach längerer Gefrierlagerung die Möglichkeit des Absterbens dieser Mikroorganismen besteht. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass sich die Koloniezahlen coliformer Keime in fäkalem Material sowie in Kulturmedien und Lebensmitteln während des Einfrierens und innerhalb der ersten Lagerungswoche verringerten (LOCHHEAD und JONES 1936, PARK 1936). Eine kanadische Studie (ANONYM 1950) befand ebenfalls die coliformen Keime als weniger effektiv für die Charakterisierung fäkaler Kontaminationen gefrorener Produkte. Im Gegensatz dazu bezeichneten MARCY und ADAM (1979) die coliformen Keime, vor allem *E. coli*, als geeignete Indikatorkeime in gefrorenen Lebensmitteln. Von der DGHM wird für „rohe oder teilgegarnte TK-Fertiggerichte, die vor dem Verzehr gegart werden müssen“, ein Richtwert für *E. coli* von  $1,0 \times 10^3$  sowie ein Warnwert von  $1,0 \times 10^4$  vorgeschlagen. Für „gegarnte TK-Fertiggerichte, die nur noch auf Verzehrstemperatur erhitzt werden müssen“, liegen diese bei  $1,0 \times 10^2$  bzw.  $1,0 \times 10^3$  (DGHM 2009).

### 2.4.3.4.3 *Enterococcus* spp.

Zum Genus *Enterococcus* zählen u.a. die Spezies *Enterococcus* (*E.*) *faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* und *E. faecalis*. Als lebensmittelassoziierte Mikroorganismen besitzen lediglich *E. faecium* und *E. faecalis* Bedeutung, wobei sie zugleich auch als Indikatorkeime bei der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln dienen können. Aus diesem Grund werden die Enterokokken, welche den grampositiven Keimen zuzuordnen sind, an dieser Stelle abgehandelt. Im Darm des Menschen finden sich *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. durans* in hoher Anzahl, aber ebenso zählen Pflanzen zu ihrem natürlichen Habitat, weshalb Enterokokken häufig auf rohem Gemüse nachgewiesen werden (FRANZ et al. 1999, MÜLLER et al. 2001). Die minimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 6 und 10°C (BAUMGART 2004), jedoch wurde sie für *E. faecium* auch mit 0 bis 3°C angegeben (STOLLE 2004). Das Temperaturmaximum liegt bei 45°C und das des pH-Wertes bei 9,6. Die minimale benötigte Wasseraktivität ( $a_w$ ) beträgt 0,93 (BAUMGART 2004).

*E. faecalis* zeigt sich während des Gefrierens als resistent gegenüber NaCl (LEE et al. 1977), und im Allgemeinen werden *Enterococcus* spp. als äußerst widerstandsfähig gegenüber niedrigen Temperaturen und ungünstigen Bedingungen beschrieben (DEIBEL 1964). MUNDT et al. (1967) und SPLITTSTOESSER (1970) wiesen in gefrorenem Gemüse *Enterococcus* spp. in höheren Mengen nach. Bei Untersuchungen verschiedener handelsüblicher Tiefkühl-erzeugnisse konnten KLEER und HILDEBRANDT (2000) für diese obere 80er/95er Perzentilgrenzen in rohen/teilgegartem Gemüfefertiggerichten von 2,6/4,3 log<sub>10</sub> KbE/g und in Fertiggerichten mit rotem Fleisch von 2,6/3,2 log<sub>10</sub> KbE/g bestimmen. Tiefgefrorene Pilze und Porree wiesen obere 95er Perzentilgrenzen von 2,9 bzw. 3,2 log<sub>10</sub> KbE/g und gegarte Fertiggerichte mit zerkleinertem rotem Fleisch von 2,8 log<sub>10</sub> KbE/g auf. GEIGES (1996) isolierte *Enterococcus*-Spezies aus tiefgefrorenen Käsecrepes.

In Versuchen mit gefrorenen Erbsen während einer Lagerung über 24 Monate stellte sich *E. faecium* deutlich gefrierresistenter dar als *E. faecalis*. *E. faecium* blieb sowohl bei -18°C als auch bei -29°C über 24 Monate in seiner Anzahl konstant. Von *E. faecalis* wurden nach 24 Monaten bei -18°C noch 48 % und bei -29°C nur noch 24 % nachgewiesen (HALL 1969). Ebenfalls empfindlich reagierten Zellen von *E. faecalis* während einer Aufbewahrung von Wasserkresse bei -21°C. Nach drei Monaten konnten keine überlebenden Keime mehr festgestellt werden (OLIVEIRA et al. 2009). Dagegen überlebten Kulturen von *E. faecalis* in Orangensaftkonzentrat bei -23,4°C für 147 Tage ohne einen Abfall in ihrer Zellzahl zu zeigen (LARKIN et al. 1955 c). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch HAHN und APPLEMAN (1952 a, b). *E. faecalis*, welcher mit anderen enterischen Organismen in Orangenkonzentrat eingefroren worden war, überdauerte alle anderen Spezies, wobei diese zum Teil schon nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar waren. Empfindlicher dagegen reagierten Zellen von *E.*

*faecalis* auf schwankende Lagertemperaturen und waren in Wasserkresse bei  $-15^{\circ}\text{C}$  bereits nach zehn Tagen abgestorben (OLIVEIRA et al. 2009).

Auf Grund seiner Kälteresistenz wurde *Enterococcus* spp. als Markerkeim vorgeschlagen und sollte *E. coli* in dieser Funktion ersetzen (ANONYM 1950). Diese Empfehlung bestätigen u.a. Studien von OSTROLENK et al. (1947). Die Autoren hielten die fäkalen Streptokokken ebenfalls für bessere Fäkalindikatoren in gefrorenen Lebensmitteln im Vergleich zu den weniger kryotoleranten coliformen Keimen. Zur gleichen Erkenntnis kam BURTON (1949 b) anhand von Resultaten mit kommerziell gefrorenen kanadischen Gemüsesorten und Melonen. Gemäß seiner Studie sind coliforme Keime besser geeignet, fäkale Kontaminationen in Lebensmitteln vor dem Gefrieren anzuzeigen, während die Enterokokken aussagekräftige Indikatoren in gefrorenen Lebensmitteln darstellen. Auch LARKIN et al. (1955 a, b, c) kamen zu diesem Ergebnis. Sie stellten bei einer Gefrierlagerung von grünen Bohnen, welche mit Fäkalstreptokokken beimpft waren, über einen Zeitraum von über 400 Tagen keinen Abfall der Zellanzahl fest. Aufgrund ihrer Versuche mit gefrorenem Orangensaftkonzentrat schlussfolgerten KAPLAN und APPLEMAN (1952), dass Enterokokken resistenter gegenüber den Lagerungsbedingungen sind als coliforme Keime. Insgesamt wurden die *Enterococcus* spp. aufgrund höherer Widerstandsfähigkeit gegenüber den Gefrierbedingungen von vielen Autoren als die sinnvollsten Fäkalindikatoren in gefrorenen Erzeugnissen angesehen. Problematisch ist allerdings, dass sie im Erdboden ubiquitär auftreten und auch zur natürlichen Mikroflora von vielen fleischhaltigen Produkten gehören. Empfehlenswert erscheint eine Untersuchung auf *Enterococcus* spp. daher nur bei Produkten, die einen Erhitzungsprozess durchlaufen haben. In diesem Fall würde ihr Nachweis auf eine sekundäre Kontamination hinweisen (KRÄMER 2007).

### 2.4.4 Hefen und Schimmelpilze

#### 2.4.4.1 Hefen

Hefen gehören zu den einzelligen Pilzen, welche sich mit Ausnahme einiger Arten durch Sprossung vermehren. Sie besitzen eine sehr große Bedeutung in der Lebensmittelherstellung und sind ebenfalls in der Umwelt, wie z.B. auf Pflanzen und Früchten, weit verbreitet. Die meisten Hefen können sich bei sehr niedrigen pH-Werten (3,7) sowie bei extremen Zuckerkonzentrationen vermehren, also unter Bedingungen, die ein Wachstum von Bakterien hemmen (YARROW und SAMSON 2004). Die benötigten minimalen  $a_w$ -Werte variieren je nach Hefeart. So benötigt die Gattung *Rhodotorula* für Wachstum und Zellteilung einen  $a_w$ -Wert von 0,92, für *Candida* und *Debaryomyces* liegt dieser bei 0,86, und einige *Saccharomyces*-Stämme werden selbst bei einem  $a_w$ -Wert von 0,62 nicht gehemmt (SINGHAL und KULKARNI 2000). Viele Hefen besitzen mesophile Eigenschaften und weisen ein Temperaturoptimum im Bereich von 20 bis  $25^{\circ}\text{C}$  auf, allerdings existieren auch

## Literatur

---

zahlreiche psychrophile Arten, welche Wachstum bei Temperaturen zwischen 4° und 15°C zeigen (YARROW und SAMSON 2004).

In Experimenten mit verschiedenen Produkten, die GEIGES und SCHULER (1988) im frischen Zustand sowie nach 13-wöchiger Lagerung bei -2,5°C und 26-wöchiger Lagerung bei -5,0°C untersuchten, waren vor allem Vertreter von *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* und *Candida* dominant, wobei der mengenmäßige Anteil je nach eingesetzter Temperatur variierte: Bei -2,5°C isolierte man hauptsächlich *Trichosporon (T.) pullulans*, *Candida sake* und *Cryptococcus laurentii*. Dagegen wuchsen bei -5°C vor allem *C. laurentii*, *Cryptococcus infirmo-miniatus*, *Rhodotorula rubra* und *T. pullulans* (GEIGES 1996). Bei Gefriertemperaturen von -2,5°C bis -3,5°C wies SCHMIDT-LORENZ (1970) hauptsächlich *Debaromyces* und *Torulopsis* sowie verschiedene *Rhodotorula* spp. nach. Diese Arten nahmen in ihrer Anzahl bei tieferen Temperaturen von -4°C bis -10°C ab, und es dominierten *Cryptococcus* spp. Bei -7,5 bis -10°C bestand die Hefeflora fast nur aus verschiedenen Vertretern dieser Gattung, da sie durch Ausbildung einer dicken Schleimkapsel vor Austrocknung geschützt sind (SCHMIDT-LORENZ 1970).

Die untere Vermehrungsgrenze von Hefen liegt meist deutlich niedriger als die von Bakterien, d.h. ungefähr bei -10°C (SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968). Allerdings wachsen einige Hefen ab einer Temperatur von -5°C nur noch sehr langsam (TUCHSCHNEID und EMBLIK 1959). Niedrigere Werte wurden nur unter Verwendung von mikrobiologischen Nährstoffen in Verbindung mit speziellen Gefrierschutz-Substanzen erreicht (GEIGES 1996).

Unter den verschiedenen Hefespezies existieren einige, die sich besonders resistent gegenüber Gefriertemperaturen verhalten (TRAKULCHANG und KRAFT 1977), und solche extrem psychrophilen Arten sind in der Lage sich noch bei -15°C zu vermehren (FEHLHABER 2004). Für bestimmte Arten wurden sogar Wachstumstemperaturen von -18 bis -34°C beschrieben (ROBERTS et al. 1982). Während langfristiger Lagerung von verschiedenen tiefgefrorenen Gemüseprodukten bei Temperaturen von -2,5°C bis -3,5°C bzw. von -4,0°C bis -10,0°C konnten SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT (1968) bei den genannten Temperaturbereichen vor allem Hefen nachweisen. In tiefgefrorenen Rohgemüseerzeugnissen wie Porree und Pilzen wurden obere 80er/95er Perzentilgrenzen von 2,3/2,8 (Hefen)  $\log_{10}$  KbE/g bzw. 3,3/3,3  $\log_{10}$  KbE/g bestimmt. In rohen/teilgegartenen Gemüsefertiggerichten sowie in teilgegartenen Fertiggerichten mit Fleischanteil lauteten die entsprechenden Werte 2,8/3,6  $\log_{10}$  KbE/g bzw. 3,6/4,3  $\log_{10}$  KbE/g (KLEER und HILDEBRANDT 2000). Im Rahmen der Untersuchung verschiedener gefrorener Gemüsesorten (u.a. Okraschoten, grüne Erbsen, Erbsen und Möhren, Artischocken) wurde ein Gehalt an Hefen zwischen  $3,9 \times 10^3$  und  $1,1 \times 10^4$  KbE/g ermittelt (GOMAA et al. 2002). Studien zur Resistenz von Hefezellen in gefrorenem Brotteig, ein Lebensmittel, bei welchem die Qualität vom Überleben der Mikroorganismen abhängt, ergaben für die Hefezellen eine sehr hohe

Überlebensrate, wenn der Teig direkt nach ihrer Zugabe eingefroren wurde. Die Ausbeute wurde geringer, wenn die Mikroorganismen vor dem Gefrierprozess im Teig bei Raumtemperatur ca. eine Stunde verblieben. Die Verzögerung provozierte ein Ausknospen der Hefezellen, was ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Gefrieren ansteigen ließ (SINGHAL und KULKARNI 2000). Bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wurde während Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ein Verlust der Lebensfähigkeit von 80 % nach 15 Tagen beobachtet. Dagegen zeigte die Hefe *Torulaspota delbrueckii* eine sehr hohe Gefrierresistenz und keinen Abfall ihrer Lebensfähigkeit über 120 Tage (ALVES-ARAÚJO et al. 2004). PARK et al. (2004) konnten nach sechsmonatiger Gefrierlagerung von Ziegenweichkäse eine signifikante Reduktion der Hefen nachweisen, dagegen blieben diese in Manchegokäse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  9 Monate lang in ihrer Anzahl relativ unverändert (PRADOS et al. 2006). Ein ähnliches Ergebnis erhielt auch SMART (1939) bei Gefrierlagerung von frischen, gewaschenen Champignons. Alle vorhandenen Hefespezies waren nach 6-monatiger Lagerung noch lebensfähig (MOUNTNEY und GOULD 1988). HALL (1969) untersuchte das Überleben einer *Rhodotorula*-Spezies bei Tiefgefrierlagerung von Erbsen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  sowie  $-29^{\circ}\text{C}$ . Im ersten Fall kam es nach 24 Stunden sowie nach einem Monat zu keiner Verringerung der Keimzahl, nach zwölf Monaten waren noch 93 % und nach 24 Monaten noch 10 % der Ausgangspopulation nachzuweisen. Bei  $-29^{\circ}\text{C}$  wurden meist geringfügig niedrigere prozentuale Anteile erreicht.

### 2.4.4.2 Schimmelpilze

Allgemein finden sich in Lebensmitteln verschiedene Arten von Schimmelpilzen wie Zygomyceten, Ascomyceten oder Deuteromyceten. Die meisten Mitglieder der Gruppe der Zygomyceten leben saprophytisch; einige Spezies wie *Rhizopus* und *Absidia* kommen auf Lagergetreide, Obst und Gemüse sowie in der Luft vor. Darüber hinaus können *Rhizopus* und *Mucor* in reifen und geernteten Früchten und Gemüse Fäulnis hervorrufen. Die meisten Ascomycetenarten leben ebenfalls saprophytisch; sie finden sich im Erdboden und auf Lebensmitteln. Zu den Deuteromyceten zählen zahlreiche wichtige Lebensmittelkontaminanten, von denen viele zur Mykotoxinbildung fähig sind (SAMSON und HOEKSTRA 2004). Die Toxinproduktion von *Fusarium sporotrichoides* kann noch bei Temperaturen von  $-4^{\circ}\text{C}$  stattfinden (SINGHAL und KULKARNI 2000). Die Anforderung an die Wasseraktivität der Substrate variiert zwischen den einzelnen Spezies, jedoch können die meisten Schimmelpilze bei einem niedrigeren  $a_w$ -Wert aktiv bleiben als Bakterien. So besitzt z.B. *Mucor* einen minimalen  $a_w$ -Wert von 0,93, während einige Stämme von *Penicillium* und *Aspergillus* noch bei  $a_w$ -Werten von 0,80 bzw. 0,75 wachsen (SINGHAL und KULKARNI 2000). Schimmelpilze gehören zur Normalflora von rohem Gemüse, und Spezies von *Aureobasidium*, *Fusarium* und *Alternaria* können häufig auf derartigen Produkten nachgewiesen werden, allerdings in geringeren Zahlen als Bakterien (ICMSF 1980 b). Bei

## Literatur

---

der Untersuchung verschiedener Gemüseerzeugnisse isolierten SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT (1968) nach langfristiger Lagerung bei Temperaturen von  $-2,5^{\circ}\text{C}$  bis  $-3,5^{\circ}\text{C}$  bzw. von  $-4,0^{\circ}\text{C}$  bis  $-10,0^{\circ}\text{C}$  lediglich im Bereich der niedrigeren Temperaturen Schimmelpilze in geringer Menge. Erhebungen an verschiedenen gefrorenen Gemüsesorten (u.a. Okraschoten, grüne Erbsen, Erbsen und Möhren, Artischocken) erbrachten für Schimmelpilze einen Keimgehalt zwischen  $3,9 \times 10^3$  und  $1,1 \times 10^4$  KbE/g (GOMAA et al. 2002). KLEER und HILDEBRANDT (2000) wiesen u.a. in tiefgefrorenen Pilzen für die Schimmelpilze eine obere 80er/95er Perzentilgrenze von  $2,3/2,6 \log_{10}$  KbE/g sowie in rohen/teilgegarteten Gemüfefertiggerichten und Fertiggerichten mit rotem Fleischanteil eine obere 95er Perzentilgrenze von  $2,3$  bzw.  $2,2 \log_{10}$  KbE/g nach. Aus Gefrierfleisch wurden vor allem *Cladosporium herbarum*, *Sporotrichum carnis* und *Penicillium* spp. isoliert. Schimmelpilzsporen sind in der Lage, sich noch unter  $0^{\circ}\text{C}$  zu entwickeln (TUCHSCHNEID und EMBLIK 1959) und können zum Teil bei Temperaturen bis zu  $-15^{\circ}\text{C}$  wachsen (SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968). Zu diesen extrem psychrophilen Schimmelpilzarten gehören u.a. *Cladosporium*, *Aureobasidium* und *Penicillium* (DEAK und BEUCHAT 1996). Unterhalb von  $-15^{\circ}\text{C}$  müsste ihre Entwicklung allerdings zum Erliegen kommen, da ihr flüssiger Zellanteil im Bereich von  $-12,5^{\circ}\text{C}$  bis  $-15^{\circ}\text{C}$  gefriert. In Kühllhäusern sind Schimmelpilze oftmals bei Temperaturen von  $-8^{\circ}\text{C}$  bis  $-10^{\circ}\text{C}$  vorzufinden, und auch bei  $-12,5^{\circ}\text{C}$  erfolgte noch eine starke Verschimmelung gefrorener Himbeeren (TUCHSCHNEID und EMBLIK 1959). In Studien von KOBURGER (1981) mit unterschiedlichen Lebensmitteln wie Fleisch, Meeresfrüchten, getrockneten Bohnen, Pasta, Gemüse und Käse, welche er bei  $-18^{\circ}$ ,  $-26^{\circ}\text{C}$  und  $-34^{\circ}\text{C}$  lagerte, zeigten die Pilze je nach verwendetem Substrat eine höhere oder niedrigere Sensitivität als die bakterielle Gesamtkeimzahl der entsprechenden Produkte. Allerdings stellten sich Schimmelpilze immer gefrierresistenter dar als die coliformen Keime. PARK et al. (2004) wiesen nach sechsmonatiger Gefrierlagerung von Ziegenweichkäse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine signifikante Reduzierung von Schimmelpilzen nach, dagegen blieben diese bei neunmonatiger Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Manchegokäse in ihrer Anzahl konstant (PRADOS et al. 2006). Ein ähnliches Ergebnis beschrieb auch SMART (1939) für die Gefrierlagerung von frischen, gewaschenen Champignons über sechs Monate. Alle vorhandenen Schimmelpilze ließen sich nach der Lagerzeit wieder anzüchten. Von Agarkulturen verschiedener Pilze blieben nach 5 Jahren Lagerung bei  $-17$  bis  $-21^{\circ}\text{C}$  noch 761 von 786 Isolaten lebensfähig (CARMICHAEL 1962). COCHRANE (1958) kam zu dem Ergebniss, dass Pilzsporen durch niedrige Temperaturen generell weniger geschädigt werden als ihr Mycel. Versuche von MAZUR (1966) zeigten, dass Sporen normalerweise viel widerstandsfähiger gegenüber niedrigen Temperaturen sind und ihr Überleben weniger von Einflussfaktoren wie Abkühlungs- und Auftaugeschwindigkeiten abhängt, wenn sie nicht in wässrigen Medien gelöst, sondern luftgetrocknet sind.



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Material und Umfang der Vorversuche

Um sicher zu stellen, dass ein Versenden der frischen, noch nicht tiefgefrorenen Lebensmittel in einer Styroporbox mit Kühlelementen keinen verfälschenden Einfluss auf die Mikroorganismenanzahl nimmt und somit die quantitative mikrobiologische Untersuchung derartiger Proben im IfL durchgeführt werden konnte, wurden im Oktober und November 2007 entsprechende Vorversuche durchgeführt. Das Probenmaterial bestand aus frischem Rinder - oder Lammhackfleisch, welches an Fleischtheken im Berliner Einzelhandel gekauft und bis zur quantitativen mikrobiologischen Untersuchung mittels Drop-plating-Verfahren kühl gelagert wurde. Die Aufbewahrung erfolgte in Styroporboxen mit Kühlelementen über fünf bzw. 7,5 Stunden. Während der Lagerzeit wurde eine Temperatur von ca. 1°C gemessen.

### 3.2 Probenmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier handelsübliche Tiefkühlprodukte untersucht, die aus dem Sortiment eines Direktvertriebers für Tiefkühlkost und Eiscreme stammten. Dazu zählten die zwei Rohgemüseerzeugnisse „Porree, geschnitten“ und „Champignons in Scheiben“ sowie die beiden Fertiggerichte „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ (Gewürztes Tiefkühlfertiggericht aus geschnittenen Maultaschen mit Schweinefleischfüllung und Gemüse) und „Stroganoff-Pfanne“ (Tiefkühlfertiggericht aus gegarten Rindfleischstücken, mit Würzsoße ummantelt sowie Gemüse und Spätzle), die aus Gemüse- und Fleischkomponenten zusammengesetzt sind. Die Zutatenlisten der beiden Fertiggerichte finden sich unter 3.2.1.1. Bei der Produktauswahl wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt. So sollten die Erzeugnisse aus kleinstückigem Material bestehen bzw. während ihrer Herstellung derart bearbeitet worden sein, dass eine annähernd homogene Keimverteilung in den einzelnen Verpackungseinheiten erwartet werden konnte. In den ausgewählten Produkten sollte weiterhin mit dem Vorkommen möglichst vieler der zu untersuchenden Keimgruppen in recht hohen Konzentrationen, jedenfalls aber in Dichten oberhalb der Nachweisgrenze, zu rechnen sein. Gerade dieses Kriterium schränkte die Auswahlmöglichkeit stark ein. Letztlich sollte die Möglichkeit bestehen, die Produkte vor dem Tiefgefrierprozess im frischen Zustand untersuchen zu können, was jedoch aufgrund technologischer Gegebenheiten nur bei den beiden Rohgemüseerzeugnissen realisierbar war, während für die Herstellung der beiden Fertiggerichte bereits tiefgefrorene Ausgangsmaterialien verwendet werden.

### 3.2.1 Angaben zum Herstellungsprozess der ausgewählten Produkte

Die beiden Rohgemüseprodukte „Porree, geschnitten“ und „Champignons in Scheiben“ werden gewaschen, wobei dem Champignontransportwasser Zitronensäure und/oder Ascorbinsäure zugesetzt sein kann, und anschließend geschnitten. Danach werden sie mit Hilfe des zu den Kaltluftgefriermethoden zählenden „Flow-Freezing-Verfahren“ bei ca.  $-35^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Bei dieser Technologie wird kalte Luft mit Druck von unten durch eine siebartig gelochte Bodenwanne geblasen. Die darauf liegenden Lebensmittel werden auf diese Weise verwirbelt und zum Ausgang der Anlage transportiert. Die Dauer des Gefrierprozesses beträgt bei dem Erzeugnis „Porree“ ca. 35 Minuten und bei den „Champignons in Scheiben“ ca. 15 Minuten. Der gestückelte, tiefgefrorene Porree, welcher Kantenlängen von bis zu  $2 \times 2$  cm aufweist, sowie die in ca. 2-3 mm dicke Scheiben geschnittenen Champignons werden jeweils in Packungen zu 1000 g abgefüllt und bei konstanten  $-24^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Herstellung der beiden Fertiggerichte erfolgt durch Mischen von bereits tiefgefrorenen Zutaten sowie Aufbringen noch nicht gefrorener Würzsoße. Für die „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ werden Maultaschen frisch produziert, anschließend geschnitten und tiefgefroren. Die einzelnen Gemüsebestandteile für dieses Produkt werden ebenfalls mittels Kaltluftgefrierverfahren tiefgefroren, wobei sowohl das „Flow-Freezing-Verfahren“ als auch das „Belt-Freezing-Verfahren“ zum Einsatz kommen. Bei letzterem wird tiefkalte Luft in einem Tunnel zu den auf einem Band transportierten Lebensmitteln geführt. Die Temperatur dieser Art von Einfrierprozess beträgt ebenfalls ca.  $-35^{\circ}\text{C}$ . Anschließend werden die tiefgefrorenen Maultaschenscheiben gemeinsam mit dem tiefgefrorenem Gemüse und einer pastösen, nicht gefrorenen Gewürzzubereitung in einem Tumbler bewegt und anschließend abgefüllt. Während des Mischvorganges erfolgt die Kühlung des Erzeugnisses mittels  $\text{CO}_2$ , weshalb das gemischte Produkt während des gesamten Prozesses eine Temperatur von unter  $-15^{\circ}\text{C}$  aufweist. Die Produktion der Maultaschen findet in der Regel ein paar Tage vor dem Mischen des Erzeugnisses statt. Auch die „Stroganoff-Pfanne“ wird aus tiefgefrorenen, zum Teil vorgegarten Bestandteilen (Rindfleischstücke sowie Eierspätzle) zusammengesetzt und mit einer nicht gefrorenen Gewürzzubereitung vermengt. Die einzelnen Zutaten werden ebenfalls mittels des „Flow-Freezing-“ sowie des „Belt-Freezing-Verfahrens“ bei ca.  $-35^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Anschließend erfolgt das Mischen der Komponenten und das Aufbringen der nicht gefrorenen Würzsoße in einem Tumbler mit  $\text{CO}_2$ -Kühlung. Während des Mischungsprozesses liegt die Temperatur ebenfalls bei unter  $-15^{\circ}\text{C}$ . Die vollständigen Gerichte werden in Behältnisse mit einer Einwaage von 1000 g verpackt und bei der Vertreiberfirma bei einer konstanten Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1.1 Zutatenliste der Tiefkühlfertiggerichte

Zutatenliste der „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“:

Maultaschen 60 % (Hartweizengrieß, Wasser, Schweinefleisch, Weißbrot (Weizenmehl, Wasser, Salz, Hefe), Speck, Spinat, Zwiebeln, Eier, jodiertes Speisesalz, Petersilie, Gewürze, Stärke, Würze, Gewürzextrakte, Stabilisator (Natriumcitrate), Traubenzucker), Karotten, Zucchini 8 %, Champignons 6 %, Paprika 5 %, Broccoli 5 %, Bohnen 4 %, pflanzliches Öl, pflanzliches Fett, Gewürze (enthält Sellerie), jodiertes Speisesalz, Hefeextrakt, Glukosesirup.

Zutatenliste der „Stroganoff-Pfanne“:

Eierspätzle gegart 31 % (Wasser, Hartweizengrieß, Eier, Speisesalz, Würze (enthält Soja), Zucker, pflanzliche Öle, Milchzucker, Stärke, Gewürze (enthält Sellerie), natürliches Aroma, Kräuter), Champignons 15 %, Rindfleisch gegart 13 % (Rindfleisch, Stärke, Speisesalz, Karamellzucker), Sahne, Paprika 9 %, Wasser, Rotwein, Zwiebeln, Gewürzgurken 2 % (Gurken, Branntweinessig, Zucker, Speisesalz, natürliches Aroma), Tomatenmark, pflanzliches Öl, Knoblauch, Zucker, jodiertes Speisesalz, Rindfleischextrakt, modifizierte Stärke, Honig, Gewürze (enthält Senf), Würze, Karamellzucker, pflanzliches Fett, Branntweinessig, natürliches Aroma.

### 3.2.2 Probenumfang

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 250 Tiefkühlproduktpackungen in einem Zeitraum von Dezember 2007 bis Dezember 2008 untersucht. Eine Übersicht über die Verteilung der Proben gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Probenverteilung der untersuchten Tiefkühlerzeugnisse

Zustand des Produktes	Porree (Packung )	Champignons in Scheiben (Packung)	Maultaschen-Gemüse-Pfanne (Fertigpackung 1000 g)	Stroganoff-Pfanne (Fertigpackung 1000 g)	Probenzahl gesamt
Frisch/roh	5	5	-	-	10
Tiefgefroren	60	60	60	60	240
Gesamt	65	65	60	60	250

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Probenversand

Die 10 Packungen der frischen Rohgemüseprodukte wurden von der Tiefkühlkostvertreiberfirma beim Hersteller der laufenden Produktion entnommen, bevor die Produkte den Tiefgefrierprozess durchlaufen hatten. Diese Proben wurden direkt nach Entnahme gekühlt per Kurier an das IfL geschickt und dort untersucht. Nach dem Tiefgefrierprozess wurden jeweils 60 Packungen der gefrorenen Erzeugnisse gesondert bei der Tiefkühlkostvertreiberfirma gelagert. Ebenso wurden nach dem Produktionsprozess der beiden Gemüse-/Fleischfertiggerichte, welche nicht im frischen, noch ungefrorenen Zustand untersucht werden konnten, 60 Packungen separat gelagert.

Alle Packungen der verschiedenen tiefgefrorenen Erzeugnisse gehörten jeweils zu einer Charge, welche im Dezember 2007 produziert wurde. Ab Januar 2008 erfolgte im vierwöchigen Abstand der Versand per Kurier von 5 Packungen/Produkt an das IfL. Während des Transportes befanden sich die Proben in verschlossenen Styroporboxen mit Trockeneis als Kältemittel (ca.  $-68,9^{\circ}\text{C}$ ).

#### 3.3.2 Bakteriologische Untersuchungen

##### 3.3.2.1 Direkte quantitative mikrobiologische Untersuchung

###### 3.3.2.1.1 Probennahme im Labor für die bakteriologische Untersuchung

Von jedem der vier tiefgefrorenen Erzeugnisse wurden monatlich fünf Parallelproben untersucht. Die Fertigpackungen der eingesandten Proben wurden mittels Abflammen keimfrei gemachter Instrumente eröffnet und 25 g des Inhaltes in einen sterilen Stomacherbeutel aus Kunststoff eingewogen. Bei den zwei Fertiggerichten wurde darauf geachtet, dass alle aufgelisteten Zutaten in der Probenmenge enthalten waren.

###### Erstverdünnung der Proben

Nach der Einwaage wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit gepuffertem 1%igen Peptonwasser (Rezept s. 9.2.2.1) aufgefüllt und anschließend 60 Sekunden im Stomacher bei mittlerer Geschwindigkeit (Stufe 7) homogenisiert. Das gepufferte Peptonwasser wurde für die Erstverdünnung verwendet, da es sich zur nicht-selektiven Voranreicherung von Bakterien eignet und reich an Nährstoffen ist. Weil die nährstoffreiche Bouillon eine hohe Wiederbelebungsrate von subletal geschädigten Bakterien erlaubt, wurde sie auch für die Untersuchungen mit Wiederbelebungsstufe verwendet. Eine Voranreicherung in diesem

Nährboden führt v.a. zu höheren Ausbeuten an subletal geschädigten, pathogenen Enterobakteriazen.

### Herstellung der dezimalen Verdünnungsreihe

Der nächste Schritt bestand in der Herstellung einer dezimalen Verdünnungsreihe, ausgehend von der Erstverdünnung. Dazu wurde mit einer sterilen Pipette 1 ml der Erstverdünnung abgenommen und zu 9 ml der sterilen Verdünnungslösung (Peptonwasser mit Agarzusatz, Rezept s. 9.2.2.2) gegeben. Die Flüssigkeiten wurden auf dem Whirl Mixer durch dreimaliges Aufsetzen für ca. 3 Sekunden vermischt. Dieser Vorgang wurde bis zu einer Verdünnung von 1:100.000 ( $10^{-5}$ ) wiederholt, so dass insgesamt fünf Verdünnungsstufen der Probe vorlagen.

### 3.3.2.1.2 Isolierung und Differenzierung der einzelnen Keimarten

Die Zusammensetzung sowie Herstellung der zur Isolierung und Differenzierung verwendeten Nährmedien ist im Anhang (9.2.2) beschrieben.

### Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl erfolgte nach dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 19 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Zur Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl wurde jeweils eine Plate-Count-Agarplatte (PC) (Rezeptur siehe 9.2.2.3) in fünf Sektoren aufgeteilt, welche mit Teilmengen der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungen der Probe tropfenweise beimpft wurden. Dazu wurde von der Erstverdünnung und jeder weiteren Verdünnungsstufe mit einer sterilen Pipette 0,05 ml auf die Oberfläche der Nährböden aufgetropft und kreisförmig ausgezogen. Nach dem Beimpfen wurden die Platten mit dem Boden nach unten stehen gelassen, bis das Inokulum angetrocknet war. Anschließend wurden die Platten mit der Bodenseite nach oben bei 30°C aerob für 72±2 Stunden bebrütet.

### Aerob wachsende Milchsäurebakterien

Zur Bestimmung der aerob wachsenden Milchsäurebakterien wurde die Analysenmethode L 06.00 – 35 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB angewendet. Für den quantitativen Nachweis der aerob wachsenden Milchsäurebakterien wurde jeweils eine Lactobacillus-Agarplatte nach DEMAN, ROGOSA und SHARPE (MRS-Agar) (Rezeptur s. 9.2.2.4) in fünf Sektoren aufgeteilt, welche mit Teilmengen der Erstverdünnung und der weiteren Verdünnungen der Probe tropfenweise beimpft wurden. Dazu wurde von jeder der hergestellten Verdünnungsstufen mit einer sterilen Pipette eine Teilmenge von 0,05 ml auf die Oberfläche der Nährböden

## Materialien und Methoden

---

aufgetropft und kreisförmig ausgezogen. Nach dem Beimpfen wurden die Platten mit dem Boden nach unten stehen gelassen, bis das Inokulum angetrocknet war, und anschließend mit der Bodenseite nach oben bei 30°C aerob für 48±2 Stunden bebrütet.

### Laktobazillen

Für die Bestimmung der Laktobazillen wurde die Methode L 06.00 – 31 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB herangezogen. Es wurde jeweils eine Lactobacillus-Agarplatte mit Sorbinsäurezusatz (Rezeptur siehe 9.2.2.5) benutzt. Inokulieren nach der Drop plating-Technik und Trocknen geschahen wie für die Gesamtkeimzahl beschrieben. Die Bebrütung erfolgte bei 30°C anaerob für 48±2 Stunden.

### Enterokokken

Zum quantitativen Nachweis der Enterokokken diente das Untersuchungsverfahren L 06.00 – 32 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB, wobei Citrat-Azid-Tween-Carbonat-Agarplatten (Rezeptur siehe 9.2.2.6) zum Einsatz kamen. Die beimpften Nährböden wurden mit der Bodenseite nach oben bei 42°C aerob für 48±2 Stunden bebrütet. Zusätzlich zu der Drop-plating-Technik, welche eine Nachweisgrenze von  $2,0 \times 10^2$  KbE/g erlaubt, wurde 1 ml der Erstverdünnung auf den entsprechenden Nährböden ausgespatelt, um eine Nachweisgrenze von  $1,0 \times 10^1$  KbE/g zu erreichen.

### Listeria monocytogenes

Die Bestimmung von *L. monocytogenes* erfolgte nach der Analysentechnik L 00.00 – 22 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Zum Nachweis von *L. monocytogenes* wurde jeweils eine Palcam-Agarplatte (PAL) (Rezeptur siehe 9.2.2.7) in fünf Sektoren aufgeteilt, und wie bei der Tropfplattentechnik üblich beimpft. Nach dem Antrocknen des Inokulums wurden die Platten mit der Bodenseite nach oben bei 37°C aerob für 48 Stunden bebrütet. Von den für *Listeria* spp. charakteristischen Kolonien wurden maximal fünf zur weiteren Differenzierung ausgewählt und jeweils mit einer Impföse als Verdünnungsausstrich auf den TSYEA-Agar aufgebracht sowie 20-24 Stunden bei 37°C bebrütet.

Als Bestätigungsreaktionen dienten der Katalase-Test, der CAMP-Test und die Kohlenhydratspaltung. Dafür wurde zunächst von dem beimpften TSYEA-Agar eine typische Kolonie auf einen Objektträger übertragen und mit einem Tropfen Bactident® Katalase-Lösung überschichtet. Listerien reagieren Katalase-positiv (Bläschenbildung). Für den CAMP-Test wurde der verwendete *S. aureus*-Teststamm strichförmig senkrecht über eine

Blutagar-Platte geimpft. Von dem TSYEA-Agar wurde Koloniematerial dazu im rechten Winkel so aufgetragen, dass der Impfstrich knapp neben demjenigen der Staphylokokken endete. Als Positiv-Kontrolle wurde ein bestätigter *L. monocytogenes*-Stamm mitgeführt. Die Bebrütung erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Ein positives Ergebnis des CAMP-Test lag bei einer vollständigen Hämolyse im Bereich der  $\beta$ -Hämolysezone des Staphylokokken-Stammes vor.

Von dem beimpften TSYEA-Agar wurden jeweils ein xylose- sowie ein rhamnosehaltiger Kohlenhydratnährboden mit typischen Kolonien beimpft und bis zu 7 Tage bei 37°C bebrütet. Als positives Ergebnis wurde eine deutliche Gelbfärbung des Mediums bewertet. Die Speziesenteilung und Identifizierung von *L. monocytogenes* erfolgte nach den in Tabelle 8 aufgeführten Reaktionsmustern.

Tabelle 8: Identifizierung von *Listeria* spp. (nach BAUMGART 2004)

Spezies	Säurebildung		CAMP-Test
	Rhamnose	Xylose	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+
<i>L. innocua</i>	v	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-
<i>L. seligeri</i>	-	+	(+)
<i>L. welshimeri</i>	v	+	-
<i>L. grayi</i>	v	-	-

V = variabel

+ = positive Reaktion

(+) = schwache Reaktion

- = negative Reaktion

### *Bacillus cereus*

Die Bestimmung präsumtiver *B. cereus* erfolgte in Form der Tropfplattentechnik nach dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 25 gemäß der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB mit Hilfe von Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Selektivagarplatten (PEMBA) (Rezeptur siehe 9.2.2.8). Nach dem Trocknen des Inokulums wurden die Platten mit der Bodenseite nach oben bei 37°C aerob für 18-24 Stunden bebrütet.

### Koagulase-positive Staphylokokken

Koagulase-positive Staphylokokken wurden nach dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 22 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB unter Einsatz von BAIRD-PARKER (BP)-Agarplatten (Rezeptur siehe 9.2.2.9) quantitativ nachgewiesen. Die beimpften Nährböden wurden bei 37°C aerob für 46±2 Stunden bebrütet. Danach wurden verdächtig erscheinende Kolonien (maximal fünf) auf Koagulase-Bildung getestet. Hierzu wurden sie mit einer sterilen Drahtöse in je ein Kulturröhrchen mit Brain-Heart-Infusion (BHI) überführt und 20 bis 24 Stunden bei 37°C

## **Materialien und Methoden**

---

bebrütet. Anschließend wurden je 0,1 ml Bouillon in sterile Kulturröhrchen mit 0,5 ml Koagulase-EDTA-Kaninchenplasma Bactident® Merck überführt und nach vorsichtigem Durchmischen bei 37°C im Wasserbad bebrütet. Nach vier Stunden wurde auf Koagulation geprüft. Der Koagulase-Test galt als positiv, wenn der Röhrcheninhalt überwiegend oder vollständig als zusammenhängender Klumpen vorlag.

### Sulfitreduzierende Anaerobier

Die Bestimmung der sulfitreduzierenden Anaerobier erfolgte nach dem Untersuchungsverfahren L 06.00 – 20 gemäß der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB. Zur Bestimmung der sulfitreduzierenden Anaerobier wurde jeweils eine Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agarplatte (TSC) (Rezeptur siehe 9.2.2.10) verwendet, welche mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft wurde. Nach dem Ausspateln wurden die Platten mit dem Boden nach unten stehen gelassen, bis das Inokulum angetrocknet war. Im Weiteren erfolgten die Überschichtung mit verflüssigtem TSC-Nährboden und Bebrüten der Platten mit der Bodenseite nach oben bei 37°C anaerob für 24±2 Stunden.

### Pseudomonaden und Aeromonaden

Zur Bestimmung von Pseudomonaden und Aeromonaden mittels der quantitativen Tropfplattentechnik fanden Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agarplatten (GSP) Verwendung (Rezeptur siehe 9.2.2.11), wobei die Kultivierungsbedingungen 30°C aerob für 48±2 Stunden lauteten. Bei verdächtig erscheinenden Kolonien wurde der Oxidase-Test durchgeführt. Für die Oxidase-positiv getesteten Kolonien wurden zur weiteren Identifizierung stichprobenartig BD BBL Oxi/Ferm Tube II-Reaktionsröhrchen eingesetzt.

### Enterobakteriäzen

Die Keimzahlbestimmung der Enterobakteriäzen erfolgte gemäß L 06.00 – 25 (Tropfplatten-Verfahren) laut amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Der verwendete Nährboden war Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar (VRBD, VG) (Rezeptur siehe 9.2.2.12), welcher bei 30°C aerob für 48±2 Stunden bebrütet wurde. Die weitere Identifizierung geschah stichprobenartig mittels BD BBL Enterotube II-Reaktionsröhrchen. Zusätzlich zu der Drop-plating-Technik, die eine Nachweisgrenze von  $2,0 \times 10^2$  KbE/g erlaubt, wurde 1 ml der Erstverdünnung auf den entsprechenden Nährböden ausgespatelt, um eine Nachweisgrenze von  $1,0 \times 10^1$  KbE/g zu erreichen.



### Coliforme Keime

Die Bestimmung der coliformen Keime wurden mittels der Methode L 01.00 – 3 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB durchgeführt, indem Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose-Agarplatten (VRB, VL) (Rezeptur siehe 9.2.2.13) zum Einsatz kamen. Nach einer anaeroben Bebrütung bei 30°C für 48±2 Stunden wurden zur weiteren Identifizierung stichprobenartig BD BBL Enterotube II-Reaktionsröhrchen eingesetzt. Um eine Nachweisgrenze von  $1,0 \times 10^1$  KbE/g zu erreichen, wurden zusätzlich zur Drop-plating-Technik die entsprechenden Nährböden mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft und diese ausgespatelt.

### Escherichia coli

Die Bestimmung von *E. coli* entspricht inhaltlich der Methode L 06.00 – 36 (Wiederbelebungsverfahren-Verfahren) gemäß amtlicher Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Ein Wiederbelebungsverfahren wird nur notwendig, wenn die zu untersuchenden Proben erhitzt, getrocknet oder tiefgefroren sind. Der mit einem Celluloseacetat-Membranfilter belegte Wiederbelebungs-nährboden (Glutaminat-Agar) (Rezeptur siehe 9.2.2.15) wurde mit 1 ml der Erstverdünnung inokuliert und nachfolgend mit der Bodenseite nach unten bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Der beimpfte und vorbebrütete Membranfilter wurde dann auf einen *E. coli*-Direkt-Agar (Rezeptur siehe 9.2.2.14) übertragen und 16-18 Stunden bei 44°C inkubiert. Die unter UV-Licht (366 nm) blau fluoreszierenden Kolonien wurden mittels Indoltest bestätigt. *E. coli* reagiert Indol-positiv. Eine solche positive Reaktion lag bei Rotfärbung der Kolonien innerhalb von 2-10 Sekunden nach Beträufeln mit Kovacs-Indol-Reagenz vor.

### Hefen und Schimmelpilze

Zur Bestimmung der Hefen und Schimmelpilze wurde das Untersuchungsverfahren L 01.00 – 37 (Tropfplatten-Verfahren) gemäß der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB herangezogen, wobei Bengalrot-Chloramphenicol-Selektivagarplatten genutzt wurden (Rezeptur siehe 9.2.2.16). Die inokulierten Platten wurden mit der Bodenseite nach oben bei 25°C aerob für 72-96 Stunden bebrütet. Um eine Nachweisgrenze von  $1,0 \times 10^1$  KbE/g zu erreichen, wurden zusätzlich zur Drop-plating-Technik die entsprechenden Nährböden mit 1 ml der Erstverdünnung beimpft und diese ausgespatelt.

Tabelle 9 gibt einen Überblick der angewendeten Bebrütungstemperatur und –dauer für die einzelnen Nährböden.

## Materialien und Methoden

---

Tabelle 9: Bebrütungstemperatur und -dauer für die verwendeten Nährböden

Nährmedium	Keimgruppe	Temperatur	Milieu	Dauer in Stunden
RO	Hefen und Schimmelpilze	25 °C	Aerob	96 +/- 2
PC	Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	30 °C	Aerob	72 +/- 2
LA	Milchsäurebakterien	30 °C	Aerob	48 +/- 2
LS	Laktobazillen	30 °C	Anaerob	48 +/- 2
GSP	Pseudomonaden und Aeromonaden	30 °C	Aerob	48 +/- 2
VG	Enterobakteriazeen	30 °C	Anaerob	48 +/- 2
VL	Coliforme Keime	30 °C	Anaerob	48 +/- 2
BP	Koagulase-positive Staphylokokken	37°C	Aerob	37 +/- 2
PAL	<i>Listeria monocytogenes</i>	37°C	Aerob	48 +/- 2
TSC	Sulfitreduzierende Sporenbildner	37°C	Anaerob	24 +/- 2
PEMBA	<i>Bacillus cereus</i>	37°C	Aerob	24 +/- 2
ZATK	Enterokokken	42°C	Aerob	48 +/- 2
ECD	<i>E. coli</i>	44°C	Aerob	16-18

---

### 3.3.2.2 Quantitative mikrobiologische Untersuchung mit vorheriger Wiederbelebungsstufe

Für die quantitativen mikrobiologischen Untersuchungen mit dem Vorschalten einer Wiederbelebungsstufe erfolgte die Probennahme und die Erstverdünnung der Probe wie unter 3.3.2.1.1 beschrieben. Anschließend wurden jeweils fünf homogenisierte Parallelproben eines jeden Produktes in sterilen Stomacherbeuteln für 75 Minuten in dem auf 20°C eingestellten Klimaschrank sowie fünf weitere homogenisierte Parallelproben im Brutschrank bei 30°C inkubiert. Die nach Ablauf dieser Resuskitation hergestellten Verdünnungsreihen sowie die weitere Isolierung und Differenzierung der Nährböden erfolgten gemäß 3.3.2.1.2.

### 3.3.2.3 Quantitative Auswertung der Nährböden und Berechnung der Keimzahl (KbE/g)

Für die Auswertung wurden diejenigen Sektoren der Platten berücksichtigt, die 1-50 klar voneinander trennbare Kolonien aufwiesen. Dabei musste mindestens eine Verdünnungsstufe vorhanden sein, auf der zwischen 5 und 50 Kolonien gewachsen waren. Bei kleinen und gut auszählbaren Kolonien wurden auch Sektoren mit bis zu 100 Kolonien herangezogen. Das typische Erscheinungsbild der einzelnen Kolonien wird im Zusammenhang mit dem jeweiligen Agar beschrieben (s. 9.2.2).

Aus den Koloniezahlen der niedrigsten und der nächsthöheren Verdünnungsstufe wurde das gewichtete arithmetische Mittel nach der Farmiloe'schen Formel berechnet.

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

$\bar{c}$  gewogener Mittelwert, Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) je g

$\sum c$  Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen werden  
(niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe und die nächst höhere)

$n_1$  Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe, die zur Berechnung herangezogen werden

$n_2$  Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe

$d$  Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Bei Verwendung einer Impfmenge von 0,05 ml wird der Mittelwert mit 20 multipliziert. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe ergibt sich die Angabe der „koloniebildenden Einheiten“ (KbE) pro Gramm Probenmaterial. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) wurde anschließend in logarithmierter Form ( $\log_{10}$ ) angegeben. Konnte auf dem mit der größten Probenmenge beimpften Sektor kein Koloniewachstum festgestellt werden, lautete das Ergebnis: „weniger als  $2,0 \times 10^2$  KbE/g“, für *E. coli* und sulfitreduzierende anaerob wachsende Sporenbildner „weniger als  $1,0 \times 10^1$  KbE/g“.

#### Berechnung des Mittelwertes von fünf Parallelproben

Pro monatlicher Untersuchung wurden für jedes TK-Erzeugnis fünf Verpackungseinheiten (Parallelproben) untersucht und die Anzahl der „koloniebildenden Einheiten“ bestimmt ( $\log_{10}$  KbE/g). Aus diesen fünf Werten wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Lagen bei einzelnen untersuchten Proben die jeweiligen Keimzahlen unterhalb der Nachweisgrenze, wurde zur Berechnung des Mittelwertes die Hälfte der Nachweisgrenze zu Grunde gelegt.

## Materialien und Methoden

---

### Berechnung des Einflusses von Einfrierprozess und anschließender einmonatiger Tiefkühlagerung auf die Mikroorganismenanzahl der frischen, ungefrorenen Produkte

Zur Berechnung des Einflusses des Tiefgefrierprozesses sowie der anschließenden einmonatigen Tiefkühlagerung auf den Mikroorganismengehalt der frischen, noch ungefrorenen Produkte „Porree“ und „Champignons in Scheiben“ wurde die Differenz aus den jeweiligen arithmetischen Mittelwerten der Keimgehalte im frischen und gefrorenen Zustand bestimmt. Die Differenz ( $\log_{10} \text{KbE/g}$ ) entspricht der Anzahl abgestorbener Mikroorganismen und gibt das Ausmaß der Keimreduktion an. In den tabellarischen Darstellungen der Ergebnisse werden diese Differenzen als „Reduktion“ bezeichnet.

Des Weiteren sollte die prozentuale Absterberate der Mikroorganismen des frischen Produktes nach Tiefgefrierprozess und einmonatiger Tiefkühlagerung ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt der Wachstums-/Absterbefaktor  $g$  zur Zeit  $t$  ermittelt. Er gibt an, um welchen Betrag sich eine Größe geändert hat und berechnet sich als Quotient aus den Werten der jeweiligen Periode und der Vorperiode, wobei ebenfalls die arithmetischen Mittelwerte der Keimgehalt zugrunde gelegt wurden:

$$g_t = I_t / I_{t-1}$$

Um anschließend auf der Basis dieser ermittelten Absterbefaktoren ( $g_t$ ) die prozentuale Absterberate der nach Tiefgefrieren und einmonatiger Lagerung abgestorbenen Mikroorganismen berechnen zu können, wurde folgende Formel verwendet:

$$p_t = (g_t - 1) \times 100 \%$$

### Berechnung der monatlichen Veränderungen der Keimzahlen während der Tiefkühlagerung

Die monatlichen Veränderungen der jeweiligen Keimzahlen würden sich aus der Differenz des Mittelwertes der Keimzahlen des Vormonats, zu denen des darauffolgenden Monats ergeben. Damit ließe sich jedoch lediglich der Unterschied der Keimgehalte zweier aufeinanderfolgender Monate darstellen. Aussagen zum durchschnittlichen Absterbeverhalten der Mikroorganismen über die gesamte Lagerzeit wären damit nicht möglich. Zudem wurden bei Betrachtung der monatlichen Differenzen starke Schwankungen mit An- und Abstiegen sichtbar. Diese Varianzen basieren zum großen Teil auf der Streuung zwischen den Packungen innerhalb einer Charge. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde auf eine Darstellung der monatlichen Keimzahldifferenzen verzichtet. Zur Betrachtung der monatlichen Veränderungen wurde stattdessen für jede Keimgruppe die durchschnittliche monatliche prozentuale Absterberate wie folgt ermittelt:

### Berechnung der durchschnittlichen prozentualen monatlichen Absterberate

Zunächst wurden die monatlichen Wachstums-/Absterbefaktoren für alle erfassten Keimgruppen nach folgender Formel berechnet:  $g_t = I_t / I_{t-1}$

Insgesamt ergaben sich damit pro Keimgruppe jeweils elf Wachstums-/Absterbefaktoren, ausgehend von der ersten Untersuchung des bereits tiefgefrorenen Produktes bis hin zum zwölften Monat der Tiefkühlagerung. Von diesen Werten wurde anschließend das geometrische Mittel bestimmt. Dieses eignet sich zur Berechnung von Durchschnittswerten, welche einer zeitlichen Veränderung unterliegen. Deshalb wird es zur Ermittlung der zentralen Tendenz von Wachstums-/Absterbefaktoren eingesetzt.

Das geometrische Mittel  $g$  der  $n$  Zahlen  $x_1, x_2, \dots, x_n$  ist gegeben durch die  $n$ -te Wurzel des Produkts der  $n$  Zahlen:

$$g = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$$

Um Aussagen über das durchschnittliche monatliche Wachstum bzw. Absterben der Mikroorganismen im Jahresverlauf machen zu können, war es weiterhin notwendig, die durchschnittliche prozentuale Wachstumsrate bzw. Absterberate zu berechnen.

$$p = (g - 1) \times 100 \%$$

- $p$       Durchschnittliche Wachstums-/Absterberate in %  
 $g$       geometrisches Mittel der Wachstums-/Absterbefaktoren

### Berechnung des Einfluss der einjährigen Tiefkühlagerung auf die Mikroorganismenzahl

Um den Einfluss der einjährigen Tiefkühlagerung auf die Anzahl der Mikroorganismen in allen vier untersuchten Produkten zu betrachten, wurde die Differenz zwischen dem Mittelwert der ersten und letzten Untersuchung des tiefgefrorenen Produktes berechnet. Die Differenz gibt die Anzahl der während der einjährigen Lagerzeit abgestorbenen Mikroorganismen an. In den tabellarischen Darstellungen der Ergebnisse werden diese Differenzen als „Reduktion“ bezeichnet. Allerdings ist zu beachten, dass hierbei die zwischenzeitlichen monatlichen Resultate nicht zur Geltung kommen und lediglich ein Vergleich der Mittelwerte von zwei Untersuchungen stattfindet.

Zur Betrachtung des Verhaltens der Mikroorganismen während einjähriger Tiefkühlagerung ist demnach die durchschnittliche prozentuale monatliche Absterberate besser geeignet.

## Materialien und Methoden

---

### Graphische Darstellung der Ergebnisse

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse in Linien- und Säulendiagrammen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel durchgeführt. Die zugrunde liegenden logarithmierten Zahlenwerte stellen die aus fünf Parallelproben berechneten Mittelwerte dar.

### Darstellung der Beziehung zwischen Mikroorganismenanzahl und Lagerdauer

Um den Zusammenhang zwischen der jeweiligen Mikroorganismenanzahl und der Dauer der Tiefgefrierlagerung darstellen zu können, wurde für jede Keimgruppe/Produkt eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die Regressionsgerade wurde innerhalb des Streudiagramms für die jeweilige Mikroorganismenart graphisch dargestellt. Mit Hilfe einer Regressionsanalyse wird der Einfluss von einer oder mehreren Variablen auf die interessierende Zielgröße untersucht. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Variablen „Lagerdauer“ auf die interessierende Zielgröße „Mikroorganismenanzahl“ mit Hilfe einer linearen Funktion überprüft, was als „lineare Einfachregression“ bezeichnet wird:

$$y = a + bx \quad \text{mit der Regressionsgeraden: } f_{(x)} = y = a + bx$$

In der Formel bedeuten:

- y     abhängige Variable/Werte der y-Achse
- x     unabhängige Variable/Werte der x-Achse
- a     Achsenabschnitt
- b     Steigung der Regressionsgeraden

Um die Aussage dieser Regressionsgeraden zu interpretieren, sind das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) bzw. der Korrelationskoeffizient (R bzw. r) zu bestimmen. Im Falle der linearen Einfachregression entspricht  $R^2$  dem Quadrat des Pearson'schen Korrelationskoeffizienten (Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten) r bzw. R. Der Korrelationskoeffizient dient zur Messung des linearen Zusammenhangs zwischen x und y und wird wie folgt berechnet:

$$r = s_{x,y} / s_y \times s_x$$

- $s_{x,y}$      Kovarianz der Merkmale X und Y
- $s_x$      Standardabweichung des Merkmals x
- $s_y$      Standardabweichung des Merkmals y

Je enger ein linearer Zusammenhang ausfällt, umso näher liegt der Korrelationskoeffizient R bei 1 oder -1; je schwächer die Beziehung ist, desto näher liegt er bei 0. Die in Tabelle 10

aufgeführte Interpretationshilfe kann für den Korrelationskoeffizienten verwendet werden, wobei diese Werte lediglich als Anhaltspunkte und nicht als feste Grenzwerte zu verstehen sind.

Tabelle 10: Interpretation des Korrelationskoeffizienten R bzw. r (BROSIUS 1998):

Betrag des Korrelationskoeffizienten	Mögliche Interpretation
0	Keine Korrelation
über 0 bis 0,2	Sehr schwache Korrelation
0,2 bis 0,4	Schwache Korrelation
0,4 bis 0,6	Mittlere Korrelation
0,6 bis 0,8	Starke Korrelation
0,8 bis unter 1	Sehr starke Korrelation
1	Vollständige Korrelation

---

Das Vorzeichen des Korrelationskoeffizienten gibt die Richtung der Regressionsgeraden an. Ein positives Vorzeichen deutet auf eine steigende Gerade und ein negatives Vorzeichen auf eine fallende Gerade.

### Ermittlung des Einflusses einer Wiederbelebungsstufe vor der quantitativen mikrobiologischen Untersuchung

Die Keimzahlen der direkten quantitativen Untersuchung (n=60) sowie der Untersuchungen nach Einschalten einer Wiederbelebungsstufe von 75 Minuten bei +20°C (n=60) bzw. +30°C (n=60) wurden verglichen und mittels des t-Tests bei gepaarten Stichproben auf signifikante Unterschiede geprüft. Graphisch erfolgte eine Darstellung der Keimgruppen, welche signifikante Unterschiede aufwiesen, in Säulendiagrammen mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel.

### Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mittels PASW Statistics 18 durchgeführt. Die Prüfung auf signifikante Reduktionen der Mikroorganismenzahlen durch den Einfrierprozess sowie durch die einjährige Tiefkühlagerung erfolgte mittels t-Tests bei unabhängigen Stichproben. Anhand des t-Tests bei verbundenen Stichproben wurde der Einfluss der Wiederbelebungsstufen auf die Keimzahlen geprüft. Darüber hinaus wurde für jede in den Produkten erfasste Mikroorganismenart eine Regressionsanalyse zwischen Lagerzeit und Keimzahl durchgeführt sowie der Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Vorversuche

Die Ergebnisse der Vorversuche finden sich in den Tabellen 32 und 33 (siehe 9.1.1). Die Resultate zeigen, dass es bei fünf- bzw. siebeneinhalbstündiger Lagerung der Proben in Styroporboxen mit Kühlelementen bei ca. 1°C lediglich zu geringen Veränderungen der Mikroorganismenanzahl kommt und ein derartiges Versenden der frischen, ungefrorenen Proben somit möglich ist.

## 4.2 Mikrobiologischer Status der frischen, ungefrorenen Rohgemüseprodukte

Bei der ersten Untersuchung im Dezember 2007 wurde der Keimstatus der frischen, noch nicht tiefgefrorenen Produkte „Porree, geschnitten“ und „Champignons in Scheiben“ ermittelt. Der Mikroorganismengehalt der beiden ungefrorenen Erzeugnisse ist in Tabelle 11 sowie in Abbildung 1 dargestellt. *L. monocytogenes*, Koagulase-positive Staphylokokken, Enterokokken, Aeromonaden, *B. cereus* und sulfitreduzierende anaerob wachsende Sporenbildner ließen sich in keiner Probe nachweisen werden bzw. lag die Anzahl dieser Mikroorganismen unterhalb ihrer Nachweisgrenze von 2,30 log<sub>10</sub> KbE/g oder 1,00 log<sub>10</sub> KbE/g. Aus diesem Grund werden die genannten Keimgruppen in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt.

Tabelle 11: Mikroorganismengehalt der ungefrorenen Produkte "**Porree, geschnitten**" und "**Champignons in Scheiben**" (n=5), Mittelwert+/-Standardabweichung (log<sub>10</sub> KbE/g)

Zielkeime	Porree, geschnitten	Champignons in Scheiben
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	7,33±0,64	6,42±0,29
Aerob wachsende Milchsäurebakterien	5,99±0,21	5,00±0,37
Laktobazillen	5,34±0,20	4,85±0,32
Pseudomonaden	6,47±0,62	6,34±0,48
Enterobakteriazeen	5,24±0,41	5,35±0,34
Coliforme Keime	5,13±0,19	4,31±0,49
<i>Escherichia coli</i>	n.n.	1,14±0,48
Hefen	3,22±0,23	3,06±0,04
Schimmelpilze	2,51±0,39	2,79±0,34

n.n. = nicht nachweisbar



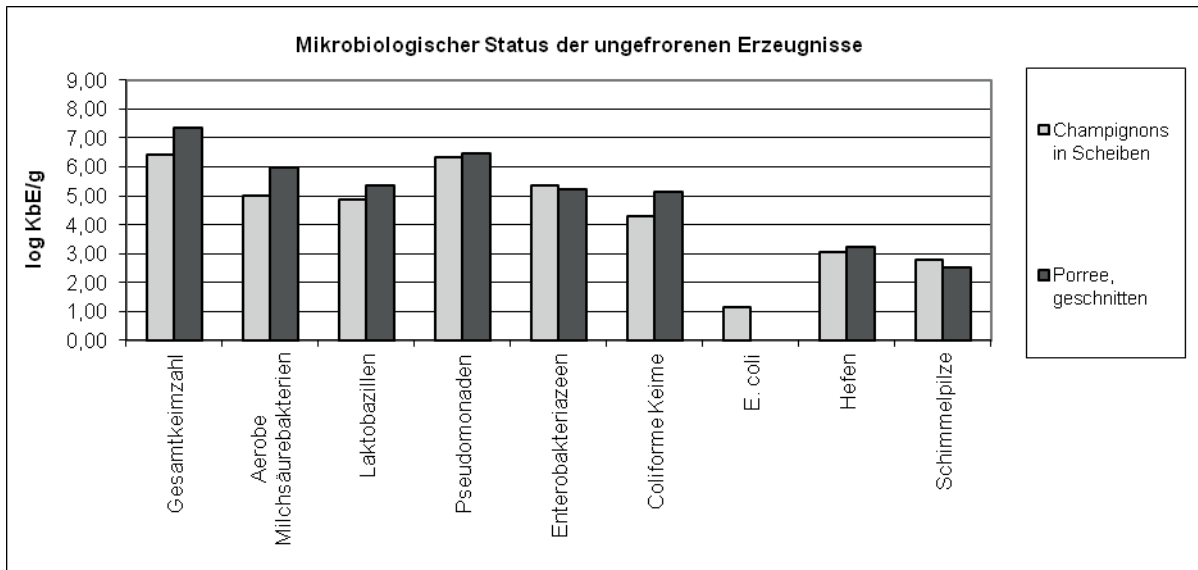


Abbildung 1: Mikrobieller Status ( $\log_{10}$  KbE/g) der ungefrorenen Produkte **"Porree, geschnitten"** und **"Champignons in Scheiben"**

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung besteht für das Erzeugnis „Porree, geschnitten“ insgesamt eine geringfügig stärkere mikrobielle Belastung als für das Erzeugnis „Champignons in Scheiben“. Eine Ausnahme bildet lediglich der Gehalt an Schimmelpilzen, welcher bei dem Produkt „Champignons“ etwas höher ausfällt. Der ermittelte Gesamtkeimgehalt liegt mit Durchschnittswerten von  $7,33 \log_{10}$  bzw.  $6,42 \log_{10}$  durchaus im Normbereich für derartige Erzeugnisse. So weist rohes, verarbeitetes Gemüse meist Mikroorganismenzahlen zwischen  $5,0$  und  $6,0 \log_{10}$  KbE/g (WEISS und HAMMES 2007) auf, kann aber auch höhere Werte annehmen, wie z.B. eine Gesamtkeimzahl in geschnittenen Champignons zwischen  $5,3$  und  $8,9 \log_{10}$  KbE/g (SWANSON 1990). Allerdings muss der Mikroorganismengehalt des Ausgangsmaterials nicht der ursprünglichen Kontamination entsprechen, vielmehr kann die Kontamination am Ende des Verarbeitungsweges aufgrund der Oberflächenvergrößerung durch das Zerschneiden sowie den Kontakt mit Maschinen und Förderbändern angestiegen sein. Ein Blanchierprozess, durch den sich die mikrobielle Belastung um den Faktor  $10^1$  bis  $10^4$  reduzieren lässt (ICMSF 2005), war bei den zwei überprüften Erzeugnissen nicht vorgesehen.

Für beide Rohgemüseprodukte ist der höchste Anteil der Mikroorganismen der Gattung *Pseudomonas* zuzuordnen. Des Weiteren finden sich in größeren Mengen aerob wachsende Milchsäurebakterien, Laktobazillen, Enterobakteriazeen sowie coliforme Keime. Auch in der Literatur werden *Pseudomonas* spp. als eine der vorherrschenden Mikroorganismengattungen auf rohem Gemüse beschrieben (ICMSF 1980 b), wie u.a. *P. aeruginosa* (ARROYO und PRESTAMO 1998). Die zu Beginn und während der einjährigen Tiefgefrierlagerung stichprobenartig isolierten *Pseudomonas* spp. ließen sich für beide Rohgemüseprodukte als *P. putida* und *P. fluorescens* identifizieren. Diese gehören zu den psychrotrophen Pseudomonadenspezies, von denen sich einige noch bis  $-7^{\circ}\text{C}$  vermehren

## Ergebnisse und Diskussion

(BAUMGART 2004). Weiterhin wurden aus dem Produkt „Porree“ *P. diminuta* und aus dem Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ *P. stutzeri* (Tab. 12) isoliert.

Ebenso zählen Milchsäurebakterien, die hier mit Gehalten von ca. 5,00 bis 6,00 log<sub>10</sub> KbE/g vorkamen, zur normalen Flora von rohen Gemüseerzeugnissen, wobei vor allem Arten der Gattungen *Leuconostoc* und *Lactobacillus* zu erwähnen sind (WEISS und HAMMES 2007). Weiterhin umfasst die Mikroflora von Pflanzen und rohen Gemüseprodukten auch Enterobakteriäzen und coliforme Keime; oftmals werden Spezies von *Serratia*, *Klebsiella* und *Enterobacter* identifiziert (WEISS und HAMMES 2007). Darüber hinaus kommen *Proteus*, *Hafnia*, *Pantoea* und *Erwinia* im Erdboden sowie auf Pflanzen vor (BAUMGART 2004). Einige dieser Bakterienarten konnten auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen nachgewiesen werden, wie z.B. in beiden Erzeugnissen *Pantoea agglomerans*, *C. freundii* sowie *K. ozaenae*. Des Weiteren wurden *Shigella* spp. angezüchtet, wie u.a. *S. flexneri* und *S. sonnei* (Tab. 12). Allerdings sollte bei diesen Befunden beachtet werden, dass nur eine stichprobenartige, qualitative Bestimmung und kein quantitativer Nachweis der Shigellen-Spezies stattgefunden hat. Es ist davon auszugehen, dass Bakterien der Gattung *Shigella* nur einen sehr geringen Anteil der Enterobakteriäzenflora in diesen Produkten ausmachen. Darüber hinaus spiegeln die Ergebnisse nur den Mikroorganismengehalt einer Charge der Erzeugnisse wieder.

Schimmelpilze, wie *Aureobasidium*, *Fusarium* und *Alternaria*, sowie Hefen gehören ebenfalls zur Normalflora von rohem Gemüse, allerdings in geringeren Zahlen als Bakterien (ICMSF 1980 b), was sich in den eigenen Ergebnissen ebenfalls erkennen lässt.

Tabelle 12: Identifizierte Spezies von Pseudomonaden, Enterobakteriäzen und coliformen Keimen

Produkt	Pseudomonaden	Enterobakteriäzen	Coliforme Keime
Porree, geschnitten	<i>Pseudomonas (P.) putida</i>	<i>Shigella (S.) boydii</i>	<i>Citrobacter (C.) freundii</i>
	<i>P. diminuta</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Klebsiella (K.) pneumoniae</i>
	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>K. ozaenae</i>
		<i>Pantoea (P.) agglomerans</i>	<i>K. oxytoca</i>
		<i>Serratia (S.) liquefaciens</i>	
Champignons in Scheiben	<i>P. putida</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>K. ozaenae</i>
	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>Enterobacter (E.) gergoviae</i>

### 4.3 Mikrobiologischer Status der Rohgemüseprodukte nach dem Einfrierprozess und vierwöchiger Tiefkühlagerung

Die zweite Untersuchung der Rohgemüseerzeugnisse erfolgte nach Einfrierprozess und anschließender vierwöchiger Tiefkühlagerung. Die ermittelten Mikroorganismengehalte und deren absolute Reduktion sowie die prozentualen Absterberaten geben die Tabellen 13 und 14 wieder. In den Abbildungen 2 und 3 sind die Keimzahlen der ungefrorenen Erzeugnisse sowie nach Gefrierprozess und anschließender vierwöchiger Tiefkühlagerung dargestellt.

Tabelle 13: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Porree, geschnitten"** im ungefrorenen Zustand, nach Gefrieren und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung (n=5) sowie Keimzahlreduktion (Mittelwerte +/- Standardabweichung (log<sub>10</sub> KbE/g)) und Absterberate (%)

Zielkeime	Frisch	Gefroren	Reduktion*	Absterberate
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	7,33±0,64	6,14±0,38	1,19±0,64***	16
Aerobe Milchsäurebakterien	5,99±0,21	5,10±0,23	0,89±0,20***	15
Laktobazillen	5,34±0,20	4,26±0,33	1,08±0,35***	20
Pseudomonaden	6,47±0,62	5,36±0,16	1,11±0,70***	17
Enterobakteriäzen	5,24±0,41	4,59±0,14	0,65±0,45**	12
Coliforme Keime	5,13±0,19	3,75±0,18	1,38±0,34***	27
Hefen	3,22±0,23	0,98±0,62	2,25±0,64***	70
Schimmelpilze	2,51±0,39	1,06±0,39	1,45±0,67***	58

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen frischem und gefrorenem Produkt dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl im frischen Produkt (p≤0,05)

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl im frischen Produkt (p≤0,01)

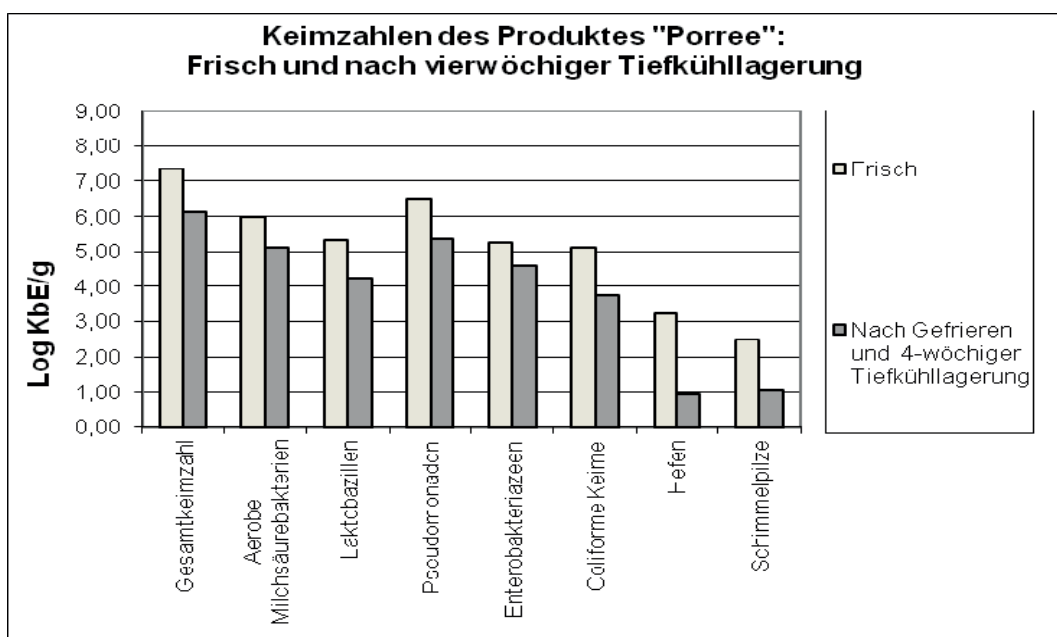


Abbildung 2: Mikroorganismengehalt des ungefrorenen Produktes **"Porree, geschnitten"** sowie nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 14: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Champignons in Scheiben"** im ungefrorenen Zustand, nach Gefrieren und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung (n=5), Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/- Standardabweichung ( $\log_{10}$  KbE/g)) und Absterberate (%)

Zielkeime	Frisch	Gefroren	Reduktion*	Absterberate
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,42±0,29	6,08±0,22	0,34±0,34	5
Aerobe Milchsäurebakterien	5,00±0,37	4,61±0,14	0,39±0,19	7
Laktobazillen	4,85±0,32	4,26±0,17	0,59±0,36**	12
Pseudomonaden	6,34±0,48	5,82±0,38	0,52±0,28	8
Enterobakteriazeen	5,35±0,34	4,38±0,21	0,97±0,47**	18
Coliforme Keime	4,31±0,49	4,01±0,30	0,30±0,19	7
<i>Escherichia coli</i>	1,14±0,48	0,76±0,13	0,38±0,31	33
Hefen	3,06±0,04	2,10±0,23	0,96±0,22**	31
Schimmelpilze	2,79±0,34	0,88±0,40	1,91±0,48**	69

\*Die Reduktion stellt die Differenz ( $\log_{10}$  KbE/g) von frischem und gefrorenem Produkt dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl im frischen Produkt ( $p \leq 0,01$ )

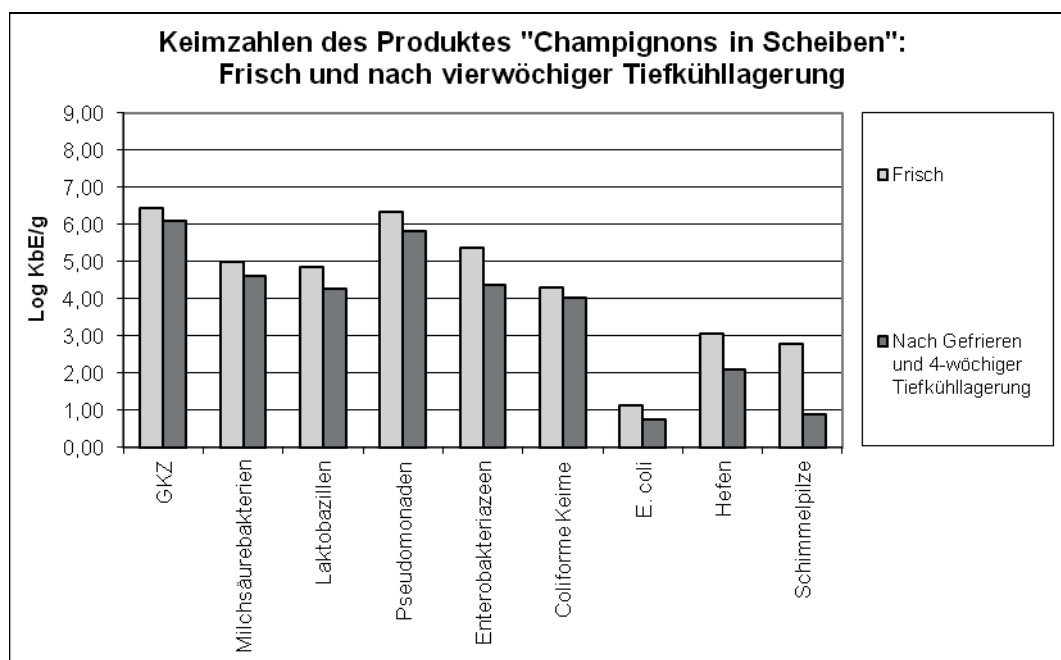


Abbildung 3: Mikroorganismengehalt des ungefrorenen Produktes „**Champignons in Scheiben**“ sowie nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung

Bei vergleichender Betrachtung findet die größte Keimzahlreduktion aufgrund des Einfrierprozesses und der vierwöchigen Tiefgefrierlagerung im Produkt „Porree, geschnitten“ bei den Hefen ( $2,25 \log_{10}$ ) und Schimmelpilzen ( $1,45 \log_{10}$ ) statt. Auch beim Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ fallen die Schimmelpilze ( $1,91 \log_{10}$ ) mengenmäßig am stärksten ab, und in diesem Produkt werden die Hefen ( $0,96 \log_{10}$ ) ebenfalls deutlicher reduziert als andere Keimgruppen, sofern man die absoluten Werte betrachtet.

In der Literatur findet man widersprüchliche Angaben bezüglich der Überlebensfähigkeit dieser Mikroorganismen bei Einfluss sehr niedriger Temperaturen. Von verschiedenen

Autoren wurde ihre Sensitivität mit der gramnegativer Keime gleichgesetzt (FRAZIER und WESTHOFF 1978, TROLLER und CHRISTIAN 1978), was bei den hier durchgeführten Untersuchungen nur für das Erzeugnis „Porree“ gilt, denn die Reduktion der Anzahl von coliformen Keimen und Schimmelpilzen fällt mit  $1,38 \pm 0,34$  bzw.  $1,45 \pm 0,67$  vergleichbar hoch aus. Andere Autoren konstatierten ebenfalls eine gewisse Gefrierempfindlichkeit von Schimmelpilzen (STEVENSON und GRAUMLICH 1978) bzw. Hefen und Schimmelpilzen (BORGSTROM 1955). WALLACE und TANNER (1934, 1935) beschrieben die höchste Gefrierempfindlichkeit für Hefezellen, danach für Schimmelpilze und die langsamste Absterbequote für Bakterien. Die gleiche Reihung ergibt sich hier beim Erzeugnis „Porree, geschnitten“. Demnach kann anhand der Ergebnisse nicht bestätigt werden, dass vegetative Zellen der Hefen und Schimmelpilze und ihre Sporen generell resistenter auf Gefrieren und Gefrierlagerung reagieren als Bakterien (BURTON 1949 a, HOBBS 1976, SCHMIDT-LORENZ 1970).

Zu einem ebenso deutlichen Abfall der Keimzahl kommt es im Erzeugnis „Porree, geschnitten“ in der Gruppe der coliformen Keime, während die Enterobakteriäzen in diesem Produkt die geringste Reduktion erfahren. Gegenteiliges lässt sich im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ beobachten. Dort verringern sich die coliformen Keime nur sehr wenig in ihrer Anzahl ( $0,30 \log_{10}$ ), während die Enterobakteriäzen um  $0,97 \log_{10}$  abfallen. In der Literatur werden oftmals Enterobakteriäzen und coliforme Keime zusammen mit anderen gramnegativen Keimen als sehr gefrierempfindlich (CHATTOPADHYAY 2000, SINGHAL und KULKARNI 2000, LARKIN et al. 1955) beschrieben. So überlebte *Shigella (S.) flexneri* in frisch hergestelltem Passionsfruchtsaft bei  $-20^{\circ}\text{C}$ -Lagerung lediglich ein bzw. zwei Stunden (AEA und BUSHNELL 1962), was allerdings als Folge des niedrigen pH-Wertes des Saftes anzusehen ist. Eine hohe Gefrierempfindlichkeit dieser Keimgruppen nach Einfrieren und vierwöchiger Tiefkühlagerung lässt sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht uneingeschränkt bestätigen. Die Ergebnisse untermauern vielmehr die These, dass auch bei diesen Mikroorganismengattungen die Letalitätsrate mit den verschiedenen Einflussfaktoren variiert (LUND 2000). Die hier ermittelten Absterberaten (7-27 %) liegen in einem Bereich, welcher mit dem von EL-ZAWAHRY und GRECZ (1981) vergleichbar ist. Dort betrug die Inaktivierung der Population von *Y. enterocolitica* durch Gefrieren bei  $-18^{\circ}\text{C}$  und  $-75^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde 7 % bzw. 42 %.

Für die Zellen von *E. coli* im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ lässt sich eine Reduktion um  $0,38 \log_{10}$  KbE/g sowie eine Absterberate von 33 % berechnen. Damit wird eine geringere Keimzahlreduktion erreicht, als einige Daten aus der Literatur beschreiben. So beobachteten RACCACH et al. (2002) nach 24-stündiger Gefrierlagerung von *E. coli* O157:H7 in Gemüsebrühe eine Verminderung der lebensfähigen Population um 56 %; nach 168 h ergab sich eine Reduktion um 96 %. Allerdings ist ein direkter Vergleich aufgrund der

## Ergebnisse und Diskussion

---

unterschiedlichen Versuchsdurchführungen nicht möglich. HAHN und APPLEMAN (1952 a, b) wiesen z.B. *E. coli* nach 24-stündiger Lagerung in Orangensaftkonzentrat bei -17°C nicht mehr nach. In geschnittener Mango sanken die Keimzahlen von *E. coli* nach siebentägiger Aufbewahrung bei -20°C um 0,40 log<sub>10</sub> KbE/g und am 14. Tag des Versuchs hatten sich diese um weitere 0,40 log<sub>10</sub> KbE/g reduziert (STRAWN und DANYLUK 2010). Ebenso stellten ANSAY et al. (1999) sowie CASARIN et al. (2009) höhere Absterberaten von *E. coli* während Gefrierlagerung fest. Gründe für die niedrigere Reduktionsrate in den hier durchgeführten Versuchen kann der höhere pH-Wert von Champignons (ca. 6,00) im Vergleich mit der stärkeren Säuerung von Orangensaftkonzentrat und Mangos sein. Auch die niedrigere Lagertemperatur von -24°C im Vergleich mit den dort verwendeten Bedingungen von -2, -17 und -18°C dürfte eine Rolle spielen.

Ebenfalls zu den gramnegativen Keimen gehört die Bakteriengattung *Pseudomonas*, die nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung in beiden Erzeugnissen nur geringfügig stärker als die grampositiven Keime reduziert wurde. Diese Befunde bestätigen Ergebnisse von HALL (1969), welcher nach einem Monat Tiefgefrierlagerung von Erbsen bei -29°C Überlebensraten von 92 % (psychrotrophe Spezies) sowie von 100 % (mesophile Spezies) fand. Die Mehrzahl der Literaturangaben berichtet jedoch über eine deutlichere Gefrierempfindlichkeit dieser Mikroorganismen. So erreichten PARTMANN (1975) durch Gefrierprozess bei -30°C in rohem Rind- und Hackfleisch eine Absterberate von 53 % bzw. 46 %. Obwohl rohes Fleisch als Matrix aufgrund der Inhaltsstoffe einen stärker schützenden Effekt auf die enthaltenen Mikroorganismen ausüben müsste, wurden in den eigenen Versuchen niedrigere Absterberaten erreicht (8 bzw. 17 %). Allerdings ist nicht beschrieben, welche *Pseudomonas* spp. in den Versuchen von PARTMANN (1975) zum Einsatz kamen. In Wasserkresse, die bei einer Temperatur von -21°C gelagert wurde, ließen sich nach zwei Monaten keine überlebenden Zellen von *P. aeruginosa* nachweisen (OLIVEIRA et al. 2009).

Von den erfassten grampositiven Mikroorganismen erweisen sich Milchsäurebakterien und Laktobazillen im Allgemeinen als relativ resistent gegenüber dem Einwirken sehr niedriger Temperaturen (TSEN et al. 2007), ein Befund, den die ermittelten Ergebnisse stützen. Allerdings lässt sich in beiden untersuchten Erzeugnissen die in der Literatur oftmals beschriebene höhere Gefrierresistenz grampositiver Mikroorganismen im Vergleich zu gramnegativen Keimen (BANWART 1989, BURTON 1949 a, BROWN und HILL 1984, ICMSF 1980 a, LUND 2000, SCHMIDT-LORENZ 1970, SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968, SINGHAL und KULKARNI 2000) nur bedingt wiedererkennen. Die Keimzahlreduktion der Milchsäurebakterien liegt bei den „Champignons in Scheiben“ sogar geringfügig höher als die von coliformen Keimen und *E. coli*. Auch die Verringerung der Laktobazillen ist etwas ausgeprägter als die Reduktion der Pseudomonaden. Allerdings wurden von einigen Autoren (KIM et al. 2009, LLOYD und PONT 1973, TABATABAIE und MORTAZAVI 2008) deutlichere

Keimzahlverminderungen beschrieben, wie sie anhand der hier ermittelten Ergebnisse nicht bestätigt werden können.

Bei den eigenen Ergebnissen fällt auf, dass die Keimzahlreduktionen im Produkt „Porree, geschnitten“ weitaus höher ausfallen als bei dem Erzeugnis „Champignons in Scheiben“. Dort werden lediglich für drei Mikroorganismengruppen signifikante Differenzen vor und nach dem Gefrieren nachgewiesen, während sich bei „Porree, geschnitten“ alle Mikroorganismen signifikant verringern. So ist beispielsweise beim Porree das Absinken der Hefezellzahlen mehr als doppelt so hoch wie bei den Pilzen, und eine nahezu doppelt so starke Verringerung der Keimzahlen findet auch hinsichtlich der Milchsäurebakterien, Laktobazillen und Pseudomonaden statt; die Verringerung des Gehaltes der coliformen Keime liegt sogar mehr als viermal so hoch. Lediglich die Reduktionen der Anzahlen von Enterobakteriazeen und Schimmelpilzen zeigt sich bei den Champignons geringfügig höher als im Produkt „Porree“.

Weil aufgrund der eigenen vergleichenden Untersuchungen der ungefrorenen und tiefgefrorenen Produkte nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung die Resistenz der grampositiven Mikroflora die Widerstandsfähigkeit der gramnegativen Komponente nicht deutlich übersteigt, bleibt die mengenmäßige Verteilung der Mikroorganismen des Ausgangsmaterials im tiefgefrorenen Produkt nahezu konstant. Im Produkt „Porree, geschnitten“ behält die im frischen Erzeugnis vorherrschende Gattung der Pseudomonaden auch nach dem Tiefgefrieren ihre Dominanz. Entsprechendes trifft auf die aeroben Milchsäurebakterien zu. Eine leichte Verschiebung lässt sich zugunsten der Enterobakteriazeen und zu Lasten der Laktobazillen feststellen; die Hefezellzahlen sinken etwas stärker ab als die der Schimmelpilze. Bei dem Produkt „Champignons in Scheiben“ ist die gleichbleibende mengenmäßige Verteilung der Keimgruppen noch deutlicher ausgeprägt; hier gibt es lediglich einen stärkeren Abfall der Enterobakteriazeen zugunsten der aeroben Milchsäurebakterien. Ein Verschieben der Mikroflora stellte dagegen PARTMANN (1975) in seinen Studien fest. So enthielt rohes Rind- und Hackfleisch vor dem Gefrierprozess bei  $-30^{\circ}\text{C}$  15 % bzw. 22 % grampositive und 85 % bzw. 78 % gramnegative Bakterienspezies. Nach der Behandlung hatte sich das Verhältnis zugunsten der grampositiven Keime (70 % bzw. 75 %) verändert. Und auch FRIES und EGGERTING (1997) unterstellten aufgrund ihrer Versuche eine Verschiebung der Mikroflora während der Lagerung zur grampositiven Seite.

## Ergebnisse und Diskussion

---

Für den deutlichen Unterschied der Zellzahlreduktionen nahezu aller Mikroorganismengruppen in den zwei Rohgemüseprodukten können verschiedene Erklärungen in Betracht gezogen werden. Beide Erzeugnisse werden geschnitten und gewaschen, wobei dem Champignontransportwasser Citronen- oder Ascorbinsäure zugesetzt sein kann. Diese Stoffe werden zumeist als Antioxidationsmittel verwendet, darüber hinaus werden der Citronensäure auch gewisse antimikrobielle Eigenschaften zugeschrieben (SØLTOFT-JENSEN und HANSEN 2005). Theoretisch könnte es möglich sein, dass durch diesen sehr schwachen bakteriziden Effekt, welcher nicht zum Absterben der Mikroorganismen geführt hat, eine gewisse Kreuztoleranz gegenüber weiteren Stressoren hervorgerufen wurde. Bekanntermaßen können säureadaptierte Mikroorganismen einen Kreuzschutz gegenüber anderen subletalen Stresseinflüssen ausbilden, wie z.B. gegenüber Gefrier- und Auftauvorgängen (BANG und DRAKE 2005, LEYER und JONSON 1993, RYU und BEUCHAT 1998).

Einen weiteren Effekt auf die Absterberate der Mikroorganismen kann ein deutlich erniedrigter pH-Wert ausüben. Der pH-Wert beträgt bei dem rohen, ungefrorenen Erzeugnis „Porree, geschnitten“ im Durchschnitt 5,5, während er für das Produkt „Champignons in Scheiben“ bei 6,9 liegt. Stark erhöhte Wasserstoffionenkonzentrationen in Lebensmitteln während des Gefrierens und der Gefrierlagerung stellen eine zusätzliche Belastung für die vorhandene Mikroflora dar. So wurde nachgewiesen, dass sich der größte prozentuale Anteil an Keimen, welche das Gefrieren überleben, im neutralen oder schwach alkalischen pH-Bereichen ergibt (SINGHAL und KULKARNI 2000) und eine höhere Gefrierempfindlichkeit in sauren Medien besteht. Mit anderen Bakterienspezies wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Festzuhalten ist aber, dass mit einer Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration vor allem bei den kälteempfindlichen Keimen die Absterbequote ansteigt (GEORGALA und HURST 1963).

Darüber hinaus kann eine Erklärung für die höhere Überlebensrate der Mikroorganismen in den verschiedenen Inhaltsstoffen der zwei Rohgemüseprodukte zu suchen sein. Beide Erzeugnisse unterscheiden sich vor allem in ihrem Eiweiß- und Kohlenhydratgehalt. So enthält das Produkt „Champignons in Scheiben“ 3,4 g Eiweiß/100 g, während Porree nur 1,6 g Eiweiß/100 g aufweist. Der Kohlenhydratgehalt liegt beim Porree mit 2,9 g/100 g (davon Zucker 2,2 g) aber deutlich höher als bei den Champignons (0,7 g/100 g; davon Zucker 0,1 g) (BOFROST 2010). Bei letzterem besteht der Kohlenhydratanteil hauptsächlich aus der Gerüstsubstanz Chitin. Darüber hinaus findet man in Pilzen Trehalose sowie die Zuckeralkohole Mannit und Xylit. Der Fettgehalt ist mit ca. 0,3 % in beiden Gemüsesorten sehr gering (EBERMANN und ELMADFA 2008). Champignons besitzen vor allem einen hohen Anteil an Kalium. Durch Versuche von STILLE (1948), der den Einfluss verschiedener Ionen auf die Überlebensfähigkeit einer Hefespezies während des Gefrierens untersuchte, wurde



die geringste Letalitätsrate in Anwesenheit von Kaliumionen festgestellt. Der Kaliumgehalt von Porree ist geringer. Unter seinen schwefelhaltigen Inhaltsstoffen ist das Diallyldisulfid mit einer schwach antibiotischen Wirkung hervorzuheben (EBERMANN und ELMADFA 2008).

Der höhere Eiweißgehalt der Champignons einschließlich vieler essentieller Aminosäuren, könnte zu einer besseren Überlebensrate der Mikroorganismen in diesem Produkt beitragen (CHATTOPADHYAY 2000, GEORGALA und HURST 1963, MOUNTNEY und GOULD 1988).

Ob die größere Absterberate der Mikroorganismen im Produkt „Porree“ auch mit dem längeren Einwirken der Gefriertemperaturen in Verbindung steht, erscheint fraglich. Diese beträgt hier ca. 35 Minuten bei  $-35^{\circ}\text{C}$ , während für das Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ lediglich ca. 15 Minuten benötigt werden. Es dürfte eher unwahrscheinlich sein, dass ein um 20 Minuten längeres Einwirken der Gefriertemperaturen einen derart starken Effekt auf die Keimzahl besitzt, zumal sich die verwendeten Temperaturen als einflussnehmender Faktor gleichen.

### 4.4 Mikrobiologischer Status der TK-Fertiggerichte nach Produktion und vierwöchiger Tiefkühlagerung

Das bei der Untersuchung im Januar 2008 ermittelte mikrobiologische Profil der tiefgefrorenen Produkte „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und „Stroganoff-Pfanne“ nach vierwöchiger Tiefkühlagerung ab Herstellung ist in Tabelle 15 und Abbildung 4 dargestellt. Koagulase-positive Staphylokokken, Aeromonaden, *L. monocytogenes* sowie *B. cereus* wurden in keiner Probe nachgewiesen bzw. lag ihre Anzahl unterhalb der Nachweisgrenze von  $2,30 \log_{10}$  KbE/g. Bei einer Nachweisgrenze von  $1,00 \log_{10}$  KbE/g ließen sich ebenfalls keine sulfitreduzierenden anaerob wachsenden Sporenbildner sowie *E. coli* anzüchten. Aus diesem Grund werden diese Keimgruppen in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt.

Tabelle 15: Mikroorganismengehalt der tiefgefrorenen Erzeugnisse "**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**" und "**Stroganoff-Pfanne**" nach vierwöchiger TK-Lagerung (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung ( $\log_{10}$  KbE/g))

Zielkeime	Maultaschen-Gemüse-Pfanne	Stroganoff-Pfanne
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	5,79±0,35	6,23±0,27
Aerobe Milchsäurebakterien	4,15±0,33	2,82±0,31
Laktobazillen	3,91±0,42	2,34±0,28
Pseudomonaden	4,64±1,49	5,54±0,49
Enterokokken	2,06±0,13	n.n.
Enterobakteriazeen	3,68±0,59	4,13±0,22
Coliforme	2,18±0,16	2,00±0,00
Hefen	1,22±0,30	1,39±0,43
Schimmelpilze	0,76±0,13	1,06±0,25

n.n.= nicht nachweisbar

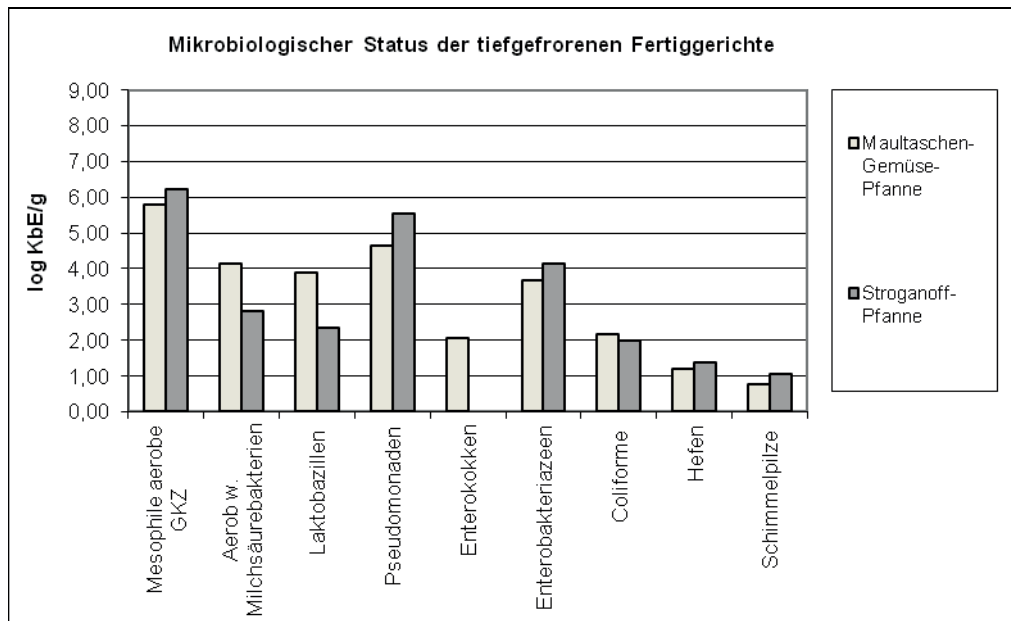


Abbildung 4: Mikroorganismengehalt (log<sub>10</sub> KbE/g) der tiefgefrorenen Erzeugnisse **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"** und **"Stroganoff-Pfanne"** nach vierwöchiger Tiefgefrierlagerung

Mit einer durchschnittlichen aeroben Gesamtkeimzahl von 5,8 bzw. 6,23 log<sub>10</sub> KbE/g liegt die aerobe Gesamtkeimzahl der beiden TK-Fertiggerichte vier Wochen nach der Herstellung im Bereich der zwei rohen Gemüseerzeugnisse. Im Gegensatz zu Rohgemüse wird die Mikroorganismenflora tiefgefrorener Fertiggerichte, welche bereits bei der Herstellung einen Erhitzungsprozess durchlaufen haben, aufgrund dieser keimtötenden Maßnahme weniger vom Ausgangsmaterial bestimmt. Da jedoch moderne Tiefkühlfertiggerichte oftmals nicht nur aus vorgegarten Komponenten, sondern auch aus rohen Anteilen zusammengesetzt sind, lassen sich – wie in den vorliegenden Fällen - beim Endprodukt oftmals keine eindeutigen Effekte erkennen.

Die deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gibt lediglich für „gegarte TK-Fertiggerichte bzw. Teile davon, die nur noch auf Verzehrstemperatur erhitzt werden müssen“ einen Richtwert für die aerobe mesophile Koloniezahl von 1,0 x 10<sup>6</sup> KbE/g an. Allerdings darf dieser Wert überschritten werden, wenn die Rezeptur rohe Zutaten wie Käse oder Petersilie ausweist (DGHM 2009). Zumindest die „Stroganoff-Pfanne“ überschreitet nach 4 Wochen Gefrierlagerung mit einer aeroben Gesamtkeimzahl von 6,23 log<sub>10</sub> KbE/g diesen Richtwert. Ebenso wie die Maultaschen-Gemüse-Pfanne enthält das Produkt jedoch rohe Komponenten und soll vor dem Verzehr vollständig durchgegart werden.

Den größten Anteil der Gesamtkeimzahl macht in beiden Produkten die Gruppe der Pseudomonaden aus. Auch viele Publikationen über die Mikroflora gefrorener Produkte bezeichnen *Pseudomonas* spp. als das am häufigsten nachzuweisende Bakterium (GEIGES 1996, GEIGES unveröffentlichte Daten), wie z.B. *P. maltophilia* (DOUDOROFF und PALLERONI 1974). Auch KLEER und HILDEBRANDT (2000) isolierten *Pseudomonas* spp. aus rohen/teilgegartem Gemüsefertiggerichten sowie gegarten Fertiggerichten mit Fleischanteil.

## Ergebnisse und Diskussion

Die oberen 80er bzw. 95er Perzentilgrenzen lagen bei 3,3/4,3 log<sub>10</sub> KbE/g (Gemüsefertiggerichte) und 4,8/5,4 log<sub>10</sub> KbE/g (Fertiggerichte mit Fleischanteil).

Des Weiteren ergeben sich für die aeroben Milchsäurebakterien sowie Laktobazillen im Erzeugnis „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ deutlich höhere Werte als in der „Stroganoff-Pfanne“. Dies ist wahrscheinlich auf den größeren Anteil an rohem Gemüse im erstgenannten Gericht zurückzuführen.

KLEER und HILDEBRANDT (2000) ermittelten für die Enterobakteriazeen obere 80er/95er Perzentilgrenzen von 4,3/4,5 log<sub>10</sub> KbE/g in gegarten Fertiggerichten mit Fleischanteil sowie von 3,3/4,1 log<sub>10</sub> KbE/g in rohen bzw. teilgegarten Gemüsefertiggerichten. In ähnlicher Größenordnung bewegen sich die Mittelwerte der beiden Fertiggerichte.

Der Gehalt an coliformen Keimen macht in den vorliegenden Proben nur ungefähr die Hälfte der Enterobakteriazeen aus und liegt mit ca. 2,00 log KbE/g nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Von KLEER und HILDEBRANDT (2000) und GOMAA et al. (2002) wurden coliforme Keime in verschiedenen Tiefkühlfertiggerichten bzw. verschiedenen Sorten gefrorenen Gemüses in höheren Mengen nachgewiesen.

Zu Beginn und während der einjährigen Tiefgefrierlagerung wurden stichprobenartig *Pseudomonas* spp. sowie Enterobakteriazeen und coliforme Keime typisiert. Ihre Artzugehörigkeit ist in Tabelle 16 aufgeführt. Darunter wurden auch *Shigella* spp. erfasst, wie u.a. *S. flexneri* und *S. sonnei*. Die Befunde sollten vorsichtig interpretiert werden, wie beim Rohgemüse bereits besprochen wurde.

Tabelle 16: Identifizierte Spezies von Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keimen

Produkt	Pseudomonaden	Enterobakteriazeen	Coliforme Keime
Maultaschen-	<i>P. putida</i>	<i>S. boydii</i>	<i>C. freundii</i>
Gemüse-Pfanne	<i>P. diminuta</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>K. ozaenae</i>
		<i>S. liquefaciens</i>	<i>K. oxytoca</i>
			<i>E. cloacae</i>
Stroganoff-Pfanne	<i>P. putida</i>	<i>S. boydii</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>P. fluorescens</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>K. oxytoca</i>
		<i>S. sonnei</i>	<i>E. gergoviae</i>
		<i>P. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>
		<i>Hafnia (H.) alvei</i>	
		<i>Yersinia (Y.) enterocolitica</i>	

Darüber hinaus konnten im Erzeugnis „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ in geringer Menge *Enterococcus* spp. nachgewiesen werden, die schon in früheren Erhebungen aus rohen/teilgegartem Gemüsefertiggerichten und Fertiggerichten mit rotem Fleisch (KLEER und HILDEBRANDT 2000) sowie aus tiefgefrorenen Käsecrepes (GEIGES 1996) isoliert wurden.

In den beiden Tiefkühlfertiggerichten macht den geringsten Anteil der mikrobiellen Flora die Gruppe der Hefen und Schimmelpilze aus. Sie liegen damit deutlich unter den Werten, welche von KLEER und HILDEBRANDT (2000) in rohen/teilgegartem Gemüsefertiggerichten sowie in teilgegartem Fertiggerichten mit Fleischanteil erhoben wurden. Auch bei der Untersuchung verschiedener gefrorener Gemüsesorten wurde ein deutlich höherer Gehalt für Hefen und Schimmelpilze ( $3,9 \times 10^3 - 1,1 \times 10^4$  KbE/g) ermittelt (GOMAA et al. 2002).

### 4.5 Einjährige Tiefkühlagerung der vier Erzeugnisse

Für die vier untersuchten Tiefkühlprodukte ist das Verhalten der Mikroorganismenzahlen während der einjährigen Lagerung in den Abbildungen 5-10, 13, 15 sowie 17-20 dargestellt. Die Keimgehalte der ersten Untersuchung des gefrorenen Produktes und die am Ende der Tiefgefrierlagerung (12. Monat) ermittelten Keimzahlen sowie deren Differenz sind in den Tabellen 17 bis 31 aufgeführt. Darüber hinaus sind in diesen Tabellen die für den Lagerzeitraum ermittelten durchschnittlichen monatlichen Absterberaten (%) angegeben. Eine Jahresübersicht über alle monatlich ermittelten Keimzahlen sowie gemessenen pH-Werte und Temperaturen der angelieferten Produkte geben die Tabellen 34-53 (9.1.2). Die anhand von Regressionsanalysen erstellten Streudiagramme finden sich in den Abbildungen 11, 12, 14, 16 sowie 35-46 (9.1.4); die Korrelationskoeffizienten sowie deren Interpretation und die Regressionsgeraden lassen sich in den Tabellen 54-57 im Anhang (9.1.4) auffinden. Für alle erfassten Mikroorganismengruppen werden bei Betrachtung des Jahresverlaufs der Keimzahlen unterschiedlich starke monatliche Schwankungen sichtbar. Diese Varianzen basieren zum großen Teil auf der Streuung zwischen den Packungen innerhalb einer Charge. Auf keinen Fall ist es realistisch, gleiche Keimzahlen in den Parallelproben eines Loses zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt zu erwarten. Aus diesem Grund kann es auch zwischen den Probenmittelwerten aufeinanderfolgender Monate zu einem virtuellen Ansteigen oder Abfallen kommen, sofern die wahren Werte nahe beieinander liegen. Bestehen nur leichte Trends in der Keimentwicklung, lassen sich diese allein mittels Regressionsanalyse über den gesamten Erhebungszeitraum validieren. Speziell bei der letzten Untersuchung (12. Monat) des Produktes „Champignons in Scheiben“ wurde für viele Mikroorganismen eine zum Teil deutlich angestiegene Keimzahl ermittelt. Da die Ursache für diesen unwahrscheinlichen Effekt nicht der Probenvarianz zuzuschreiben war und die Werte demnach nicht mit Sicherheit zu Ausreißern erklärt werden durften, sollten sie als Ergebnis nicht einfach gestrichen werden. Allerdings wird für die Fälle, in denen ein sehr starker Keimzahlanstieg der letzten Untersuchung zu verzeichnen ist, zusätzlich der mittels der Regressionsgeraden berechnete Wert für den zwölften Lagerungsmonat angegeben, um eine realistischere Tendenz der Keimzahlreduktion darstellen zu können.

### 4.5.1 Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien und Laktobazillen

Für die Parameter mesophile aerobe Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Produktes „Porree, geschnitten“ sind die Reduktionen zwischen 1. und 12. Monat sowie die durchschnittliche monatliche Absterberate in Tabelle 17 aufgeführt. Der Gesamtverlauf ist in Abbildung 5 dargestellt. Die entsprechenden Daten für „Champignons in Scheiben“ enthalten Tabelle 18 und Abbildung 6.

Tabelle 17: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Porree, geschnitten"** nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,14±0,38	5,81±0,21	0,33±0,32	1
Aerobe Milchsäurebakterien	5,10±0,23	4,46±0,12	0,64±0,24***	1
Laktobazillen	4,26±0,33	3,73±0,30	0,53±0,38**	1

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,05)

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)

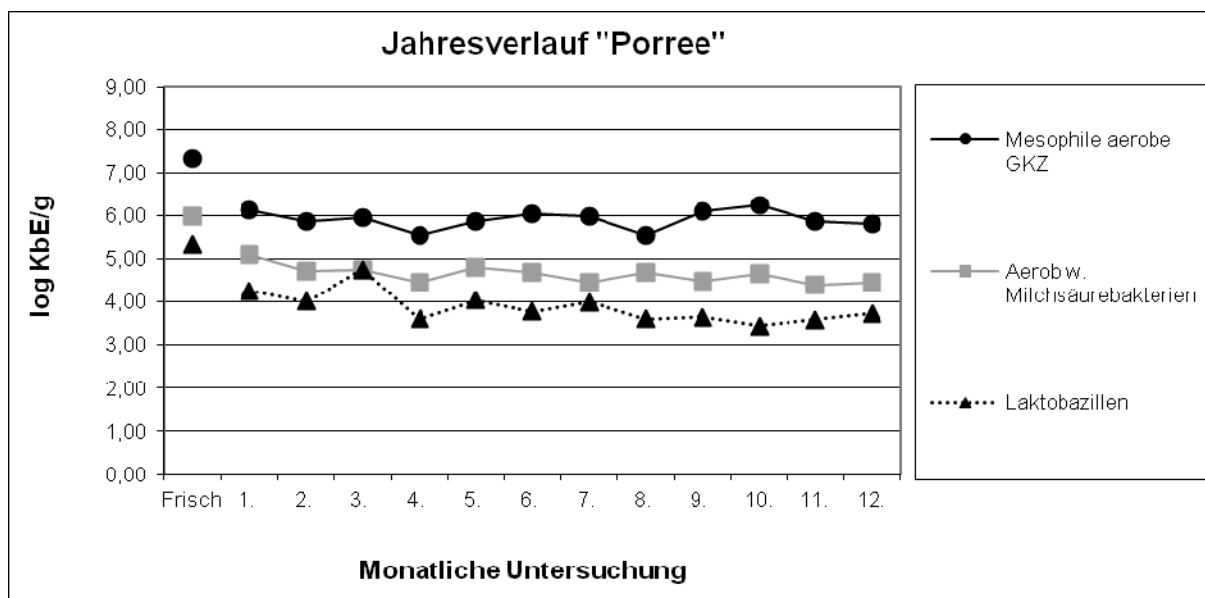


Abbildung 5: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses **"Porree, geschnitten"**

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 18: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Champignons in Scheiben"** nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1 Monat	12 Monate	Reduktion*	Absterberate (%)
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,08±0,22	5,64±0,32	0,44±0,49**	1
Aerobe Milchsäurebakterien	4,61±0,14	4,56±0,39	0,05±0,35	0
Laktobazillen	4,26±0,17	4,27±0,24	+0,01±0,28	0

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,05)

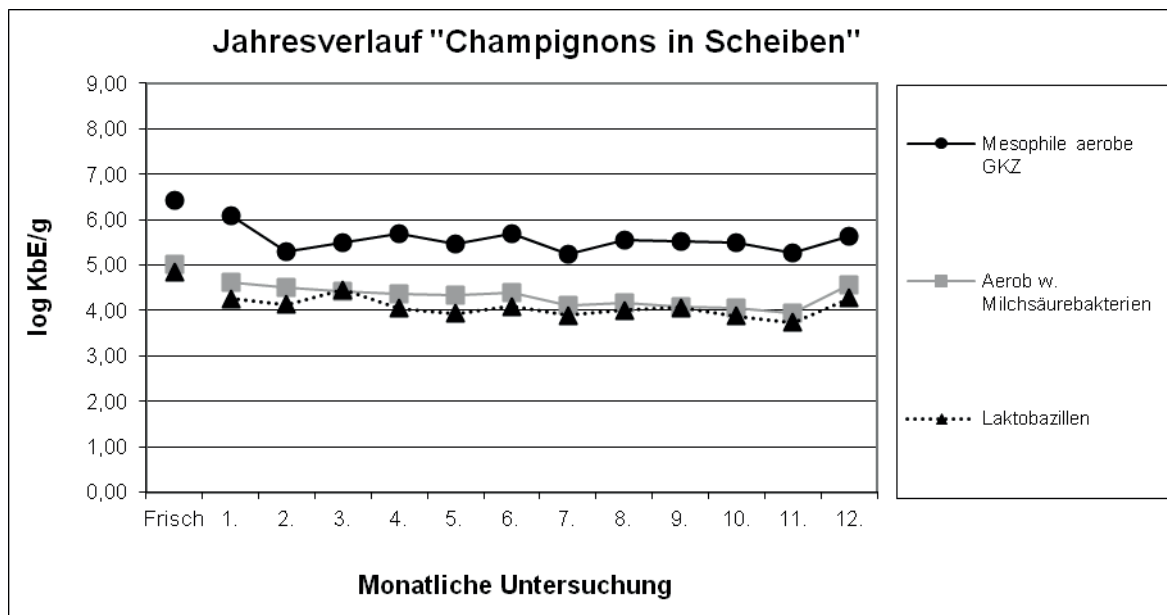


Abbildung 6: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses **"Champignons in Scheiben"**

Für „Champignons in Scheiben“ sind in Tabelle 19 die mittels der Regressionsgeraden (s. Tab. 55) berechneten, statt die im Versuch erhobenen Werte für den 12. Monat angegeben sowie die sich daraus ergebende Reduktion und Absterberate dargestellt.

Tabelle 19: Mikroorganismengehalt des Produktes „**Champignons in Scheiben**“ nach vierwöchiger Gefrierlagerung sowie anhand der Regressionsgeraden berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	Berechneter 12. Monat	Reduktion	Absterberate (%)
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,08±0,22	5,42	0,66***	1
Aerobe Milchsäurebakterien	4,61±0,14	4,10	0,51***	1
Laktobazillen	4,26±0,17	3,92	0,34***	1

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)



Tabellen 20 bzw. 21 sowie Abbildungen 7 und 8 zeigen die Entwicklungen der Gesamtkeimzahlen sowie der aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen für die TK-Gerichte „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ bzw. „Stroganoff-Pfanne“.

Tabelle 20: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"** nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/- Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1 Monat	12 Monate	Reduktion*	Absterberate (%)
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	5,79±0,35	4,95±0,29	0,84±0,48***	1
Aerobe Milchsäurebakterien	4,15±0,33	3,55±0,31	0,61±0,38**	1
Laktobazillen	3,91±0,42	3,19±0,63	0,72±0,72	2

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,05)

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)

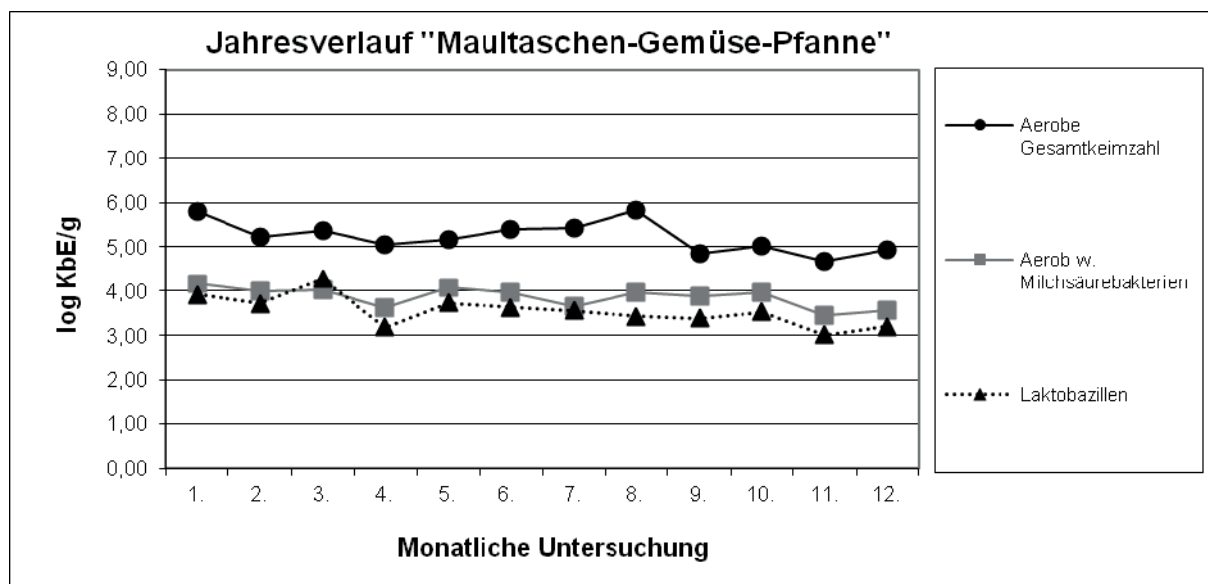


Abbildung 7: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"**

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 21: Mikroorganismengehalt des Produktes **"Stroganoff-Pfanne"** nach vierwöchiger sowie einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Mesophile aerobe Gesamtkeimzahl	6,23±0,27	5,42±0,24	0,81±0,32***	1
Aerobe Milchsäurebakterien	2,82±0,31	2,67±0,32	0,15±0,34	0
Laktobazillen	2,34±0,28	2,27±0,45	0,07±0,56	0

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)

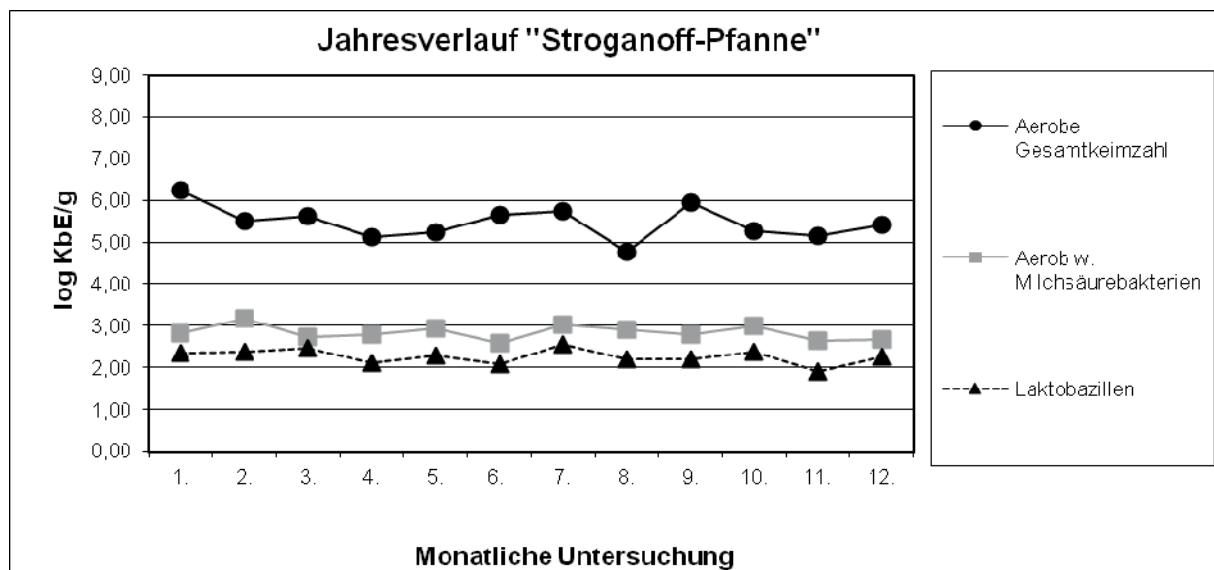


Abbildung 8: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses **"Stroganoff-Pfanne"**

Bei der Regressionsanalyse wurden für die Erzeugnisse „Porree, geschnitten“, „Champignons in Scheiben“ und „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ im Fall der Milchsäurebakterien und Laktobazillen signifikante Korrelationen ermittelt, wobei der Korrelationskoeffizient jedoch lediglich Werte bis 0,578 (mittlere Korrelation) aufweist. Die dazu erstellten Streudiagramme finden sich in den Abbildungen 35, 36, 38, 39, 43 und 44 des Anhangs (9.1.4).

Auf Grund der Auswertung werden außer im Produkt „Porree, geschnitten“ für die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl bei allen Erzeugnissen signifikante Keimzahlreduktionen ermittelt. Vor allem bei den „Champignons in Scheiben“ kommt es nach Ablauf des zweiten Lagerungsmonats zu einem deutlichen Absinken der Keimzahlen. Die durchschnittliche monatliche Absterberate beträgt in allen vier Erzeugnissen 1 %.

Darüber hinaus werden signifikante Reduktionen der Keimzahl für die aerob wachsenden Milchsäurebakterien in den Produkten „Porree, geschnitten“ und „Maultaschen-Gemüsepfanne“ sowie für die Laktobazillen im Produkt „Porree“ erreicht. In den zwei Erzeugnissen liegt die monatliche Absterberate der Milchsäurebakterien bei 1 %; das gleiche trifft auf die Laktobazillen zu. Ihre absolute Keimzahlreduktion über den Gesamtzeitraum beläuft sich auf  $0,53 \log_{10}$ , die der Milchsäurebakterien auf  $0,64 \log_{10}$  (Porree) bzw.  $0,61 \log_{10}$  (Maultaschen-Gemüse-Pfanne). Ähnliches wurde von KIM et al. (2009) beobachtet, als sie einen Abfall um  $0,75 \log_{10}$  KbE/g einer Milchsäurebakterienmischkultur bei Gefrierlagerung (bis  $-18^{\circ}\text{C}$ ) von Joghurt über 150 Tage registrierten.

Für die anderen beiden Produkte („Champignons in Scheiben“, „Stroganoff-Pfanne“) konnten anhand der ermittelten Werte keine signifikanten Keimzahlveränderungen der aeroben Milchsäurebildner und Laktobazillen festgestellt werden, allerdings kam es im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ für alle Keimgruppen zu einem deutlichen Anstieg in der letzten Untersuchung, der die Regressionsanalyse deutlich beeinflusste. Wird dieses Resultat eliminiert und durch eine mathematisch simulierte Zahl ersetzt, ergeben sich für Milchsäurebakterien und Laktobazillen nunmehr signifikante Keimzahlreduktionen ( $0,51$  bzw.  $0,34 \log_{10}$  KbE/g), und ihre monatliche Absterberate liegt bei 1 %.

Im Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ zeigt sich eine höhere Gefrierresistenz dieser beiden Parameter, deren Werte während der einjährigen Gefrierlagerung nahezu unverändert bleiben und zu einer monatlichen Absterberate von 0 % führen.

Die Ergebnisse bestätigen die Aussagen, dass Milchsäurebakterien sich im Allgemeinen als relativ resistent gegenüber dem Einwirken sehr niedriger Temperaturen erweisen (TSEN et al. 2007). Ein Grund dürfte die Anwesenheit von Mucoproteinkomplexen und Diaminopimelinsäure in den Zellwänden der grampositiven Keime sein, welche die Membranproteine gegen Denaturation schützen. So besitzen vor allem einige *Micrococcus*-, *Staphylococcus*- und *Streptococcus* spp. eine hohe Widerstandsfähigkeit (SPECK und RAY 1977), und grampositive Kokken sollen sich resistenter darstellen als grampositive Stäbchen (SINGHAL und KULKARNI 2000). Beobachtungen über keine oder nur sehr geringe Verringerung von Milchsäurebakterien- und Laktobazillenzellzahl während der Gefrierlagerung von bis zu zwölf Monaten in verschiedenen Lebensmitteln (Fisch, Käse, Sojadessert) sind in der Literatur häufiger zu finden (AL-HARBI und UDDIN 2005, HEENAN et al. 2004, LOPEZ et al. 1998, PRADOS et al. 2006). Auch HALL (1969) stellte in Studien mit

## Ergebnisse und Diskussion

---

gefrorenen Erbsen bei einer Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  sowie  $-29^{\circ}\text{C}$  über ein Jahr kein Absinken der Zellzahlen von *L. mesenteroides* fest. Darüber hinaus berichteten HEKMAT und MCMAHON (1992) sowie TSVETKOV und SHISHKOVA (1982) über bessere Überlebensfähigkeiten von Milchsäurebakterien wie *B. bifidum*, *S. lactis* und *S. thermophilus* im Vergleich zu *Lactobacillus* spp.. In den hier durchgeführten Untersuchungen lässt sich keine verminderte Gefrierresistenz der *Lactobacillus* spp. gegenüber anderen Milchsäurebakterien beobachten. Bei den zwei Rohgemüseerzeugnissen sowie dem Fertiggericht „Stroganoff-Pfanne“ weisen die Laktobazillen sogar eine geringfügig niedrigere Keimzahlreduktion auf als die aeroben Milchsäurebakterien; im Produkt „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ liegt diese unwesentlich höher. Alle hier ermittelten Absterberaten der Gesamtkeimzahl und der grampositiven Keime unterschreiten die von der ICMSF angegebene durchschnittliche Absterbequote (bei Temperaturen von  $-20^{\circ}\text{C}$ ) von 5 % monatlich (KRÄMER 2007).

Die hohe Überlebensrate ist allerdings außer von Mikroorganismenspezies und Lebensmittel auch vom schnellen Gefrierprozess und einer konstanten Lagertemperatur abhängig. So resultieren die geringen Absterberaten der hier erfassten grampositiven Keime wahrscheinlich auch aus dem industriellen Schockgefrierverfahren. Die Kontaktzeit des empfindlichen Organismus mit den schädlichen hohen Konzentrationen der gelösten Stoffe im ungefrorenen Wasser ist dabei kurz und es kommt zu einer gleichmäßigen Bildung von kleinen Eiskristallen (SINGAHL und KULKARNI 2000). Die konstante Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  trägt ebenfalls zu einer höheren Überlebensrate bei; schwankende Lagertemperaturen würden zu verstärktem Absterben der Mikroorganismen führen (ICMSF 1980 a, OLIVEIRA et al. 2009).

## 4.5.2 Enterobakteriazeen, coliforme Keime incl. *E. coli* sowie Enterokokken<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Der Keimzahlverlauf der Mikroorganismengattung *Enterococcus*, welche den grampositiven Keimen zuzuordnen ist, soll aufgrund ihrer Eigenschaft als Indikatorkeim gemeinsam mit den gramnegativen, coliformen Keimen abgehandelt werden.

Für die beiden getesteten Erzeugnisse „Porree, geschnitten“ und „Champignons in Scheiben“ enthalten Tabelle 22 bzw. 23 und Abbildung 9 bzw. 10 die entsprechenden Daten für die Keimzahlreduktion sowie die Absterberaten.

Tabelle 22: Mikroorganismengehalt im Produkt "**Porree, geschnitten**" nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Pseudomonaden	5,36±0,16	5,14±0,56	0,22±0,45	0
Enterobakteriazeen	4,59±0,14	3,85±0,47	0,74±0,38**	2
Coliforme Keime	3,75±0,18	2,26±0,13	1,49±0,28***	5

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,05)

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)

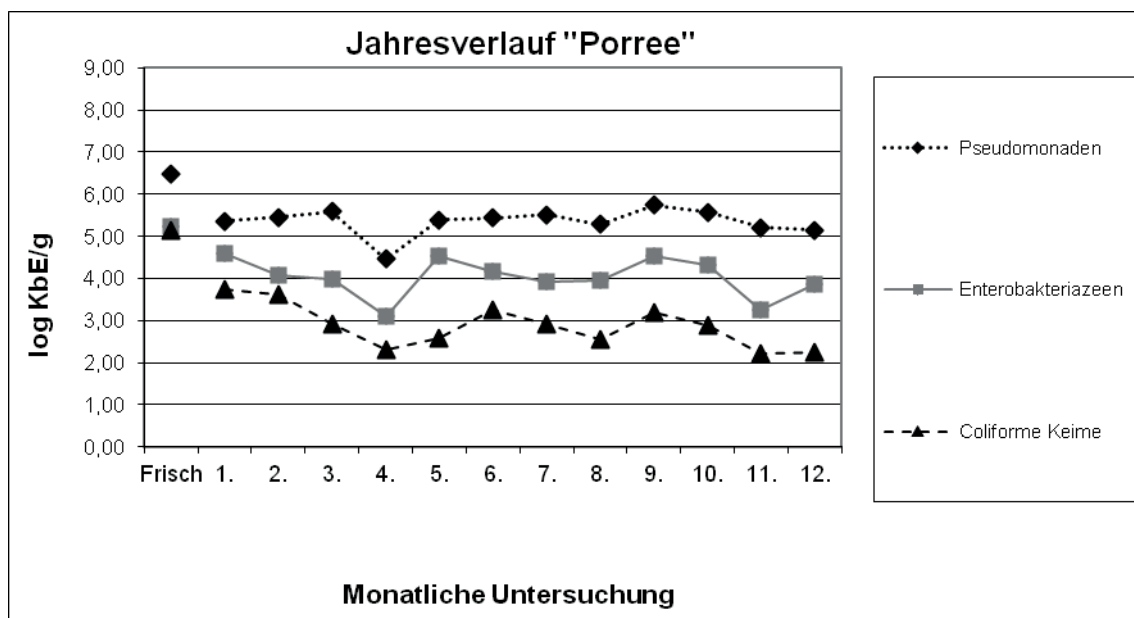


Abbildung 9: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keime des Erzeugnisses "**Porree, geschnitten**"

## Ergebnisse und Diskussion

Bei der Gruppe der Enterobakteriäzen ist ein deutlicher Anstieg der Keimzahl in der letzten Untersuchung zu verzeichnen. Da sich bei Berechnung des 12. Wertes mittels der Regressionsgeraden (Tab. 54) und Verwendung dieser Zahl statt der nachgewiesenen keine Veränderungen der Absterberate ergeben, wird auf eine tabellarische Darstellung verzichtet.

Tabelle 23: Mikroorganismengehalt im Produkt "**Champignons in Scheiben**" nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte $\pm$ -Standardabweichung  $\log_{10}$  KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Pseudomonaden	5,82 $\pm$ 0,38	5,54 $\pm$ 0,10	0,28 $\pm$ 0,41	0
Enterobakteriäzen	4,38 $\pm$ 0,21	3,46 $\pm$ 0,44	0,92 $\pm$ 0,35***	2
Coliforme Keime	4,01 $\pm$ 0,30	2,60 $\pm$ 0,18	1,41 $\pm$ 0,26***	4
<i>Escherichia coli</i>	0,76 $\pm$ 0,13	0,76 $\pm$ 0,13	0,00 $\pm$ 0,21	0

\*Die Reduktion stellt die Differenz ( $\log_{10}$  KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats ( $p \leq 0,01$ )

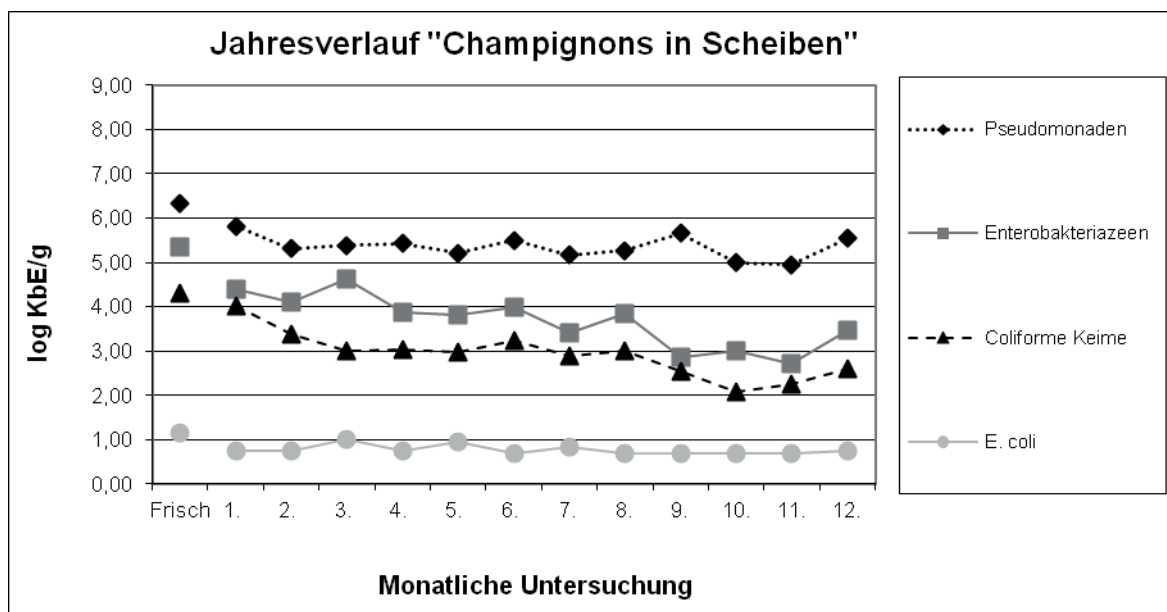


Abbildung 10: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriäzen, coliformen Keime und *E. coli* des Erzeugnisses "**Champignons in Scheiben**"

Aufgrund der deutlich angestiegenen Keimzahlen von Pseudomonaden, Enterobakteriäzen und coliformen Keimen in der letzten Untersuchung (12. Monat) erfolgte zusätzlich eine Berechnung dieser Werte anhand der Regressionsfunktionen (s. Tab. 55). Diese geschätzten Daten sind in Tab. 24 aufgeführt sowie die sich daraus ergebende Reduktion und Absterberate.

Tabelle 24: Mikroorganismengehalt des Produktes „**Champignons in Scheiben**“ nach vierwöchiger Gefrierlagerung, anhand der Regressionsgeraden berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung  $\log_{10}$  KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	Berechneter 12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Pseudomonaden	5,82±0,38	5,20	0,62***	1
Enterobakteriazeen	4,38±0,21	2,91	1,47***	4
Coliforme Keime	4,01±0,30	2,24	1,77***	5

\*Die Reduktion stellt die Differenz ( $\log_{10}$  KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats ( $p \leq 0,01$ )

Für den Enterobakteriazeengehalt sowie die Dichte an coliformen Keimen werden die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse bei dem Produkt „Champignons in Scheiben“ in den Abbildungen 11 bzw. 12 dargestellt. Für das Rohgemüseerzeugnis „Porree, geschnitten“ wurde im Fall der coliformen Keime eine signifikante Korrelation ermittelt, wobei der Korrelationskoeffizient jedoch lediglich einen Wert von 0,432 (mittlere Korrelation) aufweist. Das dazugehörige Streudiagramm findet sich in Abbildung 37 des Anhangs (9.1.4)

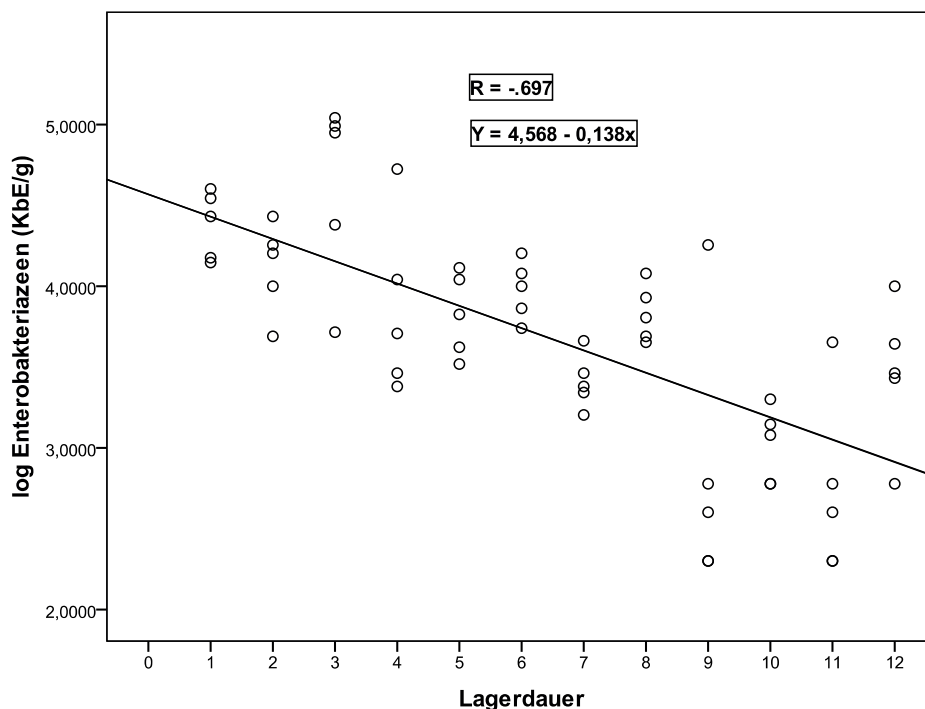


Abbildung 11: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung im Produkt „**Champignons in Scheiben**“

# Ergebnisse und Diskussion

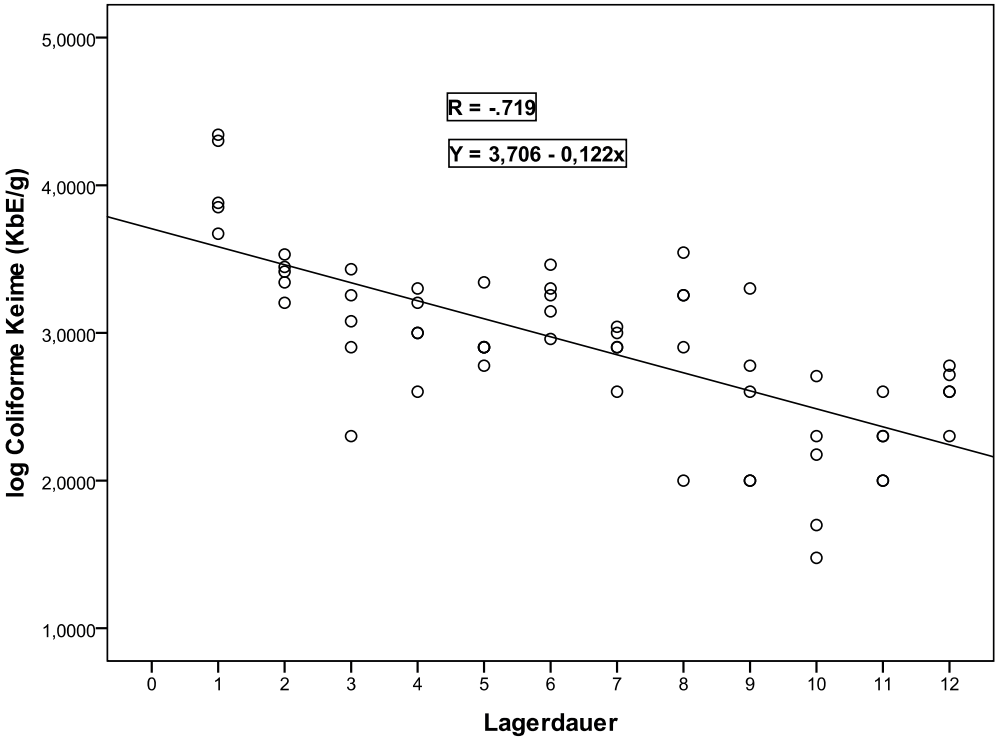


Abbildung 12: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt "Champignons in Scheiben"



Nach den gleichen Prinzipien wie für die TK-Rohgemüse sind die Keimzahlreduktionen und Absterberaten für die „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und die „Stroganoff-Pfanne“ tabellarisch (Tabelle 25 und 27) sowie graphisch (Abbildungen 13 und 15) dargestellt. Die Ergebnisse der zugehörigen Regressionsanalyse finden sich in Abbildung 14 und 16.

Tabelle 25: Mikroorganismengehalt im Erzeugnis **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"** nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung  $\log_{10}$  KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Pseudomonaden	4,64±1,49	4,72±0,55	+0,08±1,54	0
Enterokokken	2,06±0,13	0,88±0,27	1,18±0,34***	7
Enterobakteriaceen	3,68±0,59	2,48±0,42	1,20±0,82***	4
Coliforme Keime	2,18±0,16	0,88±0,16	1,30±0,21***	8

\*Die Reduktion stellt die Differenz ( $\log_{10}$  KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats ( $p \leq 0,01$ )

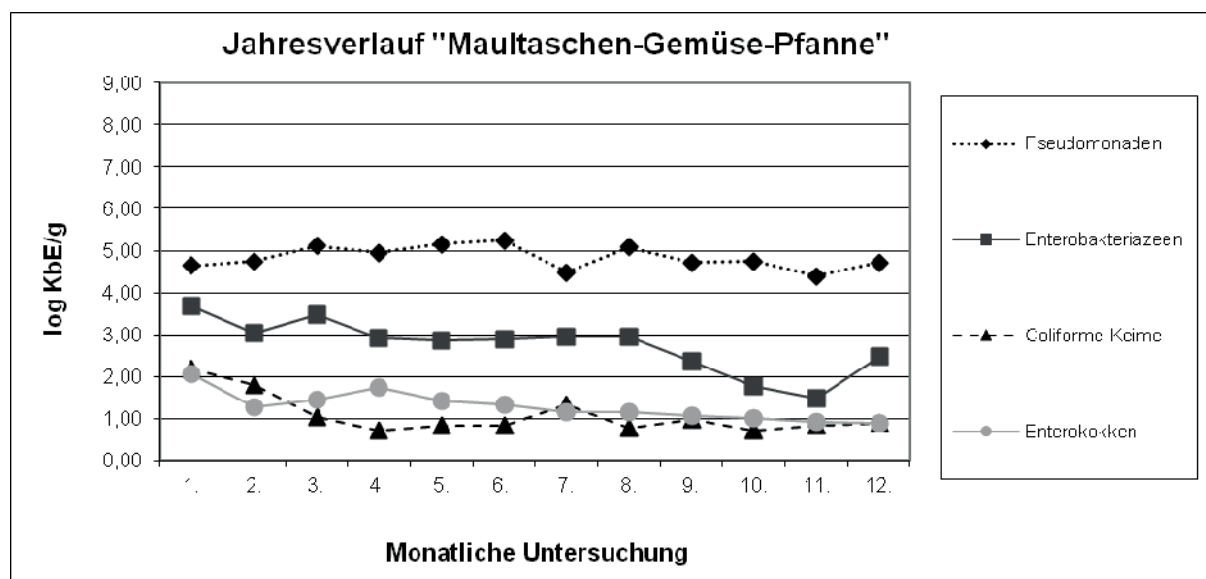


Abbildung 13: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriaceen, coliformen Keime und Enterokokken des Erzeugnisses **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"**

Es sei noch einmal betont, dass aufgrund technologischer Gegebenheiten bei den zwei TK-Fertiggerichten keine Untersuchung des Erzeugnisses im frischen, ungefrorenen Zustand erfolgen konnte, da für die Herstellung bereits tiefgefrorene Ausgangsmaterialien verwendet werden.

## Ergebnisse und Diskussion

Anhand der Regressionsgeraden (s. Tab. 56) erfolgte bei der „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ eine Berechnung der Keimzahl der Enterobakteriazeen für den 12. Monat. Die Werte sind in Tabelle 26 dargestellt, sowie die sich daraus ergebende Reduktion und Absterberate.

Tabelle 26: Enterobakteriazeengehalt im Produkt „**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**“, berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung  $\log_{10}$  KbE/g) und Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	Berechneter 12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Enterobakteriazeen	3,68 $\pm$ 0,59	1,93	1,75***	6

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats ( $p \leq 0,01$ )

Für den Enterobakteriazeengehalt finden sich die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse bei den zwei TK-Fertiggerichten in den Abbildungen 14 bzw. 16. Für die „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ wurde im Fall der coliformen Keime und Enterokokken und für die „Stroganoff-Pfanne“ im Fall der coliformen Keime ebenfalls eine signifikante Korrelation ermittelt, wobei der Korrelationskoeffizient jedoch lediglich Werte von bis zu 0,518 (mittlere Korrelation) aufweist. Die dazugehörigen Streudiagramme enthalten die Abbildungen 40, 41 und 45 des Anhangs (9.1.4).

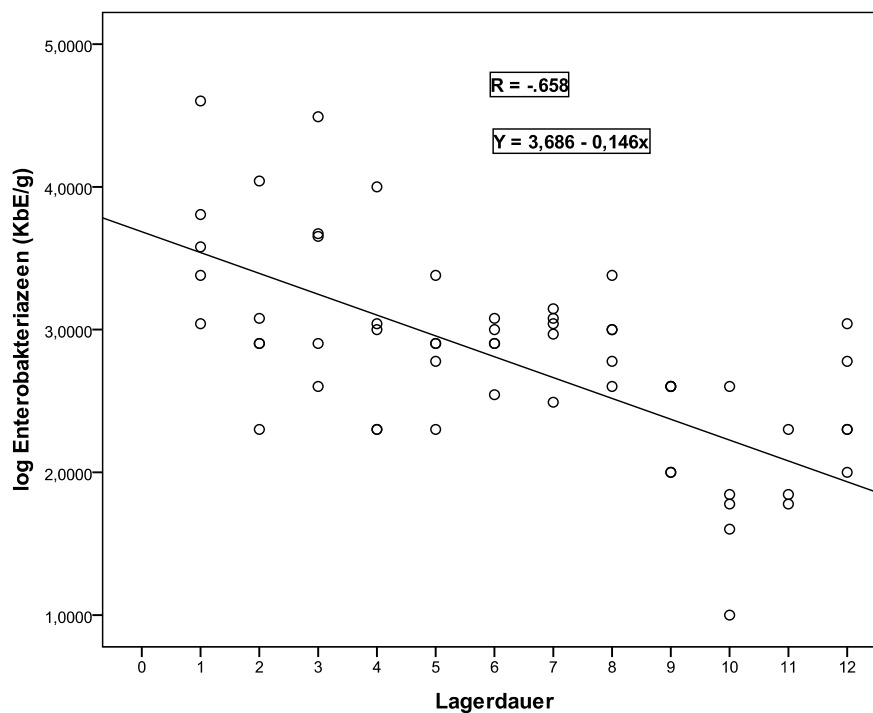


Abbildung 14: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt "**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**"

Tabelle 27: Mikroorganismengehalt im Erzeugnis "**Stroganoff-Pfanne**" nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion(n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Pseudomonaden	5,54±0,49	4,90±0,69	0,64±0,74	1
Enterobakteriazeen	4,13±0,22	1,02±0,41	3,11±0,55***	12
Coliforme Keime	2,00±0,00	0,70±0,00	1,30±0,00***	9

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,01)

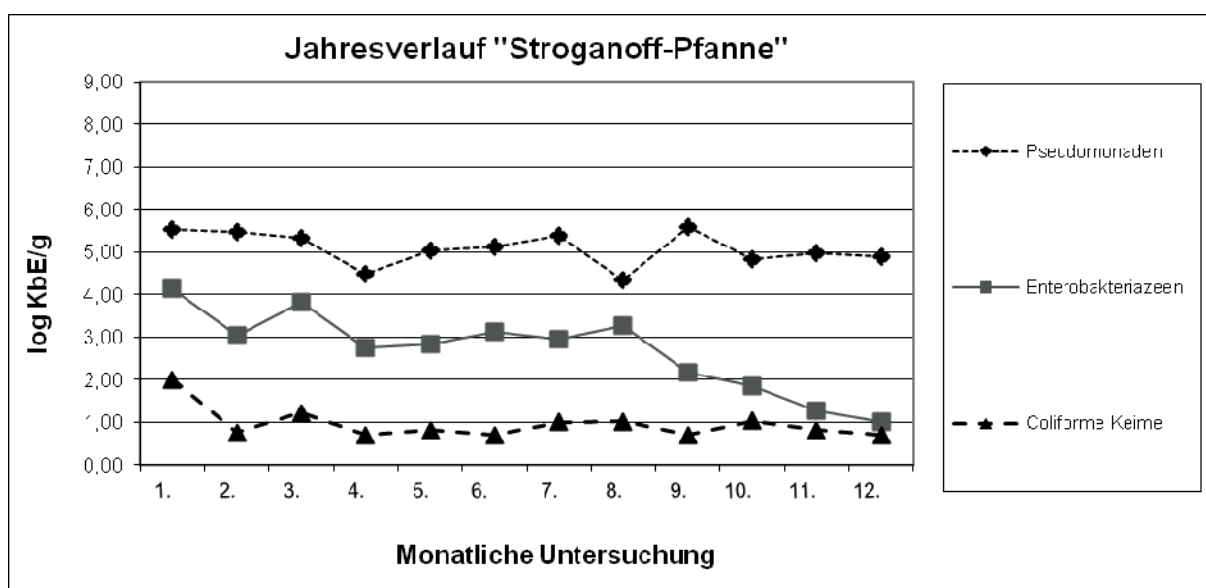


Abbildung 15: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keime des Erzeugnisses "**Stroganoff-Pfanne**"

## Ergebnisse und Diskussion

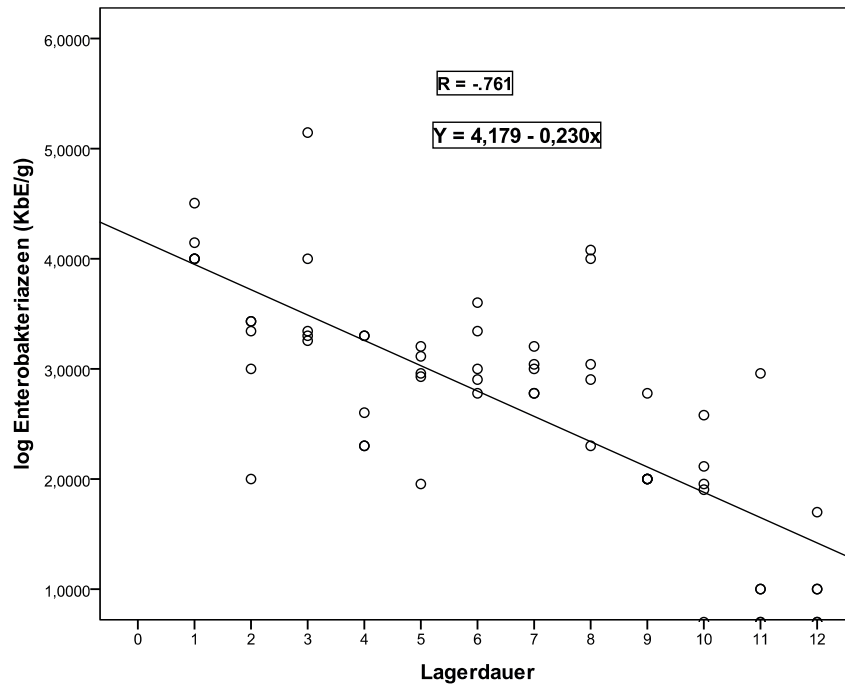


Abbildung 16: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt "Stroganoff-Pfanne"

In allen vier untersuchten Erzeugnissen lassen sich sowohl für die Enterobakteriazeen als auch für die coliformen Keime signifikante Reduktionen der Keimzahlen feststellen.

Für die coliformen Keime kann in sämtlichen Produkten eine ähnlich hohe Verringerung ermittelt werden, welche zwischen 1,30 (Tiefkühlfertiggerichte) und 1,49  $\log_{10}$  KbE/g („Porree, geschnitten“) liegt. Die monatliche Absterberate reicht von 4 % („Champignons in Scheiben“) bis 9 % („Stroganoff-Pfanne“). Wird für das Produkt „Champignons in Scheiben“ der neu berechnete Erwartungswert für den 12. Untersuchungsmonat eingesetzt, ergibt sich sogar eine Absterberate von 5 % und eine Keimzahlreduktion von 1,77  $\log_{10}$  KbE/g.

Die Enterobakteriazeen fallen außer im Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ etwas langsamer in ihrer Keimzahl ab, und ihre Absterberaten liegen zwischen 2 % und 4 %. Allerdings würde im Produkt „Champignons in Scheiben“ bei Verwendung des berechneten 12. Wertes die Absterberate der Enterobakteriazeen von 2 auf 4 % steigen. Der geringste Abfall der Enterobakteriazeenzahlen findet im Produkt „Porree“ statt (0,74  $\log_{10}$ ), die stärkste Reduktion (3,11  $\log_{10}$ ) ist mit einer durchschnittlichen monatlichen Absterberate von 12 % in dem Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ zu verzeichnen.

Enterobakteriazeen und vor allem coliforme Keime werden in der Literatur als gefrierempfindlich beschrieben, allerdings variiert die Letalitätsrate auch hier mit den Einflussfaktoren (LUND 2000). So konnten Zellen von *S. flexneri* sowie *S. sonnei* in magerem Rindfleisch bei  $-16^{\circ}\text{C}$  Lagertemperatur noch nach 360 Tagen isoliert werden (STELZNER und URBACH 1969), während diese Spezies in Shrimps und Eiscreme im Verlauf einer Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  maximal 60 Tage überlebte (RUTSCH 1987). Ebenfalls gefrierempfindlicher verhielt

sich *Serratia (S.) liquefaciens*, so dass der Keim im Darm frischer Hybrid-Tilapia nach sechsmonatiger Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nicht mehr nachweisbar war (AL-HARBI und UDDIN 2005). Im Gegensatz dazu wurden Zellen von *Enterobacter (E.) cloacae* durch Aufbewahren von kontaminiertem Vanilleeis bei  $-28^{\circ}\text{C}$  über 35 Monate nur gering reduziert (MARCY und ADAM 1979).

Im Produkt „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ fallen die Enterokokken um  $1,18 \pm 0,34 \log_{10}$  KbE/g ab; die prozentuale Absterberate liegt bei 7 %. Enterokokken gelten aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu den grampositiven Kokken als relativ gefrierresistent (SINGHAL und KULKARNI 2000), und verschiedene Autoren ermittelten eine hohe Widerstandsfähigkeit speziell bei *Enterococcus* spp. (ICMSF 1980 a). Im vorliegenden Material zeigen sich zwischen der Reduktion von coliformen Keimen, welche in diesem Produkt  $1,30 \log_{10}$  beträgt mit einer Absterberate von 8 %, und dem Verhalten der Enterokokken nur minimale Unterschiede, wobei sich die Enterokokken geringfügig gefrierresistenter darstellen.

Die Keimreduktion von *E. coli* im Produkt „Champignons in Scheiben“ muss kritisch interpretiert werden, da nach Gefrieren und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung nur noch sehr geringe Zahlen gerade oberhalb der Nachweisgrenze vorliegen. Ab dem achten bis einschließlich dem elften Untersuchungsmonat ist *E. coli* nicht mehr nachweisbar. Lediglich im letzten Monat werden erneut Zellzahlen gerade oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt, was allerdings mit der unterschiedlichen Keimverteilung innerhalb der verschiedenen Fertigpackungen in Zusammenhang steht. Rechnerisch ergäbe sich bei alleiniger Betrachtung der Werte der ersten und letzten Untersuchung des tiefgefrorenen Produktes für *E. coli* eine Keimzahlreduktion von  $0,00 \log_{10}$  und eine durchschnittliche Absterberate von 0 %. Anhand des Verlaufs der Werte über alle Untersuchungszeitpunkte wird jedoch deutlich, dass die Zellen von *E. coli* eine geringe Gefrierresistenz besitzen und nach ca. sechs Monaten nahezu vollständig absterben. Ebenfalls einen deutlicheren Abfall einer *E. coli*-Population um  $2,37 \log_{10}$  beobachtete FOSCHINO (2002) nach nur achtwöchiger Lagerung in Speiseeis bei  $-22^{\circ}\text{C}$  sowie ANSAY et al. (1999) während Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über ein Jahr. Dort kam es zu einer Reduktion um 1 bis  $2 \log_{10}$ . AL-HARBI und UDDIN (2005) konnten den Keim nach einjähriger Gefrierlagerung nicht mehr nachweisen. Allerdings existieren ebenfalls Literaturangaben über eine hohe Überlebensfähigkeit des Bakteriums bei Gefrierlagerung (AL-HARBI und UDDIN 2005, DOYLE und SCHOENI 1984, GUNDERSON und ROSE 1948, HARTSELL 1949, MARCY und ADAM 1979, STRAWN und DANYLUK 2010).

Anhand der eigenen Ergebnisse lässt sich eindeutig erkennen, dass die Enterobakteriaceen, coliformen Keime und *E. coli* bei Gefrierlagerung deutlicher als andere Mikroorganismen in ihrer Anzahl reduziert werden. Dies entspricht den Angaben der Literatur, nach denen gramnegative Bakterien meist empfindlicher reagieren (ICMSF 1980 a) und besonders die coliformen Keime als sehr sensibel gegenüber Gefrieren und Gefrierlagerung beschrieben

## Ergebnisse und Diskussion

---

werden (LARKIN et al. 1955 b). Die höhere Empfindlichkeit kann auf einer Denaturierung der Zellwand-Lipoproteine beruhen (SCHMIDT-LORENZ 1974). Die von der ICMSF (KRÄMER 2007) angegebene monatliche Verringerung der Keimzahl von ca. 5 % während Gefrierlagerung bei -20°C wird von den coliformen Keimen in allen Produkten erreicht bzw. überschritten; dies trifft auch auf die Enterokokken im Erzeugnis „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ zu. Im Gericht „Stroganoff-Pfanne“ erreicht die Absterberate der Enterobakteriäzen mit 12 % sogar einen deutlich höheren Wert.

Negative Beziehungen zwischen Keimgehalt und Lagerzeit lassen sich bei der Regressionsanalyse in allen vier Produkten für die coliformen Keime beobachten, wobei der Korrelationskoeffizient von -0,390 („Stroganoff-Pfanne“) bis -0,719 („Champignons in Scheiben“) reicht, aber lediglich im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ auf einen bereits signifikanten Zusammenhang hinweist (Abb.12). Für die Enterobakteriäzen kann in drei Erzeugnissen eine signifikante Beziehung mit Korrelationskoeffizienten zwischen -0,658 und -0,761 nachgewiesen werden (Abb. 11, 14, 16). Im Produkt „Porree“ besteht dagegen keine signifikante Beziehung für diese Mikroorganismengruppe. Für die Enterokokken ist im Erzeugnis „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang erkennbar, wobei der Korrelationskoeffizient bei -0,518 liegt (Abb. 41).

FRIES und EGGERDING (1997) beobachteten ebenfalls differierende Einflüsse der Lagerdauer auf die Keimzahlen. In ihren Versuchen erreichten sie vor allem für *E. coli* hohe Werte für das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) bei Annahme einer linearen Beziehung, während der Anteil der grampositiven Keime nicht immer eine Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit erkennen ließ. Die Autoren erklärten höhere  $R^2$ -Werte in den Versuchsgruppen, welche in Bouillon eingefroren wurden, mit mangelnden Inhaltsstoffen und zu wenig Nährstoffen für die Mikroorganismen. Niedrigere  $R^2$ -Werte erreichten sie in den Versuchsgruppen, welche in Fleisch eingefroren wurden. Dies führten sie auf den Schutz der proteinreichen Matrix zurück, welche das Absinken der Keimzahlen verhinderte.

### 4.5.3 Pseudomonaden

Die Ergebnisse der Rohgemüseprodukte finden sich zusammen mit den bereits besprochenen Daten für Enterobakteriazeen und coliforme Keime in den Tabellen 22 und 23 sowie den Abbildungen 9 und 10. In gleicher Weise sind die Resultate der Tiefkühlgerichte in den Tabellen 25 und 27 sowie den Abbildungen 13 und 15 aufbereitet.

Anhand der ermittelten Keimzahlen besteht für die Pseudomonaden in allen Tiefkühlprodukten keine signifikante Reduktion. Bei Betrachtung des neu berechneten Wertes für den 12. Lagerungsmonat im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ käme es allerdings zu einer signifikanten Verminderung, und die Absterberate würde 1 % betragen. Im Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ liegt diese ebenfalls bei 1 %. In den anderen beiden Erzeugnissen („Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und „Porree, geschnitten“) zeichnet sich ein sehr geringes Absinken der Pseudomonadenzahl ab, welches mit 0 % schwächer ausfällt als bei den grampositiven Keime in diesen Produkten.

Aufgrund der Resultate kann für Pseudomonaden die allgemein unterstellte schlechtere Überlebensfähigkeit gramnegativer Keime gegenüber grampositiven bei Gefrierlagerung (BANWART 1989, BURTON 1949 a, BROWN und HILL 1984, ICMSF 1980 a, LUND 2000, SCHMIDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968, SCHMIDT-LORENZ 1970, SINGHAL und KULKARNI 2000) nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Im Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ und bei Betrachtung des neu berechneten Wertes für den 12. Monat in „Champignons in Scheiben“ werden zwar höhere Keimzahlverringernungen ( $0,64 \log_{10}$  bzw.  $0,62 \log_{10}$  KbE/g) bei einjähriger Lagerung sichtbar, die allerdings immer noch unter den überwiegend in der Literatur zu findenden Angaben für diese Mikroorganismengattung liegen.

Die meisten Autoren beschreiben eine deutliche Gefrierempfindlichkeit von *Pseudomonas* spp. (AL-HARBI und UDDIN 2005, OLIVEIRA et al. 2009). Dagegen überlebte die Spezies *P. putrefaciens* eine Lagerung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  in Fisch, Austern, Muscheln und Shrimps über 210 Tage (LHUILLIER et al. 1977). Die psychrotrophen Spezies *P. fluorescens* und *P. putida* wurden u.a. in den hier untersuchten Lebensmitteln identifiziert. Des Weiteren fanden sich nach einjähriger Aufbewahrung bei  $-24^{\circ}\text{C}$  auch die Spezies *P. diminuta* (*Brevundimonas diminuta*) und *P. stutzeri*, welche nicht zu den psychrotrophen Arten zählen. Neben Psychrotrophie muss es demnach auch andere Eigenschaften geben, die zu einem besseren Überleben bei Gefriertemperaturen führen. So beobachtete HALL (1969) in seinen Versuchen mit 24-monatiger Gefrierlagerung von Erbsen bei  $-18^{\circ}\text{C}$  und  $-29^{\circ}\text{C}$  für eine mesophile *Pseudomonas* sp. deutlich höhere Überlebensraten als für die psychrotrophe Art. Ebenso wie auf die grampositiven Keime scheinen sich auch hier die genannten Einflussfaktoren wie industrielle Schockgefrierverfahren und die konstante Lagertemperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  positiv auf

## Ergebnisse und Diskussion

---

das Überleben der Mikroorganismen auszuwirken; bei schwankenden Lagertemperaturen waren Zellen von *P. aeruginosa* nach nur zehn Tagen abgestorben (OLIVEIRA et al. 2009).

Bei den während der einjährigen Tiefgefrierlagerung ermittelten Keimzahlen kommt es nach den Ergebnissen der Regressionsanalyse bei keinem Produkt zu einer signifikanten Beziehung zwischen Lagerdauer und Pseudomonadengehalt. Lediglich nach der Neuberechnung der Werte des 12. Lagerungsmonats im Produkt „Champignons in Scheiben“ ist eine signifikante Korrelation zu erkennen (Tabelle 55), wobei die Höhe des Korrelationskoeffizienten jedoch nur auf einen schwachen Zusammenhang hindeutet.



### 4.5.4 Hefen und Schimmelpilze

Die Reduktion zwischen 1. und 12. Lagerungsmonat sowie die prozentualen Absterberaten bei den vier TK-Produkten sind für die Hefen und Schimmelpilze in den Tabellen 28, 29, 30 und 31 angegeben. Die graphischen Darstellungen der zugehörigen Jahresverläufe enthalten die Abbildungen 17, 18, 19 und 20.

Tabelle 28: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis **"Porree, geschnitten"** nach vierwöchiger sowie einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/- Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Hefen	0,98±0,62	0,82±0,16	0,16±0,70	2
Schimmelpilze	1,06±0,39	1,04±0,28	0,02±0,51	0

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

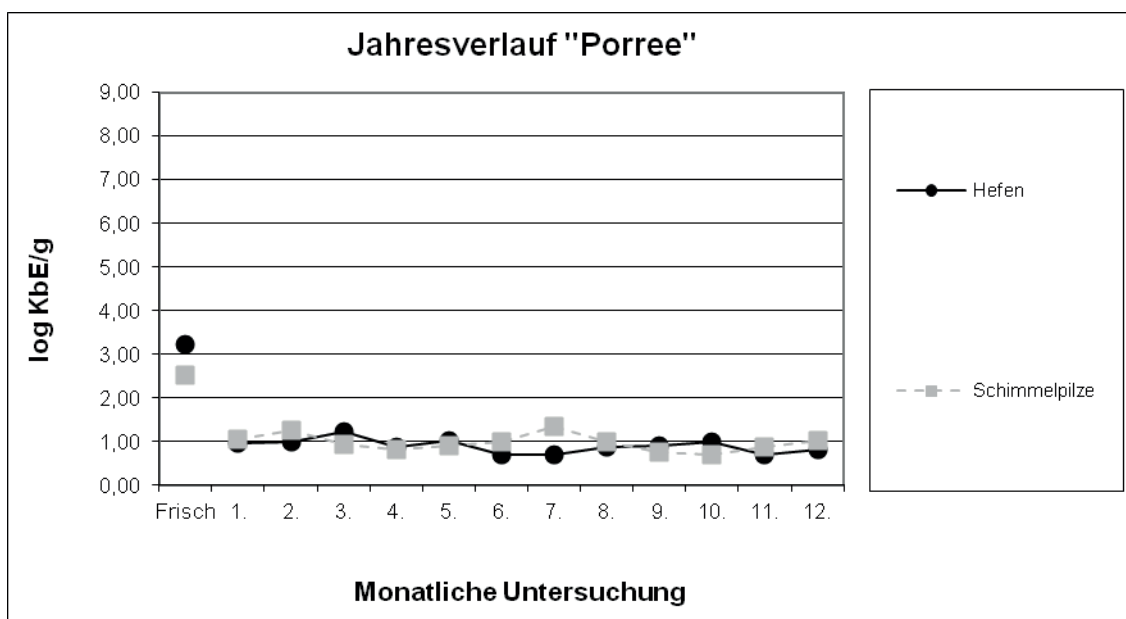


Abbildung 17: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses **"Porree, geschnitten"**

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 29: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis "**Champignons in Scheiben**" nach vierwöchiger sowie nach einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/- Standardabweichung  $\log_{10}$  KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Hefen	2,10±0,23	2,51±0,41	+0,41±0,51	+2
Schimmelpilze	0,88±0,40	1,80±0,21	+0,92±0,50	+7

\*Die Reduktion stellt die Differenz ( $\log_{10}$  KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

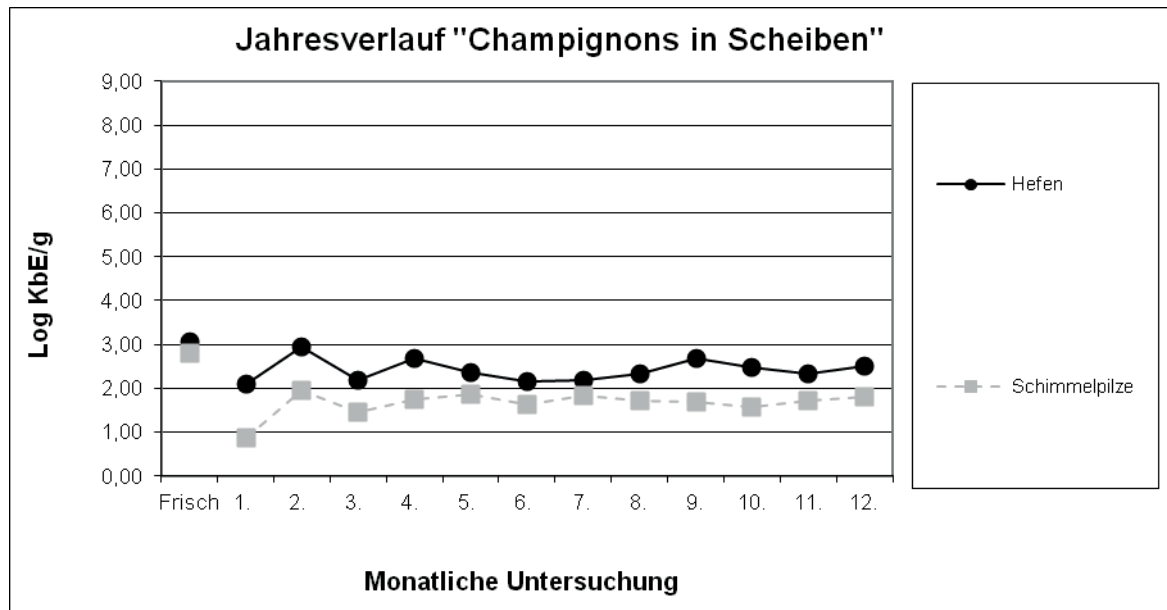


Abbildung 18: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses "**Champignons in Scheiben**"

Tabelle 30: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"** nach vierwöchiger sowie nach einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/- Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Hefen	1,22±0,30	0,94±0,25	0,28±0,17	2
Schimmelpilze	0,76±0,13	0,98±0,32	+0,22±0,40	+2

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) zwischen 1. und 12. Monat dar

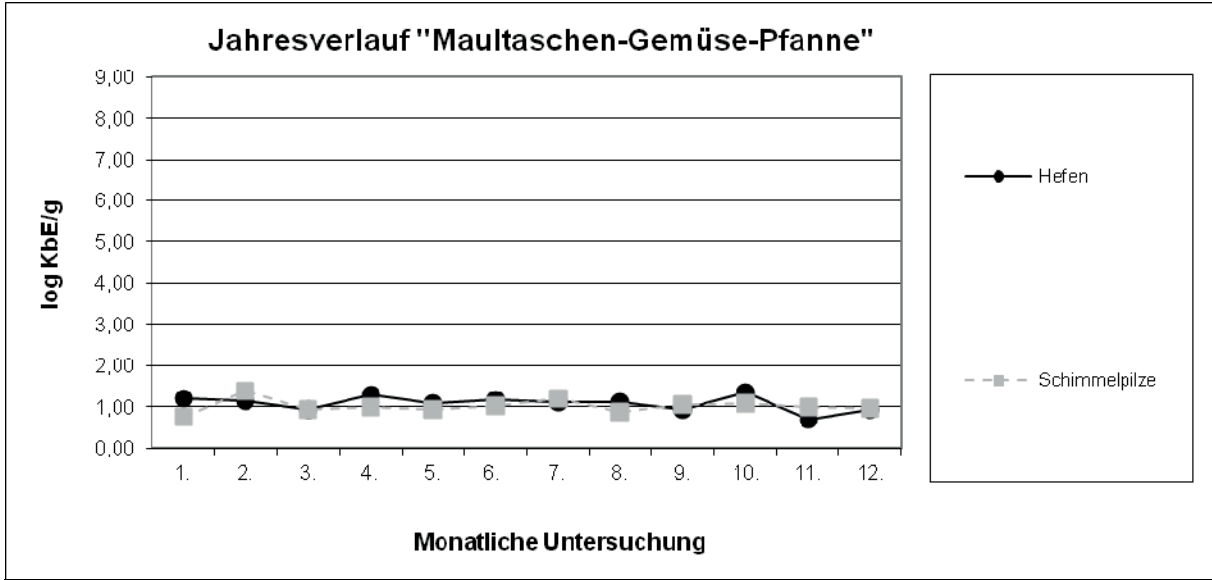


Abbildung 19: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses **"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"**

## Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 31: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis **"Stroganoff-Pfanne"** nach vierwöchiger sowie einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/- Standardabweichung log<sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%)

Zielkeime	1. Monat	12. Monat	Reduktion*	Absterberate (%)
Hefen	1,39±0,43	0,82±0,27	0,57±0,53**	5
Schimmelpilze	1,06±0,25	0,91±0,34	0,15±0,37	1

\*Die Reduktion stellt die Differenz (log<sub>10</sub> KbE/g) der Keimzahlen zwischen 1. und 12. Monat dar

\*\*Signifikanter Unterschied zu der Keimzahl des ersten Monats (p≤0,05)

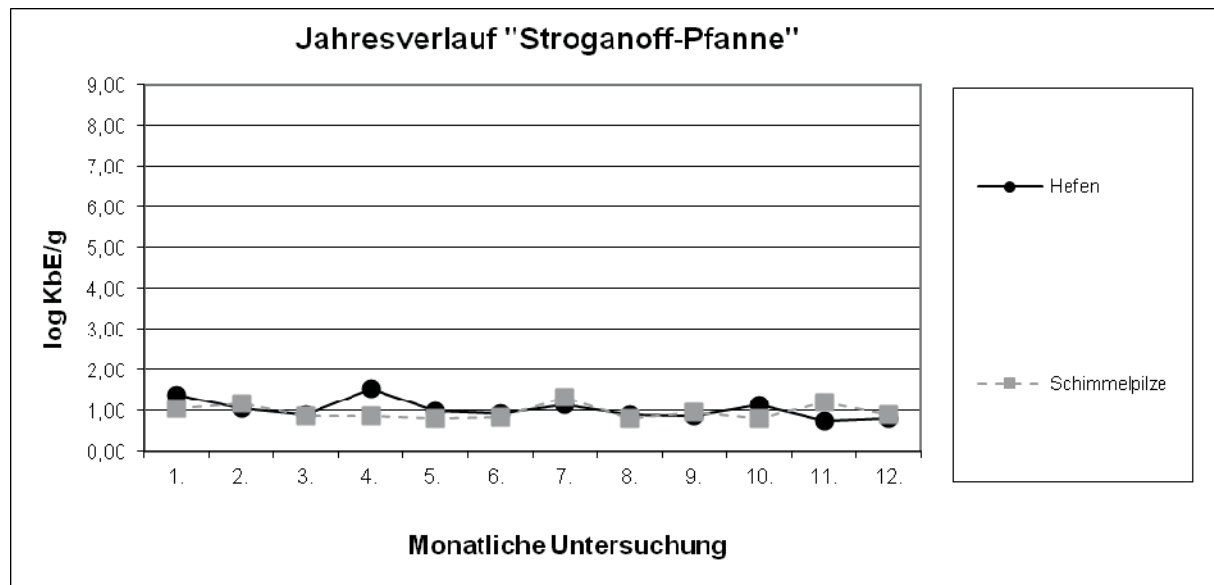


Abbildung 20: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses **"Stroganoff-Pfanne"**

Mittels Regressionsanalyse lassen sich für die Hefen in dem Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ und für die Schimmelpilze im Produkt „Champignons in Scheiben“ signifikante Korrelationen zwischen Lagerdauer und Keimgehalt feststellen. Allerdings ist der ermittelte Korrelationskoeffizient sehr niedrig und liegt für beide Mikroorganismengruppen lediglich bei ungefähr 0,270 (Tabelle 55, 57).

Im Gegensatz zu ihrer ausgeprägten Empfindlichkeit gegen den Einfrierprozess verhalten sich die Zahlen der Schimmelpilze und Hefen während der einjährigen Gefrierlagerung relativ stabil. Während dieser Aufbewahrung stellen sich die Schimmelpilze resistenter gegenüber den niedrigen Temperaturen dar als die Hefen, welche im Erzeugnis „Stroganoff-Pfanne“ signifikant reduziert werden. Für die Schimmelpilze lässt sich in keinem Produkt eine statistisch gesicherte Verminderung beobachten. In zwei Erzeugnissen („Champignons in Scheiben“ und „Maultaschen-Gemüsepfanne“) ergibt sich jeweils für die Schimmelpilze sogar eine Zuwachsrate von 2 bzw. 7 %, was jedoch auf einem sehr niedrigen Wert zum

ersten Untersuchungszeitpunkt basieren dürfte und weniger auf der Fähigkeit einiger Spezies beruht, bei Temperaturen bis  $-15^{\circ}\text{C}$  ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) zu wachsen (FARKAS 2007, SCHMIDT-LORENZ 1970, SCHMITDT-LORENZ und GUTSCHMIDT 1968). Die bessere Widerstandsfähigkeit der Pilze könnte in ihrer höheren Toleranzschwelle gegenüber niedrigen  $a_w$ -Werten und Dehydrierung (Xero- und Osmotoleranz) liegen (CHATTOPADHYAY 2000). Bei den für die vorliegende Studie gewählten Temperaturbedingungen von  $-24^{\circ}\text{C}$  ist aber nicht mehr von einer Vermehrung dieser Mikroorganismen auszugehen, die Ergebnisse dürften vielmehr Ausdruck des Stichprobenfehlers sein. In den Produkten „Porree“ und „Stroganoff-Pfanne“ liegt die Absterberate mit 0 und 1 % auf einem sehr niedrigen Niveau.

Obwohl Hefen und Schimmelpilze in der Literatur zumeist für gefrierresistenter als Bakterien gehalten werden (BURTON 1949 a, HOBBS 1976, SCHMIDT-LORENZ 1970), gibt es zum Teil auch gegensätzliche Untersuchungsergebnisse, die sie als deutlich gefrierempfindlicher beschreiben (FRAZIER und WESTHOFF 1978, STEVENSON und GRAUMLICH 1978). PARK et al. (2004) konnten nach sechsmonatiger Gefrierlagerung von Ziegenweichkäse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine signifikante Reduzierung von Schimmelpilzen nachweisen. KOBURGER (1981) beobachtete in unterschiedlichen Lebensmitteln wie Fleisch, Meeresfrüchten, getrockneten Bohnen, Pasta, Gemüse und Käse, die er bei  $-18^{\circ}$ ,  $-26^{\circ}\text{C}$  und  $-34^{\circ}\text{C}$  lagerte, eine je nach verwendetem Untersuchungsmedium höhere oder niedrigere Sensitivität als die aerobe Gesamtflora dieser Produkte. In allen vier hier untersuchten Produkten fällt die Absterberate der Gesamtkeimzahl höher als die der Schimmelpilze aus. Gemäß der Literaturangaben stellten sich die Pilze stets gefrierresistenter als die coliformen Keime dar (KOBURGER 1981). Die höhere Widerstandsfähigkeit im Vergleich zu den coliformen Keimen spiegelt sich in den hier ermittelten Ergebnissen wieder. Dies bestätigt die Beobachtung von PRADOS et al. (2006), der in Manchegokäse über einen neunmonatigen Lagerzeitraum bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eine konstante Anzahl an Schimmelpilzen nachweisen konnte.

Die Hefen weisen im Produkt „Champignons in Scheiben“ auf Grund eines sehr niedrigen Wertes in der ersten Stichprobe eine Zuwachsrate auf; in den anderen drei Erzeugnissen liegt ihre Absterberate zwischen 2 und 5 %, womit sie eine Mittelstellung zwischen grampositiven und gramnegativen Keimen einnehmen. Die Angaben aus der Literatur variieren mit der Spezies und dem verwendeten Gefriermedium; zum Teil war bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über 120 Tage keine Beeinflussung durch die Gefriertemperaturen erkennbar. Es wurde sogar das Wachstum einer besonders kälteresistenten Hefespezies bei  $-18^{\circ}\text{C}$  ( $-34^{\circ}\text{C}$ ) (SINGHAL und KULKARNI 2000) beobachtet. Andererseits kam es bereits nach 15tägiger Gefrierlagerung zu einem Verlust der Lebensfähigkeit von 80 % (ALVES-ARAÚJO et al. 2004).

### **4.5.5 Bewertung der unterschiedlichen Lebensmittel als umgebende Matrix während der einjährigen Gefrierlagerung**

Während der einjährigen Gefrierlagerung der einzelnen Mikroorganismenarten lässt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche kein eindeutiger Einfluss des Lebensmittels als umgebende Matrix feststellen. Der nach dem Einfrierprozess deutliche Unterschied der Absterberaten in den zwei Rohgemüseprodukten verliert sich während der Gefrierlagerung. In dieser Phase besteht eine sehr ähnliche Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen in den beiden Erzeugnissen. Auch ist kein eindeutiger Unterschied zwischen der Letalitätsrate der Mikroorganismen in den Rohgemüseprodukten und den tiefgefrorenen Fertiggerichten zu erkennen; lediglich bei den Enterobakteriaceen und coliformen Keimen wird in den Fertiggerichten eine höhere Absterberate erreicht. Ein Grund dafür könnte der NaCl-Gehalt der Fertiggerichte sein, da Kochsalz in geringen Konzentrationen zwar wachstumsfördernd auf die Mikroorganismen wirkt, in höheren Gehalten, welche oftmals in Lebensmitteln vorhanden sind, steigt jedoch die Gefrierempfindlichkeit der Zellen mit steigender Salzmenge (CHATTOPADHYAY 2000).

Ein schützender Einfluss der enthaltenen Inhaltsstoffe der Tiefkühlfertiggerichte wie Fette, Proteine etc. konnte hier nicht festgestellt werden.

An dieser Stelle soll abschließend darauf hingewiesen werden, dass eine vollständige Vergleichbarkeit zwischen den im Rahmen dieser Arbeit erbrachten Ergebnissen und den Angaben aus der Literatur aufgrund der unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Versuche (Ausgangsmaterialien, Einfrierbedingungen, Lagerzeit etc.) nicht möglich ist und dass wahrscheinlich aus diesem Grund viele z.T. gegensätzliche Ergebnisse über die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen existieren.

## 4.6 Wiederbelebungsstufen vor der quantitativen Untersuchung

Die ermittelten Keimzahlen der Erzeugnisse nach direkter quantitativer mikrobiologischer Untersuchung wurden jeweils mit den Keimzahlen nach Einschaltung der zwei Wiederbelebungsstufen verglichen und auf Signifikanz getestet. Die Mittelwerte der Keimzahlen finden sich in den Tabellen 58-61 (9.1.5).

Für „**Porree, geschnitten**“ konnten keine signifikant höheren Keimzahlen durch die Einführung der Wiederbelebungsstufen ermittelt werden.

Beim Produkt „**Champignons in Scheiben**“ traten zwischen den Resultaten der direkten Untersuchung und den Keimzahlbestimmungen nach Inkubation der Probe signifikante Unterschiede für die Enterobakteriaceen und coliformen Keime sowie für die Laktobazillen, Milchsäurebakterien und Hefen auf. Die entsprechenden Daten sind in den Abbildungen 21 bis 25 dargestellt.

Sie zeigen, dass nach einer Resuszipation oftmals mehr Keime als bei direkter Untersuchung nachgewiesen werden. Die Unterschiede können sogar signifikant sein, sind aber mit unter  $0,5 \log_{10}$  KbE/g für die Beurteilung des Keimstatus nicht relevant.

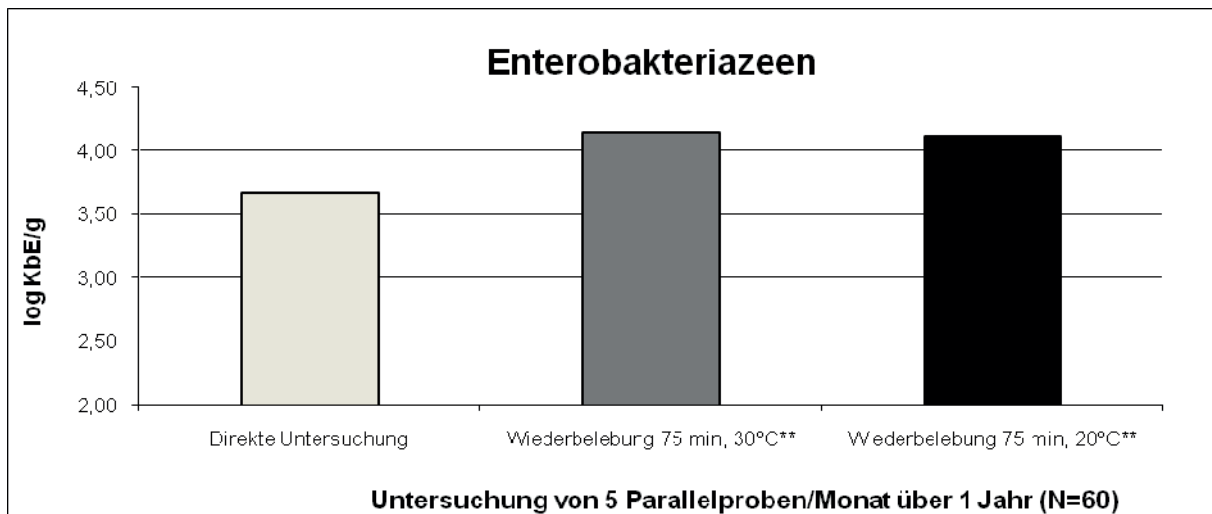


Abbildung 21: Enterobakteriaceengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufe bei 20°C und 30°C im Produkt „**Champignons in Scheiben**“

\*\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,01$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,47 \log_{10}$  (30°C) bzw.  $0,44 \log_{10}$  (20°C) niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe.

## Ergebnisse und Diskussion

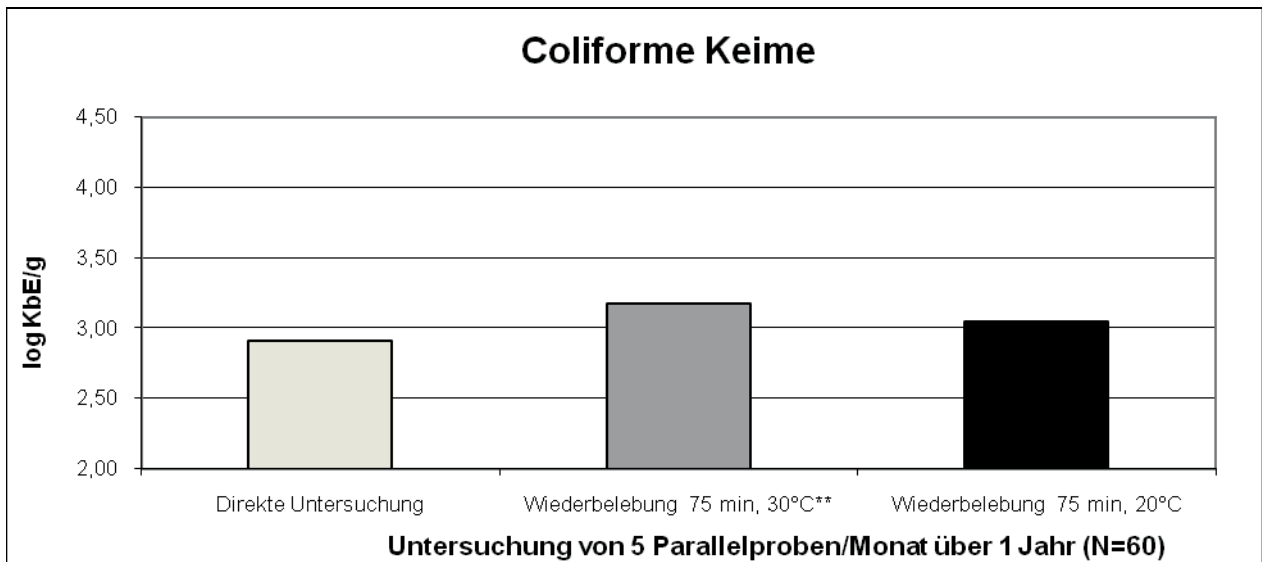


Abbildung 22: Gehalt an coliformen Keimen nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis **"Champignons in Scheiben"**

\*\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,01$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,26 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 30°C.

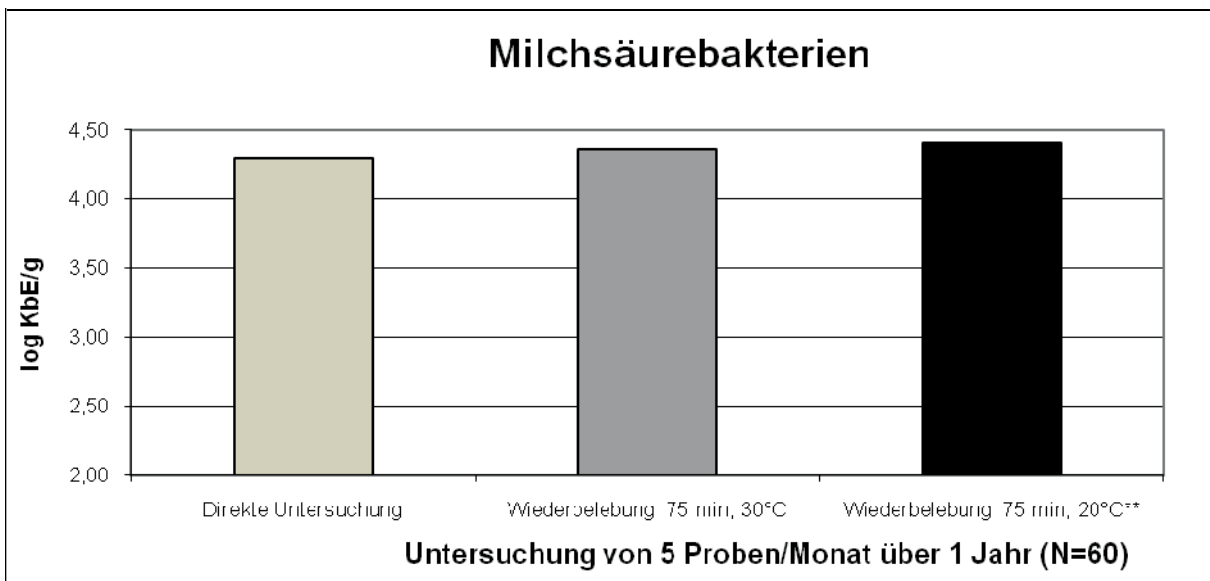


Abbildung 23: Gehalt an Milchsäurebakterien nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis **"Champignons in Scheiben"**

\*\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,01$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,12 \log_{10}$  niedriger als die mit Wiederbelebungsstufe bei 20°C.



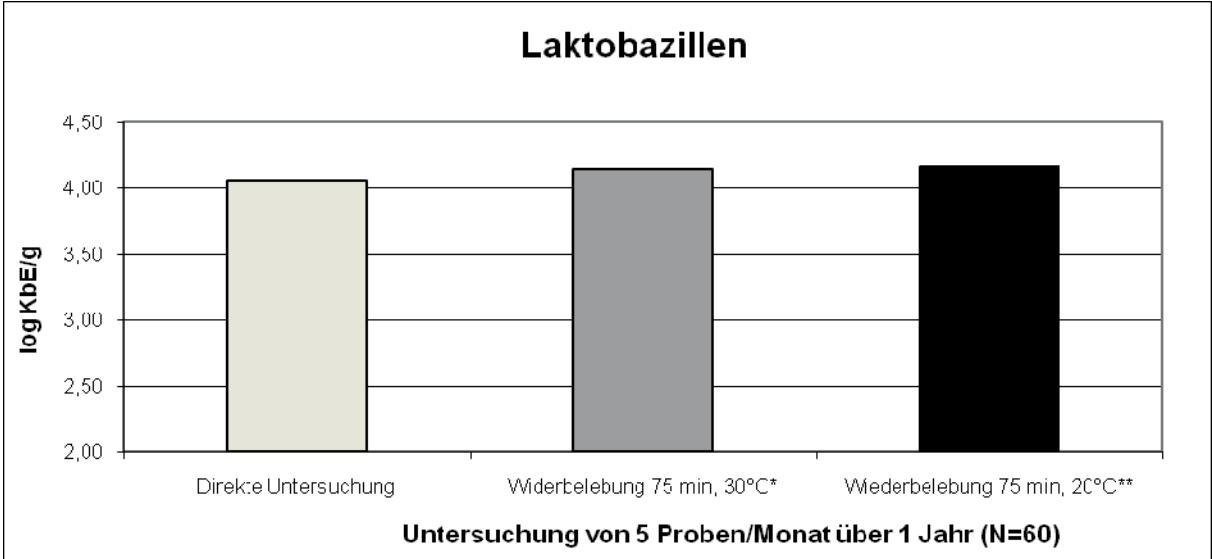


Abbildung 24: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "Champignons in Scheiben"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,082 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 30°C.

\*\* Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,01$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,11 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 20°C.

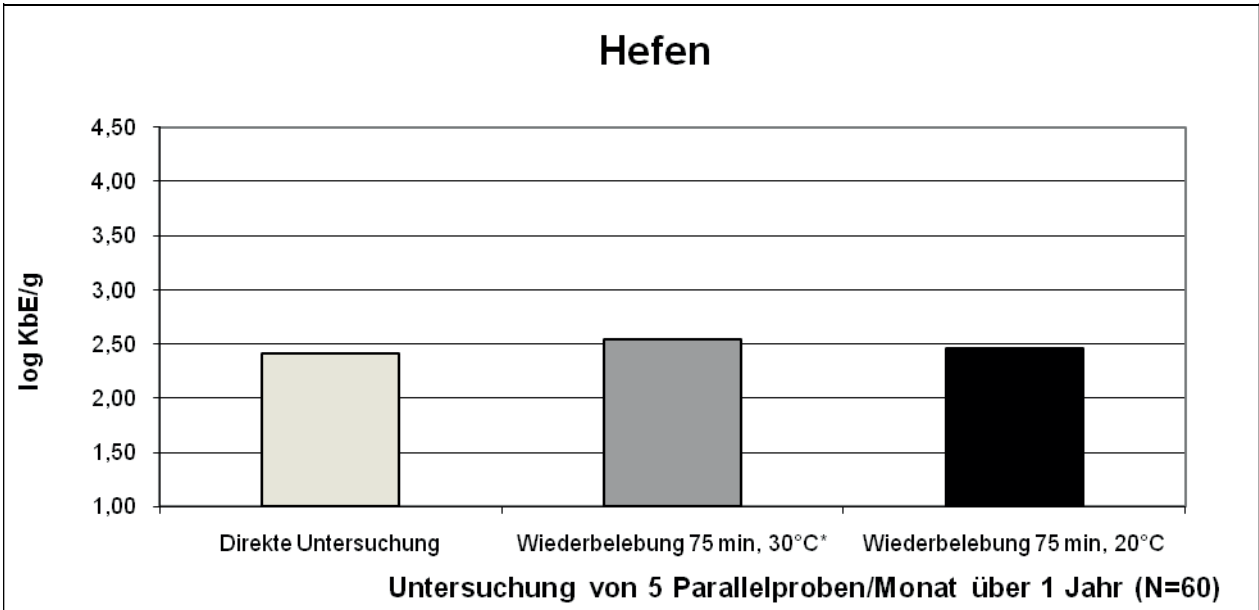


Abbildung 25: Keimgehalt der Hefen nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "Champignons in Scheiben"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,13 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 30°C.

## Ergebnisse und Diskussion

Signifikante Unterschiede der Keimzahlen nach Einsatz der Wiederbelebungstufen lassen sich in dem Produkt „**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**“ für die Enterobakteriäzen und Laktobazillen feststellen. Diese Resultate sind in den Abbildungen 26 und 27 dargestellt.

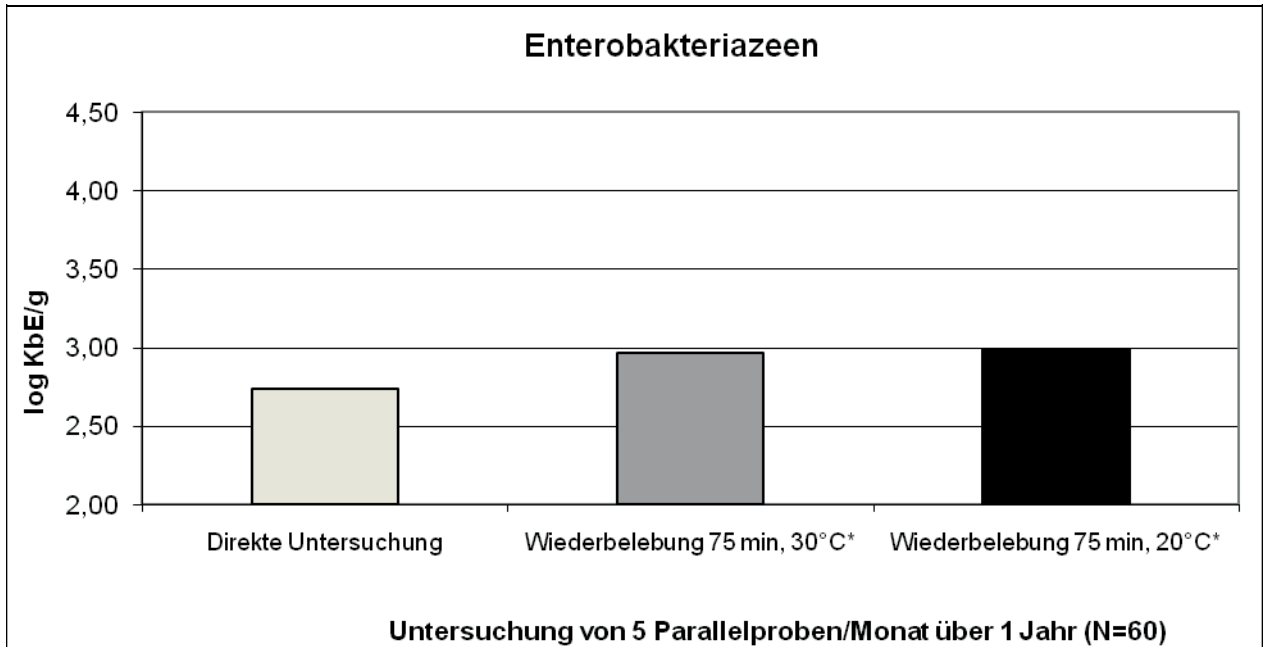


Abbildung 26: Enterobakteriäzeengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,23 \log_{10}$  (30°C) bzw.  $0,25 \log_{10}$  (20°C) niedriger als jene mit Wiederbelebungstufen.

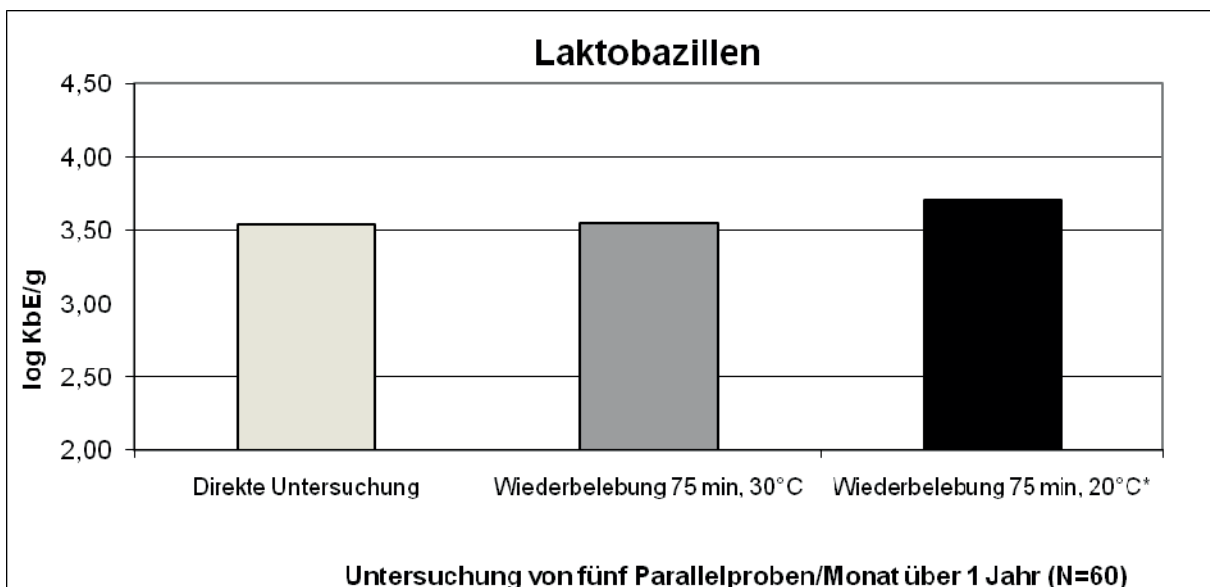


Abbildung 27: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,16 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 20°C.

Bei dem Produkt „**Stroganoff-Pfanne**“ kam es in der Gruppe der Enterobakteriäzen sowie bei den Milchsäurebakterien und Laktobazillen nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen zu signifikant höheren Keimzahlen. Diese sind in den Abbildungen 28 bis 30 dargestellt.

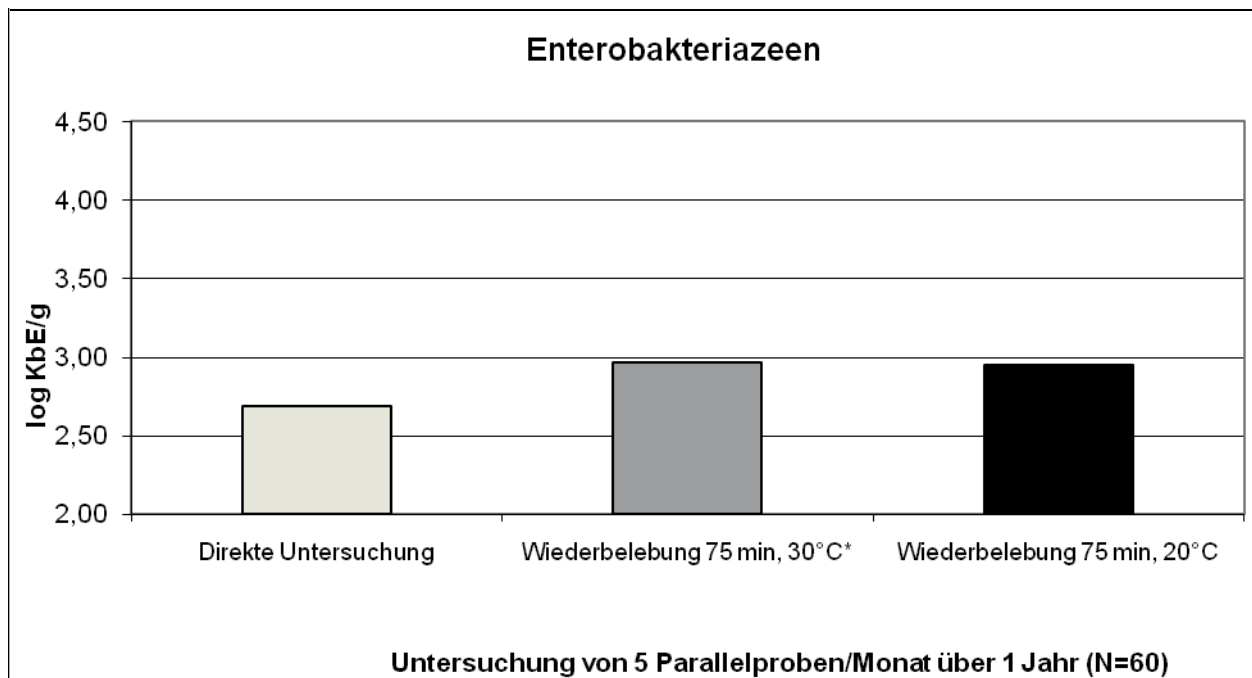


Abbildung 28: Enterobakteriäzeengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "**Stroganoff-Pfanne**"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,28 \log_{10}$  (30°C) bzw.  $0,26 \log_{10}$  (20°C) niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufen.

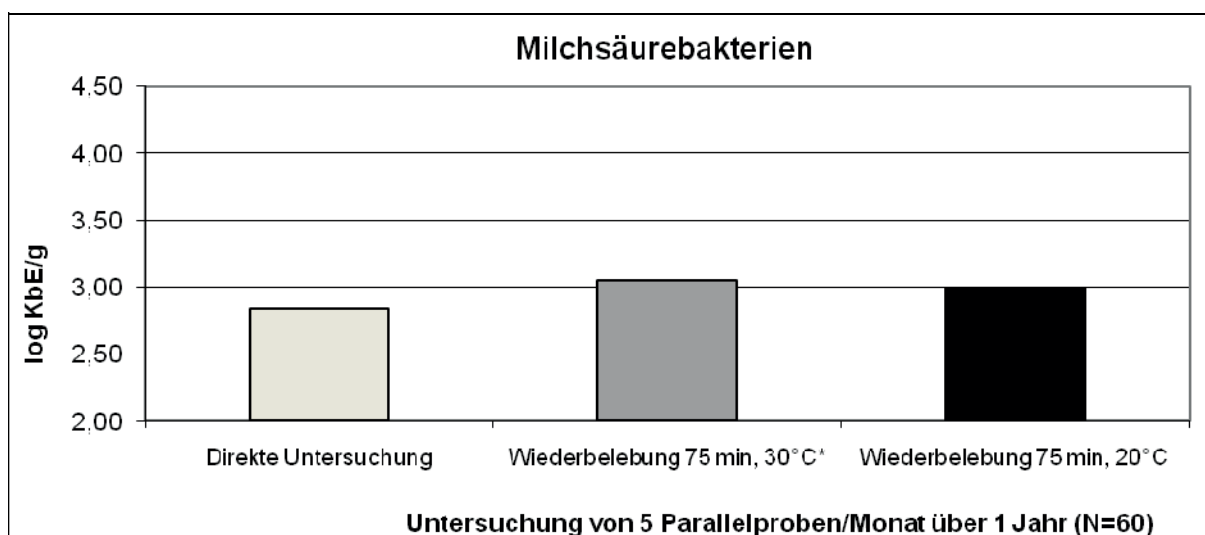


Abbildung 29: Gehalt an Milchsäurebakterien nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis "**Stroganoff-Pfanne**"

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,21 \log_{10}$  niedriger als jene mit Wiederbelebungsstufe bei 30°C.

## Ergebnisse und Diskussion

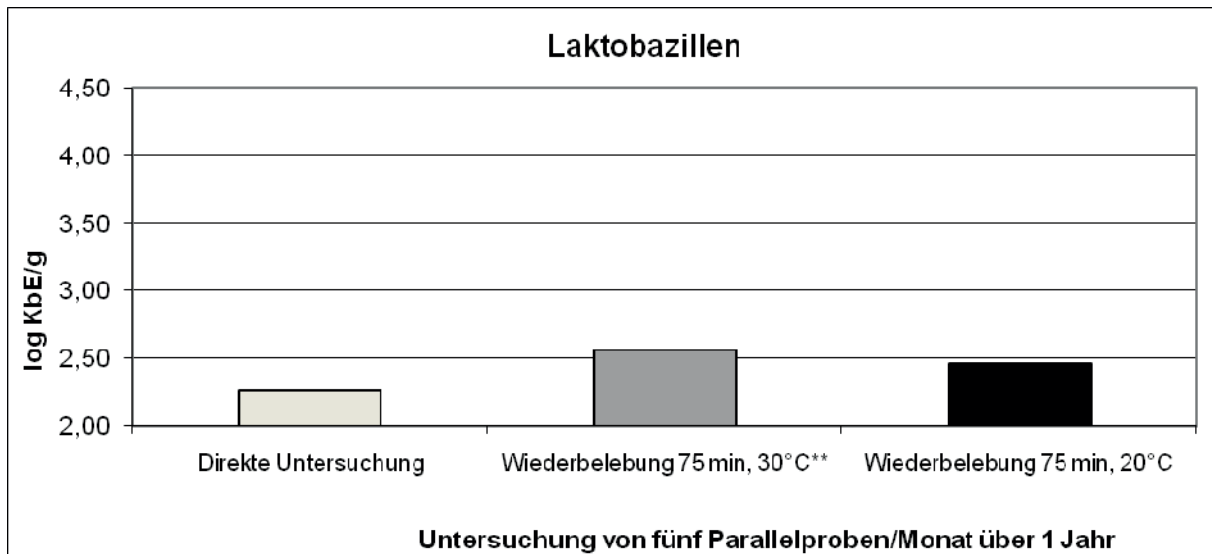


Abbildung 30: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis **"Stroganoff-Pfanne"**

\*Signifikanter Unterschied zu der direkten Untersuchung ( $p \leq 0,05$ ). Die Mittelwerte der direkten Untersuchung sind durchschnittlich  $0,30 \log_{10}$  niedriger als die mit Wiederbelebungsstufe bei 30°C.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Resuszipitation mit einer Inkubation der Erstverdünnung stellt eine flüssige Wiederbelebungsstufe mit gepuffertem Peptonwasser dar und ist als nicht-selektive Anreicherung von Mikroorganismen anzusehen. Diese Methode erfolgte in Anlehnung an den Vorschlag, bei der gezielten Suche nach pathogenen Keimen die mit der neunfachen Menge an Kochsalz-Pepton-Lösung versetzte Ausgangsverdünnung eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen zu lassen (ZSCHALER 2004). Mit den hier durchgeführten Versuchen sollte eine praxistaugliche Wiederbelebungsstufe für die Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel getestet werden, welche einen geringen materiellen und zeitlichen Aufwand beinhaltet und für alle Mikroorganismenarten eingesetzt werden kann. Aus diesem Grund wurden keine selektiven Medien mit speziellen Nährstoffen für bestimmte Mikroorganismen verwendet. Aufwendige Resuszipitationsverfahren würden vor allem bei Routineuntersuchungen ohne Verdacht auf pathogene Keime keine Praxisrelevanz besitzen.

Die optimale Temperatur und Zeit einer Wiederbelebungsstufe differieren mit der Natur der Stresseinwirkung (WU 2008), allerdings sind die meisten beschädigten Zellen innerhalb von zwei bis vier Stunden bei einer geeigneten Inkubationstemperatur in einem nährstoffreichen, nicht-selektiven Medium zur Reparatur befähigt (FUND und VAN DEN BOSCH 1975, RAY 1986). Eine generelle Festlegung von optimalen Bedingungen ist jedoch aufgrund der Unterschiedlichkeit der Beschädigungen und somit verschiedener Mechanismen, die für Reparaturen benötigt werden, nicht möglich.

Weiterhin werden allgemeine Anweisungen durch die nicht-homogene Verteilung der Mikroorganismen in den Lebensmitteln erschwert. So verwundert es nicht, dass mit verschiedenen Wiederbelebungsmedien variierende Keimzahlen von +178 bis -50 % erreicht wurden (WU 2008).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Temperaturen von +20 und +30°C liegen in einem Bereich, der oftmals in der Literatur zur Durchführung von Wiederbelebungsstufen empfohlen wird. OSCORFT et al. (1987) fanden ausreichende Reparaturvorgänge bei diesen beiden Temperaturen, was die hier ermittelten Keimzahlen bestätigen. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Keimzahlen zwischen Bebrütung bei 20°C und 30°C können lediglich für die Hefen im Produkt „Champignons in Scheiben“ festgestellt werden, wobei die Inkubation bei 30°C im Mittel eine um  $0,09 \log_{10}$  KbE/g höhere Keimzahl erbringt.

Von einigen Autoren wird allgemein eine Wiederbelebungsstufe mit einem flüssigen Nährmedium bei einer Temperatur von 25-38°C für eine bis fünf Stunden bei den meisten mesophilen Keimen als besonders effektiv angesehen. Die Resusztation mittels flüssiger Nährmedien vor dem Aufbringen auf feste Selektivmedien wird andererseits auch kritisch gesehen, weil das Risiko einer Vermehrung nicht subletal geschädigter, lebensfähiger Mikroorganismen besteht. FOSCHINO (2002) sah die ermittelten Keimzahlen auf selektiven festen Nährmedien nicht ausschließlich als eine Folge der Reparatur von beschädigten Zellen an, sondern auch als Ausdruck einer bereits erfolgten Vermehrung unbeschädigter Zellen. Zu dieser Betrachtungsweise führte ihn eine Studie, bei der er mit *E. coli* beimpftes Speiseeis direkt im tiefgefrorenen Zustand untersuchte sowie während einer zweistündigen Wiederbelebungsphase in Trypton-Soja-Hefe-Bouillon bei 30°C und zwar jeweils in halbstündigen Abständen. Er wies bereits nach 30 Minuten auf einem nicht-selektiven TSA-Agar sowie auf einem selektiven VRBL-Agar eine erhöhte Keimzahl nach, welche sich im Laufe der zwei Stunden weiter steigerte. Vor allem bei einer Verlängerung der Inkubationszeit und einer quantitativen Keimzahlerfassung forderte FOSCHINO (2002) eine kritische Ergebnisinterpretation.

Bei den hier durchgeführten Versuchen ist aufgrund der gewählten Inkubationszeit von lediglich 75 Minuten die Gefahr beginnender Keimvermehrung kaum gegeben, da in dieser Zeitspanne selten mit Teilungsvorgängen der Mikroorganismen aus tiefgefrorenen Lebensmitteln gerechnet werden kann. Auch RAY und SPECK (1973 b) und RAY et al. (1976) wiesen im Anschluss an eine Wiederbelebungsphase lediglich den schnellen Anstieg der Keimdichte auf selektiven Medien und keinen Anstieg auf nicht-selektiven Medien nach. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls keine Erhöhung der Keimzahl auf dem nicht-selektiven Plate-Count-Agar beobachtet werden, so dass nicht von einer Keimvermehrung unbeschädigter, lebensfähiger Mikroorganismen auszugehen ist. Ebenso wird aus Angaben der Literatur ersichtlich, dass diese Inkubationsdauer von 75 Minuten zur

## Ergebnisse und Diskussion

---

Resusozitation ausreicht, da sich der größte Teil der Wiederbelebung innerhalb von 30 Minuten bei Temperaturen zwischen 20 und 45°C ereignet (FOSCHINO 2002, SPECK und RAY 1973 a). Laut RAY und SPECK (1973 a) ließ sich bei Versuchen mit coliformen Keimen eine beginnende Vermehrung innerhalb zweistündiger Inkubation bei 25°C feststellen. Um die Reparaturen während der Wiederbelebungsphase von der einsetzenden Vermehrung abgrenzen zu können, schlugen sie für die quantitative Bestimmung coliformer Keime sowie von *E. coli* in kommerziell gefrorenen Lebensmitteln einständiges Inkubieren in Trypticase-Soja-Bouillon mit Hefeextrakt bei 25°C vor.

Auch wenn für einige Mikroorganismenarten signifikante Keimzahlunterschiede zwischen vorangereicherten und nicht inkubierten Proben bestanden, so fallen diese doch gering aus und liegen in einem Bereich von 0,08 log<sub>10</sub> bis maximal 0,48 log<sub>10</sub> KbE/g. Weil es sich nicht um den Nachweis pathogener Keime handelt, kann die Feststellung aus der Literatur, wonach eine Wiederbelebungsstufe vor der Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel als nicht relevant angesehen wird (ZSCHALER 2004), bestätigt werden. Jedoch dürfte eine schnell und einfach durchzuführende Wiederbelebungsstufe im Grenzfall bei bestimmten Fragestellungen und Betrachtungen von Grenzwerten bzw. zur Absicherung von Ergebnissen für die gramnegativen Keime, insbesondere die Enterobakteriazeen, sinnvoll sein.

Kritisch ist zu den eigenen Ergebnissen anzumerken, dass nicht dieselbe Ausgangsverdünnung für die direkten Untersuchungen im tiefgefrorenen Zustand und die beiden Untersuchungen nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen verwendet wurde. Für alle drei Versuchsansätze wurden jeweils 25 g Probenmaterial unabhängig voneinander aus derselben Fertigpackung entnommen. Aufgrund dieser Gegebenheit können jedoch Unterschiede zwischen den ermittelten Keimzahlen zustande gekommen sein, die zwar nicht den Trend verfälschen, aber zu erhöhten Streuungen zwischen den Parallelansätzen führen. Darüber hinaus konnten aufgrund arbeitstechnischer Gegebenheiten die Produkte „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und „Stroganoff-Pfanne“ nicht im frischen, ungefrorenen Zustand untersucht werden. Bei diesen zwei Erzeugnissen gibt es somit keine Daten zur Frage, ob die ermittelten Keimzahlen nach Durchführung der Wiederbelebungsstufen eventuell den Keimgehalt des frischen Produktes erreichen.

### 5 Schlussfolgerung

Aus den mikrobiologischen Resultaten der über ein Jahr dauernden Gefrierlagerversuchen an vier verschiedenen TK-Produkten lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Durch den Einfrierprozess, wie er bei der industriellen Herstellung von Tiefkühlprodukten durchgeführt wird, ergeben sich im Erzeugnis „Porree, geschnitten“ für alle erfassten Mikroorganismen signifikante Keimzahlreduktionen. Im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ werden lediglich folgende vier Mikroorganismengruppen signifikant reduziert: Laktobazillen, Enterobakteriazeen, Hefen und Schimmelpilze.

Für die beiden Fertiggerichte „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und „Stroganoff-Pfanne“ fehlen entsprechende Daten, weil sich der Ausgangskeimgehalt versuchsbedingt nicht ermitteln ließ.

Am Ende der einjährigen Tiefgefrierlagerung bei konstanten  $-24^{\circ}\text{C}$  werden in allen untersuchten Lebensmitteln signifikante Reduktionen für die Enterobakteriazeen und coliformen Keime erreicht. Milchsäurebakterien, Laktobazillen, Pseudomonaden sowie Hefen und Schimmelpilze werden z.T. auch signifikant in ihrer Anzahl reduziert, stellen sich aber resistenter gegenüber der Gefrierlagerung dar.

Die *Enterococcus* spp. weisen in dem hier untersuchten Lebensmittel ähnliche Absterberaten wie die coliformen Keime auf bzw. sind zum Teil weniger gefrierresistent als diese. Somit können die Angaben aus der Literatur, nach denen *Enterococcus* spp. aufgrund ihrer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber den Gefrierbedingungen die sinnvolleren Fäkalindikatoren in gefrorenen Erzeugnissen darstellen, nicht bestätigt werden.

Durch den Einfrierprozess und einjährige Tiefgefrierlagerung lässt sich keine vollständige Sanierung von Lebensmitteln erreichen. Alle erfassten Mikroorganismengruppen sind am Ende der Lagerzeit noch nachweisbar. Die Verwendung hygienisch einwandfreier Ausgangsmaterialien sowie eine ordnungsgemäße Prozess- und Betriebshygiene besitzen weiterhin höchste Priorität.

Mittels Regressionsanalyse werden für verschiedene Mikroorganismen signifikante Korrelationen zwischen Lagerdauer und Mikroorganismengehalt festgestellt. Eine starke und damit relevante Korrelation ( $R \geq 0,6$ ) besteht in den Produkten „Champignons in Scheiben“, „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ und „Stroganoff-Pfanne“ lediglich für die Enterobakteriazeen sowie im Erzeugnis „Champignons in Scheiben“ für die coliformen Keime.

## Schlussfolgerung

---

Während des Einfrierprozesses scheint die Art des Lebensmittels einen Einfluss auf Überlebensfähigkeit und Absterberate der Mikroorganismen zu besitzen. Während der anschließenden Gefrierlagerung bei den vier überprüften Produkten sind substratspezifische Effekte nicht zu beobachten.

Für die mikrobiologische Routineuntersuchung tiefgefrorenener Lebensmittel ist der Einsatz einer Wiederbelebungsstufe nicht notwendig. Für Fälle, in denen mikrobiologische Grenzwerte knapp unter- oder überschritten werden, könnte sich ein Resuszitationschritt zur Absicherung und Festigung der Ergebnisse empfehlen.



### 6 Zusammenfassung

Um die Frage zu beantworten, ob es bei der Herstellung von Tiefkühlprodukten durch industriell übliche Tiefgefrierverfahren sowie anschließende Gefrierlagerung zu einer signifikanten Reduktion der in den Lebensmitteln befindlichen Mikroorganismenflora kommt, wurden im Rahmen dieser Arbeit während einjähriger Tiefgefrierlagerung von vier handelsüblichen Tiefkühlprodukten („Porree, geschnitten“, „Champignons in Scheiben“, „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“, „Stroganoff-Pfanne“) monatlich fünf Parallelproben quantitativ mikrobiologisch untersucht, wobei der Keimgehalt der beiden Rohgemüseprodukte auch im ungefrorenen, frischen Zustand vor dem Einfrierprozess ermittelt wurde. Durch quantitative mikrobiologische Untersuchungen des für den Endverbraucher bestimmten Produkts vor dem Tiefgefrierprozess und monatliche Untersuchungen während der Tiefkühlagerung bei einer konstanten Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$ , sollte der Einfluss des Gefrierprozesses, der Temperatur und Lagerdauer - unter Berücksichtigung der Art des Produktes und seiner Vorbehandlung - auf die Mikroorganismenaktivität erfasst sowie Rückschlüsse auf Absterberate und Überlebensfähigkeit der verschiedenen Bakterienarten gezogen werden.

Alle untersuchten Lebensmittel gehörten jeweils einer Charge an, welche im Dezember 2007 produziert worden war. Die Fertigpackungen wurden anschließend bei einer konstanten Temperatur von  $-24^{\circ}\text{C}$  über ein Jahr bei einer Tiefkühlkostvertreiberfirma gelagert und monatlich zur Untersuchung an das IfL gesendet. Bei der quantitativen mikrobiologischen Untersuchung wurden mittels des Drop-plating-Verfahrens folgende Keimgruppen erfasst: Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, Milchsäurebakterien, Laktobazillen, koagulase-positive Staphylokokken, Enterokokken, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, sulfitreduzierende anaerob wachsende Sporenbildner, Aeromonaden, Pseudomonaden, Enterobakteriaceen, coliforme Keime, *E. coli*, Hefen und Schimmelpilze.

Die durch den Einfrierprozess erfolgte Reduktion der Mikroorganismenkeimzahl lag zwischen 0,30 und 2,25  $\log_{10}$  KbE/g. Im Erzeugnis „Porree, geschnitten“ wurden für alle erfassten Mikroorganismen signifikante Verringerungen der Keimzahlen erreicht, während dies im Produkt „Champignons in Scheiben“ lediglich für vier Mikroorganismenarten beobachtet werden konnte. Demnach ist während des Einfrierprozesses ein Matrixeffekt auf die Keimgruppen zu erwarten.

Die einjährige Gefrierlagerung erbrachte für verschiedene Mikroorganismen signifikante Reduktionen, die bei Enterobakteriaceen und coliformen Keimen am stärksten ausfielen. Milchsäurebakterien, Laktobazillen, Pseudomonaden sowie Hefen und Schimmelpilze erwiesen sich dagegen als weniger gefrierempfindlich.

## Zusammenfassung

---

In den hier durchgeführten Untersuchungen wiesen die Enterokokken eine ähnliche Widerstandsfähigkeit wie die coliformen Keime auf. Entgegen den Angaben aus der Literatur ist diese Bakteriengattung deshalb als Hygieneindikator für das Ausgangsmaterial nicht besser geeignet als die coliformen Keime.

Werden der Einfluss von Einfrieren und einjähriger TK-Lagerung zusammengerechnet, so reicht die Keimzahlreduzierung nicht aus, um ein Lebensmittel vollständig zu sanieren. Alle anfangs präsenten Mikroorganismen waren zum Versuchsende noch nachweisbar.

Andererseits konnten *Listeria monocytogenes*, Koagulase-positive Staphylokokken, Aeromonaden, *Bacillus cereus* sowie sulfitreduzierende anaerob wachsende Sporenbildner von Anfang an aus keiner Probe isoliert werden bzw. lag die Anzahl dieser Mikroorganismen unterhalb ihrer Nachweisgrenze von 2,30 log<sub>10</sub> bzw. 1,00 log<sub>10</sub> KbE/g.

Darüber hinaus wurde die Notwendigkeit einer Wiederbelebungsstufe vor der quantitativen mikrobiologischen Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel überprüft, weil Keime in derartigen Produkten durch Stressfaktoren wie Gefrierprozess und Tiefgefrierlagerung subletal geschädigt sein können. Da ein in der Routineuntersuchung einsetzbares Verfahren Verwendung finden sollte, wurden die Ausgangsverdünnungen von fünf Parallelproben/Produkt für 75 Minuten bei +20°C und bei +30°C inkubiert und anschließend mit der für die jeweilige Keimart spezifischen Methode weiterbearbeitet. Die ermittelten Keimzahlen wurden mit denen der direkten mikrobiologischen Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand verglichen. Es ergaben sich je nach untersuchtem Lebensmittel signifikante Unterschiede der Keimzahlen für Milchsäurebakterien, Laktobazillen, Enterobakteriaceen, coliforme Keime und Hefen; im Produkt „Porree, geschnitten“ konnten keine signifikanten Keimzahlunterschiede ermittelt werden. Die Differenzen der Keimzahlen fielen recht niedrig aus und lagen zwischen 0,08 und 0,47 log<sub>10</sub> KbE/g. Aus diesem Grund wird ein Resusztationsschritt vor der Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel als nicht notwendig erachtet. Jedoch kann eine schnell und einfach durchzuführende Wiederbelebungsstufe im Grenzfall bei bestimmten Fragestellungen - insbesondere der Absicherung von Grenzwertüberschreitungen - und Betrachtungen von Grenzwerten bzw. zur Absicherung von Ergebnissen vor allem für die Gruppe der Enterobakteriaceen sinnvoll sein.

## 7 Summary

### **Impact of the deep freezing process and frozen storage on the microflora of four commercial frozen food products**

The aim of this study was to answer the question whether the way of industrial freezing and storing of food products leads to significant reductions in the count of microorganisms. Therefore quantitative microbiological examinations of five samples per month from each of four frozen food products (“leak, sliced”, “mushrooms, sliced”, “Maultaschen-Gemüse-Pfanne”, “Stroganoff-Pfanne”) were conducted. The two raw vegetable products were also examined in the unfrozen status before the freezing process. With quantitative microbiological examinations of the products before the freezing process and monthly examinations during the frozen storage, information about the impact of the freezing process, the temperature and the storage time (with regard of type of product and its preprocessing) on the activity of the microorganisms was collected. Furthermore conclusions about the mortality and survival rate of the different bacteria species could be drawn.

Each of the examined food belonged to one lot which was produced in December 2007. After the production, the food packages were stored at constant temperature of -24°C for one year at a frozen food company and sent monthly to our institute. The quantitative microbiological examination was conducted by drop plating for the following microorganisms: Aerobic mesophilic total bacteria, lactic acid bacteria, lactobacilli, coagulase-positive staphylococci, enterococci, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, sulfite-reducing anaerobe spore-forming bacteria, aeromonads, pseudomonads, *Enterobacteriaceae*, coliforms, *E. coli*, yeasts and molds.

The reduction of the microbial count after the freezing process was between 0.30 and 2.25 log<sub>10</sub> cfu/g. In the product “leak, sliced” significant reductions of the bacterial count for all included microorganisms were noticed while this was observed for only four types of bacteria in the product “mushrooms, sliced”. According to this, a matrix effect on the microorganisms during the freezing process can be expected.

The one-year frozen storage caused for certain groups of bacteria a significant reduction in cell counts which were strongest for *Enterobacteriaceae* and coliforms. Lactic acid bacteria, lactobacilli, pseudomonads, yeasts and molds were much less susceptible.

In our experiments the enterococci showed nearly the same correlation between counts and storing time as the coliforms. Hence, the information from literature that enterococci are better hygiene indicators for frozen food products than coliforms cannot be confirmed.

## Summary

---

If adding the impact of the freezing process and frozen storage over one year, the microbial reduction will not be enough to cause a complete decontamination. All microorganisms present at the beginning were still detectable at the end of the study.

*Listeria monocytogenes*, coagulase-positive staphylococci, aeromonads, *Bacillus cereus* and sulfite-reducing anaerobe spore-forming bacteria could not be found in any sample or the number of these microorganisms was below the detection limit of 2.30 log<sub>10</sub>/1.00 log<sub>10</sub> cfu/g.

Beyond that, the necessity of a resuscitation step previous to the quantitative microbiological examination of frozen food in routine work was checked, because microorganisms can be sublethally damaged by stress factors like freezing and frozen storage. Therefore a method which could be used in laboratory routine work was tested. For this purpose the first dilutions of five samples/product were incubated for 75 minutes at 20 and 30°C. After this, they were further treated with the specific method for the respective type of microorganism. The determined bacterial counts were compared to the counts of direct microbiological examination in the frozen status. According to the type of food, significant differences were obtained for lactic acid bacteria, lactobacilli, *Enterobacteriaceae*, coliforms and yeasts; in the product "leak, sliced" significant differences could not be found at all. The differences between the bacterial counts were very small: between 0.08 and 0.47 log<sub>10</sub> cfu/g. For this reason, a resuscitation step before the routine examination of frozen food products seems not necessary. But in border cases with certain issues – in particular for testing against microbiological criteria - especially for the group of *Enterobacteriaceae*, such a step could be helpful.

---

## 8 Literaturverzeichnis

ABADIAS, M., BENABARRE, A., TEIXIDÓ, N., USALL, J., VINAS, I. (2001): Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology* **65** (3), 173-182

ABEYTA, C., KAYSNER, C.A., WEKELL, M.M., SULIVAN, J.J., STELMA, G.N. (1986): Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *Journal of Food Protection* **49** (8), 643-646

AEA, R.T.F., BUSHNELL, O.A. (1962 a): The microflora of frozen passionfruit nectar base. *Applied and Environmental Microbiology* **10** (3), 272-276

AEA, R.T.F., BUSHNELL, O.A. (1962 b): Survival times of selected enteropathogenic bacteria in frozen passionfruit nectar base. *Applied and Environmental Microbiology* **10** (3), 277-279

ALFORD, J.A., PIERCE, D.A. (1961): Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *Journal of Food Science* **26** (5), 518-524

AL-HARBI, A.H., UDDIN, M.N. (2005): Microbiological quality changes in the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) in fresh and frozen storage condition. *Letters in Applied Microbiology* **40** (6), 486-490

ALVES-ARAÚJO, C., ALMEIDA, M.J., SOUSA, M.J., LEAO, C. (2004): Freeze tolerance of the yeast *Torulaspota delbrueckii*: cellular and biochemical basis. *FEMS Microbiology Letters* **240** (1), 7-14

ANANTA, E., PONANTI, M., KNORR, D. (2002): Improvement of survival rate of probiotic bacteria during spray-drying using high pressure and heat pre-treatment. Poster presentation at IBERDESH – Symposium Drying: Process, structure and functionality, 25-27 September 2002, Valencia, Spain

ANDERSSON, R.E. (1980): Microbial lipolysis at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **39** (1), 36-40

## Literaturverzeichnis

---

ANGELOTTI, R., FOTER, M.J., LEWIS, K.H. (1961): Time-temperature effects on Salmonellae and Staphylococci in foods. 1. Behavior in refrigerated foods. 2. Behavior at warm holding temperatures. *American Journal of Public Health* **51** (1), 76-88

ANONYM (1950): Frozen foods. *Public Health Reports (U.S.)* **65**, 1645-1646 (aus BORGSTROM 1955)

ANSAY, S.E., DARLING, K.A., CASPAR, C.W. (1999): Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in ground-beef patties during storage at 2, -2, 15 and then -2, and -20°C. *Journal of Food Protection* **62** (11), 1243-1247

APILUKTIVONGSA, P., WALKER, H.W. (1980): Influence of selective agents on recovery of cold-stressed cells of *Clostridium perfringens*. *Journal of Food Science* **45** (3), 574-576

ARPAI, J. (1962): Nonlethal freezing injury to metabolism and motility of *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **10** (4), 297-301

ARCHER, D.L. (2004): Review article: Freezing: an underutilized food safety technology? *International Journal of Food Microbiology* **90** (2), 127-138

ARROYO, G., PRESTAMO, G. (1998): Evolution of microorganism numbers from tomatoes frozen slices during storage. *Alimentaria* **293**, 51-56

ASHWOOD-SMITH, M.J., WARBY, C. (1971): Studies on the molecular weight and cryoprotective properties of polyvinylpyrrolidone and dextran with bacteria and erythrocytes. *Cryobiology* **8** (5), 453-464

ASHWOOD-SMITH, M.J., TREVINO, J., WARBY, C. (1972): Effect of freezing on the molecular weight of bacterial DNA. *Cryobiology* **9** (2), 141-143

AZIZOGLU, R.O., OSBORNE, J., WILSON, S., KATARIOU, S. (2009): Role of growth temperature in freeze-thaw tolerance of *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (16), 5315-5320

BAIRD-PARKER, A.C., DAVENPORT, E. (1965): The effect of recovery medium on the isolation of *Staphylococcus aureus* after heat treatment and after the storage of frozen or dried cells. *Journal of Applied Microbiology* **28** (3), 390-402

- BALLS, A.K., LINEWEAVER, H. (1938): Action of enzymes at low temperatures. *Journal of Food Science* **3** (1-2), 57-67
- BANG, W., DRAKE, M.A. (2005): Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiology* **22** (4), 301-309
- BANWART, G.J. (1989). Control of microorganisms by retarding growth. In: Basic Food Microbiology, 2<sup>nd</sup> ed., Van Nostrand Reinhold, New York, Chap.11, 545-650
- BARNES, E.M., DESPAUL, J.E., INGRAM, J. (1963): The behaviour of a food-poisoning strain of *Clostridium welchii* in beef. *Journal of Applied Bacteriology* **26** (3), 415-427
- BARRELL, R.A. (1988): The survival and recovery of *Salmonella typhimurium* phage type U285 in frozen meats and tryptone soya yeast extract broth. *International Journal of Food Microbiology* **6** (4), 309-316
- BARTELT, E. (2007): *Listeria* spp. In: K. FEHLHABER, J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.): Handbuch Lebensmittelhygiene, 1. Auflage 2007, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. II 2.1.8, 60-64
- BAUMGART, J. (2004): Pseudomonaden und verwandte Gattungen, Milchsäurebakterien, *Escherichia coli* und coliforme Bakterien, *Enterococcus faecalis* und *E. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, Familie Enterobacteriaceae, Lactobacillus. In: J. BAUMGART, B. BECKER (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 5. aktualisierte und erweiterte Auflage, Studienausgabe, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. III 1.6, 1.7, 156-158, 2.1, 2.2, 2.3, 195-211, 3.2.4.1, 319-324, Kap. IV 5.10, 449-453, 8.9, 475-478
- BAUST, J.C. (1973): Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. *Cryobiology* **10**, 197
- BERRANG, M.E., BRACKETT, R.E., BEUCHAT, L.R. (1989): Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (9), 2167-2171
- BEYER, K. (1983): Mikroflora vakuumverpackten Fleisches während der Gefrierlagerung. *Fleischwirtschaft* **63** (11), 1741-1744, 1746

## Literaturverzeichnis

---

BEUCHAT, L. R. (1991): Behavior of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **13** (3), 217-224

BEUCHAT, L. R., GOLDEN, D. A. (1989): Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology* **43** (1), 134-142

BOEGH-SOERENSEN, L., JUL, M. (1985): Effects of Freezing/Thawing on Foods. In: R.K. ROBINSON (ed.): *Microbiology of Frozen Foods*. Elsevier Applied Science Publishers, Essex, Chap. 2, 41-82

BÖHMLER, G., THIELKE, S., SEIDE, K., THIEM, I. (2008): Einfrieren von Lebensmittelproben. Ermittlung des Einflusses auf den Keimgehalt. 49. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, Proceeding Band, 135

BOFROST\* DIENSTLEISTUNGS GMBH & CO. KG (2010). Produkte, Obst und Gemüse, Rohgemüse: Champignons in Scheiben, Porree. [www.bofrost.de](http://www.bofrost.de) (Stand 04.05.2010)

BOLLMAN, J., ISMOND, A., BLANK, G. (2001): Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen foods: impact of the cold shock response. *International Journal of Food Microbiology* **64** (1-2), 127-138

BORGSTROM, G. (1955): Microbiological problems of frozen food products. *Advances in Food Research* **6**, 163-213

BOSTIAN, M., GILLILAND, S.E. (1979): Frozen concentrated cultures of *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Food Science* **44** (3), 696-699

BOZOGLU, F., ALPAS, H., KALETUNC, G. (2004): Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40** (3), 243-247

BRAUN, P., LEKSCHAS, S., BALZER, G., FEHLHABER, K. (1997): Untersuchungen zur Aktivität mikrobieller Proteasen und Lipasen bei Kühl- und Gefriertemperaturen. 38. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, Proceeding Band, 170-177



- BREEZE, J., CADY, N., STALEY, J.T. (2004): Subfreezing growth of the sea ice bacterium "*Psychromonas ingrahamii*". *Microbial Ecology* **47** (3), 300-304
- BROADHURST, J., GILPIN, L. (1926): Acidity in relation to bacterial changes introduced by freezing. *Journal of Bacteriology* **11**, 95 (aus STILLE 1948)
- BROSIUS, F. (1998): SPSS 8 – Professionelle Statistik unter Windows. MITP Verlag GmbH, Bonn
- BROSIUS, F. (2008): SPSS 16 für Dummies. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- BROWN, C.W., HILL, S.T. (1984): Survival of micro-organisms in deep-frozen barley and pigfeed. *Journal of Stored Product Research* **20** (3), 145-150
- BRYAN, P.J., STEFFAN, R.J., DEPAOLA, A., FOSTER, J.W. (1999): Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Current Microbiology* **38** (3), 168-175
- BURTON, M.O. (1949 a): The types of coli-aerogenes organisms occurring in frozen vegetables. *Canadian Journal of Public Health* **40** (8), 361-363
- BURTON, M.O. (1949 b): Comparison of coliform and Enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. *Food Research* **14** (5), 434-438
- BÜLTE, M. (2007): *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*. In: K. FEHLHABER, J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.): Handbuch Lebensmittelhygiene, 1. Auflage 2007, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. II 2.2.2, 2.2.3, 123-128
- BUSTA, F.F. (1976): Practical implications of injured microorganisms in food. *Journal of Milk Food Technology* **39** (2), 138-145
- CALCOTT, P.H., MACLEOD, R.A. (1974): Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. *Canadian Journal of Microbiology* **20** (5), 671-681
- CALCOTT, P.H., MACLEOD, R.A. (1975): The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: the relative importance of wall and membrane damage. *Canadian Journal of Microbiology* **21** (12), 1960-1968

## Literaturverzeichnis

---

CALCOTT, P.H., LEE, S.K., MACLEOD, R.A. (1976): The effect of cooling and warming rates on the survival of a variety of bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **22** (1), 106-109

CALCOTT, P.H., STEENBERGEN, S.M., PETTY, R.S. (1979): The effect of freezing and thawing on the uptake and retention of amino acids in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **6** (5), 267-272

CALLISTER, S.M., AGGER, W.A. (1987): Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (2), 249-253

CANADA, J.C., STRONG, D.H., SCOTT, L.G. (1964): Response of *Clostridium perfringens* spores and vegetative cells to temperature variation. *Applied and Environmental Microbiology* **12** (3), 273-276

CARMICHAEL, J.W. (1962): Viability of mold cultures stored at -20°C. *Mycologia* **54**, 432-436

CASARIN, L.S., TONDO, E.C., KLEIN, M.P., BRANDELLI, A. (2009): Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in frozen chicken hamburger. *Journal of Muscle Foods* **20** (4), 478-488

CHATTOPADHYAY, P. (2000): Freezing of Foods. b) Growth and Survival of Microorganisms. In: R.K. ROBINSON, C.A. BATT, P.D. PATEL (eds.): *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, San Diego, 845-849

CHATTOPADHYAY, M.K. (2006): Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of Biosciences* **31** (1), 157-165

CHOW, K.-C., TUNG, W.L. (1998): Overexpression of dna K/dna J and gro EL confers freeze tolerance to *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **253** (2), 502-505

CHRISTOPHERSEN, J. (1968): Effect of freezing and thawing on the microbial population of foodstuffs. In: J. HAWTHORN, E.J. ROLFE (eds.): *Low Temperature Biology of Foodstuffs*, Pergamon Press, Oxford (aus ICMSF 1980)

COCHRANE, V.W. (1958): *Physiology of Fungi*, John Wiley & Sons, Inc., New York

COWMAN, R.A., SPECK, M.L. (1965): Ultra-low temperature storage of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, **48** (11), 1531-1532

DAVIDSON, R.H., DUNCAN, S.E., HACKNEY, C.R., EIGEL, W.N., BOLING, J.W. (2000): Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. *Journal of Dairy Science* **83** (4), 666-673

DAVIES, R., OBAFEMI, A. (1985): Response of Microorganisms to Freeze-Thaw Stress. In: R.K. ROBINSON (ed.): *Microbiology of Frozen Food*, Elsevier Applied Science Publishers, Essex, Chap. 3, 83-107

DEAK, T., BEUCHAT, L.R. (1996): *Handbook of Food Spoilage Yeasts*, CRC Press, Boca Raton, Florida

DEIBEL, R.H. (1964): The Group D Streptococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **28** (3), 330-366

DEMCHICK, P.H., PALUMBO, S.A., SMITH, J.L. (1982): Influence of pH on freeze-thaw lethality in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Safety* **4** (4), 185-189

DGHM - DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (2009): Veröffentlichte mikrobiologische Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln. Stand: November 2007. Universität Bonn, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften. Lebensmittel-Mikrobiologie und Hygiene

DEUTSCHES TIEFKÜHLINSTITUT (2009): Tiefkühlwirtschaft trotz der Krise  
Internet:[http://www.tiefkuehlkost.de/presse/meldungen/pm\\_2010\\_002-tiefkuehlwirtschaft-trotz-der-krise/](http://www.tiefkuehlkost.de/presse/meldungen/pm_2010_002-tiefkuehlwirtschaft-trotz-der-krise/) (Stand 04.05.2010);  
Absatzstatistik2009  
Internet:<http://www.tiefkuehlkost.de/tiefkuehlmarkt/statistiken/absatzstatistik2009/> (Stand 04.05.2010)

DIN, DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2002): Temperaturen für Lebensmittel. Lebensmittelhygiene. DIN 10508, Ersatz für DIN 10501 Bbl 1:1993-06. ICS 67.020; 97130.20, Beuth Verlag, Berlin

## Literaturverzeichnis

---

DODD, C.E.R., RICHARDS, P.J., ALDSWORTH, T.G. (2007): Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology* **120** (1-2), 46-50

DOUDOROFF, M., PALLERONI, N.J. (1974): *Pseudomonas*. In: R.E., BUCHANAN, N.E., GIBBONS (eds.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8<sup>th</sup> ed., Williams&Wilkins Co., Baltimore, 217-243

DOYLE, M.P., SCHOENI, J.L. (1984): Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Applied and Environmental Microbiology* **48** (4), 855-856

DULLER, C. (2006): Einführung in die Statistik mit Excel und SPSS, 2., überarbeitete Auflage, Physica-Verlag, Heidelberg

DUMAN, J.G., OLSEN, T.M. (1993): Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants. *Cryobiology* **30** (3), 322-328

EBERMANN, R., ELMADFA, I. (2008): Gemüse. In: Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung, Springer Verlag, Wien, Kap. 12.2, 383-391

EL-KEST, S.E., MARTH, E.H. (1992): Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganism: A review. *Journal of Food Protection* **55** (8), 639-648

EL-KEST, S.E., YOUSEF, A.E., MARTH, E.H. (1991): Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. *Journal of Food Science* **56** (4), 1068-1071

EL-ZAWAHRY, Y.A., GRECZ, N. (1981): Inactivation and injury of *Yersinia enterocolitica* by radiation and freezing. *Applied and Environmental Microbiology* **42** (3), 464-468

FARKAS, J. (2007): Physical Methods of Food Preservation, Freezing and Frozen Storage. In: M.P. DOYLE, L.R. BEUCHAT (eds.): *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3<sup>rd</sup> ed., ASM Press, Washington D.C., Chap. 32, 685-712

FEHLHABER, K. (2000): „Gefrieren“, „Gefrierkonservierung“. In: E., WIESNER, R., RIBBECK (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4., völlig neu bearbeitete Auflage, Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart

- FEHLHABER, K. (2004): Extrinsic factors. In: H.-J. SINELL (Hrsg.): Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Kap. 3 3.2.3, 116-120
- FENNEMA, O. (1966): An over-all view of low temperature food preservation. *Cryobiology* **3** (3), 197-213
- FENNEMA, O.R., POWRIE, W.D., MARTH, E.H. (1973): Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter, Marcel Dekker Inc., New York
- FLESSA, S., LUSK, D.M., HARRIS, L.J. (2005): Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology* **101** (3), 255-262
- FOSCHINO, R. (2002): Freezing injury of *Escherichia coli* during the production of ice cream. *Annals of Microbiology* **52** (1), 39-46
- FOSTER, R.D., MEAD, G.C. (1976): Effect of temperature and added polyphosphate on the survival of Salmonellae in poultry meat during cold storage. *Journal of Applied Bacteriology* **41** (3), 505-510
- FRANCIS, F.J. (2000): Encyclopedia of Food Science and Technology, 2<sup>nd</sup> ed., University of Massachusetts, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1112-1139
- FRANK, H.A., ISHIBASHI, S.T., REIS, A., ITO, I.S. (1963): Catalase activity of psychrophilic bacteria grown at 2 and 3°C. *Applied and Environmental Microbiology* **11** (2), 151-153
- FRANZ, CH.M.A.P., HOLZAPFEL, W.H., STILES, M. (1999): Enterococci at the crossroads of food safety? Review. *International Journal of Food Microbiology* **47** (1-2), 1-24
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. (1978): Growth of microorganisms at low temperatures. In: Food microbiology, 3<sup>rd</sup> ed., McGraw-Hill Book Co., New York
- FRIEDLER, S., GIUDICE, L.C., LAMB, E.J. (1988): Cryopreservation of embryos and ova. *Fertility and Sterility* **49** (5), 743-764
- FRIES, R., EGGERDING, B. (1997): Bacterial reduction in deep-frozen sterile poultry meat. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **48** (6), 123-127

## Literaturverzeichnis

---

FRUIN, J.T., BABEL, F.J. (1977): Changes in the population of *Clostridium perfringens* type A frozen in a meat medium. *Journal of Food Protection* **40** (9), 622-625

FUNG, D.Y.C., VANDEN BOSCH, L.L. (1975): Repair, growth, and enterotoxigenesis of *Staphylococcus aureus* S-6 injured by freeze-drying. *Journal of Milk and Food Technology* **38** (4), 212-218

GABIS, D.A. (1970): Studies on the effects of low temperature storage on the metabolism of *Escherichia coli*. PhD Thesis, North Carolina State University (aus DAVIES und OBAFEMI 1985)

GEER, L.P., MURRAY, W.T., SMITH, E. (1933): Bacterial content of frosted hamburg steak. *American Journal of Public Health* **23** (7), 673-676

GEIGES, O. (1996): Microbial processes in frozen food. *Advances in Space Research* **18** (12), 109-118

GEIGES, O., SCHULER, U. (1988): Behaviour of microorganisms during long-term storage of food products at subzero temperatures. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* **6** (3), 249-257

GEIGES, O., GLASER, F. (Unveröffentlichte Daten): In: GEIGES, O. (1996). Microbial processes in frozen food. *Advances in Space Research* **18** (12), 109-118

GEORGALA, D.L., HURST, A. (1963): The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *Journal of Applied Bacteriology* **26** (3), 346-358

GILBERT, J.A., HILL, P.J., DODD, C.E.R., LAYBOURN-PARRY, J. (2004): Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology* **150** (1), 171-180

GILLILAND, S.E., SPECK, M.L. (1974): Relationship of cellular components to the stability of concentrated lactic streptococcus cultures at -17°C. *Applied and Environmental Microbiology* **27** (4), 793-796

GOLDEN, D.A., BEUCHAT, L.R., BRACKETT, R.E. (1988): Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *Food Microbiology* **5** (1), 17-23

- GOLDSTEIN, J., POLLITT, N.S., INOUE, M. (1990): Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academie of Sciences of the United States of America* **87** (1), 283-287
- GOMAA, N.F., FAWZI, M., IBRAHIM, N.K., GHONEIM, E. (2002): Assessment of safety of frozen foods. *Journal of the Egyptian Public Health Association* **77** (5-6), 499-515
- GORMLEY, R., WALSH, T., HUSSEY, K., BUTLER, F. (2002): The effect of fluctuation vs. constant frozen storage temperature regimes on some quality parameters of selected food products. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **35** (2), 190-200
- GOTLIB, M.A. (1951): Influence du froid sur la vie microbienne des aliments. *Res. Cons. (France)* **3** (6), 45-46 (aus BORGSTROM 1955)
- GOULD, G.W., DRING, G.J. (1975): Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature* **258** (5534), 402-405
- GRAUMANN, P., SCHRÖDER, K., SCHMID, R., MARAHIEL, M.A. (1996): Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **178** (15), 4611-4619
- GRECZ, N., EL-ZAWAHRY, Y.A. (1984): Effect of radiation and freezing on (<sup>3</sup>H) DNA of *Yersinia enterocolitica*. *Applied and Environmental Microbiology* **47** (5), 1101-1105
- GRECZ, N., HAMMER, T.L., ROBNETT, C.J., LONG, M.D. (1980): Freeze-thaw injury: evidence for double strand breaks in *Escherichia coli* DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **93** (4), 1110–1113
- GREENWAY, D. L. A., DYKE, K. G. H. (1979): Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* **115** (1), 233-245
- GUNDERSON, M.F., ROSE, K.D. (1948): Survival of bacteria in a precooked fresh-frozen food. *Journal of Food Science* **13** (3), 254-263
- HAHN, S.S., APPLEMAN, M.D. (1952 a): Microbiology of frozen orange concentrate. I. Survival of enteric organisms in frozen orange concentrate. *Food Technology* **6**, 156-158

## Literaturverzeichnis

---

HAHN, S.S., APPLEMAN, M.D. (1952 b): Microbiology of frozen orange concentrate. II. Factors influencing the survival of microorganisms in frozen orange concentrate. *Food Technology* **6**, 165-167

HAINES, R.B. (1938): The effect of freezing on bacteria. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, *Biological Sciences* **124** (837), 451-463

HALL, L.P. (1969): The Effects of Freezing, Storing and Mishandling on Microbial Populations in Frozen Vegetables. Vol. 1. Campden Food Preserv. Research Association, Chipping Campden, England (aus ICMSF 1980 a)

HANAFUSA, N. (1967): Denaturation of Enzyme Protein by Freeze-thawing. The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

HANNA, M.O., STEWART, J.C., ZINK, D.L., CARPENTER, Z.L., VANDERZANT, C. (1977): Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. *Journal of Food Science* **42** (5), 1180-1184

HANSEN, I.A., NOSSAL, P.M. (1955): Morphological and biochemical effects of freezing of yeast cells. *Biochimica et biophysica acta* **16**, 502-512

HARRISON, M.A., HUANG, Y.W., CHAO, C.H., SHINEMAN, T. (1991): Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. *Journal of Food Protection* **54** (7), 534-537

HARTSELL, S.E. (1949): The testing of frozen eggs for pathogens. *Journal of Milk and Food Technology* **12** (2), 107-108

HARTSELL, S.E. (1951): The longevity and behaviour of pathogenic bacteria in frozen foods: The influence of plating media. *American Journal of Public Health and the Nation's Health* **41** (9), 1072-1077

HARVEY, R.B. (1918): In: STILLE, B. (1948). Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **14**, 555-587



- HAZEN, T.C., FLIERMANS, C.B., HIRSCH, R.P., ESCH, G.W. (1978): Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Applied and Environmental Microbiology* **36** (5), 731-738
- HÉBRAUD, M., POTIER, P. (1999): Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1** (2), 211-219
- HEENAN, C.N., ADAMS, M.C., HOSKEN, R.W., FLEET, G.H. (2004): Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* **37** (4), 461-466
- HEISS, R., EICHNER, K. (1995): Tiefgefrieren von Lebensmitteln. Einfrieren, Grundlagen. In: Haltbarmachen von Lebensmitteln. Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Verfahren, 3. überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer Verlag, Berlin, Kap.7 1.1, 156-164
- HEKMAT, S., MCMAHON, D.J. (1992): Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. *Journal of Dairy Science*, **75** (6), 1415-1422
- HILLIARD, C.H., DAVIS, M.A. (1918): The germicidal action of freezing temperatures upon bacteria. *Journal of Bacteriology* **3** (4), 423-431
- HOBBS, B.C. (1976): Food poisoning and food hygiene, 3<sup>rd</sup> ed., Edward Arnold Ltd., London
- HOLLANDER, D.H., NELL, E.E. (1954): Improved preservation of *Treponema pallidum* and other bacteria by freezing with glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **2** (3), 164-169
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T (1994): Enterobacteriaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9<sup>th</sup> ed., Williams&Wilkins, Baltimore, 175-189
- HUBÁLEK, Z. (2003): Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46** (3), 205-229

## Literaturverzeichnis

---

HUCKER, G.J. (1954): Low temperature organisms in frozen vegetables. *Food Technology* **8**, 79-82

HUCKER, G.J., BROOKS, R.F., EMERY, A. (1952): The source of bacteria on processing and their significance in frozen vegetables. *Food Technology* **6**, 147-155

HURST, A. (1977): Bacterial injury: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **23** (8), 935-944

HURST, A. (1984): Revival of vegetative bacteria after sublethal heating. In: M.H. ANDREW, A.D. RUSSELL (eds.): Revival of Injured Microbes, Society for Applied Bacteriology Symposium Series, No 12, Academic Press Inc., London, Orlando, 77-103

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980 a): Temperature. In: Microbial Ecology of Foods. Volume I: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms, 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, Inc., London, Chap. 1, 1-37

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980 b): Vegetables, Precooked frozen foods In: Microbial Ecology of Foods. Volume II: Food Commodities, 1<sup>st</sup> ed. Academic Press, Inc., New York, Chap. 21 II., 607-615, Chap. 27 IV., 828-829

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996): Microorganisms in Foods, Volume 5, Microbiological Specifications of food pathogens, 1<sup>st</sup> ed., James & James, Blackie Academic & Professional, London

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2005): Frozen meat. In: Microorganisms in Foods, Volume 6, Microbial Ecology of Food Commodities, 2<sup>nd</sup> ed., Kluwer Academic/Plenum, New York, Chap. 1, 52-54

INGRAM, M., MACKEY, B. M. (1976): Inactivation by cold. In: F.A. SKINNER, W.B. HUGO (eds.): Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes, Society for Applied Bacteriology Symposium Series No. 5, Academic Press, London, 111-151

JAY, J.M. (1978): Food Preservation by the use of low temperatures. In: Modern Food Microbiology, 2<sup>nd</sup> ed., D. Van Nostrand Company, New York, Chap. 11, 209-221

JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. (2005): Protection of foods with low temperatures. In: *Modern Food Microbiology*. 7<sup>th</sup> ed., Springer Science + Business Media, New York, Chap. 16, 395-409

JANSSEN, D.W., BUSTA, F.F. (1973 a): Repair of injury in *Salmonella anatum* cells after freezing and thawing in milk. *Cryobiology* **10** (5), 386-392

JANSSEN, D.W., BUSTA, F.F. (1973 b): Influence of milk components on the injury, repair of injury, and death of *Salmonella anatum* cells subjected to freezing and thawing. *Applied and Environmental Microbiology* **26** (5), 725-732

JOHNS, C.K., BERARD, H.L. (1946): The effect of freezing and cold storage upon the bacterial content of egg melange. *Scientific Agriculture* **26** (1), 34-42

JONES, A.H., LOCHHEAD, A.G. (1939): A study of micrococci surviving in frozen pack vegetables and their enterotoxic properties. *Journal of Food Science* **4** (2), 203-216

JONES, P.G., INOUE, M. (1994): The cold-shock response – A hot topic. *Molecular Microbiology* **11** (5), 811-818

JONES, P.G., VAN BOGELEN, R., NEIDHARDT, F.C. (1987): Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169** (5), 2092-2095

KANNAN, K., JANİYANI, K.L., SHIVAJI, S., RAY, M.K. (1998): Histidine utilisation operon (hut) is upregulated at low temperature in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters* **161** (1), 7-14

KAPLAN, M.T., APPLEMAN, M.D. (1952): Microbiology of frozen orange concentrate. III. Studies of enterococci in frozen concentrated orange juice. *Food Technology* **6**, 167-170

KARIPTAS, E., ERDEM, B., TULUMOGLU, S. (2010): Effects of different temperatures on virulence factors and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from retail food. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **61** (2), 57-62

KAWAHARA, H., KODA, N., OSHIO, M., OBATA, H. (2000): A cold acclimation protein with refolding activity on frozen denaturated enzymes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **64** (12), 2668-2674

## Literaturverzeichnis

---

KAYA, M., SCHMIDT, U. (1989): Verhalten von *Listeria monocytogenes* im Hackfleisch bei Kühl- und Gefrierlagerung. *Fleischwirtschaft* **69** (4), 616-620

KEITH, S.C., JR. (1913): Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water. *Science* **37** (962), 877-879

KIERMEIER, F. (1947): Der Einfluss des Gefrierens auf die Wirksamkeit von Fermenten. *Biochemische Zeitschrift* **318**, 275-296

KIM, S., LIM, C., LEE, C., AN, G. (2009): Optimization of growth and storage conditions for Lactic Acid bacteria in yogurt and frozen yogurt. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **52** (1), 76-79

KITCHELL, A.G., INGRAM, M. (1959): The survival of bacteria on frozen meat and their growth after thawing. Proceedings. 10<sup>th</sup> International Congress of Refrigeration, Copenhagen **3**, 65-70

KLEER, J. (2004): *Yersinia enterocolitica*, Andere Enterobacteriaceae und weitere Opportunisten, *Aeromonas* spp. In: H.-J. SINELL (Hrsg.): Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. neu bearbeitete Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Kap. 2 2.3.1.3, 37-40, 2.3.1.5, 42-43, 2.3.1.9, 50-51

KLEER, J., HILDEBRANDT, G. (2000): Mikrobiologischer Status von Tiefkühlkost. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **51** (2), 42-45

KNØCHEL, S. (1990): Growth characteristics of motile *Aeromonas* spp. isolated from different environments. *International Journal of Food Microbiology* **10** (3-4), 235-244

KNUDSEN, D.M., YAMAMOTO, S.A., HARRIS, L.J. (2001): Survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh and frozen strawberries. *Journal of Food Protection* **64** (10), 1483-1488

KOBURGER, J.A. (1981): Effect of frozen storage on fungi in foods. *Journal of Food Protection* **44** (4), 300-301

KOGA, T., TAKUMI, K. (1995): Nutrient starvation induces cross protection against heat, osmotic, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Vibrio parahemolyticus*. *Microbiology and Immunology* **39** (3), 213-215

KRAMER, J.M., GILBERT, R.J. (1989): *Bacillus cereus* and other Bacillus species. In: M.P. DOYLE (ed.): Foodborne Bacterial Pathogens, Marcel Dekker Inc., New York, 22-70

KRÄMER, J. (2007): Tiefkühlkost. In: K. FEHLHABER, J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.): Handbuch Lebensmittelhygiene, 1. Auflage, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. XIII 5, 897-918

KURZHALS, H.A. (2004): Grundlagen des Kühlens und Tiefgefrierens von Lebensmitteln. Allgemeines. In: K. LÖSCHE (Hrsg.): Kältetechnologie in der Bäckerei, 1. Auflage 2003, unveränderter Nachdruck 2004, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. 2 2.3.5.1, 73-76

LARKIN, E.P., LITSKY, W., FULLER, J.E. (1955 a): Fecal Streptococci in frozen foods. I. A Bacteriological survey of some commercially frozen foods. *Applied and Environmental Microbiology* **3** (2), 98-101

LARKIN, E. P., LITSKY, W., FULLER, J. E. (1955 b): Fecal Streptococci in frozen foods. II. Effect of freezing storage on *Escherichia coli* and some fecal Streptococci inoculated onto green beans. *Applied and Environmental Microbiology* **3** (2), 102-104

LARKIN, E. P., LITSKY, W., FULLER, J. E. (1955 c): Fecal Streptococci in frozen foods. III. Effect of freezing storage on *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, and *Streptococcus liquefaciens* inoculated into orange concentrate. *Applied and Environmental Microbiology* **3** (2), 104-106

LECHNER, S., MAYR, R., FRANCIS, K.P., PRÜß, B.M., KAPLAN, T., WIEßNER-GUNKEL, E., STEWART, G.S., SCHERER, S. (1998): *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** (4), 1373-1382

LEE, S.K., CALCOTT, P.H., MACLEOD, R.A. (1977): Relationship of cytochrome content to the sensitivity of bacteria to NaCl on freezing and thawing. *Canadian Journal of Microbiology* **23** (4), 413-419

## Literaturverzeichnis

---

LEYER, G.L., JOHNSON, E.A. (1993): Acid adaptation induces cross protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (6), 1842-1847

LHULLIER, M., COULANGES, P., PAGESY, H., FELISTE, J. (1977): Résistance aux basses températures des bactéries responsables de toxiinfections alimentaires et isolées d'aliments d'origine marine. *Nouvelle presse médicale* **6**, 1660

LI, H., LU, M., GUO, H., LI, W., ZHANG, H. (2010): Protective effect of sucrose on the membrane properties of *Lactobacillus casei* Zhang subjected to freeze-drying. *Journal of Food Protection* **37** (4), 715-719

LILLARD, H.S. (1977): Effect of freezing on incidence and levels of *Clostridium perfringens* in mechanically deboned chicken meat. *Poultry Science* **56** (6), 2052-2055

LIN, C., YU, R.-C., CHOU, C.-C. (2004): Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *International Journal of Food Microbiology* **92** (2), 207-215

LLOYD, G.T., PONT, E.B. (1973): An experimental continuous-culture unit for the production of frozen concentrated cheese-starters. *Journal Dairy Research* **40** (2), 149-155

LOCHHEAD, A.G., JONES, A.H. (1938): Types of bacteria surviving in frozen-pack vegetables. *Journal of Food Science* **3** (3), 299-306

LOPEZ, M.C., MEDINA, L.M., JORDANO, R. (1998): Survival of Lactic Acid bacteria in commercial frozen yogurt. *Journal of Food Science* **63** (4), 706-708

LOVELOCK, J.E. (1954): Physical instability and thermal shock in red cells. *Nature* **173**, 659-661

LUEDECKE, L.O., FORSTER, T.L., WILLIAMS, K., HILLERS, J.K. (1972): Effect of freezing and storage at -20°C on survival of mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **55** (4), 417-418

LUND, B.M. (2000): Chap. 6: Freezing. In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Vol. I., B.M. LUND, T.C. BAIRD PARKER, G.W. GOULD (eds.), Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, 122-145

MA, Y., HU, X., CHEN, J., CHEN, F., WU, J., ZHAO, G., LIAO, X., WANG, Z. (2007): The Effect of freezing modes and frozen storage on aroma, enzyme and micro-organism in hami melon. *Food Science and Technology International* **13** (4), 259-267

MACKEY, B.M., DERRICK, C.M., THOMAS, J.A. (1980): The recovery of sublethally injured *Escherichia coli* from frozen meat. *Journal of Applied Bacteriology* **48**, 315-324

MACLEOD, R.A., CALCOTT, P.H. (1976): Cold shock and freezing damage to microbes. In: T.R. GRAY, J.R. POSTGATE (eds.): The Survival of Vegetative Microbes, Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge University Press, **26**, 81-109

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. (2006): Umwelteinflüsse auf mikrobielles Wachstum: Temperatur. In: Brock, Mikrobiologie, 11. überarbeitete Auflage, Pearson Studium, München, Kap. 6 6.4, 166-171

MAGARIÑOS, H., SELAIVE, S., COSTA, M., FLORES, M., PIZARRO, O. (2007): Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. *International Journal of Dairy Technology* **60** (2), 128-134

MALICKI, A., BRUZEWICZ, S. (2007): Quantitative changes of microflora during the storage of frozen chips. *Zywnosc Nauka Technologia Jakosc* (Poland) **14** (2), 120-125

MARCY, G., ADAM, W. (1979): Abnahme der Keimmengen von *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* in Speiseeis nach längerer Lagerung bei -28° C. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **30** (2), 70-72

MARR, A.G., INGRAHAM, J.L. (1962): Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **84** (6), 1260-1267

MAZUR, P. (1961): Physical and temporal factors involved in the death of yeast at subzero temperatures. *Biophysical Journal* **1** (3), 247-264

MAZUR, P. (1965): Causes of injury in frozen and thawed cells. Federation Proceedings, Federation of American Society of Experimental Biology **24** Suppl. 15, 175-182

## Literaturverzeichnis

---

MAZUR, P. (1966): Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In: H.T. MERYMAN (ed.): *Cryobiology*, Academic Press, London, 214-315

MAZUR, P. (1977): Slow-freezing injury in mammalian cells. In: K. ELLIOT und J. WHELAN (eds.): *The Freezing of Mammalian Embryos*, Elsevier Excerpta Media, Amsterdam, Chap.3, 19-42

MAZUR, P. (1980): Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. 9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and artificial insemination, Madrid **1**, 99-114

MCCLESKEY, C. S., CHRISTOPHER, W. N. (1941): Some factors influencing the survival of pathogenic bacteria in cold-pack strawberries. *Food Research* **6**, 327-333

MCCORMACK, G. (1950): Pink yeast isolated from oysters grown at temperatures below freezing. *Commercial Fisheries Review* **12**, 28

McFARLANE, V.H. (1942): Behaviour of micro-organisms in fruit juices and in fruit juice sucrose solutions stored at -17,8°C (0°F). *Journal of Food Science* **7** (6), 509-518

McFARLANE, V.H., GORESLINE, H.E. (1943): Microbial destruction in buffered water and in buffered sugar sirups at -17,8°C (0°F.). *Journal of Food Science* **8** (1), 67-77

McFETERS, G.A. (1989): Detection and significance of injured indicator and pathogenic bacteria in water: In: B. RAY (ed.): *Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Food, Water and Feed*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Chap.7, 179-210

MERYMAN, H.T. (1974): Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **3** (0), 341-363

MERYMAN, H.T., WILLIAMS, R.J., DOUGLAS, M.ST.J. (1977): Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology* **14** (3), 287-302

MEYER, E.D., SINCLAIR, N.A., NAGY, B. (1975): Comparison of the survival and metabolic activity of psychrophilic and mesophilic yeasts subjected to freeze-thaw stress. *Applied and Environmental Microbiology* **29** (6), 739-744



- MEYER, D.H., DONNELLY, C.W. (1992): Effect of incubation temperature on repair of heat-injured *Listeria* in milk. *Journal of Food Protection* **55** (8), 579-582
- MICHENER, H.D., ELIOTT, R.P. (1964): Minimum growth temperatures for food-poisoning, fecal-indicator, and psychrophilic microorganisms. *Advances in Food Research* **13**, 349-396
- MITSCHERLICH, E., MARTH, E.H. (1984): Units and commentaries on behavior of bacteria. General physicochemical influences: cold resistance. In: *Microbial Survival in the Environment. Bacteria and Rickettsiae important in human and animal health*. Springer Verlag, Berlin, New York, III. 1, 709
- MORI, Y., HIROKO, S., NEI, T. (1986): Freezing injury in the yeast respiratory system. *Cryobiology* **23** (1), 64-71
- MOSSEL, D.A.A., VELDMAN, A., EELDERINK, I. (1980): Comparison of the effects of liquid medium repair and the incorporation of catalase in MacConkey type media on the recovery of Enterobacteriaceae sublethally stressed by freezing. *Journal of Applied Bacteriology* **49** (3), 405-419
- MOUNTNEY, G.J., GOULD, W.A. (1988): Low-temperature food preservation. In: *Practical Food Microbiology and Technology*, 3<sup>rd</sup> ed., AVI Book, New York, Chap. 7, 99-117
- MÜLLER, T., ULRICH, E.-M., MÜLLER, M. (2001): Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology* **91** (2), 268-278
- MÜLLER, G., MÜLLER, C. (1996): Kälteanwendung. In: G. MÜLLER, H. WEBER (Hrsg.): *Mikrobiologie der Lebensmittel. Grundlagen*, 8. Auflage. Behr's Verlag, Hamburg, Kap. 7 3.4, 317-326
- MÜLLER-THURGAU, H. (1880): In: STILLE, B. (1948). Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. *Archiv für Lebensmittelhygiene* Bd.14, 555
- MUNDT, J.O., GRAHAM, W.F., MCCARTY, I.E. (1967): Spherical Lactic Acid-producing bacteria of southern-grown raw and processed vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* **15** (6), 1303-1308

## Literaturverzeichnis

---

MURATA, N., WADA, H. (1995): Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Review. *Biochemical Journal* **308**, 1-8

NEI, T. (1960): Effects of freezing and freeze-drying in microorganisms. In: A.S. PARKES, A.U. SMITH (eds.): *Recent Research in Freezing and Drying*. Blackwell, Oxford, 76-86

O'DRISCOLL, B., GAHAN, C.G.M., HILL, C. (1996): Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* **62** (5), 1693-1698

OBAFEMI, A. (1983): The survival of *Salmonella typhimurium* in processed frozen poultry. PhD Thesis, University of Reading, England (aus DAVIES und OBAFEMI 1985)

OLIVEIRA, S.R., CRUZ, R.M.S., VIEIRA, M.C., SILVA, C.L.M., GASPAR, M.N. (2009): *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* behaviour in frozen watercress (*Nasturtium officinale*) submitted to temperature abuses. *International Journal of Refrigeration* **32** (3), 472-477

OSCROFT, C.A., ALCOCK, S.J., CLAYDEN, J.A. (1987): Recovery of sub-lethally injured bacteria from frozen foods. *Food Microbiology* **4** (3), 257-268

OSTROLENK, M., KRAMER, N., CLEVERDON, R.C. (1947): Comparative studies of Enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. *Journal of Bacteriology* **53** (2), 197-203

OYARZÁBAL, O.A., NOGUEIRA, M.C.L., GOMBAS, D.E. (2003): Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrates. *Journal of Food Protection* **66** (9), 1595-1598

PALUMBO, S.A. (1989): Injury in emerging foodborne pathogens and their detection. In: B. RAY (ed.): *Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Food, Water and Feeds*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Chap. 4, 115-132

PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C. (1991): Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiology* **8**, 63-68

PALUMBO, S.A., MORGAN, D.R., BUCHANAN, R.L. (1985): Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Science* **50** (5), 1417-1421

- PANOFF, J.-M., CORROLER, D., THAMMAVONGS, B., BOUTIBONNES, P. (1997): Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Journal of Bacteriology* **179** (13), 4451-4454
- PANOFF, J.-M., THAMMAVONGS, B., GUÉGUEN, M., BOUTIBONNES, P. (1998): Cold stress responses in mesophilic bacteria. Review. *Cryobiology* **36** (2), 75-83
- PARK, L. W. (1936): Sanitary significance of the succession of coli-aerogenes organisms in fresh and stored feces. *American Journal of Public health* **26** (1), 39-45
- PARK, H.S., MARTH, E.H., OLSON, N.F. (1973): Fate of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* during the the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Milk and Food Technology* **36** (11), 543-546
- PARK, Y.W., KALANTARI, A., FRANK, J.F. (2004): Changes in the microflora of commercial soft goat milk cheese during refrigerated and frozen-storage. *Small Ruminant Research* **53** (1-2), 61-66
- PARTMANN, W. (1975): The effects of freezing and thawing on food quality. In: Water Relations of Foods, R.B. DUCKWORTH (ed.), Academic Press, New York, 505-537 (aus CHATTOPADHYAY 2000)
- PETERSON, A.C., GUNDERSON, M.F. (1960 a): Role of psychrophilic bacteria in frozen food spoilage. *Food Technology* **14**, 413-417
- PETERSON, A.C., GUNDERSON, M.F. (1960 b): Some characteristics of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **8** (2), 98-104
- PIJCK, J., SCHUTYZER, G. (1972): The survival of pathogenic Staphylococci in dairy products. *Journal de pharmacie de Belgique* **27** (1), 87-97
- POWERS, E.M., LATT, T.G. (1979): Rapid enumeration and identification of stressed fecal coliforms. *Journal of Food Protection* **42** (4), 342-345
- PRADOS, F., PINO, A., RINCÓN, F., VIOQUE, M., FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. (2006): Influence of the frozen storage on some characteristics of ripened Manchego-type cheese manufactured with a powdered coagulant and rennet. *Food Chemistry* **95** (4), 677-682

## Literaturverzeichnis

---

PROCTOR, B.E., PHILLIPS, A.W. (1948): Frozen precooked foods. *American Journal of Public Health* **38** (1 Pt 1), 44-49

RACCACH, M., BAMIRO, T., CLINCH, J., COMBS, G., GIERCZYNSKI, A., KARAM, R. (2002): Frozen storage of *Escherichia coli* O157:H7 in vegetable broth. *Food Control* **13** (6-7), 381-385

RAJ, H., LISTON, J. (1961): Survival of bacteria of public health significance in frozen sea foods. *Food Technology* **15**, 429-434

RAPATZ, G., LUYET, B. (1963): Electron microscopy study of the formation of ice in bacteria upon freezing of their suspensions. Abstr. WE11. Abstr. 7<sup>th</sup> Annu. Meet. Biophysical Society, Bethesda, Md aus: FONSECA, F., MARIN, M., MORRIS, G.J. (2006): Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions: Freezing kinetics and storage temperature effects. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (10), 6474-6482

RAY, B. (1979): Methods to detect stressed microorganisms. *Journal of Food Protection* **42** (4), 346-355

RAY, B. (1986): Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. *Journal of Food Protection* **49** (8), 651-655

RAY, B. (1989): Enumeration of injured indicator bacteria from foods. In: *Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Foods, Water and Feeds*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, Chap. 1, 9-54

RAY, B. (1993): Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. *American Society for Microbiology News* **59** (6), 285-291

RAY, B., SPECK, M.L. (1972 a): Repair of injury induced by freezing *Escherichia coli* as influenced by recovery medium. *Applied and Environmental Microbiology* **24** (2), 258-263

RAY, B., SPECK, M.L. (1972 b): Metabolic process during the repair of freeze-injury in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **24** (4), 585-590

RAY, B., SPECK, M.L. (1973 a): Enumeration of *Escherichia coli* in frozen samples after recovery from injury. *Applied and Environmental Microbiology* **25** (4), 499-503

RAY, B., SPECK, M.L. (1973 b): Freeze-injury in bacteria. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **4** (2), 161-213

RAY, B., SPECK, M.L., DOBROGOSZ, W.J. (1976): Cell wall lipopolysaccharide damage in *Escherichia coli* due to freezing. *Cryobiology* **13** (2), 153-160

RAY, M.K., DEVI, K.U., KUMAR, G.S., SHIVAJI, S. (1992): Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. *Applied and Environmental Microbiology* **58** (6), 1918-1923

RAY, M.K., KUMAR, G.S., SHIVAJI, S. (1994 a): Phosphorylation of membrane proteins in response to temperature in an Antarctic *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* **140** (12), 3217-3223

RAY, M.K., KUMAR, G.S., SHIVAJI, S. (1994 b): Phosphorylation of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotroph *Pseudomonas syringae*: a possible role in temperature adaptation. *Journal of Bacteriology* **176** (14), 4243-4249

RAY, M.K., KUMAR, G.S., JANİYANI, K., KANNAN, K., JAGTAP, P., BASU, M.K., SHIVAJI, S. (1998): Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in Antarctic psychrotrophic bacteria. *Journal of Biosciences* **23** (4), 423-435

RIVKINA, E.M., FRIEDMANN, E.I., MCKAY, C.P., GILICHINSKY, D.A. (2000): Metabolic activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Applied and Environmental Microbiology* **66** (8), 3230-3233

ROBERTS, T.A., HOBBS, G. (1968): Low temperature growth characteristics of Clostridia. *Journal of Applied Bacteriology* **31** (1), 75-88

ROBERTS, T.A., HOBBS, G., CHRISTIAN, J.H.B., SKOVGAARD, N. (1982): Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity, Academic Press, New York

ROSE, A.H. (1968): Physiology of microorganisms at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology* **31** (1), 1-11

RUTSCH, C. (1987): Versuche zum Nachweis von Shigellen in Lebensmitteln. Inaugural Dissertation, Freie Universität Berlin, Journal Nr. 1312, 116-20

## Literaturverzeichnis

---

RYU, J.H., BEUCHAT, L.R. (1998): Influence of acid tolerance responses on survival growth and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology* **45** (3), 185-193

SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S. (2004): Genera von Schimmelpilzen in Lebens-und Futtermitteln. In: J BAUMGART, B. BECKER (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 5. aktualisierte und erweiterte Auflage, Studienausgabe, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. VI.4, 515-543

SANDERSON, N.H., FITZGERALD, G.A. (1940): Bacteriological flora during spoilage of frozen vegetables. *International Congress of Microbiology* **3**, 710

SATO, S. (1958): Morphological and functional changes of *Bac. megatherium* caused by freeze-thawing or freeze-drying. *Low Temperature Science*, **16**, 107-127

SATO, N., MURATA, N. (1981): Studies on the temperature shift-induced desaturation of fatty acids in monogalactosyl diacylglycerol in the blue-green alga (cyanobacterium), *Anabaena variabilis*. *Plant and Cell Physiology* **22** (6), 1043-1050

SCHANDER, R., SCHAFFNIT, E. (1919): In: STILLE, B. (1948). Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **14**. 555-587

SCHMIDT-LORENZ, W. (1963): Microbieller Verderb gefrorener Lebensmittel während der Gefrierlagerung. *Kältetechnik* **15**, 39

SCHMIDT-LORENZ, W. (1970): Psychrophile Mikroorganismen und tiefgefrorene Lebensmittel. *Alimenta* **9** (1), 32-45

SCHMIDT-LORENZ, W. (1974): Bedeutung der Anwesenheit von Mikroorganismen in Lebensmitteln. Gefrorene und tiefgefrorene Lebensmittel. Conference Proceedings, Federazione delle Associazione Scientifiche e Tecniche (Symposium), Italy

SCHMIDT-LORENZ, W. (1976): Über die Bedeutung der Anwesenheit von Mikroorganismen in gefrorenen und tiefgefrorenen Lebensmitteln. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **9** (5), 263–273

SCHMIDT-LORENZ, W., GUTSCHMIDT, J. (1968): Mikrobielle und sensorische Veränderungen gefrorener Lebensmittel bei Lagerung im Temperaturbereich von -2,5°C bis -10 °C. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1**, 26-43

SCHMIDT-LORENZ, W., SPILLMANN, H. (1988): Kritische Überlegungen zum Aussagewert von *E. coli*, Coliformen und Enterobacteriaceen in Lebensmitteln. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **39**, 3-15

SHERIDAN, J.J. (1997): The effect of freezing survival of pathogens in different meat types and the effect of varying lean fat ratios. *Hygiene Review*. The Society of Food Hygiene and Technology. [http://www.sofht.co.uk/isfht/irish\\_97.freezing.htm](http://www.sofht.co.uk/isfht/irish_97.freezing.htm) (Stand 12.05.2010)

SHEU, C. W., FREESE, E. (1973): Lipopolysaccharide layer protection of gram negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids. *Journal of Bacteriology* **115** (3), 869-875

SIEGEL, S.M., NATHAN, H.C., ROBERTS, K. (1968): Experimental biology of ammonia-rich environments: Optical and isotopic evidence for vital activity in *Penicillium* in liquid ammonia-glycerol media at -40°C. *Proceedings of the National Academy of Science* **60**, 505-508

SIELAFF, H. (1968): Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose. *Monatshefte für Veterinärmedizin* **21**, 750-758

SINGHAL, R.S., KULKARNI, P.R. (2000): Freezing of Foods. a) Damage to Microbial Cells. Nature of Freezing Process. In: R.K. ROBINSON, C.A. BATT, P.D. Patel (eds.): *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, London, 840-845

SMART, H.F. (1934): Microorganisms surviving the storage period of frozen pack fruit and vegetables. *Phytopathology* **24**, 1319-1333

SMART, H.F. (1939): Microbiological studies on commercial packs of frozen fruits and vegetables. *Food Research* **4** (3), 293-298

SØLTOFT-JENSEN, J., HANSEN, F. (2005): Citric Acid. In: D.-W. SUN (ed.): *Emerging Technologies for Food Processing*, Elsevier Academic Press, San Diego, London, Chap. 15 2.7, 393-394

## Literaturverzeichnis

---

SOUZU, H. (1973): Proceedings: The phospholipid degradation and cellular death caused by freeze-thawing or freeze-drying of yeast. *Cryobiology* **10** (5), 427-431

SOUZU, H. (1980): Studies on the damage to *Escherichia coli* cell membrane caused by different rates of freeze-thawing. *Biochimica et biophysica acta* **603** (1), 13-26

SOUZU, H. (1982): *Escherichia coli* B membrane stability related to cell growth phase. Measurement of temperature dependent physical state change of the membrane over a wide range. *Biochimica et Biophysica Acta* **691** (1), 161-170

SPECK, M.L., RAY, B. (1977): Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: A Review. *Journal of Food Protection* **40** (5), 333-336

SPLITTSTOESSER, D.F. (1970): Predominant microorganisms on raw plant foods. *Journal of Milk and Food Technology* **33** (11), 500-505

STELZNER, A., URBACH, H. (1969): The viability of *Shigella* in meat. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* **153** (6), 532-537

STEVENSON, K.E., GRAUMLICH, T.R. (1978): Injury and recovery of yeasts and molds. *Advances in Applied Microbiology* **23**, 203-217

STILLE, B. (1948): Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **14**, 555-587

STOLLE, A. (2004): Haltbarmachung und sonstige Behandlung von Lebensmitteln. Kälte. In: H.-J. SINELL (Hrsg.): Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart, Kap.4 4.2.1.1, 116-120

STRAKA, R.P., STOKES, J.L. (1959): Metabolic injury to bacteria at low temperatures. *Journal of Bacteriology* **78** (2), 181-185

STRAWN, L. K., DANYLUK, M. D. (2010): Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology* **138** (1-2), 78-84



- STRONG, D.H., CANADA, J.C. (1964): Survival of *Clostridium perfringens* in frozen chicken gravy. *Journal of Food Science* **29** (4), 479-482
- SULZBACHER, W.L. (1950): Survival of microorganisms in frozen meat. *Food Technology* **4**, 386-390
- SUZUKI, L., KANESAKI, Y., MIKAMI, K., KANEHISA, M., MURATA, N. (2001): Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik 33 in *Synechocystis*. *Molecular Microbiology* **40** (1), 235-244
- SWANSON, K.M.J. (1990): Microbial counts on fresh vegetables prior to processing (aus ICMSF 2005)
- TAORMINA, P.J., DORSA, W.J. (2010): Survival and death of *Listeria monocytogenes* on cooked bacon at three storage temperatures. *Food Microbiology* **27** (5), 667-671
- TABATABAIE, F., MORTAZAVI, A. (2008): Studying the effects of heat and cold shock on cell wall microstructure and survival of some LAB in milk. *World Applied Sciences Journal* **4** (2), 191-194
- TAKANO, M., SIMBOL, A.B., YASIN, M., SHIBASAKI, I. (1979): Bactericidal effect of freezing with chemical agents. *Journal of Food Science* **44** (1), 112-115
- THAMMAVONGS, B., DENOUE, E., MISSOUS, G., GUÉGUEN, M., PANOFF, J.-M. (2008): Response to environmental stress as a global phenomenon in biology: the example of microorganisms. Minireview. *Microbes and Environments* **23** (1), 20-23
- TRAKULCHANG, S.P., KRAFT, A.A. (1977): Survival of *Clostridium perfringens* in refrigerated and frozen meat and poultry items. *Journal of Food Science* **42** (2), 518-521
- TROLLER, J.A., CHRISTIAN, J.H.B. (1978): *Water Activity and Food*, Academic Press, New York
- TSEN, J.-H., HUANG, H.Y., LIN, Y.-P., KING, V. (2007): Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *Journal of Microbiological Methods* **70** (3), 561-564

## Literaturverzeichnis

---

TSVETKOV, T., SHISHKOVA, I. (1982): Studies on the effects of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology* **19** (2), 211-214

TUCHSCHNEID, M.V., EMBLIK, E. (1959): Die Kältebehandlung schnellverderblicher Lebensmittel, 3. Auflage, neu bearbeitet und erweitert von Dr.-Ing. Ed. Emblik, Brücke Verlag Kurt Schmiersow, Hannover

VAN DEN BROEK, C.J.H. (1949): Het bederf van dierlijke voedingsmiddelenlage temperaturen. I. *Chemische Weekblad* **45**, 777-784 (aus BORGSTROM 1955)

VAUGHN, R.H., STADTMAN, T.C., KEUNEMANN, R.W. (1946): Control of microorganisms in frozen food plants. *Quick Frozen Foods* **9**, 76-78, 114

Verordnung über tiefgefrorene Lebensmittel (TLMV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Februar 2007 (Bundesgesetzblatt I S. 258). Stand: Neugefasst durch Bek. v. 22.2.2007 I 258; geändert durch Art. 12 V v. 8.8.2007 I 1816

VITAS, A.I., AGUADO, V., GARCIA-JALON, I. (2004): Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology* **90** (3), 349-356

WADA, H., MURATA, N. (1990): Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis PCC6803*. *Plant Physiology* **92** (4), 1062-1069

WALLACE, G.I., PARK, S.E. (1933): Microbiology of frozen foods. IV. Longevity of certain pathogenic bacteria in frozen cherries and in frozen cherry juice. *The Journal of Infectious Diseases* **52** (2), 146-149

WALLACE, G.I., TANNER, F.W. (1934): Microbiology of frozen foods. II. Studies on frozen fruits and vegetables. *Fruit Products Journal* **13** (9), 274-77; (12), 366-69, 377

WALLACE, G.I., TANNER, F.W. (1935): Microbiology of frozen foods. III. Longevity of pure cultures of microorganisms frozen in various menstr. *Fruit Products Journal* **14** (8), 235-237

WALLACE, M.D., BAUMGARTNER, J.G. (1936): The destruction of microorganisms in the presence of sugars. II. The influence of sugars in chemical disinfection. *Journal of the Society of Chemical Industry* (London), **55**, 37-40 (aus Borgstrom 1955)

WARSECK, M., RAY, B., SPECK, M.L. (1973): Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. *Applied and Environmental Microbiology* **26** (6), 919-924

WEINZIRL, J., GERDEMAN, A.E. (1929): The bacterial count of ice cream held at freezing temperatures. *Journal of Dairy Science* **12** (2), 182-189

WEISER, R.S., OSTERUD, C.M. (1945): Studies on the death of bacteria at low temperatures. I. The influence of the intensity of the freezing temperature, repeated fluctuations of temperature, and the period of exposure to freezing temperatures on the mortality of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **50** (4), 413-439

WEISS, A., HAMMES, W.P. (2007): Gemüse. In: K. FEHLHABER, J. KLEER, F. KLEY (Hrsg.): Handbuch Lebensmittelhygiene, 1. Auflage 2007, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. XIII 1.2, 787-797

WHITE, C.A., HALL, L.P. (1984 a): The effect of temperature abuse on *Staphylococcus aureus* and salmonellae in raw beef and chicken substrates during frozen storage. *Food Microbiology* **1** (1), 29-38

WHITE, C.A., HALL, L.P. (1984 b): The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* **1** (2), 97-104

WHITE, C.A., HALL, L.P. (1985): Laboratory Examination of Frozen Foods. In: R.K.ROBINSON (ed.): Microbiology of Frozen Foods, Elsevier Science Publishing Co., Essex, Chap.8, 251-283

WEINZIRL, J., GERDEMAN, A.E. (1929): The bacterial count of ice cream held at freezing temperatures. *Journal of Dairy Science* **12** (2), 182-189

WOODBURN, M.J., HUSSEMANN STRONG, D. (1960): Survival of *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus faecalis* frozen in simplified food substrates. *Applied and Environmental Microbiology* **8** (2), 109-113

WOUTERS, J.A., ROMBOUTS, F.M., DE VOS, W.M., KUIPERS, O.P., ABEE, T. (1999): Cold shock proteins and low temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (10), 4436-4442

## Literaturverzeichnis

---

WU, V.C.H. (2008): A review of microbial injury and recovery methods in food. Review. *Food Microbiology* **25** (6), 735-744

YARROW, D., SAMSON, R.A. (2004): Morphologie der Hefen. In: J. BAUMGART, B. BECKER (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 5. aktualisierte und erweiterte Auflage, Studienausgabe, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. V.4, 491-494

ZHOU, G., ZHENG, D., DOU, L., CAI, Q., YUAN, Z. (2010): Occurrence of psychrotolerant *Bacillus cereus* group strains in ice creams. *International Journal of Food Microbiology* **137** (2-3), 143-146

ZSCHALER, R. (2004): Gefrorene und tiefgefrorene Lebensmittel. In: J. BAUMGART, B. BECKER (Hrsg.): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln, 5. aktualisierte und erweiterte Auflage, Studienausgabe, Behr's Verlag, Hamburg, Kap. VII.13, 685-695

## 9 Anhang

### 9.1 Ergebnistabellen

#### 9.1.1 Vorversuche

Tabelle 32: Mikrobiologischer Status ( $\log_{10}$  KbE/g) der Hackfleischproben 1-3

Zielkeime	Probe 1 (A)	Probe 1 (B)	Probe 2 (A)	Probe 2 (B)	Probe 3 (A)	Probe 3 (B)
Gesamtkeimzahl	6,97	6,38	7,41	7,38	7,56	6,26
Aerobe Milchsäurebakterien	5,20	5,73	5,82	6,00	5,85	5,56
Laktobazillen	5,00	5,32	5,82	5,40	5,34	5,30
Pseudomonaden	5,85	6,02	6,30	6,81	5,00	5,40
Enterobakteriazeen	5,18	5,75	6,11	6,00	6,00	5,00
Coliforme Keime	4,30	3,00	5,00	5,60	4,90	4,15

(A)=Direkte Untersuchung der Probe; (B)=Untersuchung der Probe nach Lagerung bei ca. 1°C für 5 Stunden (Styroporbox mit Kühlelementen)

Tabelle 33: Mikrobiologischer Status ( $\log_{10}$  KbE/g) der Hackfleischproben 1-2

Zielkeime	Probe 1 (A)	Probe 1 (B)	Probe 2 (A)	Probe 2 (B)
Gesamtkeimzahl	7,82	8,26	7,56	8,26
Aerobe Milchsäurebakterien	4,64	4,86	4,69	4,67
Laktobazillen	4,43	4,46	4,52	4,40
Pseudomonaden	7,41	7,85	7,41	7,68
Enterobakteriazeen	5,68	5,64	5,34	5,54
Coliforme Keime	4,30	3,96	4,40	5,00

(A)=Direkte Untersuchung der Probe; (B)=Untersuchung der Probe nach Lagerung bei ca. 1°C für 7,5 Stunden (Styroporbox mit Kühlelementen)

## Anhang

### 9.1.2 Monatliche Untersuchung der vier Tiefkühlprodukte

#### 9.1.2.1 "Porree, geschnitten"

Tabelle 34: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „Porree, geschnitten“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,5	-19,3	-24,1	-8,7	-10,7	-13,1	-17,5	-41,3	-17,4	-17,2	-22	-30,8	-17,9
pH-Wert	5,60	5,90	5,72	5,90	6,00	5,80	6,60	5,89	5,73	5,86	5,80	5,90	5,52
GKZ	6,48	5,67	5,99	5,65	5,62	5,64	6,00	5,74	5,52	6,53	6,00	5,34	5,69
Milchsäurebakterien	5,64	4,97	4,81	4,81	4,64	4,83	4,46	4,49	4,72	4,60	4,52	4,38	4,52
Laktobazillen	5,04	4,38	3,95	4,84	3,62	4,04	3,49	4,86	3,65	4,08	3,34	3,64	4,00
Pseudomonaden	5,71	5,26	5,30	5,49	4,49	5,26	5,56	5,38	5,20	6,38	5,54	4,81	4,65
Enterobakteriazeen	4,68	4,56	4,34	4,72	3,52	4,00	3,43	3,76	3,65	4,45	5,00	3,67	3,56
Coliforme Keime	5,10	3,54	3,72	2,30	2,30	2,68	3,00	3,18	2,60	4,08	3,15	3,08	2,30
Hefen	3,30	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00	0,70	1,00
Schimmelpilze	2,30	1,60	1,00	1,00	1,00	1,48	1,30	1,60	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 35: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „Porree, geschnitten“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,8	-17,6	-14,7	-13,7	-5,0	-13,2	-15,0	-22,7	-13,8	-11,1	-17,1	-13,0	-12,5
pH-Wert	5,60	5,89	5,68	5,90	6,00	5,90	6,60	5,88	5,73	5,91	5,82	5,91	5,56
GKZ	8,20	5,88	5,74	5,73	5,41	5,62	6,26	5,60	5,30	6,26	6,08	6,20	5,52
Milchsäurebakterien	5,98	4,93	4,91	4,78	4,52	4,82	5,00	5,00	4,71	4,38	5,08	5,00	4,34
Laktobazillen	5,40	4,15	4,08	4,79	3,64	3,91	3,84	3,83	3,69	3,49	3,56	3,64	4,08
Pseudomonaden	7,45	5,15	5,49	5,30	4,43	5,51	5,88	5,43	5,38	5,30	5,68	5,20	4,67
Enterobakteriazeen	5,00	4,56	3,66	3,34	3,15	4,78	4,40	3,74	3,65	4,00	3,00	3,51	3,34
Coliforme Keime	5,00	3,67	4,15	4,30	2,90	2,04	4,46	2,90	2,60	2,30	3,04	2,60	2,26
Hefen	3,00	0,70	1,00	1,00	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	1,48	1,00	0,70	0,70
Schimmelpilze	3,04	0,70	1,48	0,70	1,00	1,00	1,00	1,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 36: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „**Porree, geschnitten**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,7	-19,1	-16,2	-10,7	-7,0	-7,8	-9,0	-24,6	-8,4	-18,1	-8,4	-26,9	-19,6
pH-Wert	5,30	5,90	5,71	6,00	6,00	5,70	6,50	5,89	5,74	5,90	5,85	5,91	5,55
GKZ	7,34	6,20	6,08	5,81	5,60	5,81	6,08	6,15	5,43	5,78	6,43	5,60	6,00
Milchsäurebakterien	6,08	4,94	4,99	4,71	4,38	4,74	5,08	4,62	5,00	4,40	4,72	4,43	4,40
Laktobazillen	5,34	3,76	3,99	4,76	3,53	3,96	3,79	4,00	3,62	3,60	3,41	3,72	3,38
Pseudomonaden	6,45	5,46	5,62	5,38	4,54	5,34	4,92	5,71	5,00	5,52	5,26	4,52	6,00
Enterobakteriazeen	5,34	4,78	4,58	3,84	2,78	4,49	4,58	4,00	3,75	4,26	4,54	3,52	4,45
Coliforme Keime	5,04	3,88	3,51	3,20	2,00	2,71	2,78	3,08	2,90	3,15	2,30	2,30	2,30
Hefen	3,56	0,70	1,00	2,15	1,30	1,48	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	1,00
Schimmelpilze	2,60	0,70	1,48	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,60	0,70	0,70	1,00	1,48

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 37: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der vierten Parallelprobe „**Porree, geschnitten**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,6	-17,2	-10,6	-5,2	-5,5	-25,4	-7,5	-17,6	-11,1	-19,0	-25,5	-25,5	-21,8
pH-Wert	5,50	5,88	5,80	5,90	6,00	5,80	6,60	5,90	5,75	5,90	5,81	5,90	5,50
GKZ	7,60	6,67	5,30	6,04	5,64	5,30	5,74	6,26	6,20	5,71	6,30	5,56	5,82
Milchsäurebakterien	6,18	5,45	4,34	4,60	4,20	4,62	4,40	3,67	4,71	4,53	4,56	4,04	4,38
Laktobazillen	5,60	4,64	4,00	4,69	3,48	3,99	3,75	3,88	3,58	3,38	3,49	3,69	3,62
Pseudomonaden	6,34	5,40	5,00	5,81	4,60	4,93	5,26	5,20	5,64	5,56	5,49	5,30	5,00
Enterobakteriazeen	5,72	4,40	3,58	4,45	2,78	3,81	4,15	4,45	4,52	5,00	5,00	3,62	3,67
Coliforme Keime	5,34	3,67	3,08	2,78	2,30	2,88	3,08	3,15	2,60	3,60	4,00	2,34	2,40
Hefen	3,00	0,70	1,30	1,00	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70
Schimmelpilze	2,60	1,30	1,00	1,00	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00	0,70	0,70	0,70	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

## Anhang

Tabelle 38: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der fünften Parallelprobe „**Porree, geschnitten**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,6	-14,1	-12,9	-7,9	-3,3	-14,7	-6,0	-42,2	-15,1	-21,2	-16,4	-27,3	-19,3
pH-Wert	5,60	5,90	5,69	5,90	6,00	5,80	6,50	5,90	5,73	5,92	5,81	5,90	5,60
GKZ	7,04	6,26	6,18	6,58	5,38	6,99	6,08	6,15	5,30	6,18	6,48	6,58	6,00
Milchsäurebakterien	6,08	5,20	4,54	4,86	4,51	5,00	4,46	4,46	4,26	4,54	4,38	4,18	4,64
Laktobazillen	5,30	4,34	4,00	4,71	3,74	4,26	4,00	3,38	3,45	3,62	3,34	3,20	3,56
Pseudomonaden	6,41	5,54	5,85	6,00	4,26	5,95	5,54	5,85	5,20	5,95	5,86	6,20	5,38
Enterobakteriazeen	5,46	4,67	4,20	3,53	3,20	5,56	4,26	3,60	4,26	5,00	4,00	2,00	4,26
Coliforme Keime	5,00	3,98	3,62	2,00	2,00	2,64	3,00	2,30	2,00	2,78	2,00	0,70	2,04
Hefen	3,26	2,08	1,00	1,30	0,70	1,30	0,70	0,70	1,60	0,70	1,00	0,70	0,70
Schimmelpilze	2,00	1,00	1,30	1,30	0,70	0,70	1,30	1,78	1,00	1,00	0,70	1,00	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

### 9.1.2.2 “Champignons in Scheiben”

Tabelle 39: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „**Champignons in Scheiben**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-0,1	-19,6	-10,3	-8,6	-4,6	-24,6	-4,8	-19,6	-10,1	-24,2	-26,8	-37,1	-18,6
pH-Wert	6,90	7,11	7,02	6,90	7,02	6,88	7,24	6,72	6,77	7,00	6,80	6,76	6,70
GKZ	6,66	6,04	5,60	5,58	5,74	5,38	5,96	5,08	5,56	6,11	5,30	5,26	5,62
Milchsäurebakterien	5,04	4,72	4,46	4,38	4,46	4,26	4,26	4,11	4,26	4,20	3,96	3,90	4,38
Laktobazillen	4,93	4,52	4,23	4,38	4,26	3,99	4,18	3,69	4,00	4,08	3,96	4,11	4,38
Pseudomonaden	6,30	5,91	5,56	5,52	5,46	4,83	5,83	5,18	5,64	6,56	4,65	4,81	5,52
Enterobakteriazeen	5,49	4,18	4,43	4,99	4,04	3,62	4,00	3,20	3,65	4,26	3,08	2,78	2,78
Coliforme Keime	4,20	4,34	3,41	2,30	3,30	2,90	3,30	3,04	2,00	3,30	2,18	2,00	2,72
<i>E. coli</i>	1,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	3,08	2,30	3,00	2,23	2,63	2,62	2,20	2,18	2,34	2,63	2,81	2,89	2,15
Schimmelpilze	2,60	0,70	1,90	1,00	2,00	2,15	1,70	1,85	1,60	1,00	1,85	1,78	1,85

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung



Tabelle 40: Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „**Champignons in Scheiben**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-0,4	-17,3	-16,3	-6,6	-5,9	-18	-3,0	-33,7	-17,5	-15,4	-26,9	-26,9	-10,5
pH-Wert	7,00	7,05	7,00	6,89	7,00	6,89	7,24	6,70	6,77	7,00	6,83	6,77	6,72
GKZ	6,11	6,08	5,20	5,34	5,54	5,53	5,62	5,34	5,62	5,18	6,08	5,30	5,58
Milchsäurebakterien	4,96	4,40	4,49	4,54	4,52	4,43	4,38	4,30	4,18	3,74	4,34	4,00	4,43
Laktobazillen	4,69	4,08	4,20	4,48	4,08	3,85	3,83	3,81	4,20	4,08	4,11	3,74	4,54
Pseudomonaden	5,92	5,68	5,00	5,04	5,08	5,20	5,45	4,94	5,18	5,15	4,79	5,34	5,52
Enterobakteriazeen	4,76	4,60	3,69	4,38	3,71	3,52	3,74	3,66	3,81	2,78	3,30	3,65	3,46
Coliforme Keime	4,15	3,67	3,45	2,90	3,20	2,90	2,96	2,90	3,26	2,60	1,70	2,30	2,30
<i>E. coli</i>	1,60	0,70	0,70	1,60	0,70	1,30	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	3,04	2,15	3,00	2,45	2,49	2,60	2,08	2,15	2,32	2,65	2,32	2,08	2,11
Schimmelpilze	2,30	0,70	2,04	1,85	1,85	1,60	1,30	1,95	1,70	1,78	1,70	1,78	1,60

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 41: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „**Champignons in Scheiben**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,1	-18,1	-14,5	-5,9	-2,8	-12,6	-8,6	-9,6	-14,5	-19,3	-19,2	-28,2	-20,3
pH-Wert	6,90	6,90	7,04	6,89	7,01	6,88	7,25	6,72	6,76	7,00	6,78	6,77	6,75
GKZ	6,79	5,92	5,71	5,38	5,40	5,58	5,79	5,40	5,46	5,49	5,45	5,64	5,48
Milchsäurebakterien	5,30	4,64	4,58	4,40	4,04	4,30	4,38	4,30	4,04	4,20	4,00	4,11	4,38
Laktobazillen	5,34	4,20	4,04	4,34	3,84	3,84	4,20	4,18	3,71	4,04	3,49	3,81	3,98
Pseudomonaden	7,15	5,81	5,30	5,11	5,04	5,43	5,49	5,15	5,04	6,00	5,00	4,81	5,40
Enterobakteriazeen	5,64	4,43	4,20	5,04	3,38	4,04	4,20	3,38	4,08	2,30	2,78	2,60	3,64
Coliforme Keime	5,11	4,30	3,53	3,26	3,00	2,78	3,26	2,60	3,26	2,78	2,71	2,30	2,60
<i>E. coli</i>	1,00	0,70	0,70	1,00	0,70	1,30	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	3,00	2,11	2,93	2,11	2,72	1,95	2,38	2,56	2,49	2,72	2,41	2,40	2,49
Schimmelpilze	3,08	0,70	2,08	1,00	1,90	1,90	1,30	1,90	1,48	2,15	1,48	1,78	1,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

## Anhang

Tabelle 42: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Wert der vierten Parallelprobe „**Champignons in Scheiben**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-0,1	-16,5	-14,2	-14,1	-4,0	-13,6	-4,5	-25,4	-10,8	-20,0	-10,0	-34,9	-21,2
pH-Wert	6,80	7,00	7,00	6,93	7,02	6,88	7,25	6,71	6,76	7,01	6,80	6,76	6,71
GKZ	6,26	5,90	4,32	5,34	5,89	5,69	5,30	5,08	5,38	5,67	5,30	5,00	6,18
Milchsäurebakterien	4,40	4,72	4,52	4,56	4,38	4,38	4,43	3,76	4,30	4,15	3,67	3,94	5,26
Laktobazillen	4,51	4,34	4,11	4,56	4,11	4,30	4,20	3,62	3,94	4,04	3,76	3,79	4,38
Pseudomonaden	6,34	5,34	5,30	5,30	5,94	5,64	5,00	5,34	5,11	5,48	5,56	4,74	5,67
Enterobakteriazeen	5,48	4,54	4,26	4,95	4,72	4,11	4,08	3,34	3,93	2,30	2,78	2,30	4,00
Coliforme Keime	3,78	3,88	3,34	3,08	2,60	3,34	3,15	3,00	3,54	2,00	1,48	2,60	2,60
<i>E. coli</i>	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00
Hefen	3,11	2,23	2,86	1,95	2,48	2,48	2,11	1,78	2,30	2,52	2,41	2,48	3,11
Schimmelpilze	3,08	0,70	1,78	1,70	1,60	1,90	2,00	1,70	1,85	1,95	1,85	1,70	2,15

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 43: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Wert der fünften Parallelprobe „**Champignons in Scheiben**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	Frisch	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	0,3	-13,6	-11,8	-5,6	-3,4	-18,1	-10,3	-27,1	-17,8	-9,1	-11,6	-22,3	-19,5
pH-Wert	6,90	7,12	7,02	6,98	7,02	6,90	7,24	6,72	6,76	6,99	6,83	6,76	6,74
GKZ	6,28	6,45	5,66	5,81	5,82	5,20	5,76	5,26	5,68	5,20	5,34	5,20	5,34
Milchsäurebakterien	5,30	4,56	4,49	4,18	4,43	4,26	4,45	4,00	4,00	4,08	4,30	3,75	4,34
Laktobazillen	4,78	4,18	4,04	4,54	3,95	3,67	4,00	4,15	4,15	4,08	4,04	3,20	4,04
Pseudomonaden	6,00	6,38	5,38	5,93	5,64	4,96	5,75	5,26	5,40	5,08	4,98	5,04	5,58
Enterobakteriazeen	5,38	4,15	4,00	3,72	3,46	3,83	3,86	3,46	3,69	2,60	3,15	2,30	3,43
Coliforme Keime	4,30	3,85	3,20	3,43	3,00	2,90	3,46	2,90	2,90	2,00	2,30	2,00	2,78
<i>E. coli</i>	0,70	1,00	0,70	1,00	1,00	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	3,04	1,70	2,91	2,23	3,04	2,15	2,04	2,23	2,18	2,85	2,43	1,85	2,67
Schimmelpilze	2,90	1,60	1,90	1,70	1,30	1,70	1,78	1,78	1,90	1,60	1,00	1,48	1,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

### 9.1.2.3 „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“

Tabelle 44: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-20,3	-19,9	-14,1	-4,8	-36,0	-11,3	-14,3	-21,5	-25,6	-23,8	-33,5	-26,6
pH-Wert	6,11	6,23	6,40	6,36	6,02	6,45	6,34	6,20	6,40	6,40	6,25	6,14
GKZ	5,30	5,40	5,34	5,00	5,00	5,30	6,34	5,00	5,20	5,08	5,00	5,00
Milchsäurebakterien	3,69	4,11	3,69	4,04	4,11	4,00	3,71	3,58	3,88	3,65	3,60	3,43
Laktobazillen	4,00	3,90	4,30	3,56	3,83	3,92	3,52	3,38	3,00	3,34	3,20	3,11
Pseudomonaden	2,00	5,58	5,26	4,75	4,98	5,18	2,00	4,54	4,90	4,00	5,11	4,54
Enterokokken	2,30	1,00	1,48	3,18	1,00	1,00	1,78	1,00	1,00	1,00	0,70	0,70
Enterobakteriazeen	3,04	2,90	2,90	2,30	2,30	3,08	2,49	2,78	2,60	2,60	1,78	2,30
Coliforme Keime	2,30	3,53	1,60	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00	1,00	0,70	1,30	0,70
Hefen	1,00	1,00	0,70	1,30	1,30	1,00	1,00	0,70	1,30	0,70	0,70	1,00
Schimmelpilze	1,00	1,00	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30	0,70	1,85	0,70	1,00	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 45: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe "Maultaschen-Gemüse-Pfanne" während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-20,1	-13,2	-24,3	-5,3	-39,8	-17,5	-21,9	-22,1	-18,0	-31,7	-29,0	-21,2
pH-Wert	6,15	6,20	6,35	6,36	6,01	6,44	6,35	6,2	6,41	6,39	6,24	6,09
GKZ	6,20	4,26	5,30	5,46	5,08	5,08	5,26	6,00	5,20	4,76	4,08	4,60
Milchsäurebakterien	4,00	3,78	4,11	3,49	3,64	4,00	3,30	4,34	3,75	3,88	2,90	3,67
Laktobazillen	3,96	3,71	5,26	2,90	3,20	3,76	2,90	3,88	2,90	3,70	2,00	3,58
Pseudomonaden	5,49	2,00	5,15	5,26	5,00	5,20	4,96	6,34	5,00	4,72	4,15	4,00
Enterokokken	2,00	0,70	1,85	0,70	0,70	1,78	1,00	1,70	1,30	1,00	0,70	1,30
Enterobakteriazeen	3,58	2,30	4,49	3,00	2,78	2,54	3,04	3,00	2,60	1,85	0,70	2,78
Coliforme Keime	2,30	0,70	0,70	0,70	1,30	0,70	1,95	0,70	1,00	0,70	0,70	1,00
Hefen	1,00	0,70	1,00	1,60	1,00	1,30	1,30	1,95	1,00	1,70	0,70	0,70
Schimmelpilze	0,70	1,30	1,00	1,30	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,30	0,70	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

## Anhang

Tabelle 46: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Wert der dritten Parallelprobe „**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-17,2	-16,3	-19,6	-6,8	-34,8	-9,5	-22,4	-18,7	-20,2	-21,3	-25,8	-29,6
pH-Wert	6,09	6,25	6,40	6,35	6,00	6,47	6,34	6,20	6,42	6,40	6,25	6,12
GKZ	5,86	5,34	5,48	5,04	5,20	5,66	5,08	7,00	4,52	5,15	5,08	5,20
Milchsäurebakterien	4,45	3,89	4,20	3,89	4,08	3,64	3,48	3,54	3,94	3,62	3,26	3,30
Laktobazillen	4,20	3,76	4,00	3,54	3,83	2,90	3,45	2,60	3,60	3,00	2,90	2,30
Pseudomonaden	5,00	5,30	5,11	5,00	5,18	5,54	5,15	4,62	4,18	5,20	4,62	5,15
Enterokokken	2,00	1,90	1,70	2,57	1,30	0,70	1,00	0,70	1,00	1,00	0,70	0,70
Enterobakteriazeen	4,60	3,08	3,65	3,04	2,90	2,90	2,97	2,60	2,00	1,00	1,85	2,30
Coliforme Keime	2,00	1,48	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	1,60	1,00	0,70	1,30	0,70	1,30	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	1,30
Schimmelpilze	0,70	1,30	0,70	0,70	0,70	0,70	1,30	1,00	0,70	1,00	1,00	1,48

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 47: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Wert der vierten Parallelprobe „**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-19,3	-12,4	-16,0	-5,1	-22,9	-8,6	-25,7	-14,5	-17,6	-22,2	-27,2	-25,9
pH-Wert	6,10	6,22	6,38	6,37	6,02	6,44	6,36	6,21	6,40	6,41	6,25	6,14
GKZ	5,60	5,75	5,40	5,30	5,43	5,49	5,26	6,15	4,34	5,00	5,04	4,70
Milchsäurebakterien	4,15	4,38	4,04	3,38	4,30	4,08	3,74	4,64	3,78	4,00	4,00	3,30
Laktobazillen	3,18	3,74	3,91	3,00	3,76	4,08	4,11	3,56	3,90	3,15	3,58	3,00
Pseudomonaden	5,43	5,69	4,84	5,41	5,45	5,30	5,15	5,34	4,51	4,88	4,79	4,52
Enterokokken	2,00	1,48	1,48	1,30	1,48	1,60	1,00	1,60	1,00	0,70	1,48	1,00
Enterobakteriazeen	3,81	4,04	2,60	4,00	2,90	3,00	3,08	3,00	2,00	1,60	2,30	2,00
Coliforme Keime	2,00	1,78	0,70	0,70	0,70	0,70	2,52	0,70	1,48	0,70	0,70	1,00
Hefen	1,48	1,60	1,30	1,00	1,48	1,30	1,30	1,48	1,00	1,00	0,70	1,00
Schimmelpilze	0,70	1,78	1,00	1,00	1,00	1,48	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 48: Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Wert der fünften Parallelprobe „**Maultaschen-Gemüse-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-18,6	-13,2	-14,2	-6,3	-35,8	-11,1	-18,9	-16,1	-17,3	-24,9	-24,9	-25,2
pH-Wert	6,11	6,21	6,41	6,36	6,02	6,45	6,34	6,21	6,40	6,39	6,25	6,15
GKZ	5,98	5,43	5,40	4,54	5,08	5,41	5,15	5,04	5,00	5,18	4,20	5,26
Milchsäurebakterien	4,49	3,75	4,00	3,26	4,26	4,15	3,96	3,71	4,00	4,67	3,52	4,04
Laktobazillen	4,20	3,43	3,88	2,90	4,04	3,49	3,82	3,70	3,52	4,41	3,38	3,96
Pseudomonaden	5,30	5,15	5,20	4,30	5,20	5,00	5,18	4,52	5,00	4,93	3,26	5,40
Enterokokken	2,00	1,30	0,70	1,00	2,65	1,60	1,00	0,70	1,00	1,30	1,00	0,70
Enterobakteriazeen	3,38	2,90	3,67	2,30	3,38	2,90	3,15	3,38	2,60	1,78	0,70	3,04
Coliforme Keime	2,30	1,48	1,48	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,00
Hefen	1,00	1,48	1,00	1,30	1,00	1,00	1,30	0,70	0,70	2,32	0,70	0,70
Schimmelpilze	0,70	1,48	0,70	0,70	0,70	0,70	1,48	1,00	1,00	1,70	1,60	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

#### 9.1.2.4 “Stroganoff-Pfanne”

Tabelle 49: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „**Stroganoff-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-15,3	-7,8	-10,6	-3,2	-43,5	-15,2	-20,5	-16,5	-15,2	-16,6	-37,5	-18,9
pH-Wert	5,72	5,80	5,68	5,89	5,74	5,50	5,80	5,79	5,50	5,51	5,65	5,78
GKZ	6,51	5,20	5,84	5,46	5,20	6,00	5,54	5,45	5,26	5,43	5,20	5,62
Milchsäurebakterien	3,11	3,15	3,18	2,30	3,38	2,30	2,90	3,00	2,00	2,00	2,92	2,41
Laktobazillen	2,78	2,00	3,00	2,30	2,40	2,15	2,45	2,40	1,90	1,48	2,51	2,11
Pseudomonaden	6,15	5,41	5,54	4,67	4,96	5,71	5,26	4,65	5,20	5,30	5,04	5,65
Enterobakteriazeen	4,15	3,34	3,30	3,30	3,11	3,60	3,00	4,08	2,00	2,11	0,70	1,00
Coliforme Keime	2,00	0,70	1,78	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,30	0,70	0,70
Hefen	1,30	1,60	0,70	0,70	0,70	1,30	1,00	0,70	1,00	0,70	0,70	1,30
Schimmelpilze	1,00	0,70	1,30	1,30	1,00	0,70	1,60	0,70	1,48	0,70	1,30	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

## Anhang

Tabelle 50: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „**Stroganoff-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-16,2	-7,3	-14,3	-3,2	-29,7	-12,4	-18,2	-25,3	-28,5	-20,5	-20,5	-18,7
pH-Wert	5,75	5,81	5,69	5,88	5,75	5,51	5,81	5,79	5,50	5,50	5,64	5,76
GKZ	6,53	5,52	5,40	4,88	5,45	5,52	5,62	5,20	5,15	5,00	5,11	5,26
Milchsäurebakterien	2,60	2,78	2,00	2,78	2,90	3,65	3,30	3,49	3,20	3,00	3,00	2,38
Laktobazillen	2,30	2,30	2,00	2,30	2,18	3,00	2,63	2,67	3,20	2,57	2,60	1,70
Pseudomonaden	5,20	5,51	5,52	5,15	5,11	4,58	5,45	5,46	4,79	4,46	4,52	5,30
Enterobakteriazeen	4,51	3,00	3,26	3,30	3,20	2,90	3,20	4,00	2,00	1,95	0,70	0,70
Coliforme Keime	2,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	1,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	1,70	0,70	0,70	1,85	1,30	1,00	1,60	1,00	0,70	1,00	0,70	0,70
Schimmelpilze	1,30	1,30	0,70	0,70	0,70	1,48	1,00	1,00	1,00	0,70	1,48	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 51: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „**Stroganoff-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1. TK	2. TK	3. TK	4. TK	5. TK	6. TK	7. TK	8. TK	9. TK	10. TK	11. TK	12. TK
Temperatur (°C)	-15,3	-6,6	-8,5	-5,5	-27,3	-16,0	-23,7	-22,1	-14,1	-23,1	-23,1	-19,2
pH-Wert	5,74	5,81	5,70	5,88	5,75	5,51	5,80	5,80	5,49	5,50	5,65	5,78
GKZ	5,95	5,56	5,38	5,04	4,40	5,54	5,85	4,51	7,11	5,08	4,92	5,15
Milchsäurebakterien	3,20	2,60	2,60	2,00	3,64	2,60	3,26	2,00	2,00	3,74	2,08	3,18
Laktobazillen	2,30	2,30	2,00	2,00	2,95	2,08	2,85	1,70	1,78	2,97	1,30	2,94
Pseudomonaden	5,00	5,72	5,08	4,08	4,41	5,00	5,62	4,38	7,15	5,00	4,88	4,20
Enterobakteriazeen	4,00	3,43	4,00	2,30	1,95	3,00	3,04	3,04	2,00	2,58	1,00	1,70
Coliforme Keime	2,00	0,70	1,48	0,70	0,70	0,70	1,60	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	1,48	1,00	0,70	0,70	0,70	1,00	1,48	1,48	1,00	1,00	0,70	0,70
Schimmelpilze	1,00	1,30	0,70	0,70	0,70	0,70	1,30	0,70	0,70	1,00	0,70	0,70

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 52: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der vierten Parallelprobe „**Stroganoff-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-15,8	-9,1	-8,9	-2,1	-31,8	-15,0	-20,4	-19,0	-18,3	-18,6	-18,6	-14,4
pH-Wert	5,75	5,79	5,69	5,89	5,74	5,50	5,79	5,80	5,50	5,50	5,65	5,80
GKZ	6,11	5,43	5,38	5,00	5,49	4,34	6,00	5,46	6,20	5,52	5,53	5,71
Milchsäurebakterien	2,60	3,96	2,60	3,30	2,00	2,00	3,00	3,08	2,60	2,30	2,28	2,79
Laktobazillen	2,30	2,00	2,30	2,00	2,18	1,90	2,61	1,90	2,08	1,30	0,70	2,38
Pseudomonaden	5,94	5,00	4,54	4,11	5,20	3,60	5,00	5,20	5,34	4,68	5,34	4,11
Enterobakteriazeen	4,00	2,00	3,34	2,30	2,96	2,78	2,78	2,90	2,00	0,70	1,00	0,70
Coliforme Keime	2,00	1,00	1,48	0,70	1,00	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Hefen	0,70	0,70	0,70	3,11	1,30	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Schimmelpilze	0,70	1,30	1,00	1,00	0,70	0,70	1,30	1,00	1,00	0,70	1,00	1,00

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

Tabelle 53: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie Temperaturen\* und pH-Werte der fünften Parallelprobe „**Stroganoff-Pfanne**“ während einjähriger Tiefkühlagerung

Untersuchungen	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
Temperatur (°C)	-14,4	-4,5	-10,3	-6,9	-14,8	-10,9	-25,4	-29,6	-18,6	-20,9	-29,9	-16,7
pH-Wert	5,75	5,82	5,69	5,89	5,74	5,5	5,8	5,81	5,51	5,51	5,64	5,77
GKZ	6,04	5,83	6,11	5,20	5,70	6,81	5,65	3,15	6,00	5,38	4,92	5,38
Milchsäurebakterien	2,60	3,38	3,34	3,52	2,78	2,30	2,60	2,90	4,20	3,93	2,96	2,61
Laktobazillen	2,00	3,34	3,00	2,00	1,78	1,30	2,26	2,26	2,00	3,52	2,45	2,20
Pseudomonaden	5,41	5,71	5,98	4,49	5,43	6,72	5,65	2,00	5,38	4,74	5,08	5,20
Enterobakteriazeen	4,00	3,43	5,15	2,60	2,93	3,34	2,78	2,30	2,78	1,90	2,96	1,00
Coliforme Keime	2,00	0,70	0,70	0,70	1,00	0,70	1,30	1,30	0,70	1,78	1,30	0,70
Hefen	1,78	1,30	1,70	1,30	1,00	0,70	1,00	0,70	1,00	2,38	1,00	0,70
Schimmelpilze	1,30	1,30	0,70	0,70	1,00	0,70	1,48	0,70	0,70	1,00	1,60	1,48

\*Temperaturen des Lebensmittels bei Anlieferung

9.1.3 Überblick über die Keimzahlen

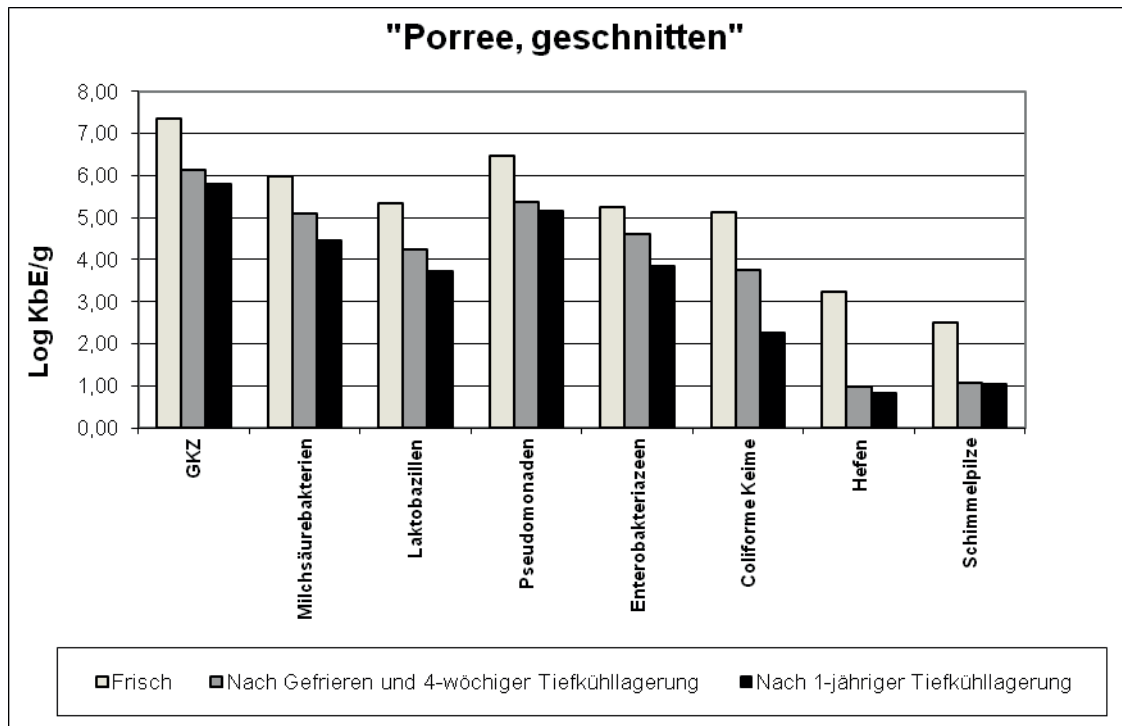


Abbildung 31: Keimzahlmittelwerte des Produktes "Porree, geschnitten"

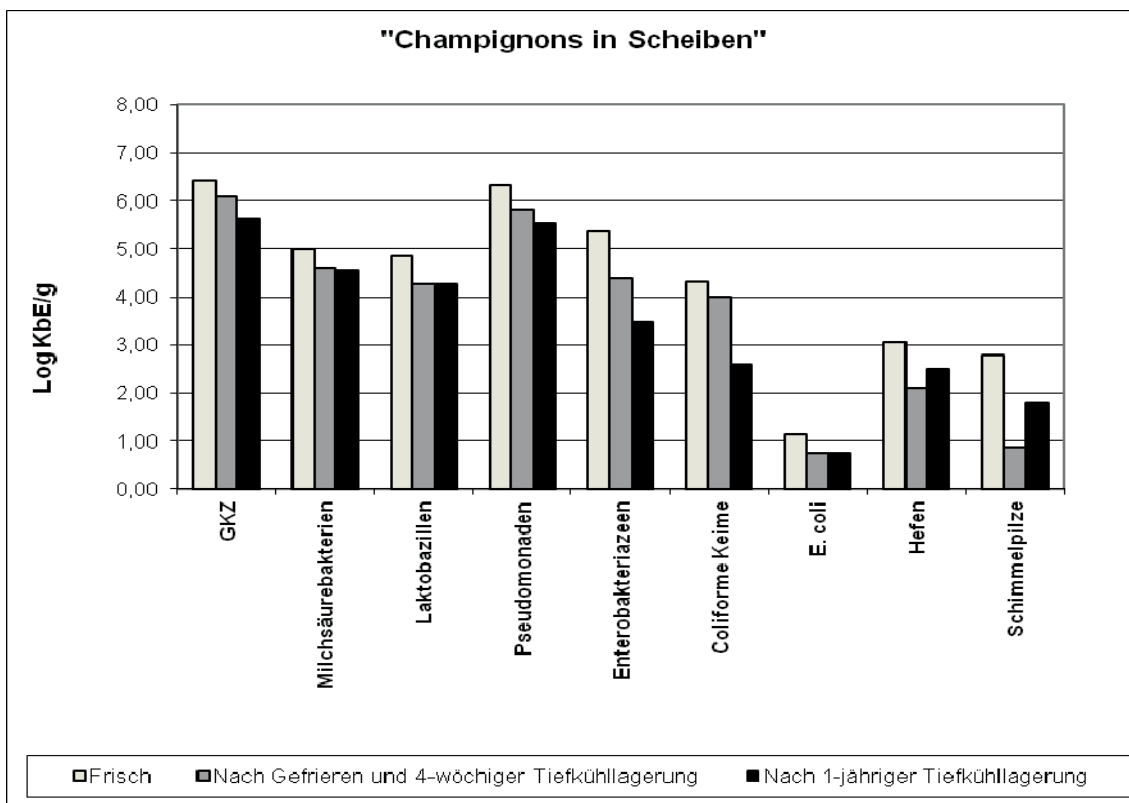


Abbildung 32: Keimzahlmittelwerte des Produktes "Champignons in Scheiben"



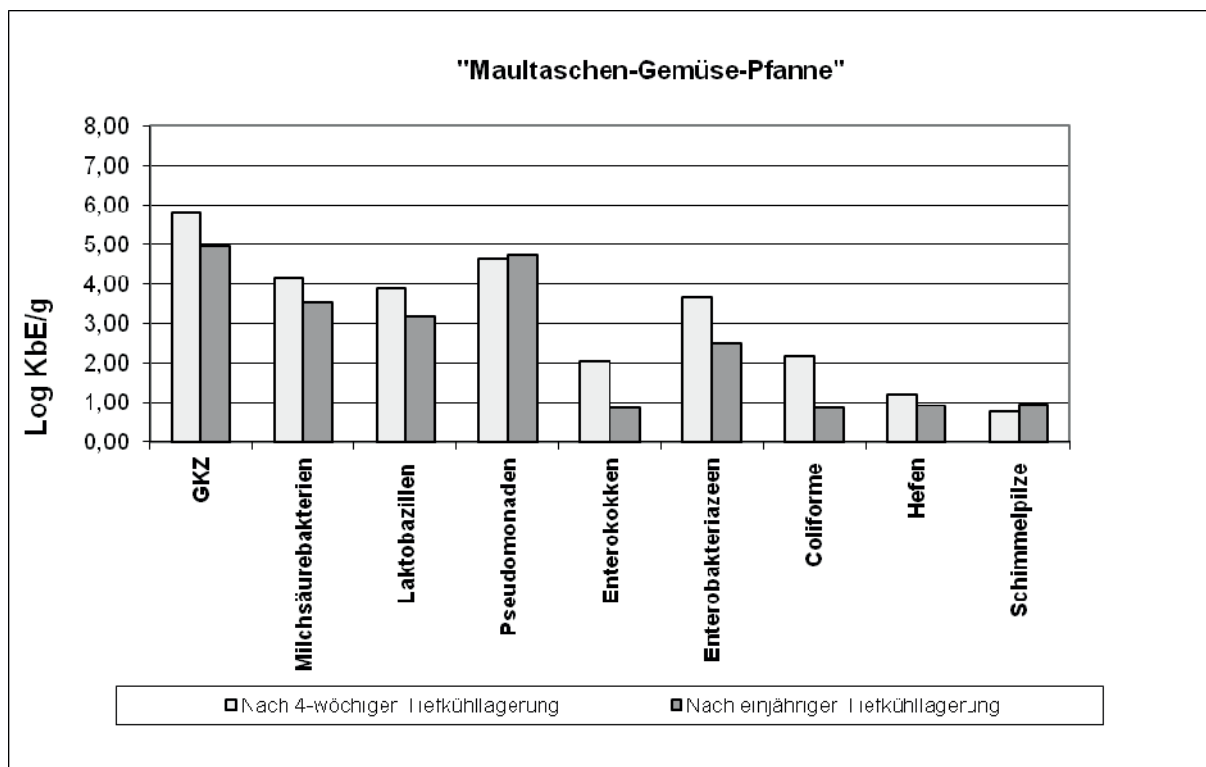


Abbildung 33: Keimzahlmittelwerte des Produktes "Maultaschen-Gemüse-Pfanne"

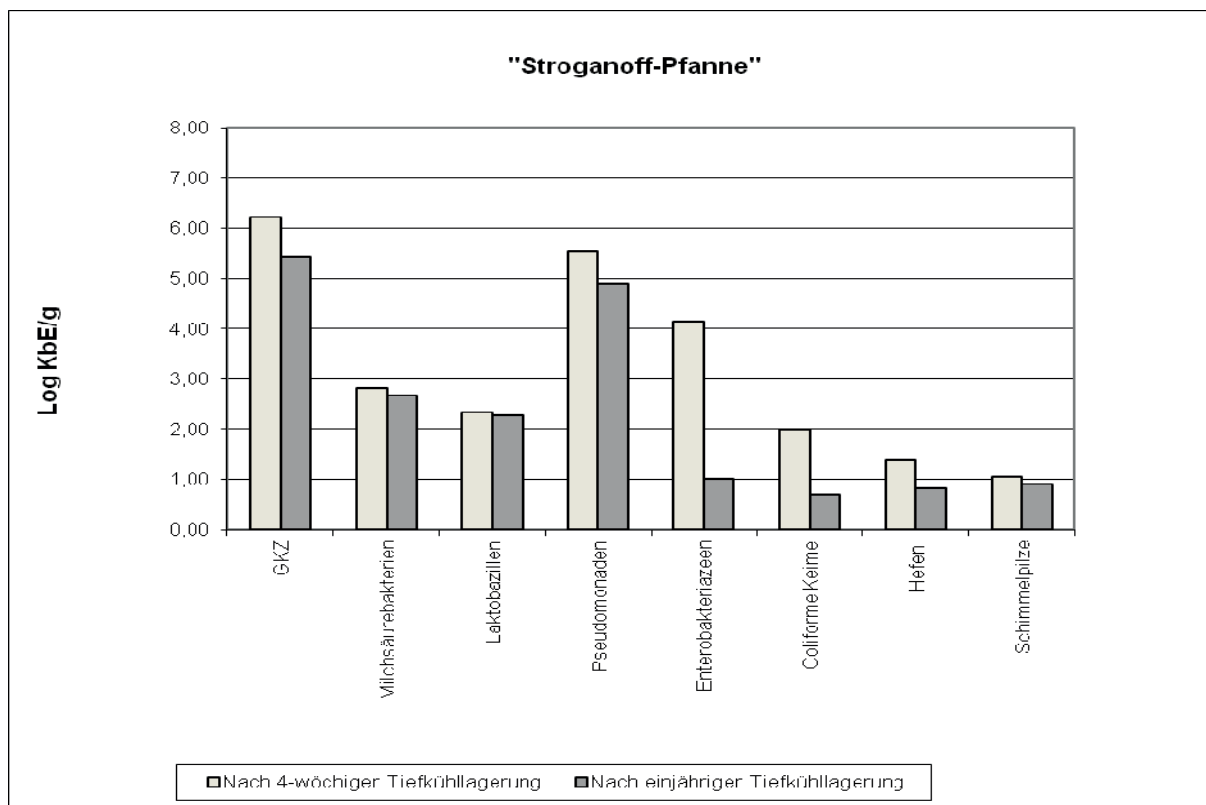


Abbildung 34: Keimzahlmittelwerte des Produktes "Stroganoff-Pfanne"

### 9.1.4 Regression und Korrelation

Die ermittelten Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen Lagerdauer und Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$  KbE/g) sowie deren Interpretation und die Funktion der Regressionsgeraden sind in den Tabellen 54 bis 57 dargestellt. Die Abbildungen 35 bis 46 zeigen die Beziehungen zwischen Lagerdauer und Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$  KbE/g) während einjähriger Tiefkühlagerung, bei denen signifikante Korrelationen berechnet wurden.

#### 9.1.4.1 „Porree, geschnitten“

Tabelle 54: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden

Zielkeime	Korrelationskoeffizient nach Pearson (R)	Interpretation der Korrelation	Regressionsgerade
Gesamtkeimzahl	0,006	Sehr schwach	$Y = 5,907 + 0,001x$
Milchsäurebakterien	-0,437**	Mittel	$Y = 4,886 - 0,038x$
Laktobazillen	-0,578**	Mittel	$Y = 4,316 - 0,069x$
Pseudomonaden	0,035	Sehr schwach	$Y = 5,317 + 0,005x$
Enterobakteriazeen	-0,144	Sehr schwach	$Y = 4,198 - 0,027x$
Coliforme Keime	-0,432**	Mittel	$Y = 3,445 - 0,088x$
Hefen	-0,234	Schwach	$Y = 1,046 - 0,022x$
Schimmelpilze	-0,191	Sehr schwach	$Y = 1,090 - 0,017x$

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant

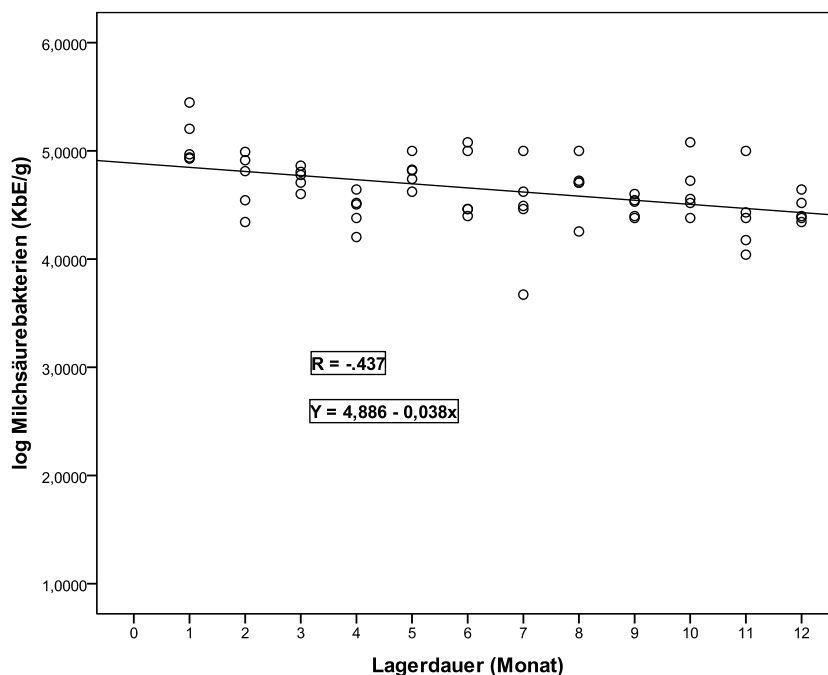


Abbildung 35: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

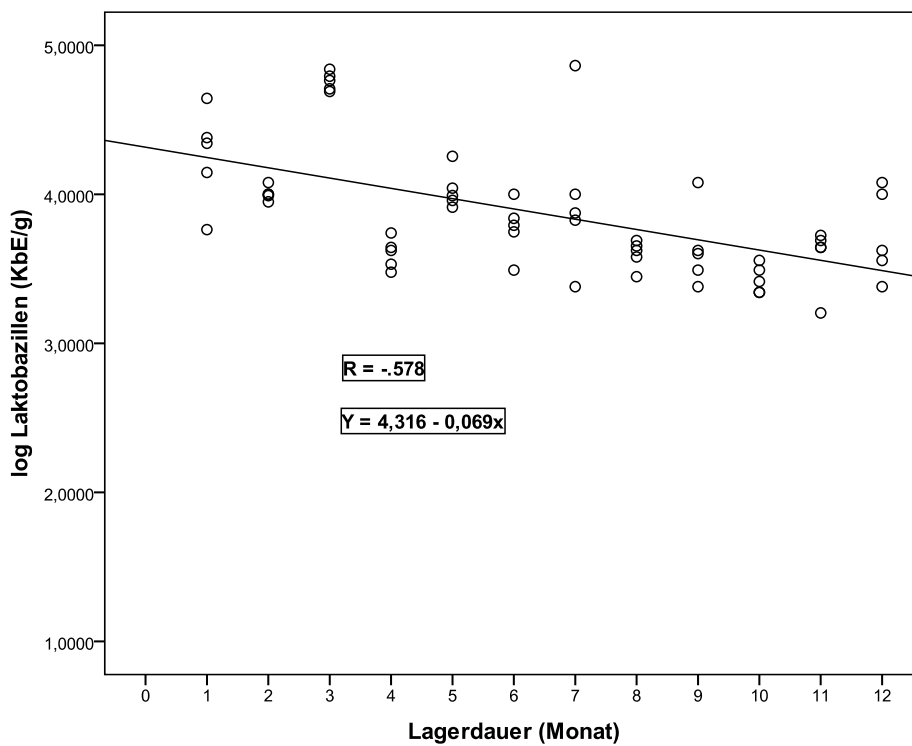


Abbildung 36: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

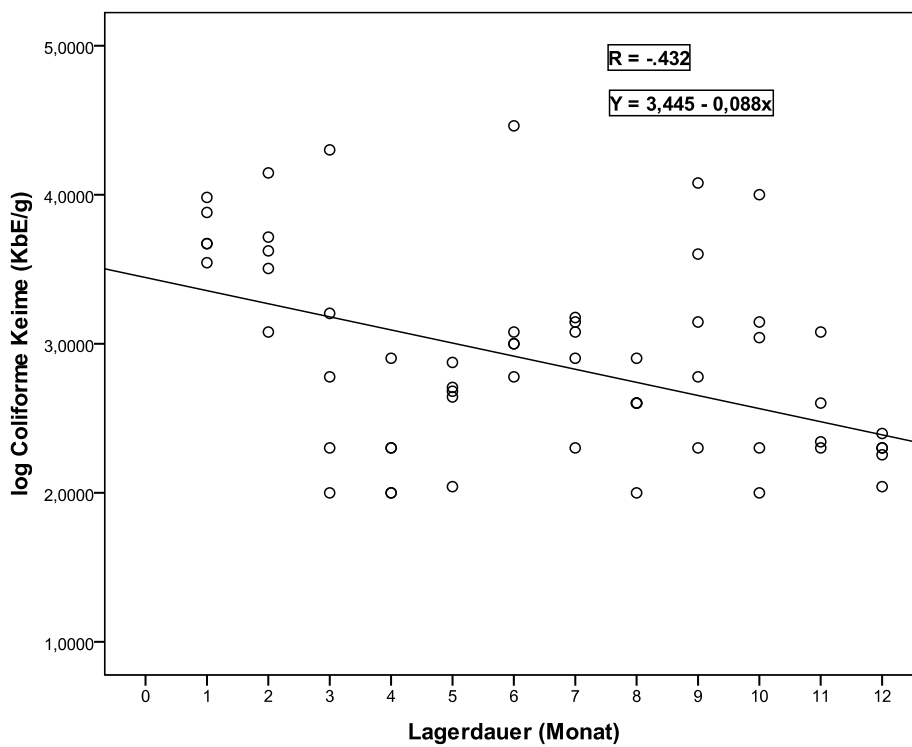


Abbildung 37: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung

## Anhang

### 9.1.4.2 „Champignons in Scheiben“

Tabelle 55: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden

Zielkeime	Korrelationskoeffizient (R)	Interpretation der Korrelation	Regressionsgerade
Gesamtkeimzahl	-0,213 (-0,308*)	Schwach	$Y = 5,672 - 0,021x$
Milchsäurebakterien	-0,463** (-0,769**)	Mittel ( <b>Stark</b> )	$Y = 4,527 - 0,036x$
Laktobazillen	-0,346** (-0,546**)	Schwach (Mittel)	$Y = 4,233 - 0,026x$
Pseudomonaden	-0,254 (-0,372**)	Schwach	$Y = 5,539 - 0,028x$
Enterobakteriazeen	-0,697** (-0,780**)	<b>Stark (Stark)</b>	$Y = 4,568 - 0,138x$
Coliforme Keime	-0,719** (-0,771**)	<b>Stark (Stark)</b>	$Y = 3,706 - 0,122x$
<i>E. coli</i>	-0,239	Schwach	$Y = 0,855 - 0,012x$
Hefen	0,036	Sehr schwach	$Y = 2,389 + 0,003x$
Schimmelpilze	0,277*	Schwach	$Y = 1,456 + 0,030x$

Die Angaben in den Klammern geben den neu berechneten Korrelationskoeffizienten an, wenn der 12. Untersuchungsmonat mittels der Funktion der Regressionsgeraden ermittelt und eingesetzt wurde

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant

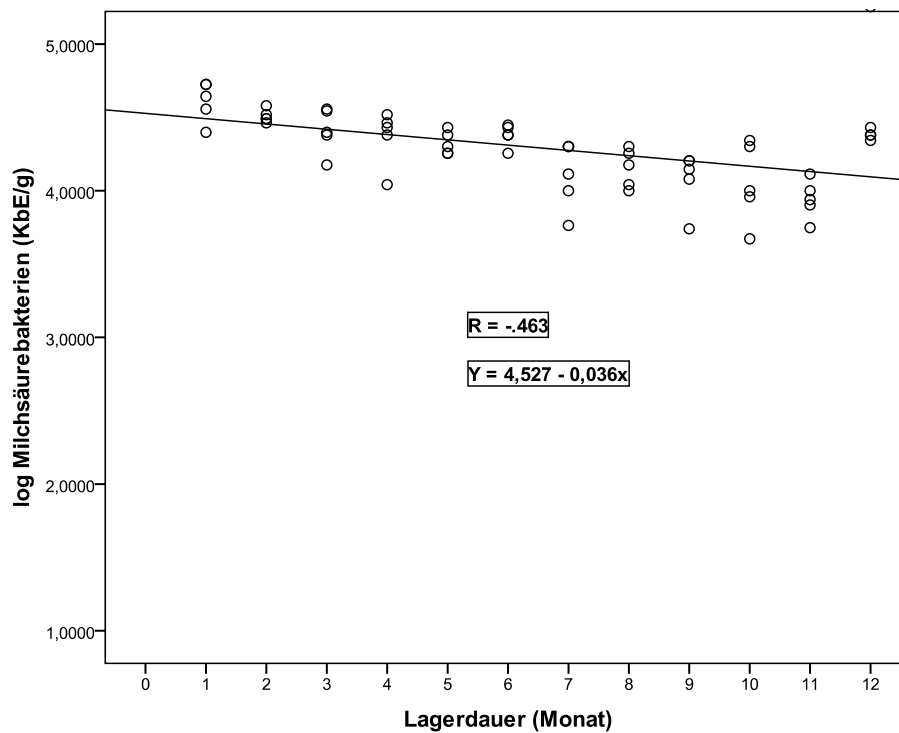


Abbildung 38: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

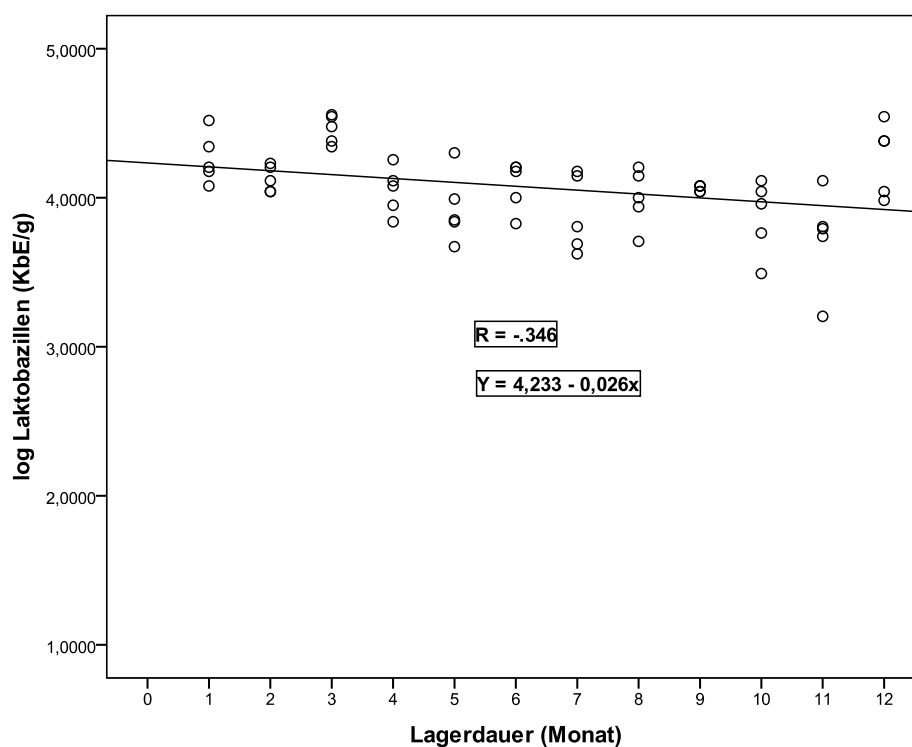


Abbildung 39: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

### 9.1.4.3 „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“

Tabelle 56: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden

Zielkeime	Korrelationskoeffizient (R)	Interpretation der Korrelation	Regressionsgerade
Aerobe Gesamtkeimzahl	-0,374**	Schwach	$Y = 5,590 - 0,055x$
Milchsäurebakterien	-0,374**	Schwach	$Y = 4,107 - 0,039x$
Laktobazillen	-0,436**	Mittel	$Y = 3,985 - 0,068x$
Pseudomonaden	-0,106	Sehr schwach	$Y = 4,993 - 0,025x$
Enterobakteriaceen	-0,658**(-0,732**)	<b>Stark</b>	$Y = 3,686 - 0,146x$
Coliforme Keime	-0,476**	Mittel	$Y = 1,605 - 0,083x$
Enterokokken	-0,518**	Mittel	$Y = 1,827 - 0,083x$
Hefen	-0,210	Sehr schwach	$Y = 1,226 - 0,022x$
Schimmelpilze	0,010	Sehr schwach	$Y = 1,015 + 0,001x$

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant

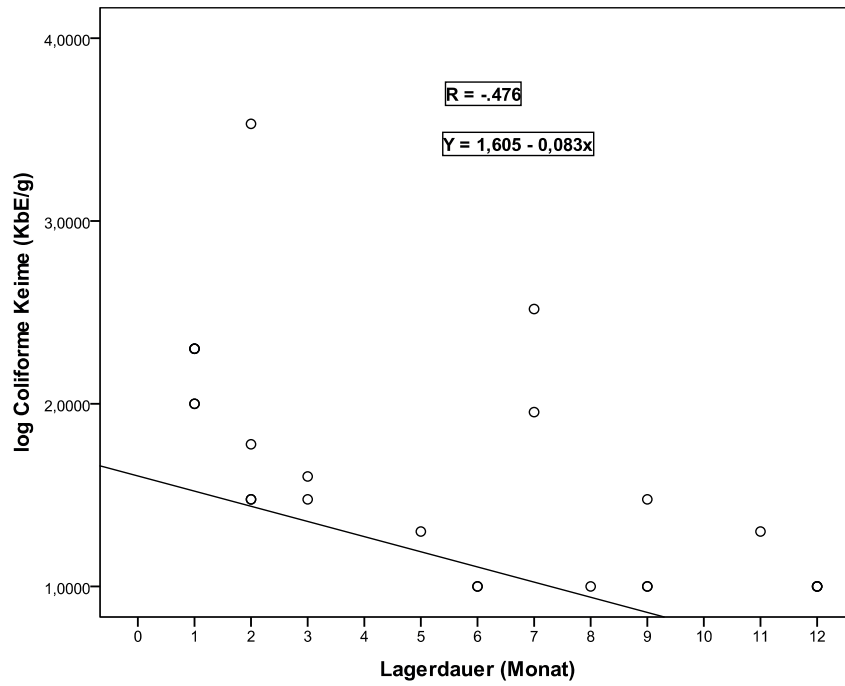


Abbildung 40: Beziehung zwischen Lagedauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung

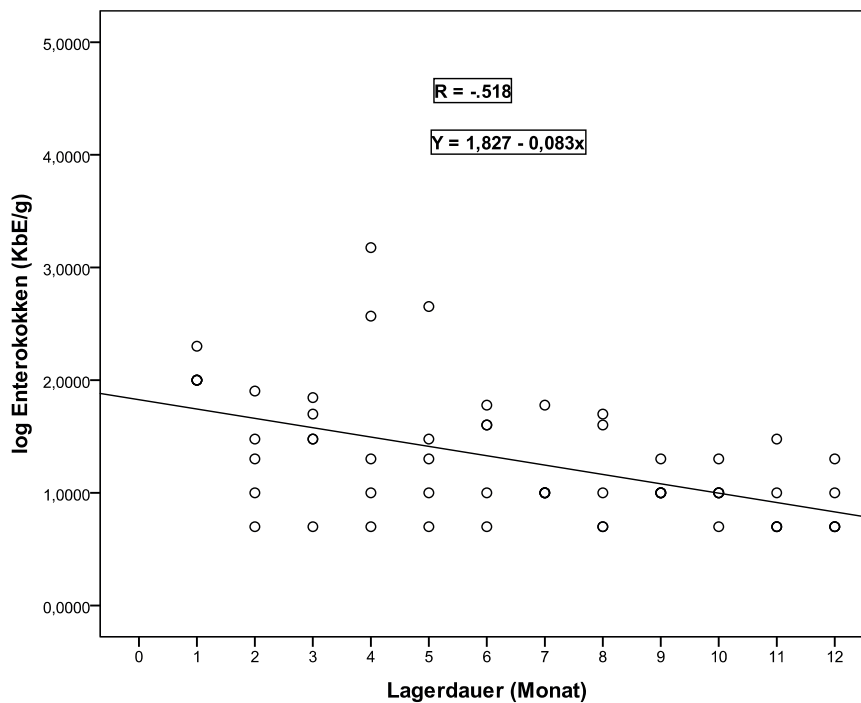


Abbildung 41: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterokokkengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

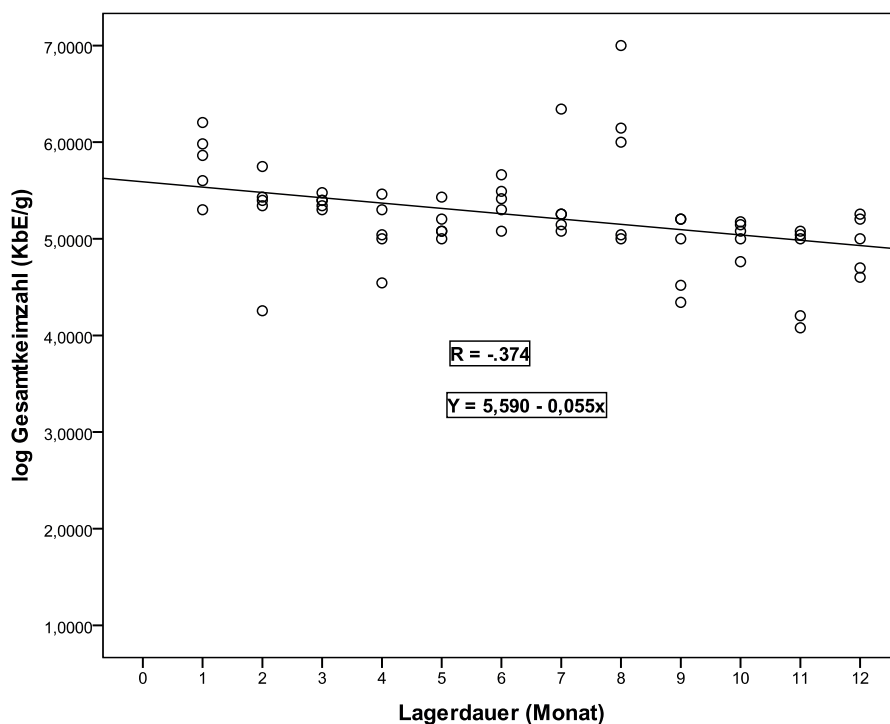


Abbildung 42: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt der GKZ während einjähriger Tiefkühlagerung

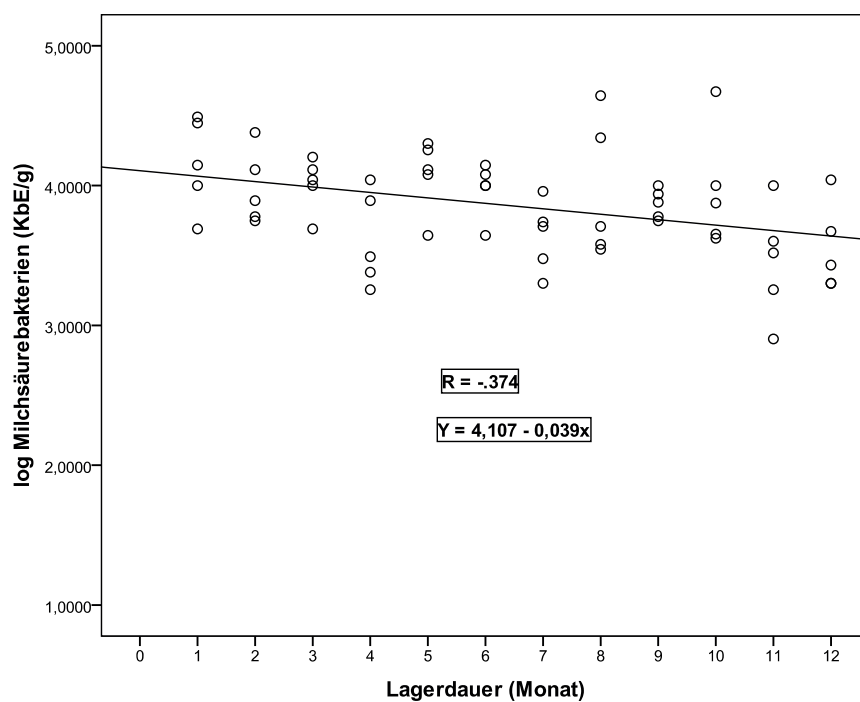


Abbildung 43: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

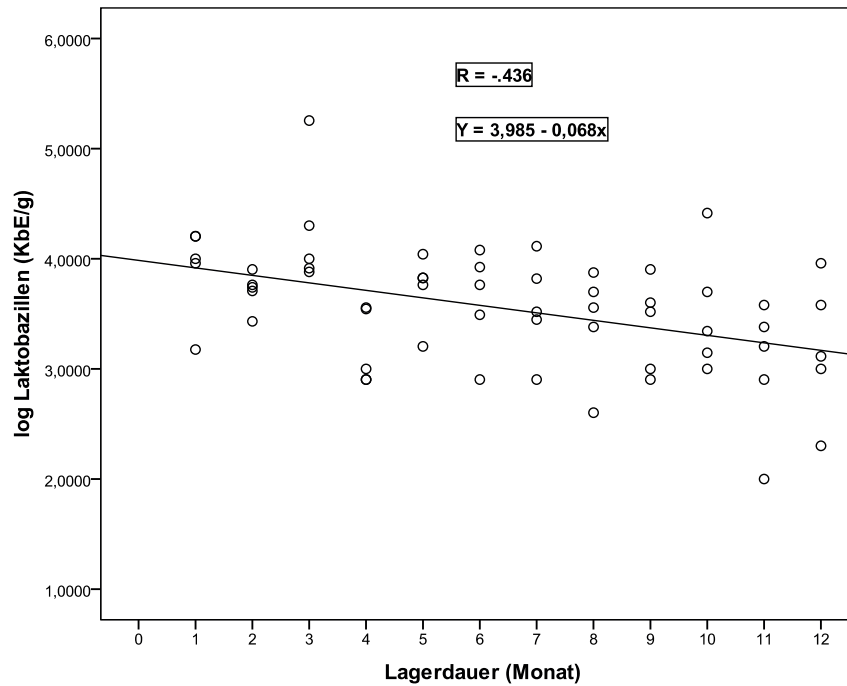


Abbildung 44: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung

## 9.1.4.4 „Stroganoff-Pfanne“

Tabelle 57: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden

Zielkeime	Korrelationskoeffizient (R)	Interpretation der Korrelation	Regressionsgerade
Gesamtkeimzahl	-0,239	Schwach	$Y = 5,738 - 0,041x$
Milchsäurebakterien	-0,092	Sehr schwach	$Y = 2,934 - 0,015x$
Laktobazillen	-0,121	Sehr schwach	$Y = 2,383 - 0,018x$
Pseudomonaden	-0,190	Sehr schwach	$Y = 5,345 - 0,040x$
Enterobakteriazeen	-0,761**	<b>Stark</b>	$Y = 4,179 - 0,230x$
Coliforme Keime	-0,390**	Schwach	$Y = 1,279 - 0,050x$
Hefen	-0,270*	Schwach	$Y = 1,281 - 0,037x$
Schimmelpilze	-0,030	Sehr schwach	$Y = 0,996 - 0,003x$

\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant

\*\*Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant



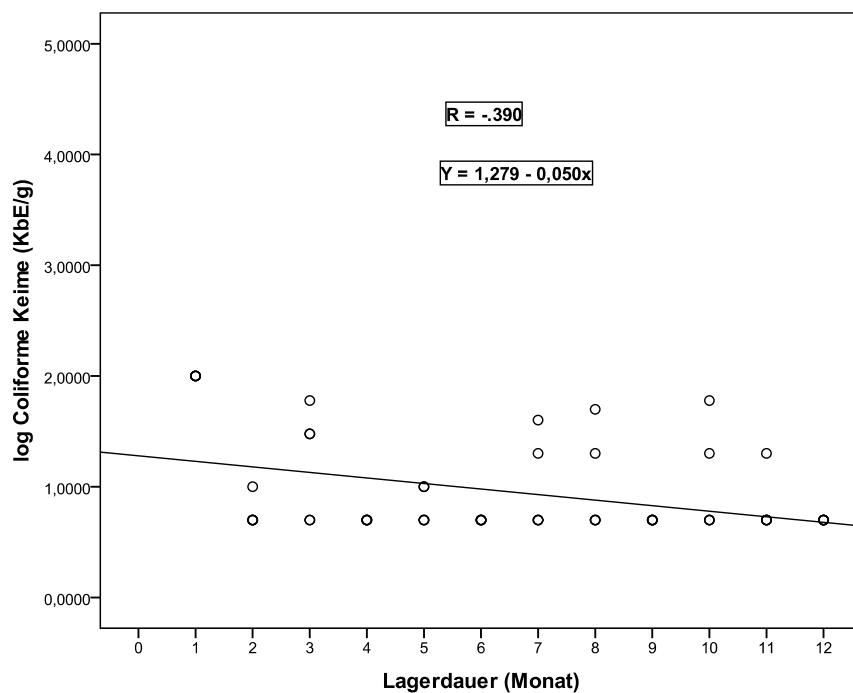


Abbildung 45: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung

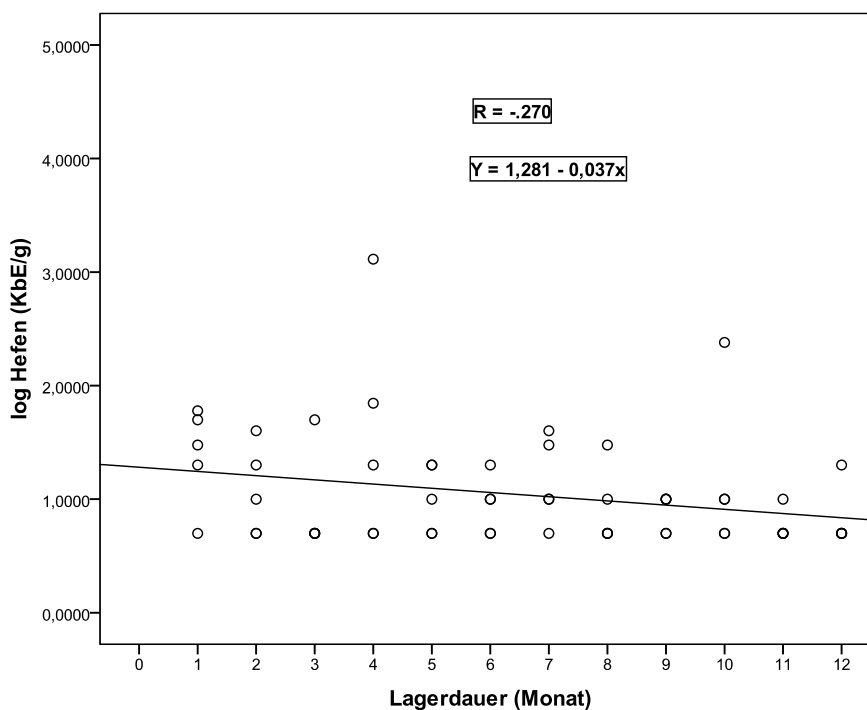


Abbildung 46: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an Hefen während einjähriger Tiefkühlagerung

### 9.1.5 Quantitative Untersuchungen mit Einführung einer Wiederbelebungsstufe

#### 9.1.5.1 „Porree, geschnitten“

Tabelle 58: Keimzahlen ( $\log_{10}$  KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/-Standardabweichung  $\log_{10}$ KbE/g)

Zielkeime	Direkte Untersuchung	Wiederbelebung	
		75 min, 20°C	75 min, 30°C
Gesamtkeimzahl	5,91±0,39	5,85±0,40	5,77±0,42
Milchsäurebakterien	4,64±0,31	4,56±0,31	4,52±0,32
Laktobazillen	3,87±0,42	3,77±0,45	3,69±0,54
Pseudomonaden	5,35±0,45	5,35±0,44	5,25±0,44
Enterobakteriazeen	4,02±0,65	4,06±0,47	3,95±0,59
Coliforme Keime	2,87±0,71	2,94±0,81	2,80±0,84
Hefen	0,90±0,33	0,87±0,42	0,86±0,30
Schimmelpilze	0,98±0,32	0,93±0,27	0,90±0,28

#### 9.1.5.2 „Champignons in Scheiben“

Tabelle 59: Keimzahlen ( $\log_{10}$  KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/-Standardabweichung  $\log_{10}$ KbE/g)

Zielkeime	Direkte Untersuchung	Wiederbelebung	
		75 min, 20°C	75 min, 30°C
Gesamtkeimzahl	5,54±0,34	5,63±0,46	5,62±0,29
Milchsäurebakterien	4,29±0,27	4,41±0,32	4,36±0,24
Laktobazillen	4,06±0,27	4,17±0,31	4,14±0,22
Pseudomonaden	5,35±0,39	5,35±0,51	5,47±0,45
Enterobakteriazeen	3,67±0,69	4,12±0,61	4,15±0,44
Coliforme Keime	2,91±0,59	3,04±0,55	3,17±0,55
<i>E. coli</i>	0,77±0,18	0,75±0,13	0,76±0,14
Hefen	2,41±0,33	2,45±0,34	2,54±0,30
Schimmelpilze	1,65±0,37	1,73±0,35	1,77±0,43

### 9.1.5.3 „Maultaschen-Gemüse-Pfanne“

Tabelle 60: Keimzahlen ( $\log_{10}$  KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/-Standardabweichung  $\log_{10}$ KbE/g)

Zielkeime	Direkte Untersuchung	Wiederbelebung 75 min, 20°C	Wiederbelebung 75 min, 30°C
Gesamtkeimzahl	5,23±0,51	5,29±0,37	5,37±0,43
Milchsäurebakterien	3,85±0,36	3,97±0,36	3,95±0,45
Laktobazillen	3,54±0,54	3,71±0,36	3,55±0,55
Pseudomonaden	4,83±0,81	5,06±0,51	5,07±0,41
Enterokokken	1,29±0,56	1,34±0,50	1,43±0,53
Enterobakteriazeen	2,74±0,77	2,99±0,82	2,97±0,62
Coliforme Keime	1,07±0,61	1,12±0,56	1,24±0,54
Hefen	1,09±0,36	1,05±0,34	1,18±0,44
Schimmelpilze	1,02±0,32	0,90±0,26	0,94±0,25

### 9.1.5.4 „Stroganoff-Pfanne“

Tabelle 61: Keimzahlen ( $\log_{10}$  KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/-Standardabweichung  $\log_{10}$ KbE/g)

Zielkeime	Direkte Untersuchung	Wiederbelebung 75 min, 20°C	Wiederbelebung 75 min, 30°C
Gesamtkeimzahl	5,47±0,60	5,29±0,60	5,22±0,87
Milchsäurebakterien	2,84±0,56	3,00±0,57	3,05±0,61
Laktobazillen	2,26±0,52	2,46±0,68	2,57±0,60
Pseudomonaden	5,08±0,73	4,76±0,79	5,05±0,57
Enterobakteriazeen	2,67±1,05	2,95±1,14	2,97±1,14
Coliforme Keime	0,96±0,44	0,84±0,40	0,98±0,55
Hefen	1,04±0,47	1,14±0,75	1,11±0,56
Schimmelpilze	0,98±0,30	0,87±0,26	1,09±0,43

## 9.2 Nährmedien und Substanzen für die mikrobiologische Untersuchung

### 9.2.1 Herstellung und Verwendung der Nährmedien

Die Nährmedien wurden im Institut für Lebensmittelhygiene anhand der entsprechenden Arbeitsanweisungen mittels kommerziell erhältlicher Trockennährböden für jede monatliche Versuchsdurchführung frisch hergestellt. Die Trockennährböden wurden in sterile Glaskolben eingewogen und mit der entsprechenden Menge demineralisiertem Wasser, welches im IFL bereitete wurde, aufgefüllt. Anschließend wurde der Glaskolben auf einem Magnetrührer bis zur vollständigen Durchmischung der Nährbodenbestandteile belassen.

Die Sterilisation erfolgte je nach Anweisung des Herstellers im Autoklav oder Dampftopf. Hiernach wurde der Nährboden im Wasserbad auf 45-50°C abgekühlt, je nach Rezeptur die entsprechenden Supplemente zugesetzt und mit einer Schichtdicke von ca. 2 mm in sterile Petrischalen (90 mm Ø) gegossen. Zuvor waren die Petrischalen mit selbstklebenden Etiketten, auf denen sich das Herstellungsdatum und das Kürzel für das entsprechende Medium befanden, gekennzeichnet worden. Zum Abkühlen und zur Verfestigung des Agars wurden die Petrischalen ca. 16-18 Stunden in waagerechter Position gelagert.

Anschließend wurden die Nährböden bis zu ihrem Einsatz bei ca. 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Jede Nährbodencharge durchlief nach Ihrer Herstellung eine Qualitätskontrolle (Überprüfung von Sterilität, Schichtdicke, Gelstabilität, Blasenbildung, pH-Wert und Farbe des Nährbodens).

Vor der Verwendung der Agarplatten erfolgte eine Vortrocknung, welche entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für ca. 10 min im Brutschrank bei 42 °C stattfand.

## 9.2.2 Rezepturen der Nährmedien

### 9.2.2.1 Pepton-Wasser, gepuffert (P)

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein, tryptisch	10,00
Natriumchlorid	5,00
di-Natriumhydrogenphosphat	9,00
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50

- Die Nährbodenbestandteile (25,50 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert. Das Medium wird in 5 l Chargen hergestellt.
- pH-Wert: 7,2 +/- 0,2
- Das gebrauchsfertige Medium ist hellbraun und klar
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gem. **L 00.00-16** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Gepuffertes Peptonwasser ist zur nicht-selektiven Voranreicherung von Bakterien, v.a. von Enterobakteriazeen, vorgesehen. Es ist reich an Nährstoffen und lässt sich somit auch sehr gut bei tiefgefrorenen Lebensmittel einsetzen, da es eine hohe Wiederbelebungsrate von subletal geschädigten Bakterien bewirkt. Das Phosphat-Puffer-System soll den pH-Wert stabil halten, damit es nicht zu einer Schädigung der Bakterien durch starke pH-Wert-Änderungen kommt.

### 9.2.2.2 Pepton-Wasser mit Agarzusatz (PW)

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein, tryptisch	1,00
Natriumchlorid	8,50
Agar	0,75

- Die Nährbodenbestandteile (10,25 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert. Danach erfolgt das Abfüllen des Mediums in Reagenzröhrchen und ein erneutes Autoklavieren, anschließend die pH-Kontrolle.
- pH-Wert bei 25°C: 7,0 +/-0,2
- Das gebrauchsfertige Peptonwasser ist klar und farblos, bei Kühlung leicht getrübt.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-18** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

## Anhang

---

- Wirkungsweise: Der Agarzusatz ist für Oberflächenverfahren (wie das Drop-plating-Verfahren) in der quantitativen mikrobiologischen Diagnostik gut geeignet, da er die Viskosität der Verdünnungsflüssigkeit erhöht.

### 9.2.2.3 Plate-Count-Agar (PC) zur Bestimmung der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	5,00
Hefeextrakt	2,50
Glucose	1,00
Agar-Agar	14,00

- Die Nährbodenbestandteile (22,50 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- pH-Wert: 7,0 +/- 0,2
- Der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und schwach gelblich bis farblos.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-35** der amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Der Nährboden ist hemmstoff- und indikatorfrei; es werden alle gewachsenen Kolonien gezählt.

### 9.2.2.4 Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS-Agar, LA) zur Bestimmung aerob wachsender Milchsäurebakterien

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	10,00
Fleischextrakt	10,00
Hefeextrakt	4,00
D(+)-Glucose	20,00
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,00
Tween 80	1,00
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,00
Natriumacetat	5,00
Magnesiumsulfat	0,20
Mangansulfat	0,04
Agar-Agar	14,00

- Die Nährbodenbestandteile (68,20 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 1 h bei 100°C im Dampftopf sterilisiert.
- pH-Wert: 5,7 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-35** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Dieser Nährboden fördert das Wachstum aller Bakterien, die Milchsäure bilden können, wie z.B. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* und *Leuconostoc*. Durch Polysorbat, Acetat, Magnesium und Mangan wird ihr Wachstum stimuliert. Dieser Nährboden besitzt eine geringe Selektivität.
- Koloniewachstum: Aerob wachsende Milchsäurebakterien erscheinen auf diesem Nährboden grau-weiß bis gelblich; es können kleine sowie auch größere Kolonien auftreten.
- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird an der zu prüfenden Kolonie ein Katalase-Test durchgeführt. Aerob wachsende Milchsäurebakterien reagieren Katalase-negativ.

#### 9.2.2.5 Sorbinsäure-Agar nach REUTER (LS) zur Bestimmung von *Lactobacillus* spp.

##### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	10,00
Fleischextrakt	10,00
Hefeextrakt	4,00
D(+)-Glucose	20,00
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,00
Tween 80	1,00
di-Ammoniumhydrogencitrat	2,00
Natriumacetat	5,00
Magnesiumsulfat	0,20
Mangansulfat	0,04
Agar-Agar	14,00

- Die Nährbodenbestandteile (68,20 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 1 h bei 100°C im Dampftopf sterilisiert.
- pH-Wert: 5,0 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-31** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

- Wirkungsweise: Dieser Nährboden ist eine Modifikation des o.g. Nährbodens für aerob wachsende Milchsäurebakterien. Ihm wurde 0,4 g Sorbinsäure zugesetzt, um über den niedrigeren pH-Wert eine Selektion zu erreichen. *Lactobacillus* spp. vertragen einen niedrigeren pH als Streptokokken, Pediokokken und *Leuconostoc*. Des Weiteren werden aufgrund der anaeroben Bebrütung dieses Nährbodens obligat aerobe Keime in ihrem Wachstum gehemmt.
- Koloniewachstum: Laktobazillen erscheinen auf diesem Nährboden unter anaeroben Bedingungen grau-weiß bis gelblich; es können kleine wie auch größere Kolonien auftreten.
- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird an der zu prüfenden Kolonie ein Katalase-Test durchgeführt. Laktobazillen reagieren Katalase-negativ.

### **9.2.2.6 Citrate Azide Tween Carbonate (CATC) Nährboden-Basis (CATC Selektivagar Basis nach BURKWALL und HARTMANN (1964) modifiziert durch REUTER (1968)) zur Bestimmung von Enterokokken**

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	15,00
Hefeextrakt	5,00
Kaliumhydrogenphosphat	5,00
Natriumcitrat	15,00
Tween 80	1,00
Agar-Agar	15,00

- Die Nährbodenbestandteile (56,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren werden dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen 20 ml/l der 10 %igen Natriumcarbonat-Lösung, 10 ml/l der 1%igen Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung und 4 ml/l der 10 %igen Natriumazid-Lösung zugemischt.
- pH-Wert: 7,0 +/- 0,2 bei 25°C
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-32** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Durch die Zugabe von Citrat und Azid wird die Begleitflora fast vollständig unterdrückt. Enterokokken reduzieren 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid zu rotem Formazan und werden dadurch rot angefärbt.
- Koloniewachstum: Enterokokken erscheinen auf diesem Selektivnährboden kräftig oder weniger kräftig rot; rosa bis weißliche Kolonien werden nicht gezählt.



- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird an der zu prüfenden ein Katalase-Test durchgeführt. Enterokokken reagieren Katalase-negativ.

### 9.2.2.7 Palcam-Agar (PAL) nach VAN NETTEN et al. zur Bestimmung von *Listeria monocytogenes*

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton	23,00
Hefeextrakt	3,00
Stärke	1,00
Natriumchlorid	5,00
D-Glucose	0,50
D-Mannit	10,00
Äskulin	0,80
Eisen(III)ammoniumcitrat	0,50
Phenolrot	0,08
Lithiumchlorid	15,00
Agar-Agar	13,00

#### Zusammensetzung PALCAM-Listeria-Selektivsupplement nach VAN NETTEN et al. (Merck):

Polymyxin-B-sulfat	5,00 mg/Fläschchen
Ceftazidim	10,00 mg/Fläschchen
Acriflavin	2,50 mg/Fläschchen

- Die Nährbodenbestandteile (71,90 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren wird dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen in je 1 ml destilliertem Wasser gelöstes PALCAM-Listeria-Selektivsupplement (2 Fläschchen/1 l Agar) nach VAN NETTEN et al. (Merck) zugefügt.
- pH-Wert: 7,0 +/- 0,1 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-22** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Durch im Nährboden enthaltenes Polymyxin, Acriflavin, Ceftazidim und Lithiumchlorid besitzt dieses Medium hohe Selektivität. Die gramnegative Begleitflora wird unterdrückt und die meisten grampositiven Keime ebenfalls gehemmt.

In diesem Nährboden sind zwei Indikatorsysteme enthalten, die eine Identifizierung von *Listeria monocytogenes* erleichtern:

*L. monocytogenes* spaltet einerseits das Äsculin zu Äsculetin und Glucose. Äsculetin bildet mit den Eisen (III)-Ionen olivgrüne bis schwarze Komplexe, wodurch sich die Kolonien anfärben sowie schwarze Höfe um die Kolonien herum entstehen.

*L. monocytogenes* kann andererseits Mannit nicht verstoffwechseln. Mannit-positive-Keime führen durch pH-Wert-Absenkung zum Farbumschlag des pH-Indikators in den gelben Bereich.

- Koloniewachstum: Listerien-charakteristische Kolonien wachsen auf Palcam-Agar grüngrau mit dunklem Zentrum, sind 1,5–2 mm groß, meist rund, flach gewölbt, glänzend und umgeben von einem schwarzen bis schwarzbraunem Hof (Äskulinspaltung).
- Bestätigung der Kolonien: Fünf verdächtige Kolonien auf TSYEA-Agar ausstreichen (24 h bei 37°C inkubieren), Katalase-Test und Camp-Test durchführen sowie Xylose- und Rhamnosehaltige Kohlehydratnährböden beimpfen.

### 9.2.2.8 Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymolblau-Agar (PEMBA) zur Bestimmung von *Bacillus cereus*

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein, tryptisch	1,00
D-Mannit	10,00
Natriumpyruvat	10,00
Magnesiumsulfat	0,10
Natriumchlorid	2,00
di-Natriumhydrogenphosphat	2,50
Kaliumdihydrogenphosphat	0,25
Bromthymolblau	0,12
Agar-Agar	14,00

- Die Nährbodenbestandteile (41,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren wird dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen Eigelb-Emulsion (50,00 ml/l) und *Bacillus cereus*-Selektiv-Supplement zugemischt.
- pH-Wert: 7,2 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 00.00-25** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Nährboden zur Isolierung und Identifizierung von *Bacillus cereus*. Der Peptonanteil und das Natriumpyruvat sorgen für eine verbesserte Eigelb-

Präzipitation und Sporenbildung. Der pH-Indikator Bromthymol-blau zeigt Mannit-Verwertung an. Polymyxin B ist ein selektierender Zusatz.

- Koloniewachstum: Die *Bacillus cereus*-Kolonien sind gezackt, ca. 5 mm groß, pfauenblau bis türkis, umgeben von einer starken Eigelb-Präzipitation in der gleichen Färbung.

### 9.2.2.9 BAIRD-PARKER-Agar (BP) zur Bestimmung Koagulase-positiver Staphylokokken

#### Zusammensetzung (g/l):

Trypton	10,00
Fleischextrakt	5,00
Hefeextrakt	1,00
Natriumpyruvat	10,00
Glycin	12,00
Lithiumchlorid	5,00
Agar-Agar	20,00

- Die Nährbodenbestandteile (63,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren wird dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen die Eigelb-Tellurit-Emulsion zugemischt (50,00 ml/l).
- pH-Wert: 6,8 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-22** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Nährboden zur Isolierung und Differenzierung von Staphylokokken.
- Lithiumchlorid und Tellurit hemmen die Begleitflora, während Pyruvat und Glycin auf Staphylokokken wachstumsfördernd wirken.
- Koloniewachstum: Koagulase-positive Staphylokokken (wie z.B. *S. aureus*) wachsen schwarz (aufgrund der Reduktion von Tellurit zu Tellur) und glänzend mit einem Durchmesser von 1-5 mm und einem schmalen weißen Rand. Durch Proteolyse sind die Kolonien von einem klaren Hof von 2-5 mm Breite umgeben, und durch Lipolyse bilden sich opake Zonen in den klaren Höfen.  
Kolonien mit Eigelb-Reaktion und Telluritreduktion kommen als *S. aureus*-Kolonien in Betracht.
- Bestätigung der Kolonien: Verdächtige Kolonien, welche die o.g. Kriterien aufweisen werden mittels Koagulase-Test untersucht.

### 9.2.2.10 Tryptose-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC) zum Nachweis von *Clostridium perfringens*

#### Zusammensetzung (g/l):

Tryptose	15,00
Pepton aus Sojamehl	5,00
Hefeextrakt	5,00
Natriumdisulfit	1,00
Ammoniumeisen(III)-citrat	1,00
Agar-Agar	19,00

- Die Nährbodenbestandteile (46,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 10 min bei 121°C autoklaviert.
- Nach dem Autoklavieren wird dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen 8 ml/l Cycloserin-Lösung (5 %) zugemischt.
- pH-Wert: 7,6 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-20** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Sulfit und Eisensalz erzeugen eine Markierung der schwefelwasserstoffbildenden Kolonien, indem sie schwarz gefärbt werden. Durch Cycloserin wird die Begleitflora gehemmt; gleichzeitig bewirkt es die Entstehung kleiner Kolonien, um eine diffuse Schwärzung zu verhindern. Der TSC-Agar ist bei der Erfassung von hitze-oder kältegeschädigtem *Clostridium perfringens* anderen Selektivnährböden überlegen.
- Koloniewachstum: *Clostridium perfringens* wächst in schwarzen, runden Kolonien.
- Bestätigung der Kolonien: Zur genauen Identifikation der Spezies sind weitere diagnostische Verfahren notwendig.

### 9.2.2.11 Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP) nach KIELWEIN zum Nachweis von Pseudomonaden und Aeromonaden

#### Zusammensetzung (g/l):

Natrium-L(+)-glutamat	10,00
Stärke, löslich	20,00
Kaliumdihydrogenphosphat	2,00
Magnesiumsulfat	0,50
Phenolrot	0,36
Agar	12,00

- Die Nährbodenbestandteile (45,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- Anschließend wird dem auf etwa 50°C abgekühlten Basisnährboden unter aseptischen Bedingungen 1 ml/l Penicillin-Lösung (Penicillin-G-Lösung) zugemischt.
- pH-Wert: 7,2 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Die angegebene Zusammensetzung und Art und Weise der Herstellung entsprechen den Angaben des Herstellers (Merck).
- Wirkungsweise: Aeromonaden verstoffwechseln die enthaltene Stärke unter Säurebildung, was einen Umschlag des Indikators Phenolrot nach Gelb bewirkt. Pseudomonaden verwerten keine Stärke. Die Begleitflora wird durch ein mangelndes Nährstoffangebot gehemmt, da viele anspruchsvolle Keime Stärke und Glutamat nicht verwerten können. Die Zugabe von Penicillin bewirkt eine bessere Selektivität.
- Koloniewachstum: Pseudomonaden erscheinen auf diesem Nährboden als große, blauviolette (Durchmesser 2-3 mm) Kolonien mit rotvioletter Umgebung. Aeromonaden wachsen als große gelbe Kolonien in gelber Umgebung.
- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird an der zu prüfenden Kolonie ein Oxidase- und ein Katalasetest durchgeführt. Pseudomonaden und Aeromonaden reagieren Katalase- und Oxidase-positiv.

### 9.2.2.12 Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose (VRBD)-Agar (VG) zum Nachweis von Enterobakteriäzen

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Gelatine	7,00
Hefeextrakt	3,00
Natriumchlorid	5,00
Glucose	10,00
Neutralrot	0,03
Gallesalzmischung	1,50
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,00

- Die Nährbodenbestandteile (39,50 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 1 h bei 100°C im Dampftopf sterilisiert.
- pH-Wert: 7,3 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-25** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.

- Wirkungsweise: Durch die Gallensalze und das Kristallviolett wird die Begleitflora größtenteils gehemmt. Die Enterobakteriazeen bauen Glucose unter Säurebildung ab, was sich in einem Farbumschlag des pH-Indikators nach Rot und eventueller Ausfällung von Gallensäuren um die Kolonien manifestiert.
- Koloniewachstum: Enterobakteriazeen erscheinen auf diesem Nähragar rot mit rötlichem Präzipitationshof. Gelegentlich kommen auch solche Enterobakteriazeen-Kolonien vor, die rosa sind und/oder keine Präzipitationshöfe aufweisen. Diese Kolonien werden mitgezählt.
- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird von der zu prüfenden Kolonie ein Enterotube II beimpft und nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C ausgewertet.

### 9.2.2.13 Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Lactose (VRB)-Agar (VL) zum Nachweis coliformer Keime

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Gelatine	7,00
Hefeextrakt	3,00
Natriumchlorid	5,00
Lactose	10,00
Neutralrot	0,03
Gallesalzmischung	1,50
Kristallviolett	0,002
Agar-Agar	13,00

- Die Nährbodenbestandteile (39,50 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 1 h bei 100°C im Dampftopf sterilisiert.
- pH-Wert: 7,4 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 01.00-3** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Durch Gallensalze und Kristallviolett wird die Begleitflora größtenteils gehemmt. Coliforme Keime bauen Lactose unter Säurebildung ab, was durch einen Farbumschlag des Indikators Neutralrot nach Rot und eine Ausfällung von Gallensäuren angezeigt wird.
- Koloniewachstum: Coliforme Keime erscheinen auf diesem Nährboden als rosafarbene bis rote Kolonien mit rötlichem Präzipitationshof. Durchmesser 1 – 2 mm.
- Bestätigung der Kolonien: In Zweifelsfällen wird von der zu prüfenden Kolonie ein Enterotube II beimpft und nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C ausgewertet.

### 9.2.2.14 Fluorocult ECD-Agar zum Nachweis von *Escherichia coli*

#### Zusammensetzung (g/l):

Pepton aus Casein	20,00
Lactose	5,00
Natriumchlorid	5,00
Gallesalzmischung	1,50
di-Kaliumhydrogenphosphat	4,00
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50
Agar-Agar	15,00
Tryptophan	1,00
4-Methylumbellyferyl- $\beta$ -D-glucuronid	0,07

- Die Nährbodenbestandteile (53,10 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 15 min bei 121°C autoklaviert.
- pH-Wert: 7,0 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-36** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Durch die Gallensalzmischung wird die Begleitflora gehemmt. *E. coli* verstoffwechselt Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid und ist unter UV-Licht als fluoreszierende Kolonie erkennbar.
- Koloniewachstum: Die Kolonien fluoreszieren unter UV-Licht (365 nm) hellblau-weißlich.
- Bestätigung der Kolonien: Die verdächtigen fluoreszierenden Kolonien werden mit Kovacs Indol-Reagenz überschichtet. Verläuft die Reaktion Indol-positiv (Rotfärbung der Kolonien nach 2-10 Sekunden), sind diese Kolonien als *E. coli* zu bewerten.

### 9.2.2.15 Glutaminat-Agar (GLUTA) zur Wiederbelebung von *Escherichia coli*

#### Zusammensetzung (g/l):

Lactose	10,00
Natriumformiat	0,25
L(-)-Cystin	0,02
L(-)-Asparaginsäure	0,024
L(+)-Argininmonohydrochlorid	0,02
Thiamin	0,001
Nikotinsäure	0,001
Pantothensäure	0,001
Magnesiumsulfat	0,10

## Anhang

---

Ammoniumeisen(III)citrat	0,01
di-Kaliumhydrogenphosphat	0,90
Calciumchlorid	0,01
Bromkresolpurpur	0,01

### Zusätzlich:

Agar-Agar	16,00
-----------	-------

- Die Nährbodenbestandteile (11,40 g/l) sowie 2,50 g/l Ammoniumchlorid und 6,40 g/l Natriumglutamat werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert und 10 min bei 116°C autoklaviert.
- pH-Wert: 6,7 +/- 0,2 bei 25°C.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 06.00-36** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Der Glutamat-Agar dient als Wiederbelebungsmedium beim quantitativen *E. coli*-Nachweis. Durch diesen zusätzlichen Schritt können geschädigte Zellen aus gefrorenen, getrockneten, hitzebehandelten und sauren Lebensmitteln „wiederbelebt“ und angezüchtet werden. Dazu wird 1 ml der Erstverdünnung auf dem Membranfilter aufgetragen für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird der Membranfilter auf den ECD-Agar übertragen.
- Koloniewachstum und Bestätigung der Kolonien: s. ECD-Agar

### **9.2.2.16 Bengalrot-Chloramphenicol-Agar (RO) zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen**

#### Zusammensetzung (g/l):

Mycologisches Pepton	5,00
Glucose	10,00
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,00
Magnesiumsulfat	0,50
Bengalrot	0,05
Agar	15,50

Chloramphenicol-Supplement 50,00 mg je Röhrchen (Merck)

- Die Nährbodenbestandteile (32,00 g/l) werden in der jeweiligen Menge demineralisiertem Wasser suspendiert.



- Pro 0,5 l Nährboden wird der Inhalt eines Röhrchens Chloramphenicol-Selektiv-Supplement (50,00 mg) in 3,00 ml Ethanol gelöst, dem Basisnährboden zugemischt und 5 min bei 121°C autoklaviert.
- pH-Wert: 7,2 +/- 0,2 bei 25°C.
- Der gebrauchsfertige Nährboden ist klar und pink.
- Validierung: Das beschriebene Verfahren entspricht sachlich der Methode gemäß **L 01.00-37** der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB.
- Wirkungsweise: Der Zusatz von Chloramphenicol unterdrückt das Bakterienwachstum. Bengalrot wird von Hefen und Schimmelpilzen intrazellulär aufgenommen; außerdem begrenzt Bengalrot die Größe und Höhe der Schimmelpilz-Kolonien und verhindert somit ein Überwuchern.
- Koloniewachstum: Hefen und Schimmelpilze können durch die Aufnahme von Bengalrot rosa erscheinen. Kolonien von Schimmelpilzen fallen dabei durch ihr Mycel auf, so dass Hefen und Schimmelpilze getrennt voneinander ausgezählt werden können.

### 9.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial für die Herstellung der Nährmedien

Autoklav 980603	Fritz Gössner GmbH&Co.KG, Hamburg
Autoklav 950102	Fritz Gössner GmbH&Co. KG, Hamburg
Autoklav 950106	Fritz Gössner GmbH&Co.KG, Hamburg
Dampftopf Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Etikettiergerät	Meto GmbH, Heppenheim
Petrischalen	Greiner bio-one,
pH-Meter 761	Knick, Berlin
pH-mV-Meter 539	WTW, Weilheim
Pipetten 1 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Trockennährböden	Merck, Darmstadt
Trockennährböden	Oxoid, Wesel
Waage 2462097	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbad GW 700	Fritz Gössner GmbH&Co.KG, Hamburg

### 9.4 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien für die bakteriologische Untersuchung

Anaerocult®Merck-Anaerobiertöpfe 2,5 l	Oxoid, Wesel
AnaeroGen	Oxoid, Wesel
Anaerobic Indicator	Oxoid, Wesel
Brutschrank 25°C	Memmert, Schwabach
Brutschrank 30°C	Memmert, Schwabach
Brutschrank 37°C	Memmert, Schwabach
Brutschrank 42°C	Memmert, Schwabach
Brutschrank 44°C	Heraeus, Hanau
BD BBL Enterotube II	BD Diagnostics, Heidelberg
BD BBL Oxi/Ferm Tube II	BD Diagnostics, Heidelberg
Fireboy	Tecnomara AG, Zürich
Gefrierschrank	Bosch,
Impfösen	Schuett-Biotec,
Indolreagenz (Kovacs)	Merck, Darmstadt
Katalase Bactident®	Merck, Darmstadt
Klimaschrank RUMED	Rubarth Apparate GmbH
Koagulase-EDTA-Kaninchenplasma Bactident®	Merck, Darmstadt
Membran-Filter 85mm, 0,45µm	Oxoid, Wesel
Mikroskop	Carl Zeiss, Typ Standard KF 2
Oxidase Bactident®-Teststreifen	Merck, Darmstadt
Petrischalen (90mmØ)	Greiner bio-one,
Pipetten 1ml	Sarstedt, Nümbrecht
Präzisionstaschenthermometer GTH 175/PT	Conrad Electronics, Hirschau
Stomacher Bag Mixer	Interscience, Frankreich
Stomacherbeutel mit Filter	Interscience, Frankreich
Waage LP4200S	Sartorius, Göttingen
Waage	Sartorius, Göttingen
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserbad W19	Haake, Karlsruhe

Sowie laborübliche Pinzetten, Einmalhandschuhe, Scheren, Bunsenbrenner und Besteck.

## 9.5 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.5.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikrobieller Status ( $\log_{10}$ KbE/g) der ungefrorenen Produkte <b>"Porree, geschnitten"</b> und <b>"Champignons in Scheiben"</b> .....	83
Abbildung 2: Mikroorganismengehalt des ungefrorenen Produktes <b>"Porree, geschnitten"</b> sowie nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung .....	85
Abbildung 3: Mikroorganismengehalt des ungefrorenen Produktes <b>„Champignons in Scheiben“</b> sowie nach Gefrierprozess und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung.....	86
Abbildung 4: Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$ KbE/g) der tiefgefrorenen Erzeugnisse <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> und <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> nach vierwöchiger Tiefgefrierlagerung .....	93
Abbildung 5: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses <b>"Porree, geschnitten"</b> .....	97
Abbildung 6: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses <b>"Champignons in Scheiben"</b> .....	98
Abbildung 7: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> .....	99
Abbildung 8: Jahresverlauf der Gesamtkeimzahl, aeroben Milchsäurebakterien und Laktobazillen des Erzeugnisses <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> .....	100
Abbildung 9: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keime des Erzeugnisses <b>"Porree, geschnitten"</b> .....	103
Abbildung 10: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen, coliformen Keime und <i>E. coli</i> des Erzeugnisses <b>"Champignons in Scheiben"</b> .....	104
Abbildung 11: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefkühl Lagerung im Produkt <b>„Champignons in Scheiben“</b> .....	105
Abbildung 12: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt <b>"Champignons in Scheiben"</b> .....	106
Abbildung 13: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen, coliformen Keime und Enterokokken des Erzeugnisses <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> .....	107
Abbildung 14: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> .....	108
Abbildung 15: Jahresverlauf der Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keime des Erzeugnisses <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> .....	109
Abbildung 16: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterobakteriazeengehalt während einjähriger Tiefgefrierlagerung im Produkt <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> .....	110

## Anhang

---

Abbildung 17: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses " <b>Porree, geschnitten</b> " .....	115
Abbildung 18: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	116
Abbildung 19: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " .....	117
Abbildung 20: Jahresverlauf der Hefen und Schimmelpilze des Erzeugnisses " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " .....	118
Abbildung 21: Enterobakteriazeengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufe bei 20°C und 30°C im Produkt „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ .....	121
Abbildung 22: Gehalt an coliformen Keimen nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	122
Abbildung 23: Gehalt an Milchsäurebakterien nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	122
Abbildung 24: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	123
Abbildung 25: Keimgehalt der Hefen nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	123
Abbildung 26: Enterobakteriazeengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " .....	124
Abbildung 27: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " .....	124
Abbildung 28: Enterobakteriazeengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " .....	125
Abbildung 29: Gehalt an Milchsäurebakterien nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " .....	125
Abbildung 30: Laktobazillengehalt nach direkter Untersuchung sowie nach Wiederbelebungsstufen bei 20°C und 30°C im Erzeugnis " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " .....	126
Abbildung 31: Keimzahlmittelwerte des Produktes " <b>Porree, geschnitten</b> " .....	178
Abbildung 32: Keimzahlmittelwerte des Produktes " <b>Champignons in Scheiben</b> " .....	178
Abbildung 33: Keimzahlmittelwerte des Produktes " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " .....	179
Abbildung 34: Keimzahlmittelwerte des Produktes " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " .....	179
Abbildung 35: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung .....	180

Abbildung 36: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	181
Abbildung 37: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung.....	181
Abbildung 38: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	182
Abbildung 39: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	183
Abbildung 40: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung.....	184
Abbildung 41: Beziehung zwischen Lagerdauer und Enterokokkengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	184
Abbildung 42: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt der GKZ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	185
Abbildung 43: Beziehung zwischen Lagerdauer und Milchsäurebakteriengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	185
Abbildung 44: Beziehung zwischen Lagerdauer und Laktobazillengehalt während einjähriger Tiefkühlagerung.....	186
Abbildung 45: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an coliformen Keimen während einjähriger Tiefkühlagerung.....	187
Abbildung 46: Beziehung zwischen Lagerdauer und Gehalt an Hefen während einjähriger Tiefkühlagerung.....	187

### 9.5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: pH-Wert, Säuregehalt und Gesamtkeimzahl bei verschiedenen Temperaturen (nach TABATABAIE und MORTAZAVI 2008).....	15
Tabelle 2: Einflussfaktoren auf Überleben und Absterben von Mikroorganismen (nach BEYER 1983).....	21
Tabelle 3: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (nach GOTLIB 1951).....	25
Tabelle 4: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei -18°C in gefrorenen Erbsen (nach HALL 1969).....	25
Tabelle 5: Anteil überlebender Mikroorganismen (%) während Lagerung bei -29°C in gefrorenen Erbsen (nach HALL 1969).....	25
Tabelle 6: Überlebensraten (%) zweier <i>Pseudomonas</i> spp. während Lagerung von Erbsen bei unterschiedlichen Temperaturen (nach HALL 1969).....	56

## Anhang

---

Tabelle 7: Probenverteilung der untersuchten Tiefkühlerzeugnisse .....	69
Tabelle 8: Identifizierung von <i>Listeria</i> spp. (nach BAUMGART 2004).....	73
Tabelle 9: Bebrütungstemperatur und -dauer für die verwendeten Nährböden .....	76
Tabelle 10: Interpretation des Korrelationskoeffizienten R bzw. r (BROSIOUS 1998): .....	81
Tabelle 11: Mikroorganismengehalt der ungefrorenen Produkte " <b>Porree, geschnitten</b> " und " <b>Champignons in Scheiben</b> " (n=5), Mittelwert+/-Standardabweichung ( $\log_{10}$ KbE/g) .....	82
Tabelle 12: Identifizierte Spezies von Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keimen .....	84
Tabelle 13: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Porree, geschnitten</b> " im ungefrorenen Zustand, nach Gefrieren und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung (n=5) sowie Keimzahlreduktion (Mittelwerte +/-Standardabweichung ( $\log_{10}$ KbE/g)) und Absterberate (%) .....	85
Tabelle 14: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Champignons in Scheiben</b> " im ungefrorenen Zustand, nach Gefrieren und vierwöchiger Tiefgefrierlagerung (n=5), Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung ( $\log_{10}$ KbE/g)) und Absterberate (%) .....	86
Tabelle 15: Mikroorganismengehalt der tiefgefrorenen Erzeugnisse " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " und " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " nach vierwöchiger TK-Lagerung (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung ( $\log_{10}$ KbE/g)) .....	92
Tabelle 16: Identifizierte Spezies von Pseudomonaden, Enterobakteriazeen und coliformen Keimen .....	94
Tabelle 17: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Porree, geschnitten</b> " nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	97
Tabelle 18: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Champignons in Scheiben</b> " nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%) .....	98
Tabelle 19: Mikroorganismengehalt des Produktes „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ nach vierwöchiger Gefrierlagerung sowie anhand der Regressionsgeraden berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%) .....	98
Tabelle 20: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> " nach vierwöchiger und einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%) .....	99
Tabelle 21: Mikroorganismengehalt des Produktes " <b>Stroganoff-Pfanne</b> " nach vierwöchiger sowie einjähriger Gefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	100

Tabelle 22: Mikroorganismengehalt im Produkt <b>"Porree, geschnitten"</b> nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	103
Tabelle 23: Mikroorganismengehalt im Produkt <b>"Champignons in Scheiben"</b> nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	104
Tabelle 24: Mikroorganismengehalt des Produktes <b>„Champignons in Scheiben“</b> nach vierwöchiger Gefrierlagerung, anhand der Regressionsgeraden berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	105
Tabelle 25: Mikroorganismengehalt im Erzeugnis <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion(n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	107
Tabelle 26: Enterobakteriazeengehalt im Produkt <b>„Maultaschen-Gemüse-Pfanne“</b> , berechneter Wert für den 12. Lagerungsmonat, Keimzahlreduktion (Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und Absterberate (%) .....	108
Tabelle 27: Mikroorganismengehalt im Erzeugnis <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> nach vierwöchiger und einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion(n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	109
Tabelle 28: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis <b>"Porree, geschnitten"</b> nach vierwöchiger sowie einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	115
Tabelle 29: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis <b>"Champignons in Scheiben"</b> nach vierwöchiger sowie nach einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	116
Tabelle 30: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis <b>"Maultaschen-Gemüse-Pfanne"</b> nach vierwöchiger sowie nach einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	117
Tabelle 31: Gehalt an Hefen und Schimmelpilzen im Erzeugnis <b>"Stroganoff-Pfanne"</b> nach vierwöchiger sowie einjähriger Tiefgefrierlagerung, Keimzahlreduktion (n=5, Mittelwerte+/-Standardabweichung log <sub>10</sub> KbE/g) und durchschnittliche monatliche Absterberate (%).....	118
Tabelle 32: Mikrobiologischer Status (log <sub>10</sub> KbE/g) der Hackfleischproben 1-3.....	167
Tabelle 33: Mikrobiologischer Status (log <sub>10</sub> KbE/g) der Hackfleischproben 1-2.....	167
Tabelle 34: Mikroorganismengehalte (log <sub>10</sub> KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der ersten Parallelprobe <b>„Porree, geschnitten“</b> während einjähriger Tiefkühlagerung.....	168

## Anhang

---

Tabelle 35: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „ <b>Porree, geschnitten</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	168
Tabelle 36: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „ <b>Porree, geschnitten</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	169
Tabelle 37: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der vierten Parallelprobe „ <b>Porree, geschnitten</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	169
Tabelle 38: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der fünften Parallelprobe „ <b>Porree, geschnitten</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	170
Tabelle 39: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung	170
Tabelle 40: Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	171
Tabelle 41: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung	171
Tabelle 42: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Wert der vierten Parallelprobe „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	172
Tabelle 43: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Wert der fünften Parallelprobe „ <b>Champignons in Scheiben</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	172
Tabelle 44: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „ <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	173
Tabelle 45: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „ <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	173
Tabelle 46: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Wert der dritten Parallelprobe „ <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	174
Tabelle 47: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Wert der vierten Parallelprobe „ <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	174
Tabelle 48: Mikroorganismengehalt ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Wert der fünften Parallelprobe „ <b>Maultaschen-Gemüse-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung.....	175



---

Tabelle 49: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der ersten Parallelprobe „ <b>Stroganoff-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	175
Tabelle 50: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der zweiten Parallelprobe „ <b>Stroganoff-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	176
Tabelle 51: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der dritten Parallelprobe „ <b>Stroganoff-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	176
Tabelle 52: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der vierten Parallelprobe „ <b>Stroganoff-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	177
Tabelle 53: Mikroorganismengehalte ( $\log_{10}$ KbE/g) sowie Temperaturen* und pH-Werte der fünften Parallelprobe „ <b>Stroganoff-Pfanne</b> “ während einjähriger Tiefkühlagerung .....	177
Tabelle 54: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden....	180
Tabelle 55: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden....	182
Tabelle 56: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden....	183
Tabelle 57: Pearson Korrelationskoeffizient mit Interpretation und Regressionsgeraden....	186
Tabelle 58: Keimzahlen ( $\log_{10}$ KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/- Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) .....	188
Tabelle 59: Keimzahlen ( $\log_{10}$ KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/- Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) .....	188
Tabelle 60: Keimzahlen ( $\log_{10}$ KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/- Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) .....	189
Tabelle 61: Keimzahlen ( $\log_{10}$ KbE/g) der direkten Untersuchung im tiefgefrorenen Zustand sowie nach Einschaltung der Wiederbelebungsstufen (n=60, Mittelwerte +/- Standardabweichung $\log_{10}$ KbE/g) .....	189

### 10 Publikationsverzeichnis

Teilergebnisse der Untersuchungen wurden vorgetragen bzw. publiziert:

REINARTZ, M., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., JACOB, J. (2009): Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora von vier verschiedenen handelsüblichen Tiefkühlprodukten. 50. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, 29.9.-2.10.2009, Proceeding Band, 160

REINARTZ, M., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., ALTER, T., MANOPAS, A.S., JACOB, J. (2010): Versuche zum Einsatz einer Wiederbelebungsstufe vor der quantitativen mikrobiologischen Routineuntersuchung tiefgefrorener Lebensmittel. 51. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, 28.9.-1.10.2010, Proceeding Band, 153

REINARTZ, M., KLEER, J., HILDEBRANDT, G., ALTER, T., JACOB, J. (2010): Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora zweier handelsüblicher Rohgemüseprodukte. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* **62** (6), 196-199

REINARTZ, M., ALTER, T., HILDEBRANDT, G., JACOB, J., KLEER, J. (2011): Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora von zwei handelsüblichen TK-Fertiggerichten. *Fleischwirtschaft* **91** (8), 111-114

### 11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Goetz Hildebrandt für die Überlassung des interessanten Themas, die jederzeit gewährte Hilfe, die geduldigen Erklärungen und für die vielen unterstützenden und motivierenden Worte bedanken.

Ebenso gilt mein sehr herzlicher Dank Herrn Dr. Josef Kleer für die unverzichtbare fachliche Betreuung, seine Geduld und ständige Bereitschaft sich Fragen und Problemen anzunehmen sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Alter möchte ich für den Anschub und die Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit, für seine jederzeit offene Tür und den Freiraum, diese Arbeit fertig stellen zu können, sehr herzlich danken.

Ein großer Dank gilt auch der bofrost\* GmbH&Co. KG, vor allem Herrn Jörg Jacob (ehemaliger Leiter Qualitätsmanagement International), für das Interesse an diesem Thema sowie das Bereitstellen der Proben und die reibungslose und kollegiale Zusammenarbeit.

Für die tatkräftige und unverzichtbare Hilfe im Labor bei der mikrobiologischen Untersuchung der Proben, danke ich sehr herzlich Frau Angelika Dorow und Frau Dr. Walentina Holdhaus, wobei mein ganz besonderer Dank an dieser Stelle Frau Brigitte Müller gilt. Ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung und ihre wertvollen Tipps sowie ihr Optimismus und ihre aufmunternden Worte waren mir immer eine große Stütze.

Von Herzen danke ich Frau Dr. Duangporn Pichpol für ihre Mitarbeit bei den praktischen Versuchen, ihre Hilfe bei fachlichen Fragen, die schöne gemeinsame Zeit im Labor, aber vor allem für den seelischen Beistand und ihre fortwährende Präsenz sowie köstliche und interessante Einblicke in die thailändische Küche und Kultur.

Ebenfalls von Herzen möchte ich mich bei Frau Aranya Sira Manopas für die schöne Zusammenarbeit der letzten Jahre, für immer offene Ohren, Verständnis und Hilfe nicht nur in beruflichen oder promotionsbedingten Lebenslagen, für die vielen unverzichtbaren Aufheiterungen und unterstützenden Worte sowie darüber hinaus für die unzähligen kulinarischen Bereicherungen bedanken.

Ich danke außerdem allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelhygiene, die hier nicht namentlich genannt sind, für ihre Hilfsbereitschaft und konstruktive Unterstützung sowie für die freundliche und angenehme Atmosphäre im Institut.

Nadine Hoffmann danke ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der englischen Übersetzung.

Bei Lennart Berger, Elke Sackstedt und Tina Westerholt bedanke ich mich von Herzen für ihre Freundschaft, ihre Unterstützung und ihr Verständnis. Ebenso herzlich danke ich an dieser Stelle meinen hier nicht namentlich erwähnten Freunden für ihre Unterstützung und das Leben neben der Doktorarbeit. Mein ganz besonderer Dank gilt René: Für das Korrekturlesen dieser Arbeit, hauptsächlich jedoch für sein Verständnis und seine Zuversicht,

## Danksagung

---

den motivierenden Rückhalt, die hervorragende kulinarische Versorgung sowie das Aushalten schlimmster Launen.

Abschließend bedanke ich mich von Herzen bei meiner Familie, ganz besonders bei meinen Eltern, für ihr Interesse an dieser Arbeit, ihre allzeit offene Tür und für ihre immer gewährte Unterstützung jeglicher Art.

## 12 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit

*„Einfluss des Tiefgefrierens und der Tiefkühlagerung auf die Mikroflora von vier handelsüblichen Tiefkühlprodukten“*

selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Marion Reinartz

Berlin, 27.04.2011