

Aus dem Institut für Fleischhygiene und -technologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Zusammensetzung der psychrotrophen
Hackfleischmikroflora "industrieller" Herstellung
mit mikroökologischer und hygienischer Bewertung
ihrer Hauptkomponenten**

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

vorgelegt von
Urte Köpke
Tierärztin aus Eutin

Berlin 2002

Journal-Nr. 2654

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. G. Reuter
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. H.-J. Sinell
Dritter Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. Günter Klein

Tag der Promotion: 17.10.2002

**Meinen Eltern
und
Schwestern**

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Psychrotrophe Fleischmikroflora.....	3
2.1.1	Begriffsklärung	3
2.1.1.1	Psychrotrophe Mikroorganismen.....	3
2.1.1.2	Definition und Rechtsgrundlagen für Hackfleisch.....	6
2.1.2	Herkunft und Wachstum der psychrotrophen Hackfleischmikroflora.....	8
2.1.2.1	Einflußfaktoren auf das Bakterienwachstum	8
2.1.2.2	Mikrobielle Kontamination.....	11
2.1.2.3	Reduzierung der bakteriellen Belastung.....	20
2.1.3	Vorkommen und Bedeutung der psychrotrophen Mikroflora des Hackfleisches als Verderbniserreger und als pathogene Spezies.....	22
2.1.3.1	Psychrotrophe Verderbniserreger im Hackfleisch.....	22
2.1.3.2	Psychrotrophe Pathogene im Hackfleisch	25
2.1.4	Antagonismus und mikroökologisches Gleichgewicht im Habitat Fleisch	41
2.2	Nachweismethoden für Komponenten der Mikroflora von frischem Fleisch.....	44
2.2.1	Kultureller Nachweis.....	44
2.2.1.1	Quantitativer Nachweis.....	46
2.2.1.2	Identifizierung einzelner Komponenten der psychrotrophen Fleischmikroflora	47
2.2.2	Weitere Nachweismethoden	48
2.2.3	Molekularbiologisch-genotypische Methoden.....	52
2.3	Mikrobiologische Normen und Kriterien für Hackfleisch	55

3	MATERIAL UND METHODEN	60
3.1	Material	60
3.1.1	Probenmaterial	60
3.1.2	Teststämme	60
3.1.2.1	Referenz- und Wildstämme	60
3.1.2.2	Isolierte Stämme.....	66
3.1.3	Nährmedien, Substrate und Reagenzien für die klassische Mikro- biologie.....	66
3.1.3.1	Stammanzucht und Stammhaltung	66
3.1.3.2	Probenaufbereitung	67
3.1.3.3	Selektivnährmedien	68
3.1.3.4	Physiologische und biochemische Prüfung	69
3.1.4	Arbeitsgeräte und sonstiges Material für die Klassische Mikrobiologie .	74
3.1.5	Materialien und Arbeitsgeräte zur molekularbiologischen Spezies- identifizierung von den <i>Acinetobacter</i> -Stämmen.....	75
3.2	Methoden	76
3.2.1	Probenaufbereitung.....	76
3.2.2	Bestimmung der Keimzahl	76
3.2.3	Isolierung der Bakterien	78
3.2.4	Identifizierung der Hackfleischisolate mittels klassischer Mikrobiologie nach einem phänotypischen Reaktionsschema	79
3.2.4.1	Thermische Wachstumsversuche, Gram-Färbungsverhalten und Beweglichkeitsprüfung.....	79
3.2.4.2	Biochemische Reaktionen	80
3.2.4.3	Differenzierung der Gram-positiven Isolate	81
3.2.4.4	Differenzierung der Gram-negativen Isolate.....	81
3.2.5	Sequenzanalyse eines partiellen hochvariablen 16S rDNA-Abschnittes der <i>Acinetobacter</i> -Isolate	93
3.2.6	Erläuterungen zur statistischen Auswertung	93

4	ERGEBNISSE	95
4.1	Überprüfung der physiologischen und biochemischen Reaktionen der Sammlungsstäme.....	95
4.1.1	Physiologische und biochemische Eigenschaften der Referenz- und Wildstäme	95
4.1.1.1	Gram-negative Sammlungsstäme	95
4.1.1.2	Gram-positive Sammlungsstäme.....	98
4.1.2	Physiologische und biochemische Eigenschaften der Isolate aus Hackfleisch	100
4.1.2.1	Gram-positive Isolate aus Hackfleisch.....	100
4.1.2.2	Gram-negative Isolate aus Hackfleisch	101
4.2	Verteilung der psychrotrophen Hackfleischisolate.....	104
4.2.1	Psychrotrophe Keimzahlen der vier Hackfleischsorten	104
4.2.2	Quantitativer Vergleich der psychrotrophen mit den mesophilen Gesamtkeimzahlen.....	104
4.2.3	Quantitativer Vergleich zwischen den Gram-positiven und den Gram- negativen psychrotrophen Mikrofloraanteilen	107
4.2.4	Gesamtüberblick der qualitativen und quantitativen Verteilung der psychrotrophen Hauptkomponenten nach Hackfleischsorten	109
4.2.4.1	Rindergehacktes.....	109
4.2.4.2	Schabefleisch	114
4.2.4.3	Schweinegehacktes.....	118
4.2.4.4	Gemischtes Hackfleisch (Rind und Schwein)	122
4.2.4.5	Vergleich der qualitativen und quantitativen Verteilung der psychrotrophen Hauptkomponenten zwischen den Hackfleisch- sorten.....	126
4.2.5	Betrachtung der qualitativen und quantitativen Ergebnisse von spe- ziellen Keimgruppen	133
4.2.5.1	Pseudomonaden-Stämme.....	133
4.2.5.2	<i>Enterobacteriaceae</i> -Stämme	136
4.2.5.3	<i>Acinetobacter</i> -Stämme	138

4.3	Vorkommen von <i>Acinetobacter</i>-Stämmen in vier Hackfleischsorten nach phäno- und genotypischer Identifizierung	140
4.3.1	Speziesidentifizierung der <i>Acinetobacter</i> -Isolate auf genotypischem Wege durch Sequenzanalyse eines partiellen 16S rDNA-Abschnittes mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms	140
4.3.2	Vergleich der Ergebnisse nach klassischer und molekularbiologischer Methode	141
5	DISKUSSION	145
5.1	Methodenwahl	145
5.1.1	Klassische Mikrobiologie mit einfachen physiologischen und biochemischen Reaktionen	145
5.1.2	Einsatz eines genotypischen Verfahrens: Sequenzanalyse eines hochvariablen partiellen 16S rDNA-Abschnittes zur Identifizierung der <i>Acinetobacter</i> -Isolate.....	147
5.2	Physiologische und biochemische Eigenschaften der Referenzstämme und Hackfleischisolate.....	148
5.2.1	Referenzstämme	148
5.2.2	Hackfleischisolate.....	149
5.3	Verteilung der psychrotrophen Hackfleischisolate.....	150
5.3.1	Psychrotrophe Keimzahlen der vier Hackfleischsorten	150
5.3.2	Quantitativer Vergleich der psychrotrophen mit den mesophilen Gesamtkeimzahlen.....	151
5.3.3	Quantitativer Vergleich zwischen den Gram-positiven und den Gram-negativen psychrotrophen Mikrofloraanteilen	153
5.3.4	Gesamtüberblick der qualitativen und quantitativen Verteilung der psychrotrophen Hauptkomponenten	154
5.4	Gesundheitliche Bewertung der Mikrofloraanteile aus "industriell" hergestelltem Hackfleisch für den Menschen	164

6	SCHLUßFOLGERUNGEN	171
7	ZUSAMMENFASSUNG	173
8	SUMMARY	176
9	ANHANG	179
10	LITERATURVERZEICHNIS	200

VERZEICHNIS HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

A.	<u>A</u> cinetobacter
Achr.	<u>A</u> chromobacter
Aer.	<u>A</u> eromonas
Alc.	<u>A</u> lcaligenes
Aqua demin.	<u>A</u> qua <u>d</u> emineralisata
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
B.	<u>B</u> rochothrix
BgVV	<u>B</u> undesinstitut für <u>g</u> esundheitlichen <u>V</u> erbraucherschutz und <u>V</u> eterinärmedizin
C.	<u>C</u> arnobacterium
cfu	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits
Cl.	<u>C</u> lostridium
CCUG	<u>C</u> ulture <u>C</u> ollection <u>U</u> niversity of <u>G</u> öteborg
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
Eb.	<u>E</u> nterobacter
FIHV	<u>F</u> leischhygiene- <u>V</u> erordnung
h	<u>h</u> our
H.	<u>H</u> afnia
HFI-RL	<u>H</u> ackfleisch- <u>R</u> ichtlinie
HFIV	<u>H</u> ackfleisch- <u>V</u> erordnung
KbE	<u>K</u> oloniebildende <u>E</u> inheiten
L.	<u>L</u> actobacillus
Lc.	<u>L</u> euconostoc
lg	dekadischer <u>L</u> ogarithmus: log ₁₀
List.	<u>L</u> isteria
LMBG	<u>L</u> ebensmittel- und <u>B</u> edarfsgegenständegesetz
mGKZ	<u>m</u> esophile <u>G</u> esamtkeimzahl
min	<u>m</u> inute
P.	<u>P</u> ediococcus
Pa.	<u>P</u> antoea
pGKZ	psychrotrophe <u>G</u> esamtkeimzahl
Pb.	<u>P</u> syrobacter
Ps.	<u>P</u> seudomonas

rDNA	<u>r</u> ibosomal <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
RG	<u>R</u> indergehacktes
RS	Gemischtes Hackfleisch, <u>R</u> ind und <u>S</u> chwein
S.	<u>S</u> erratia
SF	<u>S</u> chabefleisch
SG	<u>S</u> chweinegehacktes
Shew.	<u>S</u> hewanella
x _C	Mittelwert über die <u>C</u> hargen
x _P	Mittelwert der Logarithmen der 5 Einzelproben
Y.	<u>Y</u> ersinia

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Gerhard Reuter danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die konstruktive und kritische Anleitung sowie besonders freundliche und geduldige Hilfestellung bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Dr. Dag Harmsen gilt mein Dank für die Durchführung der molekularbiologischen *Acinetobacter*-Identifizierung.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Fleischhygiene und -technologie möchte ich für die gemeinsame Zeit im Institut und besonders Frau Dorothea Jaeger, Frau Sigrid Kringel und Frau Lilo Bräutigam für die stets freundlichen Worte danken. Dank gilt besonders meinen Mitdoktoranden Dr. Marc Goldberg und Jacobus Louwers für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie stets gewährte Hilfeleistung. Dr. Alexander Pack danke ich herzlich für das Interesse an meiner Dissertation und die persönliche Unterstützung während unserer gemeinsamen Arbeitszeit im Institut.

Frau Dr. Gisela Arndt sei hier für die Beratung bei den biometrischen Auswertungen meiner Arbeit gedankt.

Meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle für die aufmunternden Worte danken, die mir immer wieder Mut gemacht haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Schwestern für die jederzeit gewährte einzigartige Hilfe, die mir in schwierigen Zeiten ein wichtiger Rückhalt war.

LEBENS LAUF

Name Urte Köpke
Geburtsdatum und -ort 31.03.1968
Geburtsort Eutin

Schulbildung

1974-1978 Grundschule Malente
1978-1987 Johann-Heinrich-Voß-Gymnasium in Eutin

Studium

1987-1993 Studium der Veterinärmedizin

Approbation als Tierärztin

28. Mai 1993

Wissenschaftliche Tätigkeit

seit 1995 Doktorandin am Institut für Fleischhygiene und -technologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
01.04.1997 bis 30.11.2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Fleischhygiene und -technologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Berufstätigkeit

26.02.2001 bis 31.12.2001 Angestellte in der Biotechnologiefirma MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Urte Köpke, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literaturstellen verfaßt zu haben.

Berlin, 19.08.2002

Urte Köpke