

5 DISKUSSION

5.1 Methodenwahl

5.1.1 Klassische Mikrobiologie mit einfachen physiologischen und biochemischen Reaktionen

Die Gesamtanalyse der Hauptkomponenten der psychrotrophen Hackfleischmikroflora in vier verschiedenen Hackfleischsorten aus frischer "industrieller" Produktion sollte sowohl qualitativ als auch quantitativ erfolgen. Zur Erfassung eines möglichst breiten Keimspektrums eignet sich das klassische Kulturverfahren. Zur Isolierung der Stämme aus Hackfleisch wurde ein nicht-selektives Nährmedium eingesetzt. Die ausschließliche Verwendung von elektiven und selektiven Medien würde nach FRIES (1983) eine Vorwegentscheidung der auftretenden Flora bedeuten und die Gefahr bergen, daß systematische Gruppierungen, die von Wichtigkeit sein könnten, keine Berücksichtigung finden. Ein universelles oder polyvalentes Medium ist also immer vorrangig zu nutzen (REUTER, 1970e). In der vorliegenden Arbeit wurden daher nach der Aufarbeitung der Hackfleischproben der nicht-selektive Plate-Count-Agar und ausschließlich zur Bestätigung identifizierter Isolate Selektivnährböden eingesetzt. Da auf den Plate-Count-Agar-Platten nur die am häufigsten auftretenden unterschiedlichen Kolonieformen Berücksichtigung fanden, lag die untere Nachweisgrenze für Einzelisolate bei 10^3 KbE/g. Die vielfach zahlenmäßig nur in geringen Anteilen an der Gesamtflora auftretenden pathogenen Bakterien können auf universellen Nährböden von dominierenden, rein saprophytären Mikroorganismen stark zurückgedrängt werden (REUTER, 1970e) und damit bei der in dieser Arbeit gewählten Methode zum Teil nicht erfaßt worden sein.

Ein Selektivmedium zur Anzucht der psychrotrophen Flora gibt es bisher nicht. Der von SPECK (1984) vorgeschlagene Kristall-Violett-Tetrazolium-Agar erwies sich nach JAY und BUE (1987) als ungeeignet, da sowohl psychrotrophe als auch nicht-psychrotrophe Bakterien auf diesem Medium zum Wachstum in der Lage waren. Sollen jedoch bestimmte lebensmittelbedeutsame Genera bzw. Spezies sowohl qualitativ als auch quantitativ erfaßt werden, so ist der Einsatz von speziell ausgewählten

Selektivmedien, teilweise in Verbindung mit besonderen Kultivierungsbedingungen (z.B. Temperatur, Sauerstoffspannung), angebracht und sinnvoll (REUTER, 1970e).

Da die optimale Wachstumstemperatur der psychrotrophen Mikroflora mit 20 bis 30°C, die Minimaltemperatur mit -5 bis +5°C angegeben wird (ICMSF, 1980; FEHLHABER und JANETSCHKE, 1992; MOSSEL et al., 1995; KRÄMER, 1997), wurde eine aerobe Inkubation von 25°C für 48 h gewählt und die anschließende Wachstumskontrolle bei 4±1°C sowohl auf Platten im Kühlschrank als auch in Bouillon im Wasserbad unter Temperaturkontrolle durchgeführt. Die Bebrütung unter aeroben Bedingungen schließt die Erfassung bestimmter Mikroorganismen, wie z.B. anaerob wachsender Clostridien-Spezies, aus.

Die Identifizierung der Hackfleischisolate erfolgte auf klassischem Weg durch Zusammenstellung geeigneter Testbestecke aus einfachen physiologischen und biochemischen Reaktionen und Verwendung eines Fließschemas. Diese Verfahren wurden gewählt, da mit einfachen Methoden gearbeitet werden sollte, die in anderen Laboren gut nachvollziehbar und wiederholbar sind und den mikrobiologischen Status im Fleisch möglichst breit gefächert erfassen. Sie sind sehr zeit- und materialaufwendig. Handelsübliche klinische Testbestecke sind relativ einfach zu handhaben, jedoch von recht hohen Kosten begleitet. Mit ihnen kann zudem nur ein geringer Teil der Lebensmittelflora identifiziert werden, da in den Datenbanken nur die Kennzeichen einiger in Lebensmitteln auftretender pathogener Bakterienspezies enthalten sind (ODUMERU et al., 1999).

Das zur Identifizierung eingesetzte Fließschema wird von einigen Autoren kritisch eingeschätzt. OTTE (1976) wies darauf hin, daß ein falsch-positives oder falsch-negatives Ergebnis, z.B. aufgrund von differierenden Inkubationsbedingungen oder inkonstantem Verhalten des Bakterienstammes, zu einer Fehlidentifikation führen kann. BARROW und FELTHAM (1993b) merken an, daß Reaktionsunterschiede innerhalb eines Genus oder einer Spezies gegenüber einem Merkmal das Aufführen der Spezies an mehreren Punkten des Fließschemas zur Folge haben muß. Bei einem Arbeiten mit einem Fließschema müssen deshalb Fehlreaktionen, die methodisch bedingt sein können, durch Wiederholungsuntersuchungen zu

verschiedenen Zeitpunkten abgesichert werden. Dies wurde bei den vorliegenden Untersuchungen praktiziert.

5.1.2 Einsatz eines genotypischen Verfahrens: Sequenzanalyse eines hochvariablen partiellen 16S rDNA-Abschnittes zur Identifizierung der *Acinetobacter*-Isolate

Zur Identifizierung der isolierten *Acinetobacter*-Spezies kam neben dem phänotypischen ein genotypisches Verfahren zur Anwendung. Derartige Verfahren werden eingesetzt, wenn sich die Mikroorganismen nur schlecht anzüchten lassen oder keine geeigneten phänotypischen Tests zur Verfügung stehen (HARMSSEN et al., 2001). Überdies kann man sich das objektivere und durchgängige "Spezieskonzept" sowie die Möglichkeit, Rückschlüsse auf verwandtschaftliche Beziehungen zu ziehen, zunutze machen. Die Grundlage der genotypischen Identifizierung ist die Analyse der genomischen oder zytoplasmatischen DNA oder RNA. Eine der Methoden zur phylogenetischen Einordnung von Bakterien beruht auf der Sequenzierung von bestimmten Nukleinsäureabschnitten, welche dafür vervielfältigt werden müssen. Diese Vervielfältigung bestimmter Abschnitte von Nukleotidsequenzen des Genoms wird mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erzielt. Im vorliegenden Fall wurde ein partieller, hochvariabler 16S rDNA-Abschnitt amplifiziert, welcher im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg von der Arbeitsgruppe Dr. Harmsen sequenziert wurde, um im Anschluß mittels eines von dieser Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Informatik II der Universität Würzburg speziell entwickelten Computerprogramms ausgewertet zu werden (Ergebnisse siehe Kapitel 5.3.4 Abschnitt "*Acinetobacter*").

Auf der Grundlage genotypischer Verfahren gibt es bisher für die Identifizierung und den Nachweis von Bakterien aus Lebensmitteln nur begrenzte Einsatzmöglichkeiten. Auf PCR-Systemen beruhende direkte Nachweisverfahren können nur für wenige Bakterien angewendet werden. Schwierigkeiten in der Sensitivität entstehen z.B., wenn es zu Wechselwirkungen mit Substanzen im Lebensmittel kommt und die Folge ein falsch-negatives Ergebnis ist (SCHEU et al., 1998). Falsch-positive Ergebnisse kommen bei dem Nachweis von Nukleinsäuren toter Mikroorganismen vor. Diesem Problem versucht man z.B. mit vorausgehender selektiver Anreicherung entgegenzuwirken. Da für einen Einsatz in der Lebensmittelmikrobiologie die Standardi-

sierung einer ausgewählten "Nukleinsäure-Methode" und die Anpassung an die gegebenen Verhältnisse, je nach Art des Lebensmittels, nötig sind, ist eine routinemäßige Anwendung nicht so einfach möglich (CANDRIAN, 1995).

5.2 Physiologische und biochemische Eigenschaften der Referenzstämme und Hackfleischisolate

5.2.1 Referenzstämme

Von den 56 Referenzstämmen der Kultursammlungen sowie den Wildstämmen, d.h. Stämmen, die in anderen Einrichtungen aus Lebensmitteln isoliert und identifiziert worden waren, konnten lediglich 6 nach den eigenen Identifizierungsschemata den ursprünglichen Bezeichnungen nicht zugeordnet werden:

2 Stämme waren mit veralteten Bezeichnungen in die institutseigene Sammlung aufgenommen worden: *Enterobacter hafnia* En 68 erwies sich als *Hafnia alvei*-Stamm, *Enterobacter liquefaciens* En 72 als *Serratia liquefaciens*-Stamm. *Enterobacter liquefaciens* 522/90 mußte als *Yersinia enterocolitica* eingestuft werden.

Bei *Enterobacter cloacae* En 70 handelte es sich entweder um *Citrobacter freundii* oder *Pantoea agglomerans*. Differenzen traten dabei bei mehr als einem Merkmal auf (Merkmalskatalog nach BARROW und FELTHAM, 1993c, sowie FARMER, 1999). Das Fehlen der Bildung eines gelben Pigmentes spricht für die Zuordnung als *Citrobacter freundii*.

Der Stamm *Alcaligenes faecalis* 17 war in der Lage, Nitrat zu Nitrit abzubauen. KERSTERS und DE LEY (1984) gaben für diese Spezies nur die Fähigkeit an, Nitrit zu reduzieren. Bei dem untersuchten Stamm handelt es sich demnach um *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*.

Der aus der Bundesanstalt für Fleischforschung stammende *Pseudomonas putida* Ps 79 war nicht in der Lage, einen fluoreszierenden Farbstoff zu bilden, konnte

jedoch Säure aus den Kohlenhydraten Maltose und Ribose produzieren und Xylose als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen. MOLIN und TERNSTRÖM (1982, 1986) sehen diese Kriterien als eindeutig für die Zuordnung zur Spezies *Ps. fragi* an.

Insgesamt gesehen kann von einer ausreichenden Genauigkeit des Identifizierungssystems ausgegangen werden, weil Abweichungen bei so grundverschiedenen Genera, wie z.B. Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* immer zu erwarten sind.

5.2.2 Hackfleischisolate

Von den 419 psychrotrophen Stämmen konnten 404 Isolate mit Hilfe des zusammengestellten Testbestecks von physiologischen und biochemischen Reaktionen identifiziert werden. Die ausgewählten Testreaktionen scheinen demnach geeignet, den mikrobiologischen Status von Hackfleisch zu bestimmen. Eine Veränderung oder Ergänzung der in dieser Arbeit verwendeten "Bunten Reihe" könnte zur Verbesserung der Ergebnisse führen, z.B. hinsichtlich der Differenzierung der Milchsäurebakterien, der *Psychrobacter* spp. oder der *Flavobacteriaceae*.

Einige Hackfleischisolate, wie z.B. *Acinetobacter* spp., waren schwierig einzuordnen. Sie sind dafür bekannt, auf den üblichen Testnährböden erschwert zu wachsen (KÄMPFER et al., 1993). Deshalb wurde zur Speziesidentifizierung der *Acinetobacter*-Isolate außerdem auf ein molekularbiologisches Verfahren zurückgegriffen (siehe auch Kapitel 5.1.2).

5.3 Verteilung der psychrotrophen Hackfleischisolate

5.3.1 Psychrotrophe Keimzahlen der vier Hackfleischsorten

Die psychrotrophe Gesamtkeimzahl einer Hackfleischprobe wurde in dieser Arbeit aus der Summe der Quantitäten aller auftretenden psychrotrophen Stämme gebildet, welche nach der Probenaufbereitung bei der Optimaltemperatur von 25°C innerhalb von 48 h gewachsen waren und einer Wachstumskontrolle bei 4±1°C standhielten. Die Mittelwerte über die Chargen betragen bei Rindergehacktem und beim Schabefleisch 5,23 bzw. 5,37 lg KbE/g, bei Schweinegehacktem 5,22 lg KbE/g und bei Gemischtem Hackfleisch 5,33 lg KbE/g. Von HOLY und HOLZAPFEL (1988) konnten in Rinderhackfleischproben eines kommerziellen Herstellers am Tag der Gewinnung psychrotrophe Gesamtkeimzahlen (10 Tage bei 7°C) zwischen 3,5 bis 5,2 lg KbE/g ermitteln. Nach einer aeroben Lagerung bei 0°C stiegen sie nach 7 Tagen auf etwa 8 lg KbE/g, bei 7°C auf etwa 9 lg KbE/g an.

Die Belastung mit psychrotrophen Mikroorganismen war in den vier untersuchten Hackfleischsorten also nahezu gleich. Da die mikrobiologische Belastung des Ausgangsmaterials einen entscheidenden Einfluß auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Endproduktes Hackfleisch hat (KLEIN und LOUWERS, 1994; UPMANN et al., 2000a), müssen die Ausgangsmaterialien von etwa gleicher Qualität gewesen sein. Weder die tierartlich unterschiedliche Fleischgewinnung bei der Schlachtung noch die Unterschiede bei der Kühlung scheinen einen Einfluß genommen zu haben. KASPROWIAK und HECHELMANN (1990) sowie GILL et al. (2000) stellten fest, daß die Kontamination mit Verderbnis- und pathogenen Erregern bei Schlachttierkörpern von Rindern im allgemeinen geringer als bei Schweinen ist, da es bei der Schweineschlachtung mehr kritische belastende Stufen gibt, zu denen das Entbluten, Brühen, Entborsten, Polieren und Entdärmen gehören. GILL et al. (2000) ermittelten auf der Oberfläche von Schweineschlachttierkörpern mittlere aerobe Keimzahlen, welche um 1 lg-Stufe höher lagen als die von Rinderschlachttierkörpern. Die Kühlung von Schweineschlachttierkörpern kann im Gegensatz zu der von Rindern allerdings schneller und mit niedrigeren Temperaturen erfolgen (REUTER, 1996), so daß es zum Ausgleich einer Keimbelastung kommen kann.

Die Schwankungen der mikrobiologischen Qualität von Charge zu Charge innerhalb einer Hackfleischsorte und die vereinzelt "schlechte" Qualität einzelner Hackfleischchargen sind offensichtlich auf Anteile länger gelagerter Ausgangsmaterialien zurückzuführen, was in den Untersuchungen von KLEIN und LOUWERS (1994) bei Rinderhackfleisch auch schon angeführt wurde.

Die Kontamination des Fleisches mit einer Keimflora und ihre Zusammensetzung werden sowohl durch die autochthone Mikroflora der Tiere als auch durch die Betriebsmikroflora (Räume, Einrichtungen, Personal) bestimmt. Das Vorkommen autochthoner Anteile ist stark von der Technologie der Fleischgewinnung abhängig, das Auftreten der psychrotrophen Anteile vornehmlich vom hygienischen Zustand der Fleischgewinnungslinie. Die psychrotrophen Bakterien sind ubiquitär verbreitet, besonders im Erdboden und in freien Gewässern (STOKES und REDMOND, 1966; DRUCE und THOMAS, 1970), in Futtermitteln (DRUCE und THOMAS, 1970) sowie in der Umgebung der Schlachttiere (LOTT, 1970).

Bei der Hackfleischherstellung kommt es durch den Zerkleinerungsprozeß zur Erhöhung der Kontamination durch die auftretende Oberflächenvergrößerung. Mit a_w -Werten von ungefähr 0,98 (RÖDEL, 1975) und pH-Werten zwischen 5,8 und 6,0 (KLEIN und LOUWERS, 1994) finden dabei die psychrotrophen Mikroorganismen gute Wachstumsbedingungen, so daß selbst bei strikter Kühlung des frisch hergestellten Hackfleisches über einen gewissen Zeitraum eine Vermehrung der psychrotrophen Mikroflora eintritt (GILL, 1983; ABD EL RHMAN et al., 1998).

5.3.2 Quantitativer Vergleich der psychrotrophen mit den mesophilen Gesamtkeimzahlen

Für die rein quantitative Beurteilung der psychrotrophen Gesamtkeimzahl von Lebensmitteln wird nach ISO (17410, 2001) die Inkubation von Plate-Count-Agar-Platten bei $6,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ für 10 Tage angegeben. Keimzahlen, die unter solchen Bedingungen gewonnen werden, sind nach NORTJE et al. (1990a) mit denen aerober Gesamtkeimzahlen (2 Tage bei 30°C) vergleichbar, weil sie sich im Verlaufe ihrer Entwicklung angleichen. Während die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl als mikro-

biologische Bewertung des Fleischhabitates anerkannt ist (NORTJE et al., 1990a; KLEIN und LOUWERS, 1994; REUTER, 1996) und routinemäßig nach rechtlichen Vorgaben eingesetzt wird, ist es für einige Verarbeitungsbereiche durchaus sinnvoll, auch die psychrotrophen Anteile der Fleischmikroflora entsprechend zu berücksichtigen (REUTER, 1996).

Die psychrotrophen und mesophilen Keimzahlen der Hackfleischproben unterschieden sich bei den vorliegenden Untersuchungen kaum. Die mesophilen Gesamtkeimzahlen bewegten sich in Größenordnungen von 5,06 bis 5,19 lg KbE/g (Mittelwerte über die Chargen) und waren somit geringfügig niedriger als die psychrotrophen Gesamtkeimzahlen.

Die mesophilen Keimzahlen sind in der Tendenz mit denen anderer Untersucher vergleichbar (KLEIN und LOUWERS, 1994; KÖPKE und REUTER, 1995; SCHALCH et al., 1996; EISEL et al., 1997; LOUWERS et al., 1997; HILDEBRAND et al., 2001). Ein Vergleich mit den Angaben aus der Literatur ist aber nur gerechtfertigt unter der Voraussetzung, daß die Hackfleischproben unter ähnlichen Bedingungen gewonnen und gehalten wurden, also aus frischer Produktion stammten. Hackfleisch vom Rind bzw. Schwein aus dem Einzelhandel wies in der Regel höhere Keimzahlen auf, deren Mittelwerte nach TEUFEL et al. (1982) zwischen 6,0 und 7,0 lg KbE/g lagen, nach SCRIVEN und SINGH (1986) bei 7,7 lg KbE/g und nach HILDEBRAND et al. (2001) bei 6,64 lg KbE/g.

Nach den quantitativen Bewertungskriterien für Hackfleisch nach Anlage 2a der Fleischhygiene-Verordnung (FLHV, 2001) war nur eine Charge (Rind und Schwein gemischt) der insgesamt 35 untersuchten Chargen nach der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl als "nicht zufriedenstellend" zu beurteilen (mehr als 2 Proben der Charge lagen zwischen dem Richtwert von 6,18 lg KbE/g und dem Grenzwert von 6,7 lg KbE/g).

Die mesophilen Mikroorganismen sind in der Regel die Florabestandteile, welche auf frisch gewonnenem Fleisch anzutreffen sind und später nach der Behandlung durch Kühlung von den psychrotrophen ersetzt werden (REUTER, 1996). Gesundheitsschädlicher Verderb von Lebensmitteln geht vor allem von stark proteolytischen und

schnell wachsenden mesophilen bis thermophilen Mikroorganismen aus. Langsam wachsende psychrotrophe Mikroorganismen sind zunächst überwiegend saccharolytisch wirksam und führen zu weitaus geringeren sensorischen Veränderungen (REUTER, 1996). Das untersuchte "industriell" hergestellte Hackfleisch konnte aufgrund der eingehaltenen Produktionshygiene in seiner mikrobiologischen und sensorischen Qualität insgesamt als gut eingestuft werden, welches KLEIN und LOUWERS (1994) bereits für den gleichen Betrieb festgestellt hatten.

5.3.3 Quantitativer Vergleich zwischen den Gram-positiven und den Gram-negativen psychrotrophen Mikrofloraanteilen

Die Gram-positive Flora stellte im Schabefleisch sowohl quantitativ als auch qualitativ die dominierende Flora dar, und zwar mit Keimzahlmittelwerten über die Chargen (x_C) von 5,19 lg KbE/g (Median 5,20 lg KbE/g) gegenüber der Gram-negativen Flora von x_C 4,51 lg KbE/g (Median 4,42 lg KbE/g). In Rindergehacktem und Gemischtem Hackfleisch waren die Keimzahlen der Gram-positiven Flora geringfügig größer mit x_C von 4,96 bzw. 5,01 lg KbE/g (Mediane 4,93 lg KbE/g bzw. 5,04 lg KbE/g). Die Gram-positive Flora dominierte über die Gram-negative Flora in 7 von 8 bzw. 6 von 9 Chargen. In Schweinegehacktem waren die quantitativen Unterschiede nur gering, wobei jedoch in 5 von 8 Chargen die Gram-negative Flora stärker vertreten war.

Diese Unterschiede lassen sich zunächst nicht durch tierartlich unterschiedliche technologische Behandlungsformen erklären. Beim Hackfleisch vom Rind gab es nämlich Unterschiede zwischen Schabefleisch und Rindergehacktem. Diese sind aber offensichtlich dadurch bedingt, daß für die Schabefleischherstellung ausgesuchtes "gutes" Fleisch ohne viel Bindegewebe und Fett benutzt wird, für die Herstellung von Rindergehacktem jedoch stärker oberflächlich belastetes Fleisch zur Verarbeitung kommt. Damit sind die Unterschiede in der Struktur der Flora (Gram-positiv zu Gram-negativ) erklärbar. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

5.3.4 Gesamtüberblick der qualitativen und quantitativen Verteilung der psychrotrophen Hauptkomponenten

In allen Hackfleischsorten traten 10 bis 12 unterschiedliche Keimgruppen auf. Dabei nahmen Pseudomonaden, Milchsäurebakterien und Vertreter der Spezies *Brochothrix (B.) thermosphacta* bei 3 Hackfleischsorten (Rindergehacktem, Schabefleisch, Gemischtem Hackfleisch) die ersten drei Plätze ein, bewertet nach der Nachweishäufigkeit in den Chargen und den durchschnittlichen Anteilen an der psychrotrophen Gesamtkeimzahl (pGKZ). In Schweinegehacktem folgten jedoch auf die Milchsäurebakterien mit 43,4% Anteil die Pseudomonaden mit 26,4% und die *Acinetobacter* spp. mit 17,4% sowie die *Enterobacteriaceae* mit 15,6%. Erst danach schlossen sich die *B. thermosphacta*-Stämme mit einem Anteil von 14,0% an. In anderen Untersuchungen von Hackfleisch aus dem Handel und von "industriell" hergestelltem Hackfleisch (NORTJE et al., 1990a; KÖPKE und REUTER, 1995; LOUWERS et al., 1997; HILDEBRAND et al., 2001) machten ebenfalls Pseudomonaden, Milchsäurebakterien und *B. thermosphacta* erhebliche Anteile an der ermittelten Gesamtkeimzahl aus. Die Keimzahlbestimmungen fanden bei den genannten Untersuchungen z.T. mit Hilfe von Selektivnährböden statt.

Nach der Literatur nehmen auf aerob gekühlt gelagertem Fleisch die **Pseudomonaden** eine dominierende Stellung ein (GILL und NEWTON, 1977; NEWTON et al., 1978; GILL, 1983; BLÄSCHKE und REUTER, 1984; DAINTY und MACKEY, 1992; SMULDERS und VAN LAACK, 1992; BORCH et al., 1996; JACKSON et al., 1997). Diese Dominanz nimmt bei längerer Lagerung unter Kühlbedingungen noch zu und führt schließlich zum Verderb (DAINTY und MACKEY, 1992; REUTER, 1996).

In den vier "industriell" hergestellten Hackfleischsorten lagen bei den eigenen Untersuchungen die Pseudomonaden-Keimzahlen im Mittel zwischen 4,33 bis 4,79 lg KbE/g. Sie waren bei Gemischtem Hackfleisch und Schweinegehacktem etwas höher als beim Hackfleisch vom Rind. Bei diesen Keimzahlbereichen liegt noch kein Grund zu einer Beanstandung vor. KÖPKE und REUTER beschrieben Pseudomonaden in etwa gleicher Größenordnung bereits 1995. Nach den Angaben von LOUWERS et al. (1997) und HILDEBRAND et al. (2001) war Schweinegehacktes mit 2,6 bzw. 3,69 lg KbE/g und Rindergehacktes mit 3,7 lg KbE/g geringer mit

Pseudomonaden belastet. Die Kultivierung erfolgte hier auf Selektivnährböden. Dabei ist immer mit einer geringeren Ausbeute zu rechnen (REUTER, 1970e). Angaben über die Produktivität, d.h. die Ergiebigkeit des Nachweises, bzw. die Reduktionsraten für einzelne Selektivmedien sind z.B. aus den Monographien über Nährböden für die Lebensmittelmikrobiologie zu entnehmen (CORRY et al., 1995, 2002).

Bei den eigenen Untersuchungen nahm die Spezies *Ps. fragi* beim Vergleich der Mittelwerte der Keimzahlen über die Chargen (x_C) in allen vier Hackfleischsorten die dominierende Stellung unter den Pseudomonaden ein (3,98 bis 4,54 lg KbE/g). Danach folgten *Ps. fluorescens* und *Ps. lundensis*. *Ps. putida* konnte nur in jeweils einer Charge vom Schabefleisch und von Schweinegehacktem nachgewiesen werden. Die gleiche Reihenfolge der Pseudomonaden-Spezies, *Ps. fragi* und *Ps. lundensis* vor *Ps. fluorescens* (Biovar I und III), aus gekühlten Rind- und Schweinefleischproben ermittelten im Rahmen von numerischen Taxonomiestudien SHAW und LATTY (1982) sowie MOLIN und TERNSTRÖM (1982, 1986). In Untersuchungen von DROSINOS und BOARD (1995) kam es dagegen während der Lagerung (aerob, 5 Tage bei 4°C) von Hackfleischproben vom Schaf zu einer Änderung der dominierenden Pseudomonaden-Spezies von zunächst *Ps. fluorescens* zu *Ps. fragi*. Als Begründung kann die Fähigkeit von *Ps. fragi* angesehen werden, im Gegensatz zu *Ps. fluorescens* bei Temperaturen von 0 bis 2°C die Substrate Kreatin und Kreatinin zu verwerten (DROSINOS und BOARD, 1994; LABADIE, 1999) bzw. eine kürzere lag-Phase (Anpassungsphase) während des Wachstums zu durchlaufen (LEBERT et al., 1998). GUSTAVSSON und BORCH (1993) fanden dagegen auf gekühlten Rindfleischproben (2°C, 14 Tage) *Ps. fluorescens* als den dominierenden Teil der *Pseudomonas* spp., gefolgt von *Ps. lundensis* und *Ps. fragi*. Die Zusammensetzung auf gekühlten Schafschlachtettkörpern verhält sich ähnlich, nur daß außerdem 5,9% der Stämme als *Ps. putida* identifiziert werden konnten (PRIETO et al., 1992b). Bei gekühlten Hühnerschlachtettkörpern wurden die Pseudomonaden von *Ps. fragi* und *Ps. fluorescens* (Biovar A und B) angeführt, gefolgt von *Ps. lundensis* (ARNAUT-ROLLIER et al., 1999).

Diese aus Fleisch zu isolierenden Spezies der Pseudomonaden stellen saprophytäre Keime dar, welche aufgrund ihrer proteolytischen und lipolytischen Eigenschaften

eine Bedeutung als Verderbniserreger erlangen. Durch ihren hohen Anteil innerhalb der Hackfleischflora sind sie für die Verderbniserscheinungen dieses Lebensmittels unter aeroben Bedingungen hauptsächlich verantwortlich. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, daß die Form der Kühlung außerdem einen erheblichen Einfluß auf die Intensität der sensorische Veränderungen nimmt.

Die **Milchsäurebakterien** erreichten Keimzahlmittelwerte über den Chargen (x_c) von 4,52 bis 4,61 lg KbE/g, Isolate von *Brochothrix thermosphacta*, im weiteren Sinne den Milchsäurebakterien zugehörig, solche von 3,71 bis 4,66 lg KbE/g. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits von KÖPKE und REUTER (1995) sowie LOUWERS et al. (1997) angegeben. Demnach konnten Literaturangaben, daß die während der Kühlphase von Fleisch auftretende psychrotrophe Gram-positive Flora sich hauptsächlich aus Milchsäurebakterien und zusätzlich aus *B. thermosphacta* zusammensetzt (GILL und NEWTON, 1978; NEWTON et al., 1978; REUTER, 1981; DAINTY und MACKEY, 1992; PRIETO et al., 1994), bestätigt werden. Jedoch machte *B. thermosphacta* bei Lagerungsversuchen von Rinderhackfleisch (aerob, 0 und 7°C für 17 Tage) nach VON HOLY und HOLZAPFEL (1988) keinen signifikanten Anteil der Verderbnisflora aus. Am Herstellungstag wurden nicht einmal Keimzahlen von 3 lg KbE/g erreicht. In den eigenen Untersuchungen waren Milchsäurebakterien am stärksten im Schabefleisch, *B. thermosphacta* in Gemischtem Hackfleisch anzutreffen.

Der Anteil der Gram-positiven **Katalase-positiven Kokken** ist nach den eigenen Untersuchungen als unbedeutend einzustufen. Sie wurden nur in jeweils einer Charge von Schweinegehacktem und Gemischtem Hackfleisch mit Mittelwerten der Logarithmen der Einzelproben von 3,16 bzw. 3,61 lg KbE/g nachgewiesen. Das stimmt überein mit der frühen Aussage von AYRES (1960), daß die am Ende der Schlachtlinie auf der Oberfläche von Schlachttieren zu findenden Mikrokokken (GILL und MCGINNIS, 1993) schon während der Kühlphase der Tierkörper zurückgedrängt werden.

Eine Speziesidentifizierung der **Milchsäurebakterien** außer der selektiven Erfassung von *B. thermosphacta* wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, da umfangreiche Studien zu ihrem Vorkommen in Fleisch in der Literatur vorliegen (REUTER, 1970a-d, 1981; VON HOLY und HOLZAPFEL, 1988; HOLZAPFEL, 1996) und das Haupt-

augenmerk in dieser Arbeit auf die Gram-negative Flora gelegt wurde. Die Anzucht der isolierten Milchsäurebakterien war auf dem MRS-S-Nährboden (Zusatz von Sorbinsäure zu dem MRS-Nährboden nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (1960) in Konzentration von 0,14%, pH 5,7) möglich, auf welchem folgende Genera zu wachsen vermögen (REUTER, 1985; CORRY et al., 1995): *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Bakterien des Genus *Carnobacterium* spp. sowie *B. thermosphacta* wachsen nur schwach oder gar nicht auf diesem Nährboden. Pediokokken und *Leuconostoc*-Spezies sind kolonie- und keimmorphologisch abzugrenzen (REUTER, 1970c), so daß die pauschale Erfassung der Milchsäurebakterien gerechtfertigt erschien.

Die im Hackfleisch vorkommenden Milchsäurebakterien können auch vorübergehend eine Schutzfunktion haben. Eine antagonistische Wirkung wurde z.B. gegenüber *Listeria monocytogenes* nachgewiesen (SCHILLINGER et al., 1991; SKYTTÄ et al., 1991). Für einen gezielten Einsatz in Frischfleisch als Schutzkulturen sind Inokula von mindestens 10^8 KbE/g genannt worden, um eine genügend starke und zuverlässige Wirkung zu erzielen (LÜCKE, 1992). Die damit verbundene starke Säuerung des Produktes wird von den Konsumenten aber mit "verdorben" gleichgesetzt und schließt damit den Einsatz aus (KNAUF, 1998).

Die Belastung des Hackfleisches mit den in der Umwelt (Erdboden und Pflanzen) weit verbreiteten Stämmen der Spezies ***Brochothrix thermosphacta*** findet in den fleischgewinnenden sowie fleischbe- und -verarbeitenden Betrieben hauptsächlich durch die Vektoren Mensch und Tier statt (SKOVGAARD, 1985; LUDWIG und BERGANN, 1994a). Aufgrund ihrer starken Lipaseaktivität besitzt *B. thermosphacta* eine Bedeutung als Verderbniserreger. Mit dem Verderb einhergehende Geruchs- und Geschmacksabweichungen werden als "milchig", "unangenehm sauer" sowie "käsig-beißend" beschrieben (REUTER, 1970a, 1996; SMULDERS und VAN LAACK, 1992). Bei Lagerung von Fleisch unter Schutzgas-Verpackung mit hohem CO₂-Anteil ist eine Vermehrung dieser Bakterien kaum möglich (EGAN, 1984; BORCH et al., 1996), so daß Hackfleisch, unter diesen Bedingungen abgepackt, einer geringeren Gefahr der Vermehrung dieser Verderbniserreger ausgesetzt ist.

In allen vier Hackfleischsorten konnten *Psychrobacter* spp. nachgewiesen werden. Die Gram-negativen, aeroben, unbeweglichen, Oxidase-positiven Kokkobazillen kommen in der Umwelt im Boden, Wasser und Luft vor und konnten aus verschiedenen Proben des Lebensmittels Fleisch (Geflügel, Schaf, Rind, Schwein) isoliert werden (GENNARI et al., 1992). In Rindergehacktem wurde für *Psychrobacter* spp. der höchste Mittelwert über die Chargen mit 3,51 lg KbE/g erreicht, so daß diese Keimgruppe in Rindergehacktem, beurteilt nach der Quantität, an vierter Position der Hauptkomponenten der psychrotrophen Mikroflora stand. In einer Charge dieser Sorte wurde der Maximalwert (Mittelwert der Logarithmen der Einzelproben) mit 4,69 lg KbE/g ermittelt. Somit können die auf schlachtfischem Fleisch vorhandenen *Psychrobacter* spp. (GILL und NEWTON, 1978; SHAW und LATTY, 1988; REUTER, 1999) in Hackfleisch wiedergefunden werden. Sie sind als psychrotrophe Bakterien also von Bedeutung, wie es von mehreren Autoren bereits erwähnt wurde (NEWTON et al., 1978; SHAW und LATTY, 1988; DAINY und MACKEY, 1992; JACKSON et al., 1997). Allerdings sind präzise Angaben zum Auftreten und zur Quantität schwer zu finden, da es vor dem Jahre 1986 oft zu Fehlidentifikationen innerhalb dieses Genus kam und *Psychrobacter*-Stämme als *Moraxella*, *Moraxella*-like, Oxidase-positive '*Achromobacter*' und '*Acinetobacter*' aufgeführt wurden (GENNARI et al., 1992). Das liegt wahrscheinlich daran, daß es für diese Keimgruppe keine geeigneten Selektivmedien gab. GENNARI et al. (1992) setzten zur Isolierung von *Psychrobacter* spp. und *Acinetobacter* spp. (Genera der Familie *Moraxellaceae*) die Selektivmedien M und B ein, welche für *Acinetobacter* als geeignet angesehen wurden (GENNARI, 1985). Da sie in frischen Fleischproben (Geflügel, Rind, Schwein, Schaf und Kaninchen) Stämme der Familie *Moraxellaceae* nur mit einem Anteil der Gesamtmikroflora von 0,1 bis 5% fanden, welches Keimzahlwerten von 10^3 bis 10^5 KbE/g entsprach, gingen sie davon aus, daß diese Keimgruppe nur eine untergeordnete Rolle im frischen Fleisch spielt.

Auf der Grundlage von numerischen Taxonomiestudien teilten SHAW und LATTY (1988) diese aus Lebensmitteln isolierten unbeweglichen, nicht-fermentierenden Gram-negativen Bakterien in folgende 3 Hauptgruppen ein: *Psychrobacter immobilis*, *Acinetobacter johnsonii* und *Pseudomonas fragi*. Dabei waren aus Fleisch als *Psychrobacter* spp. die beiden Spezies *Psychrobacter immobilis* und *Psychrobacter phenylpyruvicus* isoliert worden (LAHELLEC et al., 1975; GENNARI et al.,

1992; PRIETO et al., 1992a). Eine weitergehende Differenzierung der eigenen aus dem "industriell" hergestellten Hackfleisch isolierten *Psychrobacter* spp. war anhand der in der Literatur genannten biochemischen Kriterien nicht möglich. Da für *Psychrobacter* spp. kaum Aktivitäten für Verderbnisvorgänge wie Proteolyse oder H₂S-Bildung beschrieben sind (GENNARI et al., 1989), scheint ihre Bedeutung für die Qualität des hier untersuchten Hackfleisches gering zu sein.

Stämme des Genus ***Acinetobacter*** konnten in allen vier Hackfleischsorten nachgewiesen werden. Das Auftreten in Schweinegehacktem in Quantitäten von 3,32 lg KbE/g (Mittelwert über die Chargen) und mit einem Maximalwert von 4,51 lg KbE/g in einer Charge reihten das Genus hinter den Pseudomonaden, Milchsäurebakterien und *B. thermosphacta* ein. Das stärkere Auftreten im Schweinehackfleisch scheint substratbedingt gewesen zu sein, d.h., es resultierte aus der Mikroflora der Umgebung der Schweinehaltung bzw. -schlachtung. Insgesamt war der quantitative Anteil der *Acinetobacter*-Flora gering. Diese Aussage gilt allerdings wiederum nur für den Zustand des hier untersuchten Hackfleisches.

Das Fehlen geeigneter selektiver Anzuchtmedien in der Lebensmittelmikrobiologie, die eine einfache quantitative Erfassung dieser Bakterien ermöglichen würden, scheint die Ursache dafür zu sein, daß keine Angaben zum mengenmäßigen Auftreten von *Acinetobacter* spp. in Hackfleisch in der Literatur zu finden sind. In den bereits genannten Untersuchungen von GENNARI et al. (1992) zum Auftreten von *Psychrobacter* und *Acinetobacter* in verschiedenen Fleischproben konnte eine Vermehrung lediglich für *Acinetobacter*-Spezies während der Lagerung bei 5°C für 7 bis 8 Tage verzeichnet werden. Es wurden Keimzahlwerte von 8 bis 9 lg KbE/g ermittelt.

Vertreter des Genus *Acinetobacter* sind in der Natur ubiquitär vorhanden und finden sich primär in Erdboden, Wasser und Luft. Sekundär sind sie bei Mensch und Tier in verschiedenen Habitaten nachzuweisen. Bei 25% gesunder Menschen werden sie als normale Hautflora gefunden (ALLEN und HARTMANN, 1990).

Die Speziesidentifizierung der aus den vier Hackfleischsorten isolierten *Acinetobacter*-Stämme war mit einfachen phänotypischen Tests nur in 7 von 17

Fällen möglich. Durch die Hinzunahme eines genotypischen Verfahrens, nämlich der Sequenzanalyse eines partiellen 16S rDNA-Abschnittes (HARMSSEN et al., 2001), in Verbindung mit dem computergestützten System RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), konnten insgesamt 14 Isolate identifiziert werden. Die in der Datenbank dieses Computerprogrammes vorhandenen Daten humanmedizinischer *Acinetobacter*-Isolate dienten als Grundlage für den Sequenzvergleich. Die Ähnlichkeitsgrade hinsichtlich der Basensequenzen zwischen diesen Stämmen und denen aus Hackfleisch schwankten von 94,01 bis 99,88%. Die Verwandtschaftsverhältnisse ließen sich in einem phylogenetischen Baum darstellen. Daraus war zu erkennen, daß die Ähnlichkeit mit den in der Datenbank vorhandenen klinischen Isolaten meist weniger groß war als die Verwandtschaft zwischen den Hackfleischisolaten. Ursache dafür ist wahrscheinlich die Tatsache, daß zwischen klinischen und Lebensmittelisolaten genotypische Unterschiede bestehen. Zumindest konnten die vorhandenen vorläufigen Identifizierungen aufgrund phänotypischer Untersuchungen weitgehend bestätigt werden.

A. Iwoffii machte in den vier Hackfleischsorten den größten Anteil der isolierten Stämme mit 47,1% aus. Der Maximalwert betrug 4,74 lg KbE/g in einer Probe. *A. junii* wurde 3 mal, *A. calcoaceticus*, *A. johnsonii* und *A. haemolyticus* wurden jeweils einmal identifiziert (Mittelwerte über die Chargen 2,88, 2,87 und 3,17 lg KbE/g). Weitere 3 Isolate konnten keiner Spezies zugeordnet werden, da die Ergebnisse beider Verfahren nicht übereinstimmten. Auch GENNARI et al. (1992) wiesen bei den aus frischen Fleisch- (Rind, Geflügel, Schwein, Schaf und Kaninchen) und Milchproben isolierten *Acinetobacter*-Stämmen die Spezies *A. Iwoffii* als größten Anteil mit 93% nach. Bei einer weiteren Untersuchung von GENNARI und LOMBARDI (1993) von verschiedenen Lebensmittelproben (Fisch, frisches und verdorbenes Fleisch, Gemüse, rohe Milch und Käse) herrschten *A. johnsonii* (Genospezies 7) und *A. Iwoffii* (Genospezies 8/9) vor. ERIBO und JAY (1985) fanden auf frischen Rindfleischproben *A. calcoaceticus*. Damit erscheinen die eigenen Identifizierungsergebnisse weitgehend literaturkonform. Einzelne Maximalwerte sind jedoch besonders beachtenswert.

Die Vertreter der Familie der ***Enterobacteriaceae*** wurden in Quantitäten (Mittelwerte über die Chargen) angetroffen, die mit Ergebnissen von KÖPKE und REUTER (1995),

LOUWERS et al. (1997) sowie HILDEBRAND et al. (2001) vergleichbar waren, wenn auch die gewählte Methodik in den letztgenannten Fällen auf der Nutzung von Selektivnährböden beruhte. So lagen die Mittelwerte über den Chargen zwischen 2,83 und 3,49 lg KbE/g. In jeweils einer Charge vom Schabefleisch und von Gemischtem Hackfleisch lagen die Mittelwerte der Logarithmen der Einzelproben allerdings bei 5,00 lg KbE/g bzw. 5,84 lg KbE/g und alle 5 Einzelproben dieser Chargen waren gleichermaßen stark mit *Enterobacteriaceae* kontaminiert. Es handelte sich offensichtlich um Fehlproduktionen, die auf stark belastetes Ausgangsmaterial zurückzuführen waren. Bei aerob, gekühlt gelagertem Fleisch können sich *Enterobacteriaceae* in der Regel nicht gegen die anderen dominierenden Floraanteile, wie Pseudomonaden, durchsetzen. Sie erlangen lediglich einen Vorteil bei Fleisch, welches einen höheren pH-Wert aufweist und unter Vakuum verpackt wurde (BORCH et al., 1996).

Bei Hackfleischuntersuchungen früherer Jahre zum Vorkommen von *Enterobacteriaceae* wurden zahlreiche Spezies unterschiedlicher Genera genannt, wobei als psychrotrophe Vertreter vor allem *Serratia (S.) liquefaciens*, *S. marcescens*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter (Eb.) aerogenes*, *Eb. agglomerans* (jetzt *Pantoea agglomerans*), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella (Kl.) pneumoniae* und *Kl. oxytoca* angegeben wurden (HECHELMANN et al., 1974; KLEEGERGER, 1979). In den eigenen Untersuchungen konnten 5 psychrotrophe Spezies isoliert werden. Es handelte sich um *Serratia (S.) liquefaciens*, *S. plymuthica*, *Hafnia (H.) alvei*, *Pantoea (Pa.) agglomerans* und *Enterobacter (Eb.) aerogenes*.

In den von RIDELL und KORKEALA (1997) untersuchten gekühlten Fleischproben (Hackfleisch, vakuumverpacktes Fleisch, Schlachttierkörper) dominierten *H. alvei* und *S. liquefaciens*. Eine Dominanz von *H. alvei* konnte bei den eigenen Untersuchungen nicht erkannt werden. *H. alvei* war nur in einer Charge Schweinegehacktes mit x_P von 3,37 lg KbE/g anzutreffen. ***S. liquefaciens*** konnte allerdings in allen vier Hackfleischsorten mit Mittelwerten der Logarithmen der Einzelproben (x_P) von 2,79 bis 5,84 lg KbE/g als die am häufigsten isolierte Spezies nachgewiesen werden. *Pa. agglomerans* wurde in jeweils einer Charge aller Sorten mit x_P von bis zu 4,38 lg KbE/g isoliert. *S. plymuthica* war in Schweinegehacktem nicht vertreten, erreichte aber in einer Charge Schabefleisch eine Menge von x_P 5,00 lg KbE/g mit

einem Auftreten in jeder Einzelprobe. Die Spezies *Eb. aerogenes* trat in einer Charge von Rindergehacktem in einer Größenordnung von 2,76 lg KbE/g auf. Es lag also ein breites Spektrum unterschiedlicher Spezies der *Enterobacteriaceae* in bunter Mischung vor. Als Ursachen sind die zufälligen Kontaminationen während der Fleischgewinnung und der weiteren Behandlung anzunehmen.

REUTER und ÜLGEN (1977) stellten einen Anstieg der Quantitäten von *Enterobacteriaceae* bei Schweinefleisch in den Verarbeitungsstadien von "schlachtwarm" über "durchgekühlt" bis "zerlegt" von 2,5 auf 3,7 lg KbE/g und dann sprunghaft im Hackfleisch auf 5,7 lg KbE/g fest. Diese hohen Werte für Hackfleisch beruhten auf den seinerzeit handwerklich hergestellten Produkten aus dem Einzelhandel, beeinflusst von den vor 25 Jahren gebräuchlichen technologischen Gegebenheiten. Derartige Keimzahlen konnten in den "industriellen" Hackfleischproben vom Schwein unter heutigen Bedingungen nicht angetroffen werden.

Vertreter der Familie *Flavobacteriaceae* konnten in allen vier Sorten Hackfleisch nachgewiesen werden. Die Mittelwerte über die Chargen lagen im Bereich von 2,79 bis 3,19 lg KbE/g, wobei der Maximalwert, der in einer Charge erreicht wurde, 4,41 lg KbE/g betrug. Literaturhinweise zu dieser Familie und zu ihrem Vorkommen in Hackfleisch sind kaum vorhanden. Es finden sich vornehmlich Angaben zum Auftreten auf Schlachtier- oder Fleischoberflächen verschiedener Tierarten, wo diese Bakterien nur einen geringen Anteil an der Gesamtflora ausmachten (NORTJE et al., 1990b; GILL und BRYANT, 1992; GILL und MCGINNIS, 1993). Da sie sehr häufig im Wasser und auch im Erdboden vorkommen, ist der Eintrag dieser Bakterien in fleischgewinnende sowie fleischbe- und -verarbeitende Betriebe über die Schlachttiere und den Menschen anzunehmen. Nach Untersuchungen von WOLTERING (1990) kam es auf Schweineschlachtierkörpern während der Kühllagerung und bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit (90 und 100%) zur verstärkten Vermehrung der Flavobakterien. Die in den letzten Jahren in großem Wandel befindliche Taxonomie der Familie *Flavobacteriaceae* und ihrer Genera erschweren die Interpretation der früheren Angaben zu in Lebensmitteln beschriebenen "Flavobakterien" (JOOSTE und HUGO, 1999).

Weitere nachgewiesene Keimarten bzw. -gruppen waren: ***Aeromonas hydrophila***, ***Shewanella putrefaciens***, ***Alcaligenes spp.*** sowie **Gram-negative Oxidase-negative** und **Oxidase-positive Stäbchen**.

Aeromonas hydrophila wurde nur in einer Charge Schabefleisch mit einem Mittelwert der Logarithmen der Einzelproben von 2,88 lg KbE/g nachgewiesen. HILDEBRAND et al. (2001) konnten Aeromonaden ebenfalls nur in 1 von 66 untersuchten Schweinehackfleischproben aus "industrieller" Produktion nachweisen (2,48 lg KbE/g), wobei hier ein Selektivmedium zur Isolierung diente. Der größte Teil der sonst aus Lebensmitteln isolierten Aeromonaden besteht aus *Aeromonas (Aer.) caviae*-Stämmen (MERINO et al., 1995). Außerdem wurden weltweit aus verschiedenen Lebensmitteln, z.B. Geflügel, frischem Fleisch sowie Fleischprodukten, *Aer. veronii* Biotyp *sobria* und *Aer. hydrophila* isoliert (KIROV, 1993), welche in Fleischextrakten noch bei 5°C in der Lage waren, Exotoxine (Enterotoxin und Hämolysin) zu bilden (MAJEED und MAC RAE, 1991).

Aer. hydrophila gilt als humanpathogen. Die Infektionsdosis für den Menschen ist unbekannt (KIROV, 1997; ISONHOOD und DRAKE, 2002). Nach TSCHÄPE (2000) soll sie bei $>10^7$ liegen. Aufgrund der weiten Verbreitung der Aeromonaden einerseits und der im Vergleich dazu außerordentlich seltenen Fälle einer Infektion durch Lebensmittel andererseits ist die lebensmittelrechtliche Würdigung von Aeromonaden-Funden in Lebensmitteln als Gefährdung zweifelhaft. Die bloße Anwesenheit von Aeromonaden in einem ohnehin keimhaltigen Lebensmittel rechtfertigt noch keine Beanstandung (SINELL, 1999). Nur in wenigen Berichten konnte die Infektkette durch Erregernachweis im Stuhl Erkrankter und in den verdächtigen Lebensmitteln rekonstruiert werden (KIROV, 1993). Es ist jedoch sinnvoll, das Auftreten dieser pathogenen Bakterien in Lebensmitteln aufgrund ihrer Möglichkeit, bei niedrigen Temperaturen zu überleben und sich zu vermehren, zu überwachen (ISONHOOD und DRAKE, 2002).

Die in der Umwelt hauptsächlich aus Wasser zu isolierende Spezies ***Shewanella putrefaciens*** wurde in drei Hackfleischsorten gefunden (Rindergehacktes: 1 Charge von 8, Schweinegehacktes: 2 Chargen von 8, Gemischtes Hackfleisch: 1 Charge von 9) mit Mittelwerten über die Chargen von 3,10 bis

4,94 lg KbE/g. Andere Untersuchungen zum Auftreten von *Shewanella putrefaciens* in Hackfleisch liegen nicht vor. Es finden sich lediglich Angaben zum Auftreten dieser Spezies auf Fleischoberflächen vor und nach dem Kühlen. Hiernach machten sie bei Rind und Schwein nur einen geringen Teil der Gesamtflora aus (NORTJE et al., 1990b; DAINTY und MACKEY, 1992; GILL und BRYANT, 1992; JACKSON et al., 1997). Einen größeren Anteil an der Verderbnisflora konnten sie erlangen, wenn der pH-Wert des Fleisches, wie z.B. bei DFD-Fleisch, erhöht war (GILL, 1983). Es ist also möglich, daß bei den eigenen positiven Befunden Ausgangsmaterialien schlechterer Qualität mit höherem Muskel-pH Grundlage für das Auftreten dieser Stämme bei den Hackfleischchargen gewesen sind.

In einer Charge Schabefleisch konnten nach Maßgabe der eingesetzten Methode (untere Nachweisgrenze 10^3 /g) ***Alcaligenes spp.*** nachgewiesen werden. Mit 2,9% Anteil an der psychrotrophen Gesamtkeimzahl betrug der Mittelwert über die Chargen 3,04 lg KbE/g. Ähnlich wie bei *Shewanella putrefaciens* finden sich in der Literatur kaum Angaben zum Vorkommen in Hackfleisch, sondern nur überwiegend auf Fleischoberflächen. NORTJE et al. (1990b) fanden in Hackfleisch aus dem Einzelhandel nur sehr wenige Stämme von *Alcaligenes spp.*, wobei sie auch im Schlachthofbereich und auf den Schlacht tieroberflächen, dem Ursprung des gewolften Fleisches, kaum größere Mengen nachgewiesen hatten.

5.4 Gesundheitliche Bewertung der Mikrofloraanteile aus "industriell" hergestelltem Hackfleisch für den Menschen

Die Risikostufen der Biotechnologie nach Kriterien der Arbeitsgruppe "Bakteriologie" der BERUFGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998, 2002) sowie sonstige Angaben der Literatur dienten als Grundlage zur Bewertung der gesundheitlichen Bedenklichkeit der Mikrofloraanteile des untersuchten Hackfleisches.

Die Eingruppierung von Bakterien in Risikogruppen, welche von der BERUFGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998, 2002) für den Umgang im Produktionsbereich der Biotechnologie vorgenommen wird, findet im mikrobiologischen Umfeld allgemeine Beachtung. Die Einstufung wird anhand der Kriterien nach § 3 der BIOSTOFFVERORDNUNG (1999) vorgenommen und erfolgt in 4 Stufen. Diese deckt

sich mit den internationalen Einstufungen des "Anhangs III der europäischen Arbeitnehmerschutzrichtlinie" (2000/54/EG). Spezielle Zusätze erfolgen auf Beschlußfassungen einer Expertengruppe, die das Merkblatt der Berufsgenossenschaft laufend ergänzt. Als Grundlage für die Einteilung in Risikostufen dienen Berichte über die Isolierung der Bakterien aus klinischem Untersuchungsmaterial des Menschen und der Nutztiere sowie das Auftreten in humanmedizinischen Krankheitsgeschehen. Die jeweils aktuelle Liste aller bisher beschriebenen Bakterien-spezies nach neuester Taxonomie ist in dem Merkblatt "Bakterien" der BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998) aufgeführt. Eine Neufassung ist für Ende 2002 vorgesehen.

Der Umgang mit den in **RISIKOGRUPPE 1** aufgelisteten Bakterien-spezies stellt kein Risiko für den Menschen dar, da es unwahrscheinlich ist, daß sie beim Menschen eine Krankheit verursachen. In diese Risikogruppe sind die meisten der im Hackfleisch gefundenen Mikroorganismen einzuordnen. Für den überwiegenden Anteil der aus Fleisch isolierten saprophytären **Pseudomonaden** konnte bisher keine Bedeutung als opportunistisch pathogene Bakterien nachgewiesen werden. Sie wurden der Risikogruppe 1 zugewiesen (BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, 1998, 2002). Das geht auch aus Angaben von PALLERONI (1992) sowie KISKA und GILLIGAN (1999) hervor.

Zwei der aus Hackfleisch isolierten Spezies, ***Pseudomonas fluorescens*** und ***Pseudomonas putida***, finden sich allerdings in der **RISIKOGRUPPE 1+** wieder, welche Bakterien-spezies charakterisieren, die in Ausnahmefällen aus klinischem Material immunsupprimierter Menschen isoliert werden. Ein Kausalzusammenhang zwischen Erkrankung und Erreger ist dabei jedoch häufig nicht sicher zu belegen. Trotz dieser vorliegenden Risikobewertung als "opportunistisch pathogener" Keim kann in dem häufigen und hohen Anteil von *Ps. fluorescens* an der psychrotrophen Gesamtkeimzahl in allen untersuchten Hackfleischsorten noch keine grundsätzliche gesundheitliche Bedenklichkeit für den Verbraucher abgeleitet werden. Gesunde Personen sind durch derartige Organismen nicht gefährdet, weil ihr Immunsystem an diese Keimgruppe adaptiert ist. Säuglinge und "compromised men", deren natürliche Abwehrmechanismen gegen Infektionserreger lokal oder allgemein herabgesetzt sind, dürften in der Regel kaum rohes Hackfleisch konsumieren.

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Pseudomonaden tritt z.B. *Burkholderia cepacia* (ehemals *Ps. cepacia*), ursprünglich ein rein pflanzenangepaßter Keim, zunehmend bei Patienten auf, deren natürliche Abwehrmechanismen gegen Infektionserreger lokal oder allgemein herabgesetzt sind, so z.B. bei Patienten mit Cystischer Fibrose (VANDAMME, 2001; BEVIVINO et al., 2002). *Burkholderia cepacia* kam auch bei Erkrankungen von Tieren vor, z.B. bei der Mastitis von Schafen (BERRIATUA et al., 2001). Bemerkenswert ist, daß in den letzten Jahren ursprünglich rein saprophytär eingeschätzte Bakterien bzw. solche, die in der Pflanzenwelt eine Rolle spielen, zunehmend auch im klinischen Bereich eine Bedeutung erlangen, wie das Beispiel von *Burkholderia cepacia* zeigt. Deshalb ist bei den Oxidase-positiven Spezies der *Ps.*-Gruppe aus Hackfleisch besondere Obacht vonnöten. DIXON (2002) weist auf der Grundlage dieser Entwicklungen auf die Risiken der strikten Trennung der Mikrobiologie nach Klinikbereich und Umwelt oder Lebensmittelbereich hin und befürwortet eine bessere Zusammenarbeit dieser Teilgebiete.

Shewanella putrefaciens (früher *Alteromonas putrefaciens*) konnte aus klinischem Material immunsupprimierter Menschen als Teil einer Mischflora isoliert werden und wurde demnach in Risikogruppe 1+ eingestuft. Die Gefährdung für den Menschen kann generell als gering angesehen werden (KHASHE und JANDA, 1998). Somit scheint auch ein gelegentliches Vorkommen in Hackfleisch keine Gefahr für den Konsumenten darzustellen.

Für ***Brochothrix thermosphacta*** und andere für die Fleischflora typische psychrotrophe **Milchsäurebakterien** wurde bisher keine direkte krankmachende Wirkung nachgewiesen, eine Infektion über Nahrungsmittel ist bisher nicht beschrieben worden (GASSER, 1994; LUDWIG und BERGANN, 1994a; ADAMS und MARTEAU, 1995). Da überwiegend nur Verderbniserscheinungen zu erwarten sind, stellt Hackfleisch aus "industrieller" Produktion bei vorschriftsmäßiger Behandlung hinsichtlich dieser Keimgruppen kein gesundheitliches Risiko dar. Diese Spezies sind im Merkblatt B 006 (Bakterien) der BERUFGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998, 2002) auch in Risikogruppe 1 eingestuft.

Zu den psychrotrophen Milchsäurebakterien gehören vor allem "atypische Streptobakterien", wie *Lactobacillus (L.) sakei* und *L. curvatus*, sowie die Streptobakterien *L. plantarum* (REUTER, 1981). Aber auch *L. farciminis* und *L. alimentarius* kommen in frischem Fleisch vor (REUTER, 1983; HOLZAPFEL, 1996). Beide Spezies wurden von REUTER (1983) beschrieben. *L. algidus* konnte aus kühl gelagertem, vakuum-verpacktem Rindfleisch (KATO et al., 2000) isoliert werden. Auch *Leuconostoc* spp., *Carnobacterium* spp. und Pediokokken können auftreten (REUTER, 1981; HOLZAPFEL, 1996). In Berichten zum Auftreten von Milchsäurebakterien im Zusammenhang mit klinischen Erkrankungen des Menschen, wie z.B. Endokarditiden und Bakteriämien, finden Laktobazillen, *Leuconostoc* spp., Pediokokken und *Weissella* spp. Erwähnung (GASSER, 1994; HUSNI et al., 1997; SARMA und MOHANTY, 1998; SCANO et al., 1999; OLANO et al., 2001). Bei den Erkrankten handelte es sich jedoch in der Regel um hospitalisierte und oft mit Antibiotika und Zytostatika behandelte Personen, deren natürliche Abwehrmechanismen gegenüber Infektionserregern herabgesetzt waren.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß der Begriff "Pathogenität" heutzutage nicht mehr allein auf eine Spezies bezogen, sondern als stammspezifische Eigenschaft definiert wird (FALKOW, 1997). Es ist unwahrscheinlich, daß in "frischem Fleisch" gerade solche opportunistischen Erreger aus diesen Bakteriengruppen vorkommen. Ein Auftreten solcher Varianten ist eher im Hospitalbereich zu erwarten, wobei diese überwiegend von mit Antibiotika, Zytostatika, Dialyse etc. behandelten Personen stammen. Das Beispiel der Spezies *L. rhamnosus* charakterisiert diese Situation treffend (KLEIN et al., 1992, 1998).

Die **RISIKOGRUPPE 2** der BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998, 2002) umfaßt Bakterien, welche Krankheiten bei Beschäftigten hervorrufen können, allerdings noch mit geringem Risiko. Eine wirksame Vorbeugung oder Behandlung der Krankheit ist normalerweise möglich.

Nach den eigenen Untersuchungen wären hier die im Hackfleisch angetroffenen *Aeromonas hydrophila*-Stämme, alle isolierten *Acinetobacter*-Spezies, die *Alcaligenes* spp. sowie 4 der 5 nachgewiesenen *Enterobacteriaceae*-Spezies als opportunistisch pathogene Spezies zu nennen und somit kritisch zu betrachten.

Das Risiko der Lebensmittelinfektion durch *Aeromonas hydrophila* ist aufgrund der geringen Häufigkeit des Auftretens und der niedrigen Keimzahlen als niedrig einzustufen, weil nur 1 von 34 der untersuchten Chargen positiv war und der Mittelwert der Logarithmen der Einzelproben bei 2,88 lg KbE/g lag. Bei HILDEBRAND et al. (2001) war 1 von 66 Proben positiv mit einem Mittelwert von 2,48 lg KbE/g.

Die aus den Hackfleischproben isolierten *Acinetobacter* spp. gehören ebenfalls zur Risikogruppe 2. In den letzten Jahren wurden Vertreter dieses Genus immer wieder im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen beschrieben und konnten aus verschiedenen klinischen Untersuchungsmaterialien isoliert werden (BERGOGNE-BEREZIN und TOWNER, 1996). Bei der Betrachtung der Beteiligungshäufigkeit der *Acinetobacter*-Spezies an nosokomialen Infektionen stellen *A. baumannii* sowie die **Genospezies 3** nach der Literatur die bedeutendsten Erreger dar (SEIFERT et al., 1993; POSTULKA, 1994; TRAUB und BAUER, 2000). Diese kamen bei der vorliegenden Untersuchung von Hackfleisch nicht vor. *A. Iwoffii* machte den größten Anteil der Isolate aus. Diese Spezies ist für den Bereich der Biotechnologie in die Risikogruppe 2 als potentiell pathogener Keim eingestuft worden. Eine neue Mitteilung, daß Vertreter dieser Spezies bei experimentellen Untersuchungen an Mäusen Entzündungserscheinungen an der Magenschleimhaut, ähnlich wie *Helicobacter pylori*, hervorrufen, bestätigen diese Einstufung (ZAVROS et al., 2002). Nach Berichten zu Lebensmittelinfektionen (SCHMIDT und TIRADO, 2001) kommt den *Acinetobacter*-Spezies keine Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger zu. Somit kann davon ausgegangen werden, daß das Auftreten dieser Spezies in "industriell" hergestelltem Hackfleisch für den Menschen nicht gesundheitlich bedenklich ist.

Der in der vorliegenden Untersuchung in einer Charge Schabefleisch nachgewiesene asaccharolytische Stamm der *Alcaligenes* spp. mit einem Mittelwert der Logarithmen der Einzelproben von 3,04 lg KbE/g dürfte ebenfalls keine Gefährdung für den Menschen darstellen. Asaccharolytische Stämme sind selten humanpathogen (SCHRECKENBERGER und VON GRAEVENITZ, 1999), und eine Infektionsdosis dieser Spezies in Verbindung mit Lebensmittelinfektionen ist nicht bekannt.

Da eine Differenzierung der aus dem Hackfleisch isolierten *Psychrobacter* spp. nicht möglich war, kann es sich bei den isolierten Stämmen sowohl um

Psychrobacter (Pb.) immobilis als auch *Pb. phenylpyruvicus* handeln. Erstere Spezies war in einigen klinischen Untersuchungsmaterialien immunsupprimierter Patienten, z.B. Blut, Wunden, Spinalflüssigkeit, nachgewiesen worden und wurde von der BERUFGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE (1998, 2002) deshalb in die Risikogruppe 1+ eingestuft. Seit 1990 ist diese Spezies immer wieder bei nosokomialen Infektionen (Konjunktivitis, Meningitis und Bakteriämie) beteiligt gewesen, vor allem bei Kindern und immunsupprimierten Patienten (LLOYD-PURYEAR et al., 1991; LOZANO et al., 1994). *Pb. phenylpyruvicus* ist in der Risikogruppe 2 wiederzufinden, da dieser Erreger für Endokarditiden und Bakteriämien verantwortlich war (GUTTIGOLI und ZAMAN, 2000; TRIPODI et al., 2002). Stämme des Genus *Psychrobacter* wurden bisher nicht in Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen gebracht, eine Infektionsdosis ist folglich nicht bekannt. Die untersuchten Hackfleischproben können allgemein als gesundheitlich unbedenklich angesehen werden, weil nur wenige Funde in jeweils geringer Menge zu verzeichnen waren.

Von den 5 ***Enterobacteriaceae***-Spezies, die im Rahmen der eigenen Untersuchungen aus Hackfleisch isoliert wurden, können 4 als opportunistische Bakterien gelten (Risikogruppe 2). Diese sind: *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans* und *Serratia liquefaciens*. Die in den Hackfleischproben am häufigsten gefundene Spezies *S. liquefaciens* wurden gelegentlich aus menschlichen klinischen Untersuchungsmaterialien, wie Atmungstrakt und Wunden, isoliert (GRIMONT und GRIMONT, 1992b; ABBOTT, 1999), hat aber im Gegensatz zu *S. marcescens* nicht die gleiche pathogene Bedeutung im humanmedizinischen Bereich (ABBOTT, 1999). Der in einer Charge Gemischtes Hackfleisch erreichte recht hohe Mittelwert über die Chargen von 5,84 lg KbE/g ist als solcher als bedenklich anzusehen. Diese Charge mußte allerdings nach den quantitativen Bewertungskriterien für Hackfleisch (FLHV, Anlage 2a, 2001) aufgrund der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl ohnehin als "nicht zufriedenstellend" eingestuft werden. In anderen Fällen erreichten *S. liquefaciens* und *Pa. agglomerans* Keimzahlwerte von mehr als 3 lg KbE/g, ebenso *H. alvei*. Diese Quantitäten müssen durchaus als beachtenswert angesehen werden und lassen die Frage entstehen, ob nicht eine Erfassung der *Enterobacteriaceae* insgesamt und nicht allein der Spezies *E. coli* bei der routinemäßigen Überprüfung von Hackfleisch von Nutzen sein könnte. Bei einer Beurteilung der *Enterobacteriaceae* wären die betroffenen Proben aufgrund der

hohen Keimzahl als bedenklich vom Verkehr auszuschließen gewesen. *H. alvei* war nur in einer der 35 untersuchten Chargen nachgewiesen worden. *Eb. aerogenes* trat einmal in einer Größenordnung von $2,76 \lg \text{KbE/g}$ auf. Als fünfte aus Hackfleisch isolierte *Enterobacteriaceae*-Spezies ist *S. plymuthica* zu nennen, eine nicht-pathogene Spezies der Risikogruppe 1.

In dem 7. Bericht des WHO Überwachungsprogramms zur Kontrolle von lebensmittelbedingten Infektionen und Intoxikationen in Europa in den Jahren 1993-1998 (SCHMIDT und TIRADO, 2001) wurden keine dieser bisher besprochenen Genera oder Spezies im Zusammenhang mit erfaßten Ausbrüchen genannt. Dieses wird auch in weiteren Bestandserhebungen (TSCHÄPE, 2000; AMMON und BRÄUNIG, 2002) so gesehen. Das Risiko einer lebensmittelbedingten Infektion des Menschen durch die in den vorliegenden Untersuchungen im Hackfleisch nachgewiesenen psychrotrophen *Enterobacteriaceae*-Spezies scheint demnach vernachlässigbar gering.