

2.1.2.3 Reduzierung der bakteriellen Belastung

Ziel ist es, möglichst keimarme Lebensmittel zu gewinnen, um einen Verderb derselben sowie die Gefahr lebensmittelbedingter Erkrankungen herabzusetzen. Die Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) (1979) definiert die Lebensmittelhygiene als "Vorkehrungen und Maßnahmen, die bei der Herstellung, Behandlung, Lagerung und dem Vertrieb von Lebensmitteln notwendig sind, um ein einwandfreies, gesundes und bekömmliches Erzeugnis zu gewährleisten". Diesem Anliegen können Maßnahmen zur Kontaminationsverhütung bei der Produktion, sowie Maßnahmen nach erfolgter Kontamination durch Verhinderung des bakteriellen Wachstums oder durch Abtötung vorhandener Mikroorganismen dienen (KASPROWIAK und HECHELMANN, 1990; THUMEL, 1995; SMULDERS und UPMANN, 2000).

Bei der Produktion von frischem Fleisch werden inzwischen moderne Kontrollkonzepte wie das HACCP-System eingesetzt (Hazard Analysis Critical Control Point), welches auf der Gefahrerkennung, Festlegung von kritischen Kontrollpunkten und Einrichtung von Überwachungssystemen beruht (SINELL, 1985b; REUTER, 1986a). Ein Hilfsmittel für die Risikoanalyse ist die vorhersagende Mikrobiologie (predictive modelling), mit welcher bakterielle Wachstumsbereiche ermittelt werden, aus denen Rückschlüsse auf das Vermehrungsverhalten und Überleben von Krankheitserregern in Lebensmitteln gezogen werden können (SMULDERS und UPMANN, 2000). Grundlage für alle erfolgreich eingesetzten Maßnahmen ist vor allem eine "good manufacturing practice" (GMP).

In Tab. 4 sind Möglichkeiten zur Verminderung der bakteriellen Belastung von frischem Fleisch nach erfolgter Kontamination aufgeführt. Es handelt sich dabei um biologische, physikalische und chemische Methoden, welche unterschiedliche Effekte z.B. im Lebensmittel aufgrund von Änderungen der Milieubedingungen ("intrinsic factors") oder bei den Mikroorganismen selbst hervorrufen.

Tab 4: Methoden zur Kontaminationsminderung von frischem Fleisch nach Literaturangaben (Lit)

Methoden	Effekt	Lit
Biologische Methoden		
Schutzkulturen	Hemmung unerwünschter MO durch erwünschte	1
Physikalische Methoden		
<u>1. Mechanisch</u>		
Abtragen mit Wasser	Entfernung der MO	2
hydrostatischer Druck	mechanische Zerstörung der MO	3
hydrodynamischer Druck	mechanische Zerstörung der MO	4
<u>2. Thermisch</u>		
Kühlen	Wachstumsverlangsamung bzw. -hemmung von MO	5
Gefrieren	Wachstumshemmung von MO	6
Hitzebehandlung	Denaturierung von Proteinen und Enzymen der MO	7
Trocknung	Erniedrigung des a_W -Wertes	8
<u>3. Bestrahlung</u>		
UV-Strahlen	DNA-, RNA-Schädigung der MO	9
ionisierende Strahlen	Erzeugung von Sekundärelektronen, Radikalbildung	10
<u>4. Änderung der Gasatmosphäre</u>		
Vakuum	Änderung des Eh-Wertes	11
Schutzgase (MAP)	Änderung des Eh-Wertes	12
Chemische Methoden		
Salzen	Erniedrigung des a_W -Wertes	13
Pökeln	Erniedrigung des a_W -Wertes, zusätzlich bakterizide Wirkung von Nitrat	14
Säuern	pH-Wert-Senkung durch organische Säuren	15

Lit: Literatur; MO: Mikroorganismen; MAP: modified atmosphere packaging

⁶SINELL (1992), ^{5,6}REUTER (1986b), ¹⁵SMULDERS et al. (1986), ¹⁵VON HOLY und HOLZAPFEL (1988)
⁸PRÄNDL (1988), ²SNIJDERS (1988a), ¹⁵SNIJDERS (1988b), ¹⁰SMULDERS und VAN LAACK (1992), ³CARLEZ et al. (1993, 1994), ¹HOLZAPFEL et al. (1995), ¹²SØRHEIM et al. (1995), ^{1,5,6,7,13}THUMEL (1995), ¹²SNYDER (1996), ¹²SØRHEIM und NISSEN (1996), ¹⁵DORSA et al. (1998), ¹⁵CASTILLO et al. (2001), ⁴WILLIAMS-CAMPELL und SOLOMON (2002)

An dieser Stelle sei nur eine kurze Erläuterung zur **Kühlung** angeführt, die eine der am häufigsten angewendeten technologischen Maßnahmen zur Verhinderung des Verderbs von Lebensmitteln darstellt. Sie ist ein produktschonendes und zugleich zuverlässiges und hygienisch sicheres Verfahren der Haltbarmachung (SINELL,

1989). Das Ziel der Fleischkühlung ist es, eine bessere und längere Frischhaltung und damit Verlängerung der Haltbarkeit zu erreichen (KLETTNER, 1996). Die Wirkung beruht auf der Verlangsamung des Wachstums von Mikroorganismen, deren Generationszeit und lag-Phase (Anpassungsphase) sich ausdehnen, wenn die Temperatur unter das Optimum gesenkt wird (JACKSON et al., 1997). Die Kühlung unterdrückt vornehmlich das Wachstum mesophiler Arten und erlaubt die Dominanz psychrotropher Anteile, zu denen sowohl Verderbniserreger als auch pathogene und toxinogene Bakterien gehören können (JACKSON et al., 1997; REUTER, 1999). Eine Unterbrechung der Kühlkette ist die häufigste Ursache für das Auftreten von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen durch gekühlte Lebensmittel (SINELL, 1989).

2.1.3 Vorkommen und Bedeutung der psychrotrophen Mikroflora des Hackfleisches als Verderbniserreger und als pathogene Spezies

Die im Hackfleisch vorkommenden Verderbniserreger und pathogenen Spezies gehören zu den "unerwünschten" Mikroorganismen in diesem Habitat. Die Verwendung des Begriffes "Habitat", einer standortbedingten Prägung, ist angezeigt, weil es sich im vorliegenden Fall nicht mehr um ein Biosystem sondern um totes Gewebe handelt und der Begriff "Biotop" daher ungeeignet ist (REUTER, 1996, 1999). Die Verderbniserreger schränken den Genußwert des Hackfleisches ein, weil es aufgrund von stofflichen Umsetzungen und sonstigen Veränderungen zum Verderb kommt. Bei den mikrobiell bedingten Abbauprozessen werden Substrate durch Enzymreaktionen auf verschiedenen Stoffwechselwegen der Glyko-, Proteo-, und Lipolyse umgesetzt. Sensorische Veränderung in Geruch, Geschmack und Farbe sind die Folge. Durch das Auftreten von pathogenen und toxinogenen Spezies im Hackfleisch kann die Gesundheit des Konsumenten gefährdet werden. Dieser Prozeß hängt von der Art der Erreger und deren mengenmäßigen Vorkommen ab.

2.1.3.1 Psychrotrophe Verderbniserreger im Hackfleisch

Solange Glukose in der Muskulatur vorhanden ist, wird diese von saccharolytisch aktiven Bakterien abgebaut. Hierzu zählen z.B. die im Hackfleisch auftretenden psychrotrophen Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae*. Ist der Vorrat an Glukose

erschöpft, so werden proteolytische Abbauewege eingeschlagen, die zum Abbau des Fleischeiweißes über einige Zwischenstufen bis zu den Aminosäuren führt. Die weitere Verwertung der Aminosäuren über die Deaminierung zu Ammoniak bzw. über Decarboxylierung zu CO₂ und biogenen Aminen (z.B. Histamin oder Cadaverin) haben eine unangenehme Geruchsabweichung zur Folge (REUTER, 1996). Durch die Anreicherung von biogenen Aminen kann es außerdem zu einer Gesundheitsschädigung des Menschen kommen.

Psychrotrophe Pseudomonaden sind bei der aeroben Lagerung von Hackfleisch neben proteolytischen auch für lipolytische Abbauvorgänge verantwortlich, die durch den Abbau der Fette zu Ketonen das typische sensorische Merkmal der Ranzigkeit hervorrufen (ABD EL-RHMAN et al., 1998). Als weitere Lipolyten sind z.B. Aeromonaden, Flavobakterien, *Enterobacteriaceae* und *Alcaligenes* spp. zu nennen (AHMED et al., 1998; HEESCHEN, 1999).

Für Farbveränderungen während der Lagerung sind neben Pigmentbildungen von Pseudomonaden u.a. Reaktionen mit dem Muskelfarbstoff Myoglobin verantwortlich. Für letzteres kommen Hydrogenperoxyd-produzierende Katalase-negative Bakterien sowie Schwefelwasserstoff-bildende Stämme von *Shewanella putrefaciens* in Frage. Frische Rinderhackfleischproben zeigten nach einer aeroben Lagerung von 5 Tagen bei 4°C minimale Farbveränderungen. 11,6% der Proben wiesen jedoch Geruchsabweichungen auf (ABD EL-RHMAN et al., 1998).

In vakuumverpacktem Hackfleisch spielen besonders Milchsäurebakterien für den Verderb eine Rolle, daneben auch Pediokokken, *Leuconostoc*, Enterokokken und *Brochothrix thermosphacta* (REUTER, 1981; GILL, 1983; HOLZAPFEL, 1996; REUTER, 1999; NYCHAS und DROSINOS, 2000). Von den Milchsäurebakterien sind vor allem *Lactobacillus curvatus* und *Lactobacillus sakei* an das Fleischmilieu adaptiert (REUTER, 1981; HOLZAPFEL, 1996). Der Verderb durch diese Bakterien wird besonders durch die langsame Bildung von flüchtigen organischen Säuren verursacht (GILL, 1983) und ist organoleptisch durch die Geruchsveränderungen von "käsig", "sauer" und "säuerlich" bis "bitter" und "leber-artig" geprägt (EGAN, 1984). Bei massenhaftem Auftreten von *Brochothrix thermosphacta*, welches eine starke Lipaseaktivität besonders nach Erschöpfung von Glukose als Nährstofflieferant

aufweist, kommt es durch Bildung freier Fettsäuren zur Ranzigkeit (LUDWIG und BERGANN, 1994b; JACKSON et al., 1997; REUTER, 1999).

Psychrotrophe *Clostridium*-Spezies können eine bedeutende Rolle für den Verderb spielen. Sie führen z.B. zu schwefelartigen Geruchsabweichungen oder wie z.B. bei *Cl. estertheticum* (COLLINS et al., 1992) zu einer Ausdehnung und Explosion der Verpackungen. Ungewöhnlicher Verderb von vakuum-verpacktem frischen Fleisch tritt durch *Cl. laramie* auf, welches noch unterhalb von 0°C wachsen und bei 2°C Sporen bilden kann. Es kommt vor bei Produkten mit normalem pH-Wert, gelagert bei 2°C. Der Verderb ist charakterisiert durch eine Anfangsfarbe von pink-rot, die nach grün übergeht, und durch die Produktion großer Mengen von Hydrogensulfat (KALCHAYANAND et al., 1993).

Im Gegensatz zur Vakuumverpackung nehmen in Verpackungen mit Schutzgasgemischen ("modified atmosphere packaging: MAP") mit relativ hohem Sauerstoffanteil (z.B. 70% O₂, 20% CO₂ und 10% N₂) neben den oben genannten Mikroorganismen auch Pseudomonaden noch einen Einfluß auf den Verderb. Die Haltbarkeit von Fleisch kann bei der Verwendung folgender Bedingungen in der genannten Reihenfolge gesteigert werden: Luft, hohe Sauerstoff-Konzentration in MAP, Vakuum, kein Sauerstoff in MAP, 100% Kohlendioxid (BORCH et al., 1996). Die Tab. 5 gibt die zu erwartende Haltbarkeitsdauer von gekühltem Fleisch unter verschiedenen atmosphärischen Lagerungsbedingungen wieder. Lagerungsversuche von industriell hergestelltem Hackfleisch in begasten Foodtainern (70% O₂, 20% CO₂, 10% N₂) haben gezeigt, daß durch diese Gasatmosphärenänderung eine Lagerungszeit von Rinder- und Schweinehackfleisch von 10 Tagen bei +2°C durchaus erreichbar ist und der limitierende Faktor die sensorischen Abweichungen darstellen (LOUWERS et al., 1997).

Tab. 5: Erwartete Haltbarkeitsdauer von Fleisch bei Kühlung und die Fähigkeit bestimmter Keimgruppen und Bakterienspezies, unter unterschiedlichen atmosphärischen Lagerungsbedingungen zu wachsen (nach BORCH et al., 1996)

pH-Wert	Lagerung	erwartete Haltbarkeitsdauer	Wachstum			
			<i>Ps. spp.</i>	<i>Enterob.</i>	MSB	<i>B. therm.</i>
normal	aerob	Tage	+++	++	++	++/+++
	hoher O ₂ -Anteil-MA	Tage	+++	++/+++	++/+++	+++
	Vakuum	Wochen-Monate	+	+/++	+++	++/+++
	100% CO ₂	Monate	+	+/++	+++	+
erhöht	Vakuum	Tage	+	++/+++	+++	++/+++
	100% CO ₂	Wochen-Monate	+	+/++	+++	+

+++ : dominanter Anteil der Mikroflora; ++ : mittlerer Anteil an der Mikroflora; + : geringer Anteil an der Mikroflora; MA: modified atmosphere; *Ps. spp.*: *Pseudomonas* spp.; *Enterob.*: *Enterobacteriaceae*; MSB: Milchsäurebakterien; *B. therm.*: *Brochothrix thermosphacta*

2.1.3.2 Psychrotrophe Pathogene im Hackfleisch

Die Lebensmittelinfektionskrankheiten stehen in der Häufigkeitsskala übertragbarer Krankheiten in der Bundesrepublik Deutschland auf dem ersten Rang (TSCHÄPE, 2000). Fleisch ist dabei häufig der Auslöser bzw. die Ursache von lebensmittelbedingten Erkrankungen, den "foodborne diseases", (SMULDERS und VAN LAACK, 1992). Nach dem 7. Bericht des WHO-Überwachungsprogrammes zur Kontrolle von lebensmittelbedingten Infektionen und Intoxikationen in Europa waren in den Jahren 1993-1998 bei immerhin 17,4% der lebensmittelbedingten Krankheiten in Deutschland Fleisch und Fleischprodukte beteiligt, in ganz Europa 13,4% (SCHMIDT und TIRADO, 2001). Hackfleisch konnte allerdings in Europa nur in 0,1% der Fälle als Ursache ausgemacht werden. Faktoren, die bei den Ausbrüchen eine erhebliche Rolle gespielt haben, sind der falsche Temperaturegebrauch (44%), rohes Material (20,5%), falsches "Handling" (14,1%) und andere Umweltfaktoren (12,8%). Hackfleisch stellt demnach ein Lebensmittel mit einem Gefährdungspotential dar, weil es sich um ein rohes Material handelt, welches vom Verbraucher oft falsch gehandhabt wird.

Bakterielle Infektionserreger mit höherer Gefährdung in Fleisch können verotoxinogene *Escherichia coli* (z.B. O157:H7), *Listeria monocytogenes*- und

Yersinia enterocolitica-Stämme sein. Als toxinogene Spezies sind z.B. *Clostridium botulinum* und *Staphylococcus aureus* zu nennen (REUTER, 1986b). Zum Teil reichen schon wenige lebende Zellen der pathogenen Spezies aus, um zum Ausbruch einer Erkrankung zu führen, z.B. 10 Keime bei enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) (TSCHÄPE, 2000). Im allgemeinen ist aber erst eine wesentliche Vermehrung im Lebensmittel die Voraussetzung für eine Erkrankung. Es muß zu einer Anreicherung der pathogenen Erreger gekommen sein, letztendlich begünstigt durch Verdrängung oder Ausschaltung einer komplexen natürlichen Lebensmittelmischflora (REUTER, 1996, 1999), insbesondere infolge einer Reinfektion mit pathogenen Erregern nach einer Entkeimung eines Lebensmittels.

Der Begriff der "Pathogenität" wird zum Teil unterschiedlich definiert. Im Gegensatz zur medizinischen Lehrbuchmeinung, wo die Eigenschaft speziesbezogen gesehen wird, halten Mikrobiologen die Pathogenität auch für eine stammspezifische Eigenschaft (FALKOW, 1997; NATARO, 1997). NATARO (1997) schlägt außerdem vor, den Begriff "pathogen" auf einen einzelnen Mikroorganismus zu beziehen, welcher eine Infektion bei einer einzelnen Person zu einem genauen Zeitpunkt verursacht hat. Die Verwendung sollte also nur im klinischen Bereich vorgenommen werden. Außerdem zieht er die Bezeichnung "professional pathogens" für Organismen, welche sich an die Pathogenität angepaßt haben und diese als "ökologische Nische" nutzen, dem Begriff "primary pathogens" vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die potentiell pathogenen Erreger (Opportunisten) aus der Gruppe der Psychrotrophen, die in der Hackfleischmikroflora anzutreffen sind, abgehandelt werden. Bei opportunistischen Bakterien handelt es sich um Mikroorganismen, welche, freilebend oder als Angehörige der normalen Flora, nur unter bestimmten Bedingungen Krankheiten auslösen können (BERUFSGENOSSENSCHAFT DER CHEMISCHEN INDUSTRIE, 2002). Bei gesunden Personen verursachen sie normalerweise keine Infektion. Kommt es doch zu Infektionskrankheiten, dann ist neben der spezifischen Eigenschaft des Erregers und der Konzentration am Infektionsort, besonders die Abwehrlage des Wirtes von Bedeutung. Der "kompromittierte" Wirt ist durch die lokale oder allgemeine Herabsetzung der natürlichen Abwehrmechanismen gegen Infektionserreger gekennzeichnet.

Gram-negative Psychrotrophe als potentiell pathogene Bakterien

Aeromonadaceae

Aeromonaden nutzen eine große Breite von ökologischen Nischen (FARMER et al., 1992). Sie können ubiquitär aus Umweltproben von Wasser, wie Flüssen, Seen, Meer etc. isoliert werden (KROVACEK et al., 1991; ALTWEGG, 1999). Umfangreiche Untersuchungen von Lebensmitteln des Handels haben Aeromonaden in Austern, Fischen und Krebstieren, in Frischfleisch von Geflügel, Rind, Schwein, Schaf, auch gekühlt, in roher und pasteurisierter Milch und in Frischgemüse nachgewiesen (BUCHANAN und PALUMBO, 1985; KIROV, 1993; VAN LAACK et al., 1993; DOHERTY et al., 1996; BAUMGART, 2001; ISONHOOD und DRAKE, 2002).

Die Kenntnis über die Taxonomie der Aeromonaden ist in ständiger Entwicklung. Das Genus *Aeromonas* (*Aer.*) innerhalb der Familie *Aeromonadaceae* besteht aus 14 unterschiedlichen Spezies, nachdem intensive Untersuchungen mit den ursprünglich identifizierten vier *Aeromonas*-Spezies (*Aer. hydrophila*, *Aer. sobria*, *Aer. caviae* und die fischpathogene *Aer. salmonicida*) zu unterschiedlichen biochemischen Gruppierungen ("phenospecies") und unterschiedlichen DNA-Hybridisations-Gruppen ("genospecies"), teilweise auch als "hybridization groups" (HGs) bezeichnet, geführt haben, welche eine Erweiterung der Spezies-Bezeichnungen und der Klassifizierung zur Folge hatte (ABBOTT et al., 1992; KIROV, 1997; BORELL et al., 1998; KAZNOWSKI, 1998).

Aeromonaden sind Gram-negative, Oxidase-positive, Glukose fermentierende, fakultativ anaerobe Stäbchen, welche durch polare Flagellen meist beweglich sind. Sie wachsen in pH-Wert-Bereichen von 5,5 bis 9,0 und in NaCl-Konzentrationen von bis zu 3,5%. *Aeromonas hydrophila* besitzt eine optimale Wachstumstemperatur von 28°C und kann in einem Temperaturbereich von 1 bis 42°C wachsen (PALUMBO, 1986). Aeromonaden weisen eine ungewöhnliche Resistenz gegenüber den Lebensmittel-Prozeßstufen auf. Die Bakterien sind zwar grundsätzlich nicht Hitze- oder Säure-resistent, sie können sich aber durch Produktion eines Schutzproteins an eine saure Umgebung anpassen und dort überleben (ISONHOOD und DRAKE, 2002). Es hat sich gezeigt, daß die Zellen in einer späten exponentiellen Vermehrungsphase (log-

Phase) doppelt so resistent sind wie solche in einer frühen log-Phase (CONDON et al., 1992). Zur Identifizierung klinischer Isolate stellte CARNAHAN et al. (1991) ein biochemisches Testbesteck, bestehend aus 7 Tests (Aerokey II), zusammen.

Die Pathogenitätsmechanismen von Aeromonaden sind noch nicht eindeutig geklärt. Eine Reihe von mutmaßlichen Virulenzfaktoren wurde identifiziert. Hierzu gehören Hämolysin, Invasin, Adhäsine, Endotoxine, Exotoxine und einige extrazelluläre Enzyme (KIROV, 1997). MAJEED und MACRAE (1991) konnten zeigen, daß bewegliche *Aeromonas* spp. in Fleischextrakten, welche bei 5 und 12°C gelagert wurden, nicht nur in der Lage waren zu wachsen, sondern auch bei Kühltemperaturen Enterotoxin und Hämolysin zu bilden. Dies sollte ein Grund sein, Lebensmittel hinsichtlich dieser Bakterien zu kontrollieren (MAJEED und MACRAE, 1991).

Bewegliche Stämme der *Aeromonas hydrophila*-Gruppe verursachten beim Menschen extraintestinale Infektionen und wurden im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen besonders bei Kindern, älteren und immunsupprimierten Menschen genannt (FARMER et al., 1992). Ihre Bedeutung und die ihrer produzierten Toxine und das Verhältnis zur Virulenz als Ursache von humanen Gastroenteritiden ist noch nicht eindeutig geklärt (ISONHOOD und DRAKE, 2002). Es gibt nur wenige Berichte, bei denen die Infektkette durch Erregernachweis im Stuhl Erkrankter und in den verdächtigen Lebensmitteln rekonstruiert worden ist (KIROV, 1993). In den meisten Fällen waren Meeresfrüchte involviert, wie Austern, Garnelen und Shrimps. Eine exakte Infektionsdosis ist nicht bekannt (KIROV, 1997; ISONHOOD und DRAKE, 2002), wird aber von einigen Autoren mit 10^6 - 10^8 (GRANUM et al., 1995) bzw. $>10^7$ (TSCHÄPE, 2000) angegeben. Aeromonaden sollen beim Menschen außerdem eine Rolle bei anderen Komplikationen wie Wundinfektionen, Septikämien und Endokarditis spielen (KIROV, 1997; ALTWEGG, 1999). Obwohl die Pathogenitätsmechanismen noch nicht geklärt sind, müssen *Aer. hydrophila* und *Aer. sobria* als pathogene Bakterien angesehen werden, die zur Lebensmittelvergiftung führen können (MAJEED und MACRAE, 1991). Aufgrund ihrer Fähigkeit, bei Kühltemperaturen zu überleben und sich zu vermehren, ist eine Überwachung in Lebensmitteln angezeigt (ISONHOOD und DRAKE, 2002).

***Pseudomonas* spp.**

Pseudomonaden sind weltweit verbreitet und kommen vor allem in Wasser, Pflanzen und Lebensmitteln vor (BAUMGART, 2001). Das häufige Auftreten in frischen Lebensmitteln hängt mit dem reichlichen Vorkommen in Wasser und Erde zusammen. So sind Pseudomonaden Kontaminanten von Eiern, Fleisch, Milch, Geflügel, Meeresfrüchten und Obst.

STANIER et al. (1966) stellten in einer taxonomischen Basisarbeit die physiologische Diversität der Genus *Pseudomonas* dar. Auch auf genetischer Ebene liegt eine große Vielfalt vor. Die ursprüngliche Einteilung des Genus *Pseudomonas* in 5 rRNA-Homologie-Gruppen (PALLERONI et al., 1973) führte zu einer Neuordnung von 4 dieser Gruppen in separate Genera. Auf der Grundlage von weiteren Untersuchungen auf genotypischer Ebene (16S rRNA-Sequenzanalyse, rRNA-DNA-sowie DNA-DNA-Hybridisierungen) in den letzten zehn Jahren kam es zu einer Revision der Klassifikation und Nomenklatur der Pseudomonaden (KERSTER et al., 1997). In dem Genus *Pseudomonas*, beschränkt auf die ursprüngliche rRNA-Gruppe I, gibt es mehr als 100 *Pseudomonas*-Spezies, welche genotypisch und phänotypisch mit dem Typstamm *Ps. aeruginosa* eng verwandt sind. Als psychrotrophe Bakterien haben *Ps. fragi*, *Ps. lundensis* sowie unterschiedliche Biovare von *Ps. fluorescens* sowie *Ps. putida* eine Bedeutung.

Die Vertreter des Genus *Pseudomonas* umfassen obligat aerobe, z.T. psychrotrophe, gewöhnlich Oxidase-positive, Gram-negative Stäbchen. Ihre Beweglichkeit beruht auf einer oder mehreren polaren Flagellen. Der Metabolismus ist rein respiratorisch, wobei allerdings einige Isolate auch in der Lage sein sollen, durch die Nutzung von Nitrat oder Arginin anstelle von Sauerstoff als Elektronenakzeptor unter anaeroben Bedingungen zu wachsen (KISKA und GILLIGAN, 1999).

Zur Differenzierung psychrotropher Pseudomonaden eignen sich biochemische Unterscheidungsmerkmale, erhoben aus numerischen Taxonomiestudien von MOLIN und TERNSTRÖM (1982, 1986) (Tab. 16 in Kap. 3.2.4.4). Pseudomonaden können eine Reihe niedermolekularer Substanzen abbauen und Substanzen wie Aminosäuren, Lipide, Peptide als Energiequelle nutzen. Durch die Produktion von

Proteasen und Lipasen haben sie eine große Bedeutung bei dem Verderb von Lebensmitteln. Einzelne Arten bilden fluoreszierende Farbstoffe (Pyocyanin und Pyoverdin).

Neben saprophytären Spezies sind auch solche vertreten, welche für Pflanzen, Tiere und Menschen pathogen sein können. *Ps. aeruginosa* spielt in der Human- und Tiermedizin eine wichtige Rolle als Ursache von Infektionen, z.B. von Wunden, sowie im Respirations- und Urogenitaltrakt. Sie ist allerdings nicht psychrotroph. Den psychrotrophen Pseudomonaden, wie *Ps. fluorescens*, *Ps. fragi*, *Ps. putida* und *Ps. lundensis*, konnte bisher keine auffallende Bedeutung als pathogene Mikroorganismen nachgewiesen werden (PALLERONI, 1992; KISKA und GILLIGAN, 1999). Lediglich *Ps. fluorescens* wurde vereinzelt im Zusammenhang mit klinischen Erkrankungen genannt. Nach der Isolierung von der Haut von Blutspendern wurde ein Zusammenhang mit einer Transfusion-assoziierten Septikämie vermutet (PUCKETT et al., 1992). *Ps. putida* trat bei Krebspatienten bei Katheter-Infektionen auf (ANAISSE et al., 1987). Nach VON GRAEVENITZ und WEINSTEIN (1971) sollten *Ps. fluorescens* und *Ps. putida* trotz ihrer geringen Virulenz als potentiell pathogene Mikroorganismen eingestuft werden.

***Alcaligenes* und *Achromobacter* spp.**

(*Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans*)

Alcaligenes spp. sind in der Umwelt im Erdboden und Wasser anzutreffen, gehören aber außerdem zur normalen Darmflora der Wirbeltiere (BUSSE und AULING, 1992). Sie stellen Kontaminanten der Lebensmittel Milch, Fleisch und Meeresfrüchte dar.

Taxonomische Untersuchungen aufgrund von DNA-Homologiestudien und 16S rRNA-Sequenzanalysen haben große Änderungen im Genus *Alcaligenes* (*Alc.*) hervorgerufen. Nur noch 3 Spezies werden dem Genus zugeordnet, darunter *Alc. faecalis* ssp. *faecalis*, wohingegen *Alc. denitrificans* als *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* klassifiziert wird (YABUUCHI et al., 1998).

Alcaligenes spp. und *Achromobacter* spp. sind Gram-negative, bewegliche, Oxidase-positive Stäbchen. Sie vermögen auf MacConkey-Agar zu wachsen. Im Gegensatz zu *Alc. faecalis*, welches nur Nitrit zu reduzieren vermag, kann *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* außerdem auch Nitrat reduzieren.

Die asaccharolytischen *Alc. faecalis* und *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*, welche im Habitat Fleisch auftreten können, werden selten als human-pathogene Stämme gefunden (SCHRECKENBERGER und VON GRAEVENITZ, 1999).

***Acinetobacter* spp.**

Acinetobacter spp. sind in der Natur weit verbreitet. Sie finden sich dort primär im Erdboden, Wasser und in der Luft. Sekundär sind sie daher bei Mensch und Tier aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien zu isolieren. Beim Menschen gehören sie zur normalen Hautflora und werden bei 25% gesunder Menschen gefunden. In Lebensmitteln konnten *Acinetobacter* spp. in Fisch, Milch, Milchprodukten, Fleisch verschiedenen Ursprungs (Geflügel, Rind, Schwein, Kaninchen) nachgewiesen werden (ERIBO und JAY, 1985; GENNARI et al., 1989; GENNARI et al., 1992). Die größte Anzahl der Stämme, die bisher aus Lebensmitteln isoliert werden konnten, sind *A. Iwoffii*-Stämme (Genospezies 8/9) (GENNARI et al., 1992) und *A. johnsonii* (Genospezies 7) (GENNARI und LOMBARDIE, 1993).

Die Bakterien dieses Genus wurden zunächst den "*Achromobacter*", einer Gruppe nicht-pigmentierter, beweglicher und unbeweglicher, aerober Gram-negativer Bakterien, zugeordnet. Als separates Genus gehörten sie ursprünglich der Familie der *Neisseriaceae* an und werden nun, zusammen mit den Genera *Moraxella* und *Psychrobacter*, in die Familie der *Moraxellaceae* eingeordnet (ROSSAU et al., 1991). Aufgrund von DNA-Verwandtschaften, können 21 DNA-Homologie-Gruppen (genannt Genospezies) unterschieden werden. 18 der 21 taxonomisch zu unterscheidenden Genospezies (BOUVET und GRIMONT, 1986; BOUVET und JEANJEAN, 1989; TJERNBERG und URSING, 1989; GERNER-SMIDT et al., 1991; KÄMPFER et al., 1993) lassen sich mit biochemischen und physiologischen Tests mehr oder weniger gut unterscheiden (Tab. 18, siehe Kap. 3.2.4.4). Nur 7 von ihnen besitzen Spezies-

namen (BOUVET und GRIMONT, 1986; BOUVET und JEANJEAN, 1989; TJERNBERG und URSING, 1989). Bei der Bezifferung der Genospezies gibt es je nach Untersucher geringgradige Unterschiede. Zwei weitere Genospezies mit den Speziesnamen *A. ursingii* und *A. schindleri*, isoliert von klinischem Untersuchungsmaterial von Menschen, sind kürzlich nach genotypischen Untersuchungen von NEMEC et al. (2001) hinzugekommen. Kommerzielle "Kits", wie API 20NE, versagen bei der Identifizierung der verschiedenen Genospezies (BERNARDS et al., 1996)

Acinetobacter spp. sind strikt aerobe, Gram-negative kokkoide Stäbchen, welche Oxidase-negativ, Katalase-positiv und unbeweglich sind. Sie sind in der Regel nicht in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, Nitrat-positive Stämme können jedoch auftreten (BOUVET und GRIMONT, 1986).

Acinetobacter-Spezies spielen für den Verderb von Fleisch aufgrund ihrer fehlenden Proteolyse-Aktivität oder Unfähigkeit, H₂S zu bilden, eine untergeordnete Rolle (GILL und NEWTON, 1980; GENNARI et al., 1992). In großen Mengen vorkommend, können sie durch ihre lipolytische Aktivität zum Verderb beitragen (GENNARI et al., 1992).

Acinetobacter spp. werden als nicht pathogen für gesunde Menschen angesehen, können aber Infektionen bei Individuen mit geschwächter Abwehrlage, besonders immunsupprimierten Patienten, verursachen. *A. baumannii* scheint dabei die größte klinische Bedeutung zu besitzen (Tab. 6) und spielt eine Rolle bei nosokomialen Infektionen im Zusammenhang z.B. mit Bakteriämien, Harnwegsinfektionen, sekundären Meningitiden und vor allem Pneumonien (BERGOGNE-BEREZIN und TOWNER, 1996). Erschwerend kommt ihre weitverbreitete Antibiotikaresistenz hinzu. Eine neue Mitteilung (ZAVROS et al., 2002) besagt, daß *A. Iwoffii*, ähnlich wie *Helicobacter pylori*, in der Lage ist, histopathologische Veränderungen in der Magenschleimhaut zu verursachen. Dieses wurde zwar bisher nur experimentell bei Mäusen nachgewiesen, ist aber aufgrund von Beobachtungen bei Personen mit angehobenem Magen-pH-Wert zu vermuten. Opportunistische Pathogene können sich dann ansiedeln, *Acinetobacter* und *Pseudomonas* spp. eingeschlossen.

Tab. 6: Prozentuale Verteilung der am häufigsten auftretenden menschlichen *Acinetobacter*-Isolate aus klinischem Probenmaterial nach Literaturangaben

Spezies		SEIFERT et al. (1993) n = 584	POSTULKA (1994) n = 230	TRAUB und BAUER (2000) n = 2359
Geno-	Taxo-			
2	<i>A. baumannii</i>	72,9% (1)	42% (1)	14,2% (3)
3	unbenannt	9,4% (2)	–	44,6% (1)
4	<i>A. haemolyticus</i>	1,5% (6)	12% (3)	–
5	<i>A. junii</i>	1,9% (5)	11% (4)	–
7	<i>A. johnsonii</i>	5,0% (3)	–	–
8	<i>A. Iwoffii</i>	3,6% (4)	28% (2)	6,9% (4)
13TU	unbenannt	–	–	14,9% (2)

n : Anzahl untersuchter klinischer *Acinetobacter*-Stämme

() : Rangplatz bei der Verteilung der Spezies;

TU: Genospezies-Nr. nach TJERNBERG und URSING (1989)

fett gedruckt: am häufigsten identifizierte *Acinetobacter*-Spezies

***Psychrobacter* spp.**

Psychrobacter (*Pb.*)-Spezies konnten von verschiedenen Proben aus dem Meer und dem Land, einschließlich Lebensmitteln, sowie der Luft isoliert werden. *Pb. immobilis* und *Pb. phenylpyruvicus* wurden in Lebensmittelproben vom Fisch (Kiemen und Haut) (SCHOLES und SHEWAN, 1964), Geflügel (LAHELLEC et al., 1975; GENNARI et al., 1992), Schaf (GENNARI et al., 1992;), PRIETO et al., 1992a sowie anderen Fleischproben, wie Huhn, Pute, Rind, Schwein und Kaninchen (GENNARI et al., 1992), nachgewiesen.

Das Genus *Psychrobacter* gehört zur Familie der *Moraxellaceae* (ROSSAU et al., 1991) und beinhaltet 6 Spezies: *Pb. immobilis*, *Pb. urativorans*, *Pb. frigidicola*, *Pb. (Moraxella) phenylpyruvicus*, *Pb. glacincola* und *Pb. pacificensis*. Ursprünglich waren alle psychrotrophen, saprophytären, nicht-pigmentierten aeroben Gram-negativen Bakterien als "*Achromobacter*" klassifiziert worden. In dem Genus sind Gram-negative, aerobe, unbewegliche, Oxidase-positive Kokken und teilweise Stäbchen zu finden.

Die in Lebensmitteln auftretenden Spezies *Pb. immobilis* und *Pb. phenylpyruvicus* können bei niedrigen Temperaturen (4 bis 10°C) wachsen und haben ihre Optimaltemperatur bei 20°C. Oberhalb von 35 bis 37°C ist ein Wachstum nicht mehr möglich. Nach GARCIA-LOPEZ und MARADONA (2000) ist eine Unterscheidung der beiden Spezies aufgrund der in Tab. 7 aufgeführten Tests möglich. *Pb. immobilis* (JUNI und HEYM, 1986) kann unter aeroben Bedingungen Säure aus einzelnen Kohlenhydraten bilden. Proteine werden nicht hydrolysiert, Indol und H₂S werden nicht produziert (GENNARI et al., 1989). Die meisten Stämme zeigen Lecithinase- und lipolytische Aktivitäten und können dadurch, in großen Mengen vorkommend, eine Rolle beim Verderb spielen (GILL und NEWTON, 1980). Aufgrund ihrer Morphologie, des biochemischen Verhaltens und der genetischen Grundlagen sind *Psychrobacter*-Spezies nahe verwandt mit *Moraxella* und *Acinetobacter*. *Psychrobacter* spp. sind besonders resistent gegenüber ionisierender Strahlung (ITO und IZUKA, 1983).

Tab. 7: Tests zur Unterscheidung von *Pb. immobilis* und *Pb. phenylpyruvicus* (GARCIA-LOPEZ und MARADONA, 2000)

	<i>Pb. immobilis</i>	<i>Pb. phenylpyruvicus</i>
Wachstum stimuliert durch Gallensalze	-	+
Simmons-Citrat-Test	-	+
Säureproduktion aus L-Arabinose		
D-Xylose	+	-
D-Raffinose		

Als Verderbniserreger haben die *Psychrobacter* spp. meist keine Bedeutung, da sie mit anderen Verderbniserregern, wie Pseudomonaden, nicht zu konkurrieren vermögen und ihre Menge in gekühlt gelagertem Fleisch mit der Lagerungszeit abnimmt (GARCIA-LOPEZ und MARADONA, 2000). Sie können eventuell in frischen Produkten Einfluß haben, wenn sie von Beginn quantitativ stark vertreten sind (GENNARI et al., 1992).

Psychrobacter immobilis konnte aus verschiedenen klinischen Proben isoliert werden, wie z.B. Blut, Wunden, Spinalflüssigkeit. Seit 1990 wird die Spezies immer wieder bei nosokomialen Infektionen (Konjunktivitis, Meningitis und Bakteriämie)

angetroffen, vor allem bei Kindern und immunsupprimierten Patienten (LLOYD-PURYEAR et al., 1991; LOZANO et al., 1994).

Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae sind weit verbreitet in Pflanzen, im Erdboden und im Wasser und außerdem im Verdauungstrakt von Mensch und Tier (freilebende und domestizierte) (BRENNER, 1992). RIDELL und KORKEALA (1997) isolierten von gekühlten Fleischproben (Hackfleisch, vakuumverpacktes Fleisch und Schlachttierkörper) 17 verschiedene Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* und ermittelten die minimalen Wachstumstemperaturen. Am häufigsten wurden *Hafnia alvei* und *Serratia liquefaciens* isoliert, mit minimalen Wachstumstemperaturen von 2,6 und 1,7°C. Sie schlossen jedoch nicht aus, daß die Vielfältigkeit der ermittelten Spezies auf die unzureichend auf Umweltproben ausgerichteten kommerziellen Testkits beruht.

Die Nomenklatur und Klassifikation der Genera, Spezies, Subspezies, Biogruppen und Serotypen der *Enterobacteriaceae* wird immer wieder diskutiert und unterliegt ständigen Änderungen. Zur Zeit können 31 Genera der Familie zugeordnet werden.

Enterobacteriaceae sind Gram-negative, Oxidase-negative, Katalase-positive, fakultativ anaerobe Stäbchen. Die meisten Spezies wachsen gut bei Temperaturen zwischen 22 und 35°C und können D-Glukose als einzige Kohlenstoffquelle nutzen. Säure und oft Gas werden bei der Fermentation von D-Glukose und anderen Kohlenhydraten gebildet. Für die von RIDELL und KORKEALA (1997) von gekühlten Fleischproben isolierten und Temperaturkontrollen unterzogenen psychrotrophen *Enterobacteriaceae*-Spezies wurde ein Identifizierungsschlüssel zusammengestellt (Tab. 19, 20, siehe Kap. 3.2.4.4).

Verschiedene Vertreter der *Enterobacteriaceae* sind verantwortlich für Erkrankungen bei Pflanzen, Tieren und dem Menschen. Beim Menschen wurden sie im Zusammenhang mit Abszessen, Pneumonien, Meningitiden, Septikämien und Infektionen

von Wunden, Harn- und Verdauungstrakt isoliert. Einige Spezies spielen eine wichtige Rolle bei nosokomialen Infektionen (FARMER, 1999).

In der Tab. 8 sind für psychrotrophe *Enterobacteriaceae*-Spezies aus Fleisch das Vorkommen und die Bedeutung für den Menschen dargestellt.

Im folgenden wird etwas näher auf die für Lebensmittelinfektionen bedeutenden pathogenen *Yersinia enterocolitica* eingegangen.

Sie sind weit verbreitet in der Erde und im Oberflächenwasser, sowie bei Wild-, Nutz- und Haustieren. *Y. enterocolitica* konnte aus Milch, Fleisch und Fleischprodukten, vor allem vom Schwein, aber auch Rind und Geflügel, isoliert werden (DE BOER et al., 1982; FUKUSHIMA et al., 1987). Bei optimalen Wachstumsbedingungen ist ein Wachstum bis $-1,3^{\circ}\text{C}$ möglich. Die humanpathogenen Stämme gehören fast ausschließlich zu den Serotypen O:3, O:9 und O:5,27 (Europa) und vereinzelt zu O:8 (USA). Angaben zur Infektionsdosis schwanken zwischen 10^4 bis 10^9 Keimen, teilweise unter dem Vermerk „für gesunde Erwachsene“ (TSCHÄPE, 2000). Besonders Kinder, jünger als 7 Jahre, erkranken an einer akuten Enteritis mit abdominalen Schmerzen und Fieber, aber auch ältere Menschen können betroffen sein. Außerdem können eine mesenteriale Lymphadenitis oder eine akute terminale Ileitis auftreten. Komplikationen treten in Form von Pseudoappendizitis, Arthritiden (rheumatische Verlaufsform), respiratorischen und dermatologische Erkrankungen (z.B. Erythema nodosum) auf (SINELL, 1999). In Deutschland sind weniger als 1% lebensmittelbedingter bakterieller Infektionskrankheiten durch *Y. enterocolitica* bedingt (TSCHÄPE, 2000). Nach einem Bericht des Robert Koch-Institutes (AMMON und BRÄUNING, 2002), Berlin, sind sie jedoch nach Salmonellen und Campylobacter die dritthäufigsten Erreger von „foodborne diseases“. Der fehlende Einsatz von speziellen Nachweismethoden kann u.a. die Ursache für den selten zu belegenden Nachweis *Yersinia enterocolitica*-bedingter Lebensmittelinfektionen sein (SCHMIDT und TIRADO, 2001), so daß an der Verbesserung und weiteren Entwicklung von Nachweismethoden gearbeitet werden sollte (JOHANNESSEN et al., 2000).

Tab. 8: Übersicht psychrotropher *Enterobacteriaceae*-Spezies: Vorkommen und Bedeutung für den Menschen (nach Literaturangaben)

Vorkommen	Bedeutung für den Menschen
<i>Citrobacter freundii</i> ¹ Wasser, Verdauungstrakt Mensch und Tier	Enterotoxinbildner: pathogen im Verdauungstrakt; Septikämie, Meningitiden nosokomiale Infektionen
<i>Enterobacter aerogenes, amnigenus, cloacae, intermedius</i> ² Wasser, Abwasser, Erde, Gemüse, Fleisch, Milchprodukte, Verdauungstrakt Mensch und Tier	Endokartitiden, Meningitiden, Arthritis u.a., nosokomiale Infektionen (Harntrakt, Bakteriämie)
<i>Hafnia alvei</i> ³ Oberflächenwasser, Erde, Abwasser, Pflanzen, Intestinaltrakt und Faeces von Fischen, Insekten, Vögeln und Säugetieren, Fleisch, Milchprodukte, Fische	opportunistisch pathogen für extraintestinale Erkrankungen
<i>Klebsiella oxytoca, pn. ssp. ozaenae, pn. ssp. pneumoniae</i> ⁴ Wasser, Erde, Pflanzen; Verdauungstrakt von Mensch und Tier	<i>Kl. pneumoniae</i> pathogen: Verdauungs-, Harn-, Atmungstrakt; nosokomiale Infektionen
<i>Pantoea agglomerans</i> ⁵ Pflanzen, Erde, Wasser; menschlichen Proben: Wunden, Blut, Urin, Organe	opportunistisch pathogen, z.B. Neugeborenen-Meningitis und -Sepsis
<i>Serratia fonticola, liquefaciens, marcescens, plymuthica</i> ⁶ Erde, Luft, Wasser, Pflanzen; Tiere; Milch und Milchprodukten, Eier Fleisch, Obst, Gemüse	<i>S. marcescens</i> opportunistisch pathogen: Atmungs-, Harntrakt, Wunden, Septikämie, nosokomiale Infektionen
<i>Yersinia enterocolitica</i> ⁷ Erde, Wasser; Wild-, Nutz-, Haustiere, Reptilien, Fleisch und Fleischprodukte, Milch	pathogen: Enteritis, Pseudoappendizitis, Arthritiden, Atemwegserkrankungen, dermatologische Erkrankung

¹ FREDERIKSEN und SØGAARD, 1992, ² GRIMONT und GRIMONT, 1992a, ³ RIDELL, 2000, ⁴ GRIMONT et al., 1992, ⁵ MORIN und PARVEEN, 2000, ⁶ GRIMONT und GRIMONT, 1992b, ⁷ KÄMPFER, 2000, NEUBAUER et al., 2001

Das Schwein scheint insbesondere in den skandinavischen Ländern ein Reservoir für pathogene Serotypen dieser Spezies darzustellen (BÜLTE et al., 1991; KAPPERUD, 1991; FUNK et al., 1998). Dort sind die Stämme vor allem in Tonsillen und auf Zungen, seltener in Faeces und auf dem Schlachttierkörper anzutreffen. Durch Verunreinigungen während des Schlachtprozesses kann es zu einer Kontamination des

Fleisches und so auch zum Auftreten in Produkten, wie dem Hackfleisch, kommen (KAPPERUD, 1991; NEUBAUER et al., 2001). Die von Anfang an starke Begleitflora im Hackfleisch hat allerdings einen hemmenden Effekt auf eine Vermehrung von Yersinien (KLEINLEIN und UNTERMANN, 1990; BÜLTE et al., 1991; SINELL, 1999), so daß eine Anreicherung derselben bei kühler Aufbewahrung nicht zum Tragen kommt. Von BÜLTE et al. (1991) wurde deshalb eine Gefährdung des Menschen durch Yersinien aufgrund des Verzehrs von frischem Fleisch, also auch Hackfleisch, sofern es die natürliche Mikroflora enthält, als gering eingeschätzt.

Gram-positive Psychrotrophe als potentiell pathogene Bakterien

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes gehört zu den in der Umwelt weit verbreiteten Listerien (Erdboden, Gemüse, Silage, Abwasser, Wasser, Futtermittel, frisches und gefrorenes Geflügelfleisch, frisches und verarbeitetes Fleisch, Rohmilch, Käse) (SEELIGER und JONES, 1986). Aus Hackfleischproben vom Rind und Schwein sowohl aus dem Einzelhandel als auch aus "industrieller" Produktion konnte *List. monocytogenes* wiederholt isoliert werden. Das Auftreten schwankte dabei erheblich zwischen etwa 5 und 80% der untersuchten Proben. Es wurden Keimzahlen von 10 und 10^2 KbE/g und einmalig von 10^3 KbE/g erreicht. Eine Übersicht hierzu wurde von SCHOTT und HILDEBRANDT (1996) zusammengestellt. Stämme dieser Spezies sind Gram-positive, fakultativ anaerobe, bewegliche (bei 20-25°C), kurze Stäbchen, welche Katalase-positiv und Oxidase-negativ reagieren. Die untere Wachstumsgrenze liegt bei 0°C, aber die Vermehrung wird beeinflusst von der antagonistischen Wirkung anderer begleitender Bakterien einer Lebensmittelflora (FARBER und PERKIN, 1991).

Pathogen für Menschen und Tiere sind die Spezies *List. monocytogenes*, *List. ivanovii* und *List. seeligeri*, obwohl die beiden letzteren selten Krankheiten verursachen (HOF und HEFNER, 1988). Lange Zeit konnte kein direkter Zusammenhang zwischen kontaminierten Lebensmitteln und Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden. Von der Listeriose werden besonders Schwangere, ungeborene Kinder sowie Neugeborene und immungeschwächte Personen

betroffen. Die Erscheinungen können vielfältig sein: Grippe-ähnliche Symptome, Gehirnhautentzündung, Hautveränderungen (kutane Listeriose), chronisch-septische Listeriose, glanduläre Listeriose (Lymphknotenschwellungen) (NAC, 1991). Bei Schwangeren kann es zur Infektion des Fetus und zum Abort kommen. Über den Mechanismus der Pathogenität ist wenig bekannt (BILLE et al., 1999). Nicht alle Stämme von *List. monocytogenes* sind pathogen, aber alle pathogenen Stämme bilden ein Hämolysin (NAC, 1991).

***Clostridium* spp.**

Zu den psychrotrophen toxinogenen *Clostridium* (*Cl.*) spp. müssen die nicht-proteolytischen Stämme von *Cl. botulinum* Typ E, sowie B und F gezählt werden (KRAFT, 1992). Sie werden in der Umwelt, im Erdboden sowie im Wasser gefunden. Für *Cl. botulinum* Typ E gilt der Darmtrakt von Fischen als Reservoir (HOBBS, 1981). Clostridien sind anaerobe, Gram-positive bis Gram-variable, Katalase-negative Stäbchen, die Sporen bilden. Die psychrotrophen Stämme können bei 3 bis 5°C wachsen und produzieren Toxine, ihr Wachstumsoptimum liegt bei 30 bis 37°C, die Optimaltemperatur für die Toxinproduktion bei 20 bis 25°C. Sie werden bei einer Salzkonzentration von über 5% und einem a_w -Wert unterhalb von 0,97 gehemmt (HOBBS, 1981).

Bei der oralen Aufnahme des in Lebensmitteln gebildeten Botulinumtoxins treten nach Stunden oder Tagen Symptome der Intoxikation in Form von Schwächung und anschließender Lähmung der Muskulatur auf. Ohne medizinische Behandlung tritt Lähmung des Zwerchfells und der Zwischenrippenmuskulatur mit Tod durch Ersticken ein.

Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind in der Umwelt weit verbreitet. Für Fleisch und Fleischprodukte spielen vor allem Laktobazillen, *Leuconostoc* spp., *Carnobacterium* spp, Pediokokken und *Weissella* spp. eine Rolle. Grundsätzlich kann gesagt werden, daß diese Milchsäurebakterien generell als nicht pathogen eingestuft werden, sie aber als opportunistische Erreger vor allem in Fällen von immunsupprimierten oder länger therapierten Patienten in Zusammenhang mit klinischen Krankheiten angeführt werden.

Laktobazillen können in und auf Pflanzen, sowie in Lebensmitteln und Futtermitteln angetroffen werden (HAMMES et al., 1992). Sie sind außerdem Bestandteil der natürlichen Darmflora von Tier und Mensch und dort für die Aufrechterhaltung eines mikroökologischen Gleichgewichtes von besonderer Bedeutung (REUTER, 1965). Weitere Habitate sind die Mund- und Vaginalflora vom Menschen, Erdboden, Abwasser, verschiedene Lebensmittel (Milch und Milcherzeugnisse, Fleisch und Fleischerzeugnisse) (HAMMES et al., 1992). In Fleisch und Fleischprodukten konnten *Lactobacillus* (*L.*) *sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. alimentarius*, *L. brevis* und *L. algidus* isoliert werden (REUTER, 1981, 1983; VON HOLY und HOLZAPFEL, 1988; KATO et al., 2000). Stämme von *L. plantarum* sowie der *L. casei*-Gruppe traten z.B. in Verbindung mit Endokarditiden und Septikämien in Blutkulturen auf (KLEIN et al., 1992; AGUIRRE und COLLINS, 1993; HARTY et al., 1994; ADAMS und MARTEAU, 1995; HUSNI et al., 1997). Eine Infektion über Nahrungsmittel ist bisher nicht beschrieben worden, so daß von keiner Gefahr für den Menschen über diesen Weg ausgegangen wird (ADAMS und MARTEAU, 1995; REUTER, 1997), obwohl neuerdings ein Bericht vorliegt, daß der Stamm eines probiotischen Produktes in Leberabszessen eines kompromittierten Patienten gefunden wurde. (RAUTIO et al., 1999).

Stämme des Genus *Leuconostoc* sind oft mit Laktobazillen vergesellschaftet und teilen mit ihnen die natürlichen und künstlichen Habitate (HOLZAPFEL und SCHILLINGER, 1992). Unter gekühlten Lagerungsverhältnissen und Vakuumverpackungen werden sie im Fleisch besonders mit *L. sakei* und *L. curvatus* nachgewiesen (REUTER, 1981). Im Habitat Fleisch finden sich vor allem

Leuconostoc (Lc.) mesenteroides sp. *mesenteroides*, *Lc. carnosum* und *Lc. gelidum* (REUTER, 1970d; HITCHENER et al., 1982). Die üblicherweise als nicht pathogen eingeschätzten *Leuconostoc* spp. wurden bei Patienten mit anderen zugrundeliegenden Erkrankungen aus Blutkulturen isoliert (GASSER, 1994).

Weitere Milchsäurebakterien, die in Fleisch und Fleischprodukten eine Rolle spielen können, sind ***Carnobacterium* spp.**, **Pediokokken** und ***Weissella* spp.**

Carnobacterium (C.) divergens, *C. piscicola* können in Hackfleisch und in gekühlten, vakuumverpackten Fleischproben vom Rind, Schwein und Schaf (HITCHENER et al., 1982; SHAW und HARDING, 1984) häufig mit *Lc. gelidum* zusammen nachgewiesen werden (KATO et al., 2000). Bei *C. piscicola* scheint es sich vorwiegend um einen Fisch-pathogenen Keim zu handeln. Für die anderen Carnobakterien liegen noch keine Berichte über Isolierungen aus klinischen Proben vor.

Die aus dem Habitat Fleisch isolierbaren Pediokokken *Pediococcus (P.) acidilactici* und *P. pentosaceus* können als opportunistisch eingestuft werden. Es liegen vereinzelte Nachweise, z.B. bei Septikämien, Leberabszessen und Bakteriämie, vor (SARMA und MOHANTY, 1998).

In Fleischprodukten sind auch *Weissella (W.)* spp. (*W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. paramesenteroides* und *W. viridescens*) anzutreffen (NIVEN und EVANS, 1957; MILBOURNE, 1983; COLLINS et al., 1993). Sie gehörten noch bis zum Jahre 1993 zu den Laktobazillen. *Weissella* spp. fanden vereinzelt Erwähnung in klinischen Berichten. Eine neuere Arbeit zitiert ausdrücklich *W. confusa* im Zusammenhang mit einer Bakteriämie beim Menschen (OLANO et al, 2001).

2.1.4 Antagonismus und mikroökologisches Gleichgewicht im Habitat Fleisch

Die Mikroflora des Fleisches unterliegt im Verlauf der Gewinnung und Verarbeitung einem ständigen Wandel. Je nach Einflußfaktoren, wie z.B. pH-Wert oder Temperatur, kann sich ein Teil dieser Flora gegenüber einem anderen Teil durchsetzen. Dieses beruht auf unterschiedlichen langen Generationszeiten sowie antagonistischen Wirkungen innerhalb der konkurrierenden Flora (NEWTON und GILL, 1978). Der Begriff "Microbial interference" wurde von DUBOS und SCHAENDLER (1960) zur

Beschreibung des Antagonismus eines Mikroorganismus gegenüber einem anderen vorgeschlagen. Die möglichen Mechanismen dieses Phänomens sind (HOLZAPFEL et al., 1995; JAY, 1996):

1. Produktion und Exkretion von Substanzen, die inhibitorisch oder letal auf andere mikrobiologische Zellen wirken. Dazu gehören z.B. organische Säuren, H₂O₂, Kohlendioxid, Bakteriozine, Diacetyl.
2. Konkurrenz um Anheftungsstellen. In der Tierproduktion macht man sich dieses Prinzip beim sogenannten Nurmi-Konzept oder "competitive exclusion" (NURMI und RANTALA, 1973) zum Ausschluß der Besiedlung des Magen-Darm-Traktes von jungen Hühnern mit Salmonellen und Campylobacter zu Nutze.
3. Veränderung der Umweltbedingungen durch die Änderung im Oxidations-Reduktions-Potential und pH-Wert-Bereich.
4. Konkurrenz um Sauerstoff und Nährstoffe.

Die natürliche Fleischmikroflora ist unbedenklich hinsichtlich einer Gesundheitsgefährdung des Menschen, sofern die Kühlung alsbald beginnt und die Kühlkette eingehalten wird. Pathogene und potentiell toxinogene Mikroorganismen können meist nicht mit einer quantitativ hohen Begleitflora konkurrieren (REUTER, 1990, 1994). Der kumulative Streß durch suboptimale intrinsische und extrinsische Faktoren (pH, Temperatur u.a.) und der Wettkampf mit großen Mengen an saprophytären Mikroorganismen sind die Ursache (GILL und NEWTON, 1980). Der größte Ausbruch einer lebensmittelbedingten Hämorrhagischen Colitis durch *E. coli* O157:H7 aus Rinderhackfleisch im Jahre 1993 in den USA wurde darauf zurückgeführt, daß nur eine geringe Anzahl an "Background Bakterien" vorhanden gewesen war (JAY, 1996). Tab. 9 gibt das Konkurrenzverhalten verschiedener Bakterien der Fleischflora bei unterschiedlichen Bedingungen wieder.

Mit dem Einsatz von Schutzkulturen im Lebensmittelbereich setzt man gezielt stoffwechselaktive Bakterien zu, welche die sensorischen Eigenschaften des Produktes nicht weiter beeinflussen, aber aufgrund von antagonistischen Wirkungen gegenüber saprophytären, infektiösen oder toxinbildenden Keimgruppen zu einer Stabilität und mikrobiellen Sicherheit desselben führen sollen (HOLZAPFEL et al., 1995; THUMEL, 1995). Die erwünschten Mikroorganismen verhindern durch aktive Verdrängung das

Wachstum der unerwünschten (KNAUF, 1998). Starterkulturen dagegen sind bei fermentierten Lebensmitteln bewußt zugesetzte Mikroorganismen, welche die sensorischen Eigenschaften und Beschaffenheit des Produktes verbessern sollen. Die Begriffe Starter- und Schutzkulturen lassen sich aber häufig nicht voneinander trennen, da es sich um die gleichen Mikroorganismen handeln kann, die nur zum unterschiedlichen Zweck eingesetzt werden (HOLZAPFEL et al., 1995). Bei den eingesetzten Bakterienspezies handelt es sich z.B. bei der Rohwurstproduktion um *Lactobacillus (L.) plantarum*, *L. curvatus*, *L. sakei*, *Staphylococcus carnosus*, *Pediococcus (P.) acidilactici*, *P. pentosaceus*. REUTER (1972b) sah die pH-Wert-Senkung als den wichtigsten Faktor an, durch welchen das Wachstum anderer unerwünschter Mikroorganismen gehemmt wird. Die pH-Wert-Erniedrigung durch Bildung organischer Säuren, sowie die Bildung bakterizid wirksamer Substanzen (Bakteriozine) wirkt sich hemmend auf das Wachstum von Vertretern der psychrotrophen *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Listeria* spp. aus (SCHILLINGER und LÜCKE, 1989; SCHILLINGER et al., 1991; SKYTTÄ et al., 1991; DEMBELE et al., 1998). Nach LÜCKE (1992) sind für eine genügend starke und zuverlässige Wirkung bei Frischfleisch Inokula von mindestens 10^8 KbE/g notwendig. Die sensorische Veränderung des Fleischproduktes durch die Säuerung sowie die hohen Keimzahlen werden von den Konsumenten gleichgesetzt mit "verdorben" und machen daher den Einsatz der Schutzkulturen in diesem Lebensmittel zur Verbesserung der Lagerzeit schwierig (KNAUF, 1998).

JAY (1996) schlägt zur Verhinderung der Kolonisation pathogener Mikroorganismen auf Schlachttierkörpern das Besprühen dieser Tierkörper mit einer Mixtur von "Background Bakterien" vor. Dazu gehören vor allem Gram-positive Bakterien, zu denen zur besseren Anheftung auf der Fleischoberfläche eine geringe Menge von *Psychrobacter* und *Acinetobacter* spp. zugegeben wird.

Tab. 9: Ökologische Nischen für Bakterien von Fleisch und Fleischprodukten (modifiziert nach LÜCKE, 1995)

	Bevorzugtes "Kompetitives" Wachstum bei			
	niedrigem pH-Wert	niedrigem a_W -Wert	niedriger Temperatur	Abwesenheit von O ₂
<i>Pseudomonas</i> (psychrotrophe Spezies)	(+)	-	++	-
<i>Acinetobacter</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Shewanella</i>	-	-	++	-
<i>Enterobacteriaceae</i> (psychrotrophe Spezies)	(+)	(+)	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	(+)	(+)	+	+
<i>Leuconostoc</i> , <i>Carnobacterium</i>	+	(+)	++	++
<i>Lactobacillus</i> (psychrotrophe Spezies)	++	+	++	++
<i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i>	+	+	(+)	++
<i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	(+)	++	-	(+)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	(+)	+	++	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	(+)	+	+	+
<i>Clostridium botulinum</i> (nicht-proteolytische Stämme)	(+)	-	+	++

"Kompetitives" Wachstum: - : nicht vorhanden, (+) : schwach, + : stark, ++ : sehr stark

2.2 Nachweismethoden für Komponenten der Mikroflora von frischem Fleisch

2.2.1 Kultureller Nachweis

Für den direkten Nachweis von Bakterien in frischem Fleisch kann das klassische Kultivierungsverfahren mit festen Nährböden eingesetzt werden, welches die Anzucht der Mikroorganismen in Form von sichtbaren Kolonien, angegeben als "Kolonie-bildende Einheiten" (KbE), ermöglicht. Zur Bestimmung des Mikroflora-status in Fleisch eignet sich der Einsatz nicht-selektiver, universeller Nährmedien, welche aufgrund ihrer Zusammensetzung das Wachstum überwiegend aller Bakterien ermöglicht, z.B. Blut-Agar, Plate-Count-Agar (REUTER, 1970e). Es besteht

dadurch nicht die Gefahr, eine Vorselektion bestimmter Keimgruppen vorzunehmen und wichtige Gruppierungen nicht zu berücksichtigen (FRIES, 1983). Dominierende rein saprophytäre Mikroorganismen können auf diesen universellen Nährböden die geringen Anteile pathogener Bakterien zurückdrängen (REUTER, 1970e).

Zur Erfassung spezieller Keimgruppen oder Bakterienspezies können Nährmedien mit speziellen Zusätzen verwendet werden, welche entweder das Wachstum bestimmter Bakterien begünstigen (Elektivnährmedien) oder sich hemmend auf die Vermehrung einzelner Mikrofloraanteile auswirken (Selektivnährmedien). Durch die Wahl geeigneter Kultivierungsbedingungen kann eine weitere Selektion der nachzuweisenden Mikroorganismen vorgenommen werden.

SPECK (1984) stellte als Selektivmedium zur Anzucht der psychrotrophen Flora den Kristall-Violett-Tetrazolium-Agar (CVT) bei einer Bebrütung bei 30°C für 48 Stunden oder 22°C für 5 Tage vor. Er 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.

Für den Nachweis einzelner psychrotropher Mikrofloraanteile können verschiedene Selektivnährmedien eingesetzt werden. Um einen ungefähren Eindruck der Belastung von Fleischproben mit Verderbniserregern zu erlangen, könnte die Keimzählung von Pseudomonaden herangezogen werden, da sie unter aeroben Verhältnissen bei hoher Luftfeuchtigkeit in der Regel den größten Anteil der Flora ausmachen (GILL und NEWTON, 1977; NEWTON et al., 1978; GILL, 1983; DAINTY und MACKEY, 1992; SMULDERS und VAN LAACK, 1992; JACKSON et al., 1997). JEPESSEN (1995) stellte in seiner Arbeit die zur Verfügung stehenden Nährmedien zur Isolierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln und der Umgebung gegenüber. Neben frühen Medien, wie z.B. Medium B von KING et al. (1954) zum Nachweis fluoreszierender Spezies, findet der von MEAD und ADAMS (1977) entwickelte Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin-Agar (CFC) Erwähnung. Nach MEAD (1985) läßt dieser sich für verschiedene Lebensmittel einsetzen und unterdrückt effektiv die Gram-positive Begleitflora sowie den unerwünschten Anteil der Gram-negativen. Um eventuell zum Wachstum befähigte *Enterobacteriaceae* auszuschließen, ist ein Überfluten der Nährbodenplatten mit einem Oxidase-Reagenz anzuraten. Der CFC-Agar wurde in

die internationale Norm zur Keimzählung von *Pseudomonas* spp. in Fleisch und Fleischprodukten (ISO 13720,1995) übernommen. Der von KIELWEIN (1969) zur selektiven Anzucht von Pseudomonaden und Aeromonaden entwickelte Glutamat-Stärke-Penicillin-Agar (GSP) ist nur bedingt geeignet, da regelmäßig mit dem Wachstum von *Enterobacteriaceae* zu rechnen ist (REUTER, 1970e; KIELWEIN, 1971).

2.2.1.1 Quantitativer Nachweis

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Fleisch und Fleischerzeugnissen ermöglicht die mikrobiologische Beurteilung dieser Habitate, wobei die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl allgemein als Parameter anerkannt ist (NORTJE et al., 1990a; KLEIN und LOUWERS, 1994; REUTER, 1996) und in Vorschriften zur Durchführung von Gesetzen und Normen festgelegt ist (DIN 10161, Teil 1 und 2, 1984). Nach dem geltenden Recht wird sie bei der mikrobiologischen Kontrolle von Hackfleisch eingesetzt (Anlage 2a FIHV, 2001).

Die Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen von Lebensmittelproben sollte auf der Grundlage von standardisierten Methoden stattfinden, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Für die Probenvorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen kann das nach § 35 LMBG vorgeschlagene Untersuchungsverfahren angewendet werden (L 06.00-16, entspricht DIN 10162). Die Beimpfung der Nährböden kann nach verschiedenen Methoden erfolgen, welche Eingang in offizielle Arbeitsanweisungen fanden. Hierzu zählen z.B. das Gußplattenverfahren, die Spateltechnik (z.B. § 35 LMBG L 06.00-18, entspricht DIN 10161, Teil 1) und die Tropfplattentechnik (Drop-plating, z.B. § 35 LMBG, L 06.00-19, entspricht DIN 10161, Teil 2). Die arbeitssparende Spateltechnik und das drop-plating-Verfahren weisen nach BÖTCHER und HILDEBRANDT (1991) sowie MÜLLER und HILDEBRANDT (1989) gegenüber dem Gußplattenverfahren keine Nachteile in Bezug auf Keimausbeute und Genauigkeit auf.

Durch die Wahl einer geeigneten Bebrütungstemperatur wurde versucht, das Wachstum der besonders zu ermittelnden Bakterienkomponenten zu begünstigen. Zur vorläufigen Erkennung von psychrotrophen Bakterien wurde von JAY (1987) aus einer bewachsenen Bouillon mit Tupfern ein Ausstrich auf "brain heart infusion agar"

(BHIA) vorgenommen, welcher anschließend bei $10 \pm 1^\circ\text{C}$ für 48 h bebrütet wurde. COUSIN et al. (1992) stellten verschiedene Inkubationsbedingungen für die psychrotrophe Keimflora vor: für Gußplatten 10 Tage bei 7°C , für ausgestrichene Platten 7 bis 8 Tage bei 7°C oder 16 Stunden bei 17°C , gefolgt von 3 Tagen bei 7°C . Nach ISO 17410 (2001) werden nicht-selektive Nährmedien für 10 Tage bei $6,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ bebrütet. Zur Verkürzung der Bebrütungszeit für die psychrotrophe Keimzahlbestimmung aus Fleischproben sah GREER (1981) die Inkubation für 24 Stunden bei 25°C vor.

2.2.1.2 Identifizierung einzelner Komponenten der psychrotrophen Fleischmikroflora

Die Identifizierung von Mikroorganismen ist nur möglich, wenn diese im Vorfeld klassifiziert worden sind. Zur Klassifizierung, d.h. der taxonomischen Einstufung der Bakterien, werden physiologisch-biochemische und serologische Merkmale sowie die Basenzusammensetzung der DNA, DNA-DNA-Hybridisierungen, Sequenzen der 16S- oder 5S-rRNA und die Antibiotika-Empfindlichkeit herangezogen. Die Identifizierung dagegen basiert überwiegend auf der Bestimmung phänotypischer Merkmale. Voraussetzungen sind das Vorliegen einer Reinkultur, das Vorhandensein geeigneter Tests und der Einsatz eines praktikablen, sicheren Identifizierungssystems (BAUMGART, 1999). Das Identifizierungsschema sollte aus möglichst wenigen Tests bestehen, welche leicht bestimmbare Eigenschaften der Bakterien definieren (HOLT et al., 1994a).

Gram-Färbungsverhalten und Bakterienmorphologie erlauben eine grundlegende Einteilung der Stämme. Durch physiologische und biochemische Tests, zu denen z.B. die Bestimmung der Wachstumsgrenztemperaturen, Beweglichkeitsprüfung, Nachweis gebildeter Enzyme, Verwertung verschiedener Reaktionskörper gehören, ist es möglich, eine Identifizierung bis auf Genus- und auch Speziesebene zu erreichen. Um eine Auswahl geeigneter Tests vornehmen zu können, müssen "wesentliche Merkmale" der Bakterien bekannt sein. Nach BARROW und FELTHAM (1993a) sollen diese Merkmale drei Eigenschaften besitzen. Sie sollen "spezifisch" sein, z.B. wie die Fähigkeit von *Staphylococcus aureus*, Koagulase zu bilden. Andererseits sollen sie "differenzierend" sein, d.h., daß sie nicht spezifisch für eine

einzigste Spezies sind, aber sehr ähnliche Mikroorganismen zu unterscheiden vermögen, z.B. die Fähigkeit von *Ps. fragi* gegenüber *Ps. fluorescens*, aus Maltose Säure zu bilden. Und zuletzt gehören Merkmale dazu, die alle Mitglieder einer Gruppe "teilen": z.B. die Fähigkeit der *Enterobacteriaceae*, unter anaeroben Bedingungen aus D(+)-Glukose Säure zu bilden. Aufgrund der ausgewählten Reaktionen können Identifizierungs- bzw. Fließschemata aufgestellt werden, die das Bestimmen der Bakterien ermöglichen. Die Problematik dieser Schemata liegt darin, daß die Ergebnisse von der Menge des eingesetzten Inokulums, der Inkubationstemperatur und -dauer, der Zusammensetzung der Medien und den Kriterien, welche das "positive" und "negative" Ergebnis charakterisieren, abhängen (HOLT et al., 1994a). Daher sollten die Bedingungen standardisiert sein und grundsätzlich eine Überprüfung des Identifizierungsschemas mit geeigneten Referenzstämmen vorausgegangen sein.

Für die Praxis hat die konventionelle, klassische Form der Identifizierung und Beschreibung der Bakterien immer noch große Bedeutung. In Standardwerken (Bergey's Manual of Systematic and Determinative Bacteriology, The Prokaryotes) sind Namen, Beschreibungen morphologischer und physiologischer Art, Bestimmungsmerkmale und taxonomische Einstufungen zusammengefaßt.

Der Nachweis und die Identifizierung über konventionelle Methoden sind kostengünstig und geben sowohl qualitative als auch quantitative Auskünfte, brauchen jedoch teilweise Tage und gegebenenfalls etliche Wiederholungen, bis ein endgültiges Ergebnis vorliegt. Sie sind somit sehr arbeitsintensiv (DE BOER und BEUMER, 1999).

2.2.2 Weitere Nachweismethoden

In der Lebensmittelindustrie werden schnelle Methoden für eine Aussage über das Vorkommen pathogener Mikroorganismen im rohen Material und fertigen Lebensmittel, zur Kontrolle des Herstellungsprozesses und der Überwachung der Effektivität von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen benötigt.

In Tab. 10 sind schnelle und automatisierte Methoden zur mikrobiologischen Analyse aufgeführt. Einige von ihnen sollen im folgenden kurz angesprochen werden. Bei der **Spiralplattentechnik** erfolgt die Beimpfung automatisiert spiralförmig auf eine rotierende Agarplatte. In Kombination mit einem Laser-gesteuerten Ablesegerät kann ein Zeitgewinn im Vergleich zur manuellen Beimpfung und Ablesung erreicht werden (BAUMGART, 1980). **Dip-Slides** eignen sich entweder als direkte Abklatschpräparate oder zum Eintauchen in Probenhomogenisate (BÜLTE und REUTER, 1982; BÜLTE und STOLLE, 1989). Bei der **Hydrophic Grid Membrane Filter-Technik** (HGMF) wird ein spezieller Filter eingesetzt, und die quantitative Erfassung erfolgt ähnlich dem Prinzip der "most-probable-number"-Methode. Sie ist für verschiedene Bakteriengruppen oder -spezies einsetzbar, z.B. für die Gesamtkeimzahl, die coliformen Bakterien, *E. coli*, Salmonellen, *Y. enterocolitica* u.a. (GREER und DILTS, 1997). Die **Impedanz- und Konduktanz-Methoden** stellen elektrische Meßverfahren dar. Bei Zellzahlen von $>10^5$ Zellen/ml (BÜLTE und REUTER, 1984; BAUMGART, 2001) können Änderungen der Leitfähigkeit des Mediums aufgrund des Bakterienwachstums festgestellt werden. BÜLTE und REUTER (1984) sahen die Leitfähigkeits- bzw. Widerstandsänderungen primär durch Enterobakteriaceen hervorgerufen. STRASSER (1979b) konnte eine gute Übereinstimmung dieser Methode mit der Gesamtkeimzahl feststellen. Vorteilhaft ist, daß keine Beeinflussung durch Probenmaterial auftritt (STRASSER, 1979a) und das Ergebnis in zwei (bei 10^8 KbE/g) bis zwölf Stunden (bei 10^2 KbE/g) vorliegt (BÜLTE und STOLLE, 1989). WAWERLA et al. (1999) dagegen sahen die Impedanzmethode zur Gesamtkeimzahlbestimmung als ungeeignet an, da eine Kalibrierung für jedes Lebensmittel einen großen Zeitaufwand bedeutet und geschädigte Zellen das Ergebnis beeinflussen. Auf der Messung von Zellinhaltsstoffen bzw. -bestandteilen aufgrund der Intensitätsschwächung des einfallenden Lichtes in Flüssigmedien beruht die Trübungsmessung (**Turbidometrie**). Die Nachweisgrenze liegt mit 10^4 bis 10^5 Keimen pro ml relativ hoch und die Methode ist am ehesten für Reinkulturen geeignet (STRASSER, 1979b; OTERO et al., 1998). Die **Direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik** (DEFT) soll die Bakterienzahl in Lebensmittelsuspensionen bestimmen, indem nach Filtration zurückgebliebene Bakterien angefärbt und im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop gezählt werden (LOOS, 1983; DEIBL et al., 1998). Das **Durchflußzytometer** (Flow Cytometry, FCM) ermöglicht eine hoch sensitive Analyse von Zellen in Bezug auf ihre Zahl, Größe und Form. Dabei wird die Änderung des auf mit fluoreszierenden Substanzen

angefärbte Zellen treffenden Laserstrahls hinsichtlich Streuung und Adsorption gemessen und ausgewertet. Da sich die Lebensmittelmatrix störend auswirkt, ist die Methode in der Lebensmittelmikrobiologie erschwert einzusetzen (DE BOER und BEUMER, 1999). Die **Aminopeptidase-Aktivität** kann in Fleischproben gemessen werden. Dieses Enzym findet sich bei den meisten psychrotrophen Gram-negativen Bakterien und spaltet L-Alanin-p-nitroanilid in p-Nitroanilin, welches spektrophotometrisch gemessen werden kann. Nach ALVARADO et al. (1992) kann in weniger als 3 Stunden ein Keimgehalt zwischen 10^4 und 10^8 KbE/cm² auf Fleischoberflächen ermittelt werden. Bei dem **Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test** (LAL-Test) führen die Polysaccharide der Bakterienwand Gram-negativer Zellen zur Gerinnung der Blutkörperchen des Pfeilschwanzkrebsses (*Limulus polyphemus*) (EISGRUBER und STOLLE, 1987). Indirekte Keimzählverfahren, wie die **Biolumineszenz**, liefern erst ab Keimzahlen von 10^4 KbE/g oder höher brauchbare Ergebnisse (BÜLTE und STOLLE, 1989). Bei der Biolumineszenz wird die Menge an bakteriellem ATP nach einer Komplexbildung mit Luciferin und Luciferase photometrisch nachgewiesen. Sie erweist sich für die Ermittlung der mikrobiellen Kontamination von Fleischproben als schnelle, brauchbare Methode (BÜLTE und REUTER, 1985).

Immunologische Methoden finden auch in der Mikrobiologie des Lebensmittelbereiches Einsatz. Die Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes dient dem Nachweis spezieller Bakterien oder ihrer Enzyme. Anschließend werden Farbreaktionen photometrisch gemessen und die ursprünglich vorhandene Menge an Antigenen wird errechnet. GONZALEZ et al. (1996) setzten einen indirekten **enzyme-linked immunosorbent assay** (ELISA) mit polyklonalen Antikörpern gegen lebende Zellen eines *Ps. fluorescens*-Stammes ein, um *Ps. fluorescens* und verwandte psychrotrophe Bakterien in gekühltem Fleisch nachzuweisen. Die Nachweisgrenze des ELISA lag bei 10^4 bis 10^5 KbE/g. Der ELISA zum Nachweis von pathogenen Bakterien in Lebensmitteln ist nur nach deren Anreicherung (16-24 Stunden) möglich mit einem Grenzbereich von 10^3 bis 10^5 KbE/ml (DE BOER und BEUMER, 1999). Auf den Einsatz von genotypischen Methoden zum Nachweis von Bakterien wird im folgenden Kapitel eingegangen.

Tab. 10: Schnelle und automatisierte Methoden zur mikrobiologischen Analyse in der Fleischindustrie (nach OTERO et al., 1998)

<p>1. Quantitativer Nachweis</p> <p>1.1. Automatisierung der Probenaufbereitung, Plattentechnik und des Koloniezählverfahrens Automatische Pipettiergeräte Spiralplattentechnik Automatische Mikrokolonienzählung (Coulter Counter-Verfahren) Kommerzielle Systeme (Fertignährbodenplatten; Dip-Slides; Petrifilm) Membranfiltrations-Methoden (hydrophobic grid membrane filter-System, HGMF)</p> <p>1.2. Methoden, bei denen die Mikroorganismen in Flüssigmedien wachsen und auf einer Änderung der Leitfähigkeit sowie der Trübung beruhen (Ergebnis nach 4 bis 24 Stunden, abhängig von Keimgehalt und –gruppe) Impedanz- oder Konduktanz-Methode Turbidometrie</p> <p>1.3. Sehr schnelle Methoden (Ergebnis in weniger als 2 Stunden) Direkte Keimzählverfahren Fluoreszenzmikroskopie (Direkte Epifluoreszenz-Filter-Technik: DEFT) Flow Cytometry Indirekte Keimzählverfahren (Messung von Zellbestandteilen, Stoffwechselprodukten oder metabolischen Aktivitäten) p-Nitroanilin Test (Aminopeptidase-Test) Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) Biolumineszenz-Verfahren</p>
<p>2. Qualitativer Nachweis von Genera bzw. Spezies und/oder Toxinen</p> <p>2.1. Medien mit chromogenen oder fluorogenen Substraten (z.B. Rainbow-Agar O157 für Nachweis von <i>E. coli</i> O157:H7)</p> <p>2.2. Automatische auf phänotypischen Merkmalen beruhende Identifizierungskits (z.B. API, VITEK, Microscan, MIS)</p> <p>2.3. Immunologische Methoden (z.B. ELISA)</p> <p>2.4. Methoden, die auf DNA-Analysen basieren (PCR-Anwendungen)</p>

Besonders im humanmedizinischen Bereich werden zur Identifizierung pathogener Mikroorganismen **kommerzielle Identifizierungssysteme** eingesetzt, welche entweder auf phänotypischen oder genotypischen Merkmalen beruhen. Dazu gehören z.B. biochemische Profilanalysen (API, VITEK-System, MicroScan, WalkAway 40), die Analyse zellulärer Fettsäure-Profile (Sherlock, Microbial Identifications System = MIS), Verwertung von Kohlenstoff-Quellen (MicroLog), 16S-rRNA Gen Sequenzanalysen (MicroSeq). Da diese Systeme für den klinischen Bereich ausgerichtet sind, ist ihr Einsatz im Lebensmittelbereich nur bedingt möglich.

Die Eignung von automatischen mikrobiellen Identifikationssystemen für die Identifizierung von lebensmittelbedingten Pathogenen hängt nach ODUMERU et al. (1999) wesentlich von den verfügbaren Datenbanken des ausgewählten Systems ab.

2.2.3 Molekularbiologisch-genotypische Methoden

Neben der klassischen phänotypischen Mikrobiologie gewinnen molekularbiologische Verfahren für die Identifizierung und taxonomische Einordnung von Bakterien zunehmend an Bedeutung. Sie stellen z.B. Alternativen für phänotypische Techniken dar, wenn sich die Mikroorganismen nur schlecht anzüchten lassen, langsam wachsen, auf klassischem Weg schwer zu differenzieren sind, das Wachstum eine Gefahr für das Laborpersonal darstellt oder geeignete phänotypische Tests nicht zur Verfügung stehen (HARMSEN et al., 2001). Die Grundlage der genotypischen Methoden ist die genetisch festgelegte Information in Form von Nukleotidsequenzen. Analysen der DNA oder RNA werden sowohl zur Identifizierung als auch zur Aufklärung taxonomischer Verwandtschaften verwendet. Zum Einsatz kommen dabei die DNA-DNA-Hybridisierung, die Gensondentechnik sowie DNA-Homologiestudien nach erfolgter Sequenzierung bestimmter DNA-Abschnitte.

Die am besten entwickelte Methode zur Vervielfältigung eines Teils des Bakteriengenoms *in vitro* ist die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (MULLIS und FALOONA, 1987). Sie wird in der Lebensmittelmikrobiologie verstärkt bei der Identifikation und/oder teilweise bei dem direkten Nachweis von pathogenen Bakterien eingesetzt, ist aber zur Zeit nur für eine geringe Zahl von Mikroorganismen verfügbar (SCHEU et al., 1998) (Tab. 11).

Die wichtigsten Kriterien für den Einsatz von PCR-Systemen zum Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln sind die Spezifität und Sensitivität. Die Spezifität wird durch den Primer bestimmt, der möglichst nur zu einem Zielorganismus paßt. Für die Sensitivität spielt die Matrix, in der die DNA vorliegt, eine große Rolle, wobei reine Bakterienkulturen wesentlich sensitiver sind als komplexe Lebensmittelproben. In letzteren können Substanzen enthalten sein, welche z.B. Nukleinsäuren und/oder Primer zerstören können (RNase, DNase) oder die DNA-Polymerase hemmen, was

dann zu falsch-negativen Ergebnissen führt. Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen liegt in der Tatsache begründet, daß jede Nukleinsäuresequenz vervielfältigt wird, zu der der Primer paßt. So werden auch tote Mikroorganismen erfaßt. Ein selektiver Vermehrungsschritt der Zielorganismen vor der PCR kann dieses verhindern. Außerdem werden lebende Mikroorganismen durch die Verwendung von Antikörper-behafteten paramagnetischen "Kügelchen" (beads) selektiert.

Es gibt verschiedene Regionen des Genoms, welche als Ziel des Nachweises ausgewählt werden können. Zum einen können das die Regionen des Genoms sein, die bei pathogenen Mikroorganismen für die Kodierung von Toxinen verantwortlich sind (z.B. Verotoxine von verotoxinproduzierenden *E. coli*, Hämolyisin von *Listeria monocytogenes*), zum anderen Teilabschnitte der rRNA. Ribosomale RNA stellen Makromoleküle dar, welche in zellulären Organismen am weitesten verbreitet sind und von denen bestimmte Regionen im Verlauf der Evolution nicht verändert wurden, d.h. die hochkonserviert vorliegen. Andere Regionen der Nukleotidsäuresequenzen können auch bei nahe verwandten Taxa stark variieren. Aufgrund dieser Eigenschaften haben sich die 16S rRNA-Sequenzen als besonders geeignet für die Beurteilung von phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Bakterien herausgestellt (LUDWIG und SCHLEIFER, 1999). Darüber hinaus lassen sich mit ihnen auch diagnostische Fragestellungen beantworten (HARMSSEN, 2001).

Das Prinzip der **16S rDNA Sequenzanalyse** beruht zunächst auf der Vervielfältigung partieller Abschnitte der 16S rDNA mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Nach der Amplifikation erfolgt die Bestimmung der Basenfolge mit Hilfe eines Sequenzers. Computerprogramme ermöglichen dann den Vergleich der ermittelten Sequenz mit in Datenbanken abgelegten Sequenzen von Referenzstämmen, welche z.T. über das Internet frei zugänglich sind (NCBI: National Center for Biotechnology Information; RDP: Ribosomal Database Project; RIDOM: Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den DNA-Sequenzen kann eine Aussage zur DNA-Homologie und schließlich zum Verwandtschaftsgrad der geprüften Stämme gemacht werden.

Tab. 11: Beispiele von PCR-Systemen für den Nachweis von Bakterien im Lebensmittel Fleisch (nach SCHEU et al., 1998)

Bakterien	Probe	Gen-Region für Vervielfältigung	Nachweissystem	Nachweisgrenze	Literatur
<i>Brochothrix</i> spp.	Fleisch (Hühnchen)	variable Region der 16S rRNA	IMS (immunomagnetische Separation)	$>10^2$ KbE/g	GRANT et al. (1993)
<i>Carnobacterium</i> spp.	Fleisch	16S rRNA	Gel und Oligonukleotidproben (radioaktiv und nicht-radioaktiv)	$<10^1$ KbE/ml	BROOKS et al. (1992)
<i>Clostridium</i> spp.	ungekochtes und gekochtes Fleisch, Gemüsekonserven	Botulinum Neurotoxin-kodierende Gene	Gel, Southern Blot, Dioxigenin-markierte Probe	10^1 KbE/g nach 18 h Voranreicherung	FACH et al. (1995)
<i>E. coli</i> , Verotoxin-produzierend	Hackfleisch, rohe Hamburger	Gen für Verotoxin 1 und 2	IMS, Gel	1-6 Zellen/g	BAUMGARTNER und GRAND (1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> und andere <i>List.</i> spp.	Hackfleisch, Käse	LA1/LB1 polyklonale Antikörper gegen <i>List. monocytogenes</i>	Gel	2×10^3 KbE/g	MAKINO et al. (1995)
<i>List. monocytogenes</i>	Rinderhackfleisch, Milch, Eis	Sequenz des hyl-Gens (Hämolyisin)	Gel	10^2 Bakterien/ml Voranreicherungsbouillon	BOHNERT et al. (1992)
<i>Salmonella</i> spp.	Fleisch : Schwein, Rind, Huhn	IS 200 (25 Kopien/Genom)	Fluoreszenz-Nachweis in Mikrotiterplatten	1-10 KbE/Assay	CANO et al. (1993)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lebensmittel (Fleisch, Wasser)	yadA-Gen (Untereinheit eines Membranproteins)	IMS, nested PCR, Gel oder Mikrotiterplatte	2 KbE/g mit 10^7 Hintergrundflora nach Anreicherung über Nacht	KAPPERUD et al. (1993)

2.3 Mikrobiologische Normen und Kriterien für Hackfleisch

In Deutschland wurde für das aus hygienischer Sicht als risikoreiches Lebensmittel geltende Hackfleisch bereits im Jahr 1936 ein **Hackfleisch-Verordnung** (HFIV) erlassen. Die aktuelle Fassung enthält Vorschriften für das gewerbsmäßige Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Erzeugnissen aus zerkleinertem Fleisch von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren für die **lokale Vermarktung**, d.h. für den direkten Verkauf an den Endverbraucher. In ihr sind keine Vorschriften zur mikrobiologischen Kontrolle der Produkte enthalten.

Am 01.01.1992 trat die **Hackfleisch-Richtlinie** (HFI-RL) 88/657/EWG in Kraft, die am 15.03.1995 durch die Verordnung zur Änderung fleisch- und geflügelfleischhygienerechtlicher Vorschriften in das nationale Recht in Form der Anlage 2a der Fleischhygiene-Verordnung (FIHV, 1995) umgesetzt wurde. Diese Verordnung schrieb die regelmäßige mikrobiologische Überwachung in **EU-zugelassenen Betrieben** vor, die Hackfleisch, Fleisch in Stücken von weniger als 100 g und Fleischzubereitungen herstellten. Danach mußten diese Produkte täglich auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl und das Vorliegen von Salmonellen sowie zusätzlich einmal wöchentlich auf die Anzahl der "Kolibakterien", auf sulfitreduzierende Anaerobier und Staphylokokken untersucht werden. Eine aktualisierte Fassung dieser Richtlinie (94/65/EG) vom 14. Dezember 1994 zur "Festlegung von Vorschriften für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch/Faschiertem und Fleischzubereitungen" wurde in die Fleischhygiene-Verordnung vom 28. Juni 2001 als nationales Recht übertragen. Dabei wurde eine Reduzierung des bis dahin erforderlichen mikrobiologischen Untersuchungsprogrammes eingearbeitet, die in der Weglassung der Untersuchung der sulfitreduzierenden Clostridien bestand. Die gültige Fassung ist in Tab. 12. aufgeführt.

Im folgenden werden einige weitere Unterschiede zwischen den beiden bestehenden Rechtsnormen herausgestellt. Zur Herstellung von Hackfleisch darf nach HFIV Fleisch geschlachteter oder erlegter warmblütiger Tiere gelangen ohne Verwendung von Kopf-, Bein-, Stich- und Separatorenfleisch sowie Zwerchfell- und Bauchmuskulatur. Nach der HFI-RL darf frisches Fleisch von Rind, Schwein, Schaf, Ziege

und Einhufern und nach Untersuchung auf Cysticercose die Kau- und Zwerchfellmuskulatur sowie Bauchmuskulatur ohne Linea alba zur Verwendung gelangen. Hackfleisch und zubereitetes Hackfleisch aus Geflügelfleisch oder Wildfleisch dürfen nach der HFIV und HFI-RL nicht an Verbraucher abgegeben werden. Während sich in der HFIV kein Hinweis auf das Alter der zu verwendenden Muskulatur findet, ist nach HFI-RL nur frisches Fleisch im Sinne der EU-Richtlinie 64/433/EWG, also auch tiefgefrorenes aber nicht vorbehandeltes Fleisch, verwendbar. Werden die Hackfleischerzeugnisse unmittelbar nach ihrer Herstellung auf -18°C gefroren, so dürfen sie nach der HFIV bis 6 Monate gelagert werden. Ansonsten sind die Erzeugnisse bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ zu lagern und zu befördern und am Tage der Herstellung in den Verkehr zu bringen. Bei einer alsbaldigen Abgabe darf die Aufbewahrungstemperatur kurzfristig $+7^{\circ}\text{C}$ betragen. Wird das Hackfleisch jedoch in EU-zugelassenen Betrieben hergestellt, so muß zu jedem Zeitpunkt der Herstellung und Verteilung eine Temperatur von $+2^{\circ}\text{C}$ eingehalten werden. Bei frischen Hackfleischerzeugnissen ist das Verfallsdatum, bei tiefgekühlten Erzeugnissen das Mindesthaltbarkeitsdatum anzugeben. Die Aufsicht der Hackfleischherstellung obliegt nach HFIV (§10) sachkundigen Personen, zu denen z.B. Fleischermeister sowie Gesellen mit einer mindestens dreijährigen Tätigkeit in einem Betrieb mit Hackfleischherstellung gehören. Nach HFI-RL (Art. 7, Abs. 2) muß der Betriebsinhaber bzw. Geschäftsführer für ein adäquates Schulungsprogramm für das Personal zur Sicherung hygienischer Herstellungsbedingungen Rechnung tragen.

Aufgrund der unterschiedlichen rechtlichen Anforderungen für die Herstellung, Behandlung und für das Inverkehrbringen von Hackfleisch nach der "Hackfleisch-Verordnung" und für Hackfleisch, welches der "Fleischhygiene-Verordnung" unterliegt, ist eine höhere mikrobiologische Belastung für das erstere, nämlich das "handwerklich" hergestellte Hackfleisch, zu erwarten. HILDEBRAND et al. (2001) wiesen dieses auch für das Schweinehackfleisch nach, wobei der Grenzwert M der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl nach FIHV (2001) bei Hackfleisch aus Fleischereien in 18,8% aus Fleischabteilungen von Supermärkten in 47,2% der Proben überschritten wurde. Hackfleisch aus Betrieben mit EU-Zulassung war dagegen nur in 4,5% der Fälle zu beanstanden gewesen.

Im Zusammenhang mit mikrobiologischen Normen bei Lebensmitteln wurden Definitionen für folgende Begriffe (**Kriterien**) getroffen (SCHMIDT-LORENZ, 1974; LEISTNER, 1982; REUTER, 1984):

- **Standards:** sind lebensmittelrechtlich verankert in Gesetzen, Verordnungen und Verwaltungsvorschriften; legen maximal akzeptierte Zahl von Mikroorganismen fest.
- **Richtwerte** (Limits, Guidelines): sind lebensmittelrechtlich nicht verbindlich; geben Orientierungshilfe für Lebensmittelhersteller und –überwachung, welches produktspezifische Mikroorganismenspektrum zu erwarten ist und welche Keimgehalte bei Einhaltung der GMP (Good Manufacturing Practice) akzeptabel sind.
- **Spezifikationen:** sind vertragliche Vereinbarungen zwischen Lieferanten und Abnehmern über akzeptable Keimgehalte.

Weitere gebräuchliche Definitionen (GRÄF et al., 1988, BAUMGART, 2001):

- **Warnwerte:** geben Mikroorganismengehalte an, deren Überschreitung einen Hinweis darauf gibt, daß die Prinzipien einer guten Hygienepraxis verletzt wurden und zudem eine Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers nicht auszuschließen ist. Die amtliche Lebensmittelüberwachung ergreift bei Überschreitung des Warnwertes unter Wahrung der Verhältnismäßigkeit die erforderlichen lebensmittelrechtlichen Maßnahmen.
- **Grenzwerte:** definieren die Menge an Mikroorganismen, bei deren Überschreitung ein Produkt gesundheitsgefährdend, verdorben oder unbrauchbar ist.

In den Normen zur mikrobiologischen Kontrolle von Hackfleisch, welches in EU-zugelassenen Betrieben hergestellt wird (Anlage 2a FIHV, RL 94/65/EG), gelten die Anforderungen, die in Tab. 12 aufgeführt sind.

Tab. 12: Mikrobiologische Kriterien für Hackfleisch (Anlage 2a FIHV, 2001)

Keimart/ Keimgruppe	n	c	m	M
Aerober Keimgehalt (+30°C)	5	2	5x10 ⁵ /g	5x10 ⁶ /g
"Kolibakterien"	5	2	50/g	5x10 ² /g
Salmonellen	5	0	nicht feststellbar in 10g	
Koagulasepositive Staphylokokken	5	1	10 ² /g	5x10 ³ /g

n = Zahl der Proben einer Partie (= Charge)

c = Zahl der Proben einer Partie, die Werte zwischen **m** und **M** aufweisen dürfen.

m = Richtwert, bis zu dem alle Ergebnisse als zufriedenstellend anzusehen sind.

Toleranz für Richtwertüberschreitung bei Keimzählung in festen Medien um das Dreifache des Tabellenwertes, bei flüssigen Medien um das Zehnfache.

M = Grenzwert, der von keiner Probe überschritten werden darf; darüber liegende Ergebnisse gelten als nicht zufriedenstellend. Dabei gilt folgendes:

M = 10m bei Zählung in festen Medien (entspricht Tabellenwert);

M = 30m bei Keimzählung in flüssigen Medien (entspricht dem Dreifachen des Tabellenwertes).

Die Bewertung der Ergebnisse des aeroben Keimgehaltes (+30°C), des Gehaltes an *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* erfolgt nach einem **Drei-Klassen-Schema**:

- eine Klasse bis zum Richtwert **m**
- eine Klasse zwischen dem Richtwert **m** und dem Grenzwert **M**
- eine Klasse über dem Grenzwert **M**.

Die Qualität der Charge gilt als

- **zufriedenstellend**: kein Wert überschreitet Richtwert **m**,
- **annehmbar**: nicht mehr als die vorgegebene Zahl **c** der Proben liegt zwischen **m** und **M** und keine Probe überschreitet Grenzwert **M**,

- **nicht zufriedenstellend:** Grenzwert **M** oder Anzahl **c** zwischen **m** und **M** wird überschritten,
- **gesundheitlich** bedenklich oder verdorben: Keimgehalt von $10^3 \times m$ wird erreicht oder überschritten. Der Gehalt an *Staphylococcus aureus* darf zu keinem Zeitpunkt den Wert von $5 \times 10^4/g$ überschreiten.

Für die Salmonellen ist ein **Zwei-Klassen-Schema** zugrunde gelegt, d.h. keine ($c=0$) der Proben darf positiv ausfallen.

Erste Erfahrungen über die amtlich vorgeschriebenen, umfangreichen Untersuchungsprogramme für Hackfleisch sind in der Literatur zu finden. SCHALCH et al. (1996) berichteten über die unterschiedlichen mikrobiologischen Anforderungen zwischen der alten Hackfleisch-Richtlinie 88/657/EWG und der EU-Richtlinie 94/65/EG. Sie stellen fest, daß eine Reduzierung des mikrobiologischen Prüfprogrammes keine wesentlich anderen Ergebnisse brachte. Während 75,8% von 145 Chargen die Anforderungen der alten Richtlinie erfüllten, waren es bei den Chargen nach den Kriterien der HFI-RL 94/65/EG 77,9%, also lediglich 2,1% mehr. KLEIN und LOUWERS (1994) sahen die tägliche mikrobiologische Kontrolle in der vorgeschriebenen Form nach EU-Richtlinie als sinnvoll an, da die Ergebnisse abweichende Chargen aufzuspüren vermochten. Dadurch konnte die betriebliche Eigenkontrolle und der hygienische Standard der Produkte gefördert werden. GERHARDT und HILDEBRANDT (1997) beklagten den immensen Untersuchungs- und Kostenaufwand. Nach ihrer Meinung bestand bei diesem Untersuchungsvorgehen für Hackfleisch kein angemessener Regelkreis zwischen Produktbeschaffenheit und Qualitätssicherungsmaßnahmen. Sie kamen zur Empfehlung, daß eine Probenreduzierung auf Sammelproben und damit eine wesentliche Senkung der Kosten und des Aufwandes für die mikrobiologische Hackfleischkontrolle vertretbar wäre. Nach wie vor gelten aber die ungeänderten EU-Vorschriften, niedergelegt in der Anlage 2a der FIHV (2001).