

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

Das Probenmaterial bestand aus "industriell" hergestelltem Hackfleisch, das in einem Berliner Zerlegebetrieb, der sich routinemäßig mit besonderer EU-Zulassung darauf spezialisiert hatte, gewonnen wurde. Die Untersuchung erfolgte vom 26.07.1996 bis zum 31.01.1997. In diesem Zeitraum bezog der Betrieb sein Rindfleisch und Schweinefleisch von 23 verschiedenen Lieferanten aus unterschiedlichsten Regionen Deutschlands (Abb. 2). Es wurden von der jeweils produzierten Hackfleischcharge während der Produktion fünf Proben genommen. Die Proben wurden vom Hersteller in Polystyrolschalen mit sauerstoffdurchlässiger Kunststoffolie verpackt. Das Hackfleisch wurde unmittelbar 1 bis 4 Stunden nach der Herstellung mikrobiologisch untersucht. Bis zur Untersuchung wurde eine Temperatur von $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten. Insgesamt wurden 35 Hackfleischchargen (175 Proben) analysiert. Davon bestanden 10 Chargen aus "Schabefleisch" (50 Proben), 8 Chargen aus "Rindergehacktem" (40 Proben), 8 Chargen aus "Schweinegehacktem" (40 Proben) und 9 Chargen aus "Gemischtem Hackfleisch" (45 Proben). Beim "Schabefleisch" handelt es sich um sehnen- und fettgewebsarmes Rindfleisch, bei "Rindergehacktem" um grob entsehntes Rindfleisch, bei "Schweinegehacktem" um grob entfettetes Schweinefleisch und bei "Gemischtem Hackfleisch" um grob entsehntes Rind- und grob entfettetes Schweinefleisch (DEUTSCHES LEBENS-MITTELBUCH, 1994).

3.1.2 Teststämme

3.1.2.1 Referenz- und Wildstämme

In Tab. 13 sind die für die Untersuchungen verwendeten Referenz- und Wildstämme zusammengestellt. Die Tabelle gibt Auskunft über die Herkunft der Stämme, die Art

des Probenmaterials, aus dem sie isoliert worden waren, und den Zeitpunkt, zu dem sie in die Kultursammlung des Institutes für Fleischhygiene und -technologie aufgenommen worden waren. Es wurden dabei Stämme ausgewählt, die nach Hinweisen in der Literatur (REUTER, 1972a; GILL und NEWTON, 1978; NORTJE et al., 1990b; COUSIN et al., 1992; KRAFT, 1992) als psychrotrophe Bakterien der Fleischmikroflora ein Rolle spielen können.

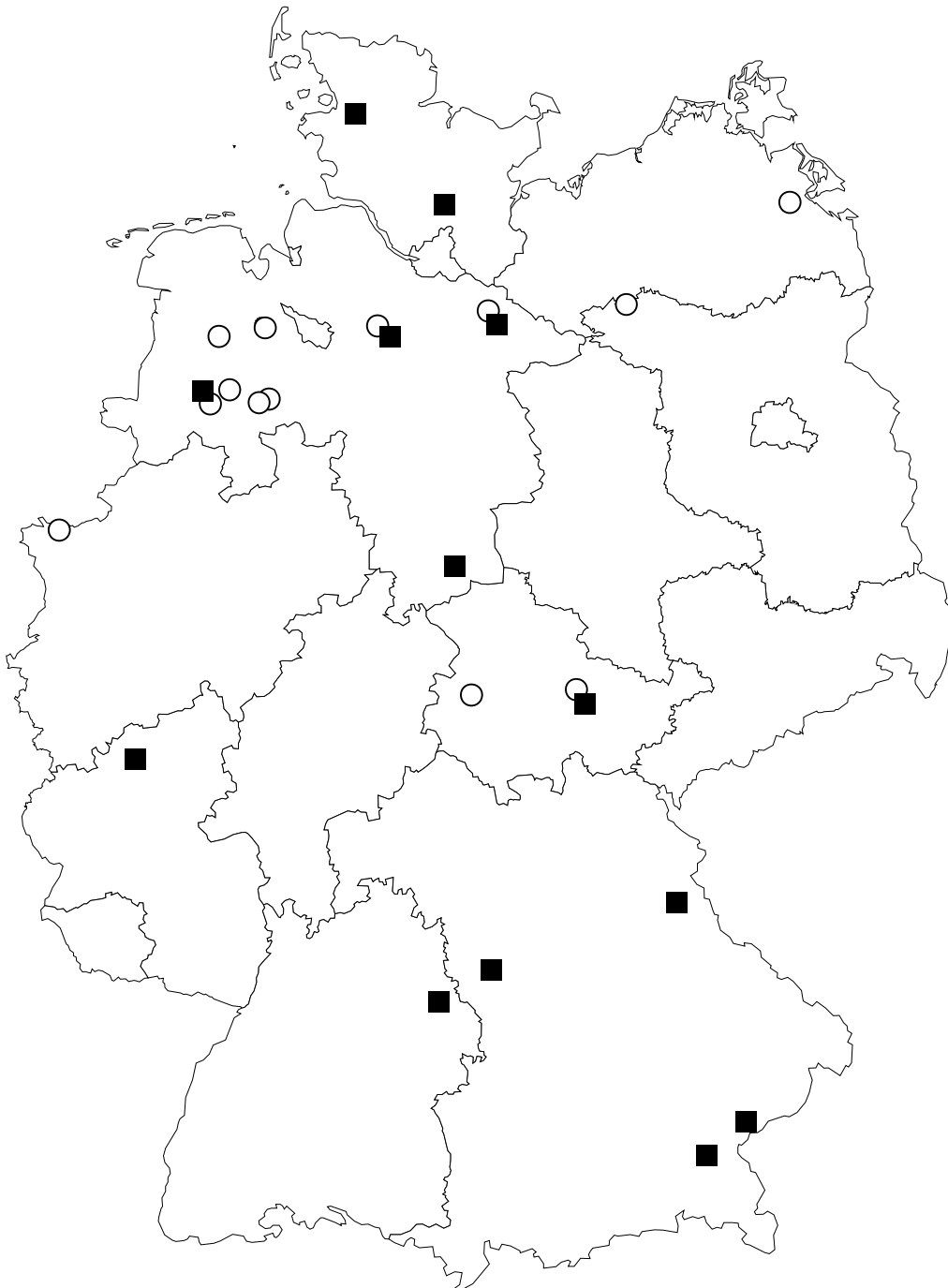


Abb. 2: Einzugsgebiet des Berliner Zerlegebetriebes, Lieferanten für die Hackfleischproduktion im Zeitraum vom 26.07.1996 bis 31.01.1997.

■ : Rindfleischlieferanten, n=13

○ : Schweinefleischlieferanten, n=13

Tab. 13: Untersuchte Referenz- und Wildstämme (Speziesdeklaration laut Herkunft)

GRAM-POSITIVE STÄMME

Spezies	Stamm	Herkunft	isoliert aus	Aufnahme
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	ATCC 11509 ^T	ATCC	Schweine- fleischsauce, SULZBACHER	09/1995
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	1a	institutseigene Sammlung	Fleischisolat	03/1983
<i>Kurthia gibsonii</i>	DSM 20636 ^T	DSMZ	Fleisch, KEDDIE	06/1999
<i>Kurthia zopfii</i>	DSM 20580 ^T	DSMZ	unbekannt, BARNES	06/1999
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 20600 ^T	DSMZ	Kaninchen, MURRAY	06/1999
<i>Listeria monocytogenes</i>	691	BgVV	unbekannt	10/1997
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	CCUG 31333	CCUG	Milch, TROILI- PETERSSON 1903	02/1994
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	DSM 20017 ^T	DSMZ	Starterkultur für Reiswein	12/1988
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	CCUG 32077	CCUG	Blut, Mensch	02/1994
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	DSM 20241	DSMZ	unbekannt, DE MOSS	11/1988

Fortsetzung Tab. 13:

GRAM-NEGATIVE STÄMME

Spezies	Stamm	Herkunft	isoliert aus	Aufnahme
I. Familie Aeromonadaceae				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM 30187 ^T	DSMZ	Milch,	03/1996
ssp. <i>hydrophila</i>			SPECK	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	LRA 330.07.76	bio Merieux	unbekannt	08/1994
II. strikt aerob wachsende Oxidase-positive bewegliche Stäbchen				
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	DSM 30026 ^T	DSMZ	Boden,	06/1999
ssp. <i>denitrificans</i> ¹			FREDRICH	
<i>Alcaligenes faecalis</i> ssp.	DSM 30030 ^T	DSMZ	unbekannt,	04/1997
<i>faecalis</i>			CONN	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	17	institutseigene Sammlung	Isolat REUTER	03/1967
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50090 ^T	DSMZ	„Pre-filter tanks“,	10/1995
Biovar I			RHODES	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50091	DSMZ	Leitungswasser	07/1983
Biovar I				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DSM 50117	DSMZ	Hühnerei	07/1983
Biovar III				
<i>Pseudomonas fragi</i>	DSM 3456 ^T	DSMZ	unbekannt,	08/1995
			EICHHOLZ 1902	
<i>Pseudomonas lundensis</i>	CCUG 18757 ^T	CCUG	Rindfleisch,	02/1996
			TERNSTRÖM 1980	
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 291 ^T	DSMZ	unbekannt,	10/1995
Biovar A			HEGEMANN	
<i>Pseudomonas putida</i>	DSM 50222	DSMZ	unbekannt,	07/1983
Biovar B			WALKER	
<i>Pseudomonas putida</i>	Ps 79	BAFF Kulmbach	Rindfleisch	07/1994
<i>Shewanella putrefaciens</i>	DSM 50426	DSMZ	Butter,	03/1996
			HAMMER	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Sw 1	BAFF Kulmbach	Rindfleisch	07/1994

¹: früher: *Alcaligenes denitrificans*

Fortsetzung Tab. 13:

GRAM-NEGATIVE STÄMME

Spezies	Stamm	Herkunft	isoliert aus	Aufnahme
III. Familie Moraxellaceae				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	CCUG 19095 ^T	CCUG	Boden, BEIJERINCK 1910	02/1996
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	CCUG 888 ^T	CCUG	Speichel, STENZEL 1962	02/1996
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	CCUG 12804 ^T	CCUG	Dünndarm, Mensch, MANNHEIM 1964	02/1996
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	CCUG 33984 ^T	CCUG	unbekannt, LWOFF 1939	02/1996
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	Psy 14	BAFF Kulmbach	Wurstware	07/1994
<i>Psychrobacter immobilis</i>	CCUG 9708 ^T	CCUG	Geflügelschlachtkörper, THORNLEY	02/1996
<i>Psychrobacter immobilis</i>	LMG 1125	LMG	unbekannt, SCOTT 1957	01/1995
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	CCUG 351 ^T	CCUG	Blut, Mensch, KING	02/1996
IV. Familie Enterobacteriaceae				
<i>Citrobacter freundii</i>	Ci 26	BAFF Kulmbach	Rohschinken	02/1996
<i>Citrobacter freundii</i>	221/91	BgVV	Hähnchen, gefroren	10/1993
<i>Citrobacter freundii</i>	295/92	BgVV	Schweineblut	10/1993
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30053 ^T	DSMZ	Speichel	03/1996
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1385/86	BgVV	Masthuhn	10/1993
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1404/86	BgVV	Masthuhn	10/1993
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054 ^T	DSMZ	Spinalflüssigkeit, JORDAN 1890	03/1996
<i>Enterobacter cloacae</i>	En 70	BAFF Kulmbach	Rohschinken	02/1996
<i>Enterobacter cloacae</i>	2341/90	BgVV	unbekannt	10/1993
<i>Enterobacter hafniae</i>	En 68	BAFF Kulmbach	Rohschinken	02/1996

Fortsetzung Tab. 13:

GRAM-NEGATIVE STÄMME

Spezies	Stamm	Herkunft	isoliert aus	Aufnahme
Fortsetzung Familie <i>Enterobacteriaceae</i>				
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	En 72	BAFF Kulmbach	Rohschinken	02/1996
<i>Enterobacter liquefaciens</i>	522/90	BgVV	Kalb, Kot	10/1993
<i>Hafnia alvei</i>	DSM 30163 ^T	DSMZ	unbekannt, STUART	03/1996
<i>Hafnia alvei</i>	321/623	BgVV	unbekannt	10/1993
<i>Hafnia alvei</i>	1624/ 92	BgVV	Seefisch	10/1993
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>pneumoniae</i>	DSM 4799	DSMZ	unbekannt, SCHNEIDER	03/1996
<i>Klebsiella oxytoca</i>	KI 31	BAFF Kulmbach	Hackfleisch	02/1996
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 14153	InstHygBAMi	unbekannt	06/1983
<i>Proteus mirabilis</i>	Pr 13	BAFF Kulmbach	Schinkenfleisch	02/1996
<i>Proteus vulgaris</i>	Pr 14	BAFF Kulmbach	Rohschinken	02/1996
<i>Serratia marcescens</i>	DSM 30121 ^T	DSMZ	Teichwasser, KOCUR	03/1996
<i>Serratia marcescens</i>	BR 2122/93	BgVV	unbekannt	10/1993
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSM 4780 ^T	DSMZ	„Glanders-like infection of face“	04/1997

^T : Typstamm; ¹: früher: *Alcaligenes denitrificans*; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA; BAFF: Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, Bundesrepublik Deutschland; bio Merieux: bio Merieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Bundesrepublik Deutschland; BgVV: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin, Bundesrepublik Deutschland; CCUG: Culture Collection University Göteborg, Schweden; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland; InstHygBAMi: Institut für Hygiene der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel; LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgien

Die Typ- und Referenzstämmen stammten aus den Kultursammlungen der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), der CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Schweden, Kurator Falsen), der DSMZ (Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland) und des LMG (Laboratorium voor Microbiologie, Gent, Belgien). Des weiteren wurden Wildstämme einbezogen, welche von der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach (BAFF, Hechelmann) und dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) zur Verfügung gestellt wurden.

3.1.2.2 Isolierte Stämme

Im Untersuchungszeitraum wurden insgesamt 419 Bakterienstämme isoliert, 105 von diesen (SF 1-105) stammen aus 50 Proben Schabefleisch, 103 Stämme (RG 1-103) aus 40 Proben Rindergehacktem, 102 Stämme (SG 1-102) aus 40 Proben Schweinegehacktem und 109 Stämme (RS 1-109) aus 45 Proben Gemischtem Hackfleisch.

3.1.3 Nährmedien, Substrate und Reagenzien für die Klassische Mikrobiologie

3.1.3.1 Stammanzucht und Stammhaltung

Die **Stammanzucht** der lyophilisiert vorliegenden Referenz- und Wildstämme und der isolierten Stämme aus Hackfleisch erfolgte auf Plate-Count-Agar (PCA, Firma, Fa., Merck, 5463) und Humanblutagar. Die Bebrütung wurde im Brutschrank (Kühlbrutschrank BK 600, Fa. Heraeus) bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ für 48 h unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Humanblutagar:

Blutagar-Basis (Fa. Oxoid, CM 55)	40 g
Aqua demin.	1000 ml
pH $7,3\pm 0,2$	

Nach dem Autoklavieren für 15 Minuten bei 121°C und Abkühlen im Wasserbad auf $+50^\circ\text{C}$ wurde dem Medium 50 ml defibriniertes Humanblut (abgelaufene Humanblutkonserven) zugesetzt, so daß dieses in einer Endkonzentration von 5% vorlag.

Zur **Stammhaltung** wurden die Stämme zuerst in einer Bouillon angezüchtet:

ISO-Bouillon:

Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	15,0 g
Fleischextrakt, trocken (Fa. Merck, 3979)	3,0 g
Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 3753)	5,0 g
D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074)	1,0 g
Aqua demin.	1000 ml
pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,1$	

Anschließend wurde der dicht bewachsenen Bouillon (Bebrütung 2 bis 4 Tage bei $+25^{\circ}\text{C}$) Glycerol (Fa. Roth, 7530) zugesetzt, so daß es in einer Endkonzentration von etwa 20% vorlag. Als Aufbewahrungsgefäße dienten 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße. Diese wurden im Gefrierschrank (Arctis Jumbo 2200 GS, Fa. AEG) bei $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ gelagert. Außerdem erfolgte die Stammhaltung auf Schrägagar im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 bis 6°C .

Schrägagar:

Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224)	3,45 g
Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	3,45 g
Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400)	5,0 g
Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8)	13,0 g
Aqua demin.	1000 ml

3.1.3.2 Probenaufbereitung

Für die Aufbereitung des Hackfleisches als Probenmaterial wurden folgende Medien verwendet:

Pepton-Kochsalz-Lösung zur Herstellung der Erst- und Dezimalverdünnung:

Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	1,0 g
Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400)	8,5 g
Aqua demin.	1000 ml

Plate-Count-Agar (Fa. Merck, 5463) zur Bestimmung der aeroben Keimzahl bei $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.1.3.3 Selektivnährmedien

Violet Red Bile Glukose Agar (VG, Fa. Oxoid, CM 485) zur selektiven Anzucht der Enterobakteriazeen.

Zur Herstellung eines anaeroben Milieus wurden Anaerobiertöpfe (Fa. BBL) mit „Anaerocult A“ (Fa. Merck, 113829) benutzt.

Als Pseudomonaden-Selektivagar wurde der „Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin-Agar“ (CFC) (MEAD und ADAMS, 1977) verwendet:

Pseudomonas-Agar-Basis:

Gelatinepepton (Fa. Merck, 7284)	16,0 g
Casein-Hydrolysat (Fa. Merck, 2239)	10,0 g
Kaliumsulfat (Fa. Merck, 5153)	10,0 g
Magnesiumchlorid (Fa. Merck, 5833)	1,4 g
Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8)	20,0 g
Aqua demin.	1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,1 \pm 0,2$

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen im Wasserbad auf $+50^{\circ}\text{C}$ wird der Inhalt eines Röhrchens Pseudomonas-CFC-Selektivsupplement (Fa. Oxoid, SR103), welches in 2 ml einer Mischung aus Ethanol (Fa. Roth, 9065) und sterilem Aqua demin. (1:1) gelöst wurde, zu 500 ml steriler Pseudomonas-Agar-Basis gegeben, gut gemischt und in Platten gegossen.

Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP-Agar, Fa. Merck, 230) (KIELWEIN, 1969) diente zudem als *Pseudomonas-Aeromonas*-Selektivagar. Dem Nährboden mußte nach dem Autoklavieren und Abkühlen im Wasserbad auf $+50^{\circ}\text{C}$ 100.000 I.E./l Penicillin-G Natriumsalz (Fa. Sigma, PEN-NA) zugegeben werden.

Streptomycin-Inosit-Neutralrot-Agar (SIN, SCHILLINGER und LÜCKE, 1986):

Blut-Agar Basis (Fa. Merck, 10886)	40 g
Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 3753)	2,0 g
Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101)	1,0 g
Magnesiumsulfat (Fa. Merck, 6067)	0,8 g
Natriumcarbonat (Fa. Merck, 6398)	0,35 g

myo-Inosit (Fa. Merck, 4728)	10,0 g
Aqua demin.	1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,1$

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf $+50^{\circ}\text{C}$ werden 500 mg/l Streptomycinsulfat (Sigma, S-6501) zugesetzt, das mit Hilfe eines Einmal-Filters (Fa. Roth, C450.1) sterilfiltriert worden ist.

Der Lactobacillus-Agar nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE (MRS-Agar) (1960) (Fa. Biotest, 953127005) mit Zusatz von Sorbinsäure (Fa. Roth, 7158) in einer Konzentration von 0,14% (MRS-S-Agar; REUTER, 1985), pH-Wert 5,7, diente zur Identifizierung von Milchsäurebakterien mit Ausnahme der Spezies des Genus *Carnobacterium*, welche auf diesem Nährboden nur schwach oder gar nicht wachsen.

MacConkey-Nährboden (MacCo, Fa. Oxoid, CM7)

3.1.3.4 Physiologische und biochemische Prüfung

Zur pyhsiologischen und biochemischen Prüfung wurden folgende Substrate und Nährmedien verwendet:

1. Gramfärbungs-Set (Fa. Difco, 3338-32)
2. Oxidase-Reagenz (Fa. Becton Dickinson, 4361181)
3. Katalase-Reagenz (3%ige H_2O_2 -Lösung; angesetzt aus einer 30%igen H_2O_2 -Lösung, Fa. Merck, 8597), verwendbar 10 Tage bei kühler Aufbewahrung unter Lichtausschluß
4. Physiologische Kochsalzlösung (physiolog. NaCl)

- Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400)	8,5 g
- Aqua demin.	1000 ml
5. Oxidation-Fermentation(OF)-Testnährboden mit Glukose nach HUGH und LEIFSON (1953) und anderen Reaktionskörpern:

- Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	2,0 g
- Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 3753)	1,0 g
- Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400)	5,0 g
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101)	0,2 g

- Bromthymolblau (Fa. Aldrich, 11,442-1) 0,08 g
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8) 2,5 g
- Aqua demin. 1000 ml

Reaktionskörper 10,0 g (Endkonzentration 1%ig):

- L(+)-Arabinose (Fa. Aldrich, A 9,190-6)
- D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074)
- myo-Inosit (Fa. Merck, 4728)
- Laktose-Monohydrat (Fa. Merck, 7657)
- Maltose-Monohydrat (Fa. Merck, 5910)
- D(-)-Mannit (Fa. Merck, 5982)
- Raffinose-Pentahydrat (Fa. Merck, 7549)
- D(-)-Ribose (Fa. Merck, 7605)
- L(+)-Rhamnose (Fa. Merck, 4736)
- D(-)-Sorbit (Fa. Merck, 7758)

pH-Wert des Mediums $7,1 \pm 0,1$

- dickflüssiges Paraffin (Fa. Merck, 7160) zum Überschichten der Röhren zur Fermentationsprüfung

6. Verwertung von Aminosäuren mit Hilfe der Arginindehydrogenase (ADH), Lysin-decarboxylase (LDC) und Ornithindecaboxylase (ODC) (FALKOW, 1958):

- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224) 5,0 g
- Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 3753) 3,0 g
- D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074) 1,0 g
- Bromkresolpurpur (Fa. Merck, 3025) 0,02 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $6,7 \pm 0,1$

Die Aminosäuren L(+)-Lysin-hydrochlorid (Fa. Sigma, L-5626), L-Arginin-hydrochlorid (Fa. Merck, 1543), L-Ornithin-hydrochlorid (Fa. Merck, 6906) wurden dem Basalmedium zugegeben, so daß sie in einer Endkonzentration von 0,5% vorlagen.

- dickflüssiges Paraffin (Fa. Merck, 7160) zum Überschichten der Röhren

7. Nutzbarmachung von verschiedenen Substanzen als einzige Kohlenstoffquelle (MOLIN UND TERNSTRÖM, 1982)

- Di-Natriumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 6559) 3,0 g

- Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, 4871)	2,3 g
- Ammoniumchlorid (Fa. Merck, 1145)	1,0 g
- Magnesiumsulfat (Fa. Merck, 6067)	0,5 g
- Calciumchlorid (Fa. Merck, 2820)	0,005 g
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8)	10,0 g
- Aqua demin.	1000 ml

pH-Wert des Mediums $6,8 \pm 0,1$

Alle als Kohlenstoffquelle dienenden Substanzen wurden sterilfiltriert zugegeben, so daß sie in einer Endkonzentration von 0,13% vorlagen.

D(-)-Fruktose (Fa. Merck, 5321)

D(+)-Xylose (Fa. Merck, 8689)

8. Schwefelwasserstoff-Indol-Motilitäts-Nährboden (SIM):

- Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	20,0 g
- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224)	6,6 g
- Ammoniumeisen(III)citrat (Fa. Merck, 3761)	0,2 g
- Natriumthiosulfat (Fa. Merck 6512)	0,2 g
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8)	3,0 g
- Aqua demin.	1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,3 \pm 0,1$

Kovács-Reagenz (Fa. Merck, 9293) zum Nachweis der Indolreaktion

9. Gelatinase-Test:

- Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213)	3,45 g
- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224)	3,45 g
- Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400)	5,0 g
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8)	13,0 g
- Aqua demin.	1000 ml
- Gelatine, gepulvert (Fa. Merck, 4078)	135 g

pH-Wert des Mediums 7,6-7,8

10. Methylrot-Reaktion (MR) (CLARK und LUBS, 1915):

- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224)	7,0 g
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101)	5,0 g
- D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074)	5,0 g
- Aqua demin.	1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,5 \pm 0,1$

Indikator-Lösung:

- Methylrot (Fa. Merck, 6076) 0,1 g
- 96%iger Ethylalkohol (Fa. Merck, 0971) 300 ml
- Aqua demin. 200 ml

11. Voges-Proskauer-Bouillon (VP) (VOGES und PROSKAUER, 1898):

- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224) 7,0 g
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101) 5,0 g
- D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074) 5,0 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $6,9 \pm 0,1$

Testreagenzien:

- Barritt-Reagenz: 5 g Naphthol-(1) (Fa. Merck, 6223) in 100 ml Ethanol lösen
- 40%ige Kalilauge: 40 g Kaliumhydroxid-Plätzchen (Fa. Merck, 5021) in 100 ml Aqua demin. lösen

12. Urease-(Harnstoffabbau-)Reaktion (Ur) nach CHRISTENSEN (1946):

- Pepton aus Fleisch (Fa. Merck, 7224) 1,0 g
- Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400) 5,0 g
- D(+)-Glukose-Monohydrat (Fa. Merck, 4074) 1,0 g
- Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, 4871) 2,0 g
- Phenolrot (Fa. Merck, 7241)
(0,2%ige Lösung in 50% Ethylalkohol) 6,0 ml
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8) 15,0 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $6,8 \pm 0,1$

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen im Wasserbad auf $+50^{\circ}\text{C}$ wurden 100 ml einer 20%igen Harnstofflösung (Fa. Merck, 8488) sterilfiltriert zugegeben. Es wurden Schrägröhrchen hergestellt.

13. Phenylalanindeaminase (PAD)-Reaktion (EWING et al., 1957):

- Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 7224) 3,0 g
- L-Phenylalanin (Fa. Merck, 7256) 1,0 g
- Di-Natriumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 6586) 1,0 g

- Natriumchlorid (Fa. Merck, 6400) 5,0 g
- Agar Nr. 3 (Fa. Oxoid, L 13) 12,0 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,4 \pm 0,1$

Reagenz: 10%ige Eisen(III)chlorid-Lösung (Fa. Merck, 3945)

14. Glukonat-Oxidations-Test (GB) (SHAW und CLARKE, 1955):

- Pepton aus Casein (Fa. Merck, 7213) 1,5 g
- Hefeextrakt, granuliert (Fa. Merck, 3753) 1,0 g
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101) 1,0 g
- Kaliumgluconat (Fa. Sigma, G-4500) 40,0 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,1$

Benedict's-Lösung:

- Tri-Natriumcitrat (Fa. Merck, 11037) 17,3 g
- Natriumcarbonat (Fa. Merck, 6398) 10,0 g
- Kupfersulfat-Heptahydrat (Fa. Merck, 2790) 1,73 g
- Aqua demin. 1000 ml

15. Fluoreszenz-Beweglichkeit-Nitrat(FBN)-Agar:

- Proteose Pepton Nr. 3 (Fa. Difco, O122-17) 10,0 g
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Fa. Merck, 5886) 1,5 g
- Di-Kaliumhydrogenphosphat (Fa. Merck, 5101) 1,5 g
- Kaliumnitrat (Fa. Merck, 5063) 1,5 g
- Agar-Agar (Fa. Aldrich, 28289-8) 1,5 g
- Aqua demin. 1000 ml

pH-Wert des Mediums $7,2 \pm 0,1$

- Griess-Ilosvay-Reagenz (Fa. Merck, 9023)

- Zinkstaub (Fa. Merck, 8774)

16. Simmons-Citrat-Nährboden (Cit, Fa. Merck, 2501) (SIMMONS, 1926):

pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,1$

17. Desoxyribonuklease-Testagar (DNase) (Fa. Merck, 449)

18. Caseinolysetest (Cas):

Nach der Herstellung einer doppelt-konzentrierten Nähragarlösung (Standard I, Fa. Merck, 7881) wurde diese bei 121°C für 5 min

autoklaviert. Eine 10%ige mit Magermilchpulver (Fa. Merck, 115363) hergestellte wässrige Lösung wurde bei 121°C für 5 min autoklaviert.

Nach dem Abkühlen beider Lösungen im Wasserbad auf +50°C erfolgte anschließend das Mischen von 500 ml Nähragarlösung mit 250 ml Magermilchlösung und das Gießen der Platten.

pH-Wert des Mediums 7,4±0,1

19. Lezithinasetest (Lez, Eigelbreaktion):

- Lebensmittelkeimzahlagar (Fa. Merck, 231) 900 ml

pH-Wert 6,8±0,1

- Eigelbsuspension: Eigelb (aus Hühnerei selbst gewonnen)

+ physiologische NaCl 1:1 100 ml

3.1.4 Arbeitsgeräte und sonstiges Material für die klassische Mikrobiologie

Arbeitsgeräte und Material für die Probenaufbereitung:

1. pH-Meter zur pH-Wert- und Temperaturmessung: CG 804 (Fa. Schott)
2. Tischwaage: Typ L2200 S-D (Fa. Satorius)
3. Stomacher-Filterbeutel: BagPage (Fa. neoLab, 20001381)
4. Stomacher: Stomacher 400 (Fa. Kleinfeld Labortechnik)
5. Reagenzröhrchen: Duran-Reagenzröhrchen (Fa. Schott Glaswerke, 261312107)
6. Pipetten: 1-10 ml (Fa. Brand)
7. mechanisches Schüttelgerät: IKA Vibrofix VF1 (Fa. Schmid, 44A2100)
8. Kühlbrutschrank: BK 600 (Fa. Heraeus)

Arbeitsgeräte und Material für die physiologische und biochemische Prüfung

1. Reagenzröhrchen: Duran-Reagenzröhrchen (Fa. Schott Glaswerke, 261312107)
2. Pipetten: 1-10 ml (Fa. Brand)
3. Objektträger (Fa. Menzel-Gläser, 011101)
4. Mikroskop: Dialux 20 (Fa. Leitz)
5. Hohlschliffobjektträger (Fa. Roth, H884.1)
6. Vaseline nach DAB 10 (Fa. Roth, E746.1)
7. Filterpapier (Fa. Schleicher und Schüll, 12)
8. mechanisches Schüttelgerät: IKA Vibrofix VF1 (Fa. Schmid, 44A2100)

9. Zentrifuge: Megafuge 1.0 (Fa. Heraeus)
10. Kühlbrutschrank: BK 600 (Fa. Heraeus)
11. Wasserbad: Umwälz/Bad-Thermostat „Kälte“ D8-V (Fa. Haahl Mess-Technik)

3.1.5 Materialien und Arbeitsgeräte zur molekularbiologischen Spezies-identifizierung von den *Acinetobacter*-Stämmen

Die Sequenzanalyse eines partiellen hochvariablen 16S rDNA-Abschnittes der *Acinetobacter*-Isolate wurde im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg von der Arbeitsgruppe HARMSEN durchgeführt. Sämtliche Reagenzien, Lösungen und weitere Materialien wurden dort zur Verfügung gestellt und verwendet.

Zur DNA-Aufbereitung im eigenen Haus fanden folgende Materialien Anwendung:

1. Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, 0030120.086)
2. verschiedene Pipetten mit verstellbarem Volumenbereich (Fa. Eppendorf)
3. Pipettenspitzen: 100-1000 µl (Fa. Eppendorf, 0030015.002)
4. mechanisches Schüttelgerät: IKA Vibrio Fix VF1 (Fa. Schmid, 444A21000)
5. Tischzentrifuge: Zentrifuge 5415 C (Fa. Eppendorf, 541526315)
6. Blockthermostat BT 200 (Fa. Kleinfeld)

3.2 Methoden

3.2.1 Probenaufbereitung

Die Proben wurden am Tag der Herstellung untersucht. Nach der sterilen Messung der Temperatur und des pH-Wertes wurden die Proben gemäß L 06.00-16 (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG: Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen, Vorbereitung der Proben, gleichlautend mit DIN 10162) vorbereitet. Hierfür wurden 10 g der Probe mit 90 ml NaCl-Pepton in einem Stomacherfilterbeutel mit Hilfe des Stomachers in 2 Minuten homogenisiert (Abb. 3). Anschließend wurde eine dekadische Verdünnungsreihe mit NaCl-Pepton-Lösung hergestellt. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} wurden jeweils 0,1 ml auf je zwei PCA-Nährbodenplatten einer Verdünnungsstufe pipettiert und mit einem sterilen Spatel ausgespatelt. Anschließend wurden die Platten bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ für 48 h aerob bebrütet.

3.2.2 Bestimmung der Keimzahl

Nach 48stündiger Bebrütung wurden die Kolonien auf den PCA-Nährbodenplatten gezählt. Zur Ermittlung der Keimzahl wurde das gewichtete Mittel in Anlehnung an FARMILOE et al. (1954) nach der Formel

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

- \bar{c} : gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen
- $\sum c$: Summe der Kolonien aller Nährbodenplatten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- n_1 : Anzahl der ausgezählten Nährbodenplatten (1 oder 2), die eine Koloniezahl zwischen 1 und 50 bzw. 100 besaßen (niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe)
- n_2 : Anzahl der Nährbodenplatten (0, 1 oder 2) der nächsthöheren Verdünnungsstufe

berechnet.

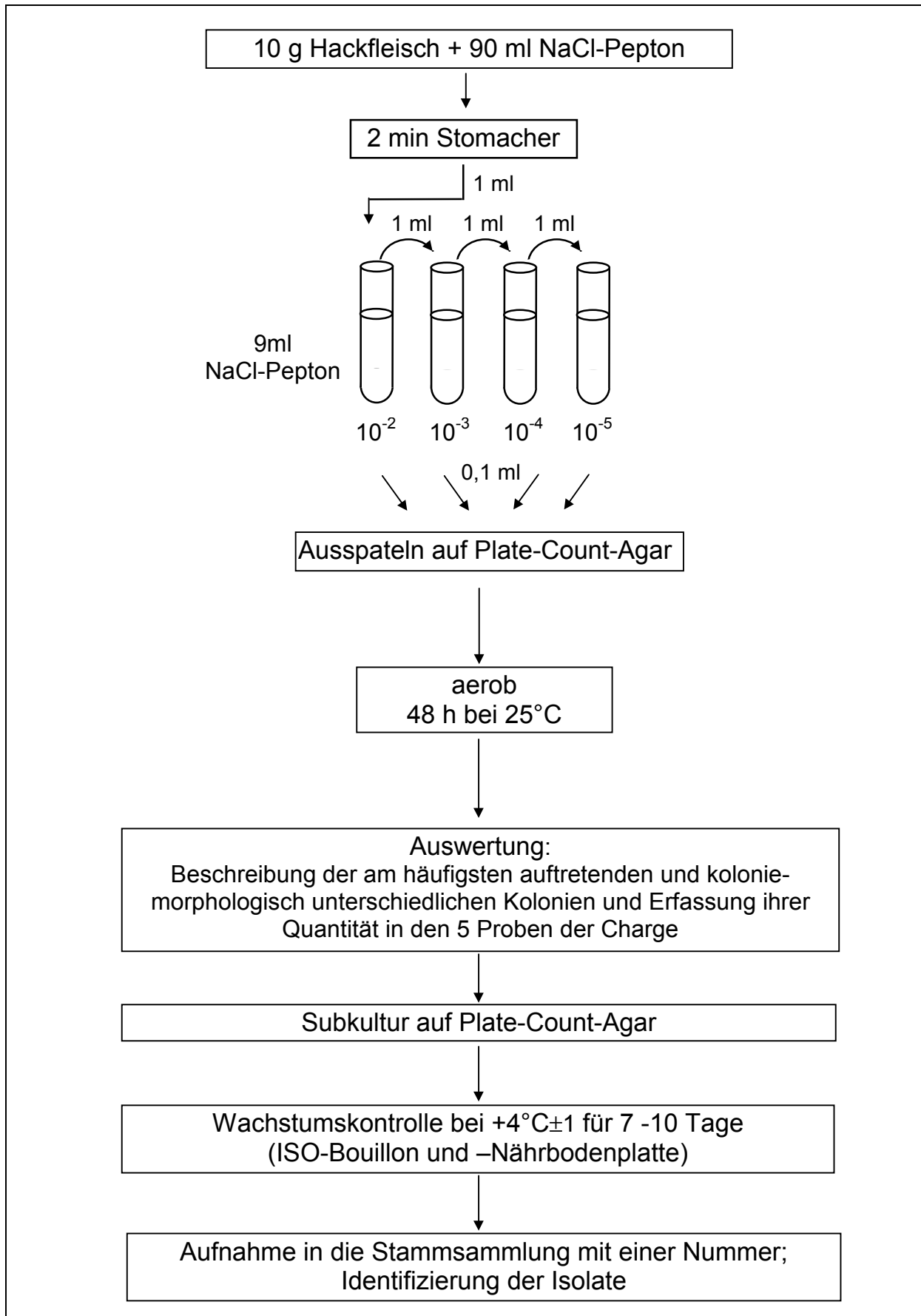


Abb. 3: Aufbereitung der Hackfleischproben und Isolierung der psychrotrophen Bakterien

3.2.3 Isolierung der Bakterien

Die Isolierung der Kolonien erfolgte von Verdünnungsstufen der PCA-Nährbodenplatten, auf denen die Kolonien gut voneinander abgrenzbar waren. Es wurden nur die am häufigsten auftretenden Kolonieförmungen berücksichtigt und 8 bis 18 Isolate von einem Kulturansatz genommen. Die koloniemorphologisch unterschiedlichen Kolonien wurden beschrieben (Tab. 14) und ihre Quantität in den 5 Proben der Charge erfaßt. Repräsentativ für jeden Kolonietyp erfolgte dann die Isolierung und Subkultivierung auf PCA-Nährbodenplatten bei $25\pm 1^\circ\text{C}$. Die anschließend Wachstumskontrolle der neuen Subkulturen fand bei $4\pm 1^\circ\text{C}$ statt. Diese erfolgte zum einen in einem thermostatierten Wasserbad, zum anderen in einem thermostatierten Kühlschrank. Für die Kontrolle im Wasserbad wurden 0,05 ml einer 48stündig bebrüteten, gut bewachsenen ISO-Bouillon in 5 ml ISO-Bouillon überführt. Für die Kontrolle im Kühlschrank wurde dagegen eine ISO-Nährbodenplatte mit der Impföse der gut bewachsenen Bouillon beimpft. Die Bebrütung erfolgte in beiden Fällen für 7 bis 10 Tage bei $4\pm 1^\circ\text{C}$. Nach dieser Zeit zeigte sich ein Wachstum auf den ISO-Nährbodenplatten in Form von deutlich sichtbaren Kolonien, in der ISO-Bouillon durch Trübung oder deutlichen Bodensatz.

Die als psychrotrophe Bakterien bestätigten Kulturen erhielten eine Stammsammlungsnummer. Diese setzt sich aus dem Kürzel für das Herkunftsmaterial (SF für Schabefleisch, RG für Rindergehacktes, SG für Schweinegehacktes und RS für Gemischtes Hackfleisch) sowie einer laufenden Nummer zusammen.

Tab. 14: Morphologische Merkmale zu identifizierender Kolonien

Merkmal	Ausprägung
Oberfläche	S: smooth (glatt); R: rough (rauh)
Größe	[•]: kaum sichtbar, [I]: stecknadelstichgroß, (I): bis 0,5 mm Ø, I: 1 mm Ø, II: 1-2 mm Ø, III: mehr als 2 mm Ø
Konsistenz	muc.: mukös, tr.: trocken
Querschnitt	fl.: flach, l.erh.: leicht erhaben, erh.: erhaben
Rand	gl.R.: glatter Rand, unrgl. R.: unregelmäßiger Rand
Form	rgl.: regelmäßig, unrgl.: unregelmäßig
Farbe	Pigmentbildung

3.2.4 Identifizierung der Hackfleischisolate mittels klassischer Mikrobiologie nach einem phänotypischen Reaktionsschema

3.2.4.1 Thermische Wachstumsversuche, Gram-Färbungsverhalten und Beweglichkeitsprüfung

Die Wachstumsversuche wurden bei 4°, 25°, 37° und 42°C in thermostatgeregelten Wasserbädern durchgeführt. 0,05 ml einer 48stündig bebrüteten gut bewachsenen ISO-Bouillon wurden in 5 ml ISO-Bouillon überführt und bei den Temperaturen 25°, 37° und 42°C für 24 bis 48 h, bei 4°C bis 7 Tage bebrütet. Die Temperaturkontrolle erfolgte durch mitgeführte geeichte Thermometer. Die Toleranzgrenze lag bei $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Ein Wachstum war anhand der Trübung der Bouillon oder eines deutlichen Bodensatzes zu erkennen.

Alle Stämme wurden auf Humanblutagarplatten überimpft und bei $25\pm 1^\circ\text{C}$ für 24 h bebrütet, um von diesen die Kolonien abzunehmen und das Gram-Färbungsverhalten zu überprüfen. Diese Platten standen routinemäßig zur Verfügung und erwiesen sich für die Überprüfung des Gram-Verhaltens als geeignet.

Um die Beweglichkeit aller Stämme zu überprüfen, wurde jeweils ein Tropfen einer bei Zimmertemperatur gut bewachsenen ISO-Bouillon auf ein Deckgläschen gegeben. Die Fixierung des Gläschens erfolgte auf einem Hohlschliffobjektträger mit Vaseline, welche die Vertiefung umrandete und einen dichten Abschluß gewährleistete. Der hängende Tropfen wurde dann unter dem Mikroskop betrachtet und eindeutig gerichtete Bewegungen als positiv beurteilt. Strömungsbedingte oder aufgrund von Brownschen Molekularbewegungen hervorgerufene Ortsveränderungen galten als negativ. Zusätzlich wurde ein Motilitätstest in einem halbfesten Medium mit 0,3-0,4% Agar (ISO-Bouillon mit Agar) in Röhrchen durchgeführt, wobei das Inokulat in die Mitte der Agarsäule mittels Impföse eingebracht wurde. Beweglichkeit bestand, wenn sich der Nährboden zunehmend trübte oder ein Auswandern aus dem Stichkanal an partieller Trübung erkennbar war.

3.2.4.2 Biochemische Reaktionen

Alle eingesetzten biochemischen Reaktionen sind in Tab. 15 mit den üblichen Abkürzungen aufgelistet unter Angabe des Ablesezeitpunkts nach erfolgter Inkubation.

Tab. 15: Zusammenstellung aller biochemischen Reaktionen

	Abkürzungen	Ablesezeitpunkt, Inkubation bei 25±1°C [Tage]					
		1	2	4	7	10	14
Oxidations-Fermentations(OF)-Test	Gluk: O, F		X	X			
Gas aus Glukose	Gluk _G		X	X			
Säurebildung aus Reaktionskörpern:							
Arabinose, Inosit, Laktose, Maltose, Mannit, Sorbit, Raffinose, Rhamnose, Ribose	Ara, Ino, Lakt, Mal, Man, Sor, Raf, Rha, Rib		X	X			
Verwertung von Kohlenhydraten als einzige Kohlenstoff-Quelle:	C-Quelle						
Fruktose, Xylose	Fruk, Xyl		X	X	X		
Simmons-Citrat (Verwertung von Citrat als einzige Kohlenstoff-Quelle)	Cit						
SIM-Nährboden							
Schwefelwasserstoffbildung	H ₂ S		X	X			
Indol-Bildung	Ind				X		
Beweglichkeit	Mot		X	X			
FBN-Agar							
Fluoreszenz	F				X		
Beweglichkeit	B				X		
Nitratreduktion	Nit				X		
Aminosäurenverwertung							
Arginin	ADH	X	X				
Lysin	LDC	X	X				
Ornithin	ODC	X	X				
Methylrotreaktion	MR		X	X			
Phenylalanindeaminase	PAD		X	X			
Voges-Proskauer-Reaktion	VP		X	X			
Urease-Reaktion	Ur		X	X			
Desoxyribonuklease(DNase)-Test	DN				X		
Caseinolyse	Cas		X	X			
Lezithinase	Lez		X	X			
Gelatinase-Test	Gel				X	X	X

3.2.4.3 Differenzierung der Gram-positiven Isolate

Zunächst wurde der Katalase-Test auf einem Objektträger durchgeführt. Hierfür wurde auf einen entfetteten Objektträger ein Tropfen einer 3%igen H₂O₂-Lösung gegeben und in diesen eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes mit der Platinöse eingerieben. Bei rascher Entwicklung von Gasblasen lag ein positives Ergebnis vor. Durch diesen Katalase-Test ließen sich die Katalase-negativen psychrotrophen Milchsäurebakterien von den Katalase-positiven Stämmen, wie *Brochothrix (B.) thermosphacta*, *Listeria (List.) monocytogenes*, *Kurthia* spp. und *Micrococcus* spp., abgrenzen. Die Katalase-negativen Bakterien waren Milchsäurebakterien, welche auf dem MRS-S-Nährboden (Zusatz von Sorbinsäure zu MRS in Konzentration von 0,14%) anzuzüchten waren und folgende Genera umfaßten: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. *Carnobacterium* spp. wuchsen nur schwach auf diesem Nährboden oder gar nicht. Die Genera der Katalase-positiven Gruppe ließen sich durch Untersuchung auf Beweglichkeit weiter voneinander abgrenzen. *Kurthia* spp. und *List. monocytogenes* als bewegliche Vertreter unterschieden sich wiederum in ihrem Verhalten, Acetoin zu bilden. *List. monocytogenes* war dazu in der Lage und damit war die Voges-Proskauer-Reaktion (VP) positiv. *Kurthia* spp. reagierte dagegen VP-negativ. Die beiden psychrotrophen Spezies des Genus *Kurthia* ließen sich durch Wachstumskontrolle bei 45°C sowie den Phosphatase-Test voneinander unterscheiden. *Kurthia gibsonii* wuchs bei 45°C, und der Phosphatase-Test war positiv, *Kurthia zopfii* reagierte in beiden Fällen negativ. Für die unbeweglichen Stämme *B. thermosphacta* und *Micrococcus* spp. ließen sich als Unterscheidungskriterien die Fähigkeiten, bei 37°C zu wachsen und Acetoin bilden zu können, heranziehen. *B. thermosphacta* wuchs nicht bei 37°C, reagierte jedoch VP-positiv. *Micrococcus* spp. wuchsen bei 37°C und waren nicht in der Lage, Acetoin zu bilden (Abb. 4). Der Selektivnährboden SIN wurde für die Spezies *B. thermosphacta* zusätzlich als Kontrollmedien zur Bestätigung hinzugezogen.

3.2.4.4 Differenzierung der Gram-negativen Isolate

Alle Stämme wurden einer Vordifferenzierung mittels Oxidase-Test auf einem mit sterilem Aqua demin. angefeuchteten Filterpapier unterzogen. Auf dieses Filterpapier

wurde das Oxidasereagenz aufgetragen und sogleich eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes mit der Impföse aufgetragen. Das Ablesen des Ergebnisses erfolgte bis spätestens 30 Sekunden. Eine Blaufärbung des Filterpapiers zeigte eine positive Reaktion an. Fand keine Verfärbung statt, so war das Ergebnis negativ. Anschließend wurden die unterschiedlichsten Reaktionsröhrchen, die zu einer „Bunten Reihe“ zusammengestellt worden waren, mit den zu untersuchenden Stämmen beimpft. Nach Zentrifugation einer gut bewachsene ISO-Bouillon für 5 min bei einer Drehzahl von 3000min^{-1} und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des verbleibenden Pellets in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Von dieser Suspension wurden jeweils 0,05 ml als Inokulum benutzt. Bei den in das Identifizierungsschema einbezogenen Tests handelte es sich um Reaktionen, die in Tab. 15 aufgeführt sind. Die Selektivnährböden Violet-Red-Bile-Glukose-Agar (VG) sowie Ceftrimid-Fucidin-Cephaloridin-Agar (CFC) und Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP) wurden zur Bestätigung für Enterobakteriäzen bzw. Pseudomonaden hinzugezogen.

Das Fließschema in Abb. 5 und die Tab. 19 und 20 stellen Identifizierungsschlüssel nach der Literatur (BARROW und FELTHAM, 1993c; BAUMGART, 1994; HOLT et al., 1994b; FARMER, 1999) zur Abgrenzung der verschiedenen Gram-negativen psychrotrophen Bakterien der Hackfleischmikroflora dar. Zur weiteren Differenzierung bis auf Speziesebene wurden bei einigen Genera zusätzliche Reaktionen hinzugezogen.

Die Gram-negativen, **Oxidase-positiven** psychrotrophen Vertreter umfassen folgende Genera (Abb. 5):

Alcaligenaceae

Alcaligenes (*Alc.*) *faecalis* und *Achromobacter* (*Achr.*) *xylosoxidans* (*xyl.*)
spp. denitrificans (früher: *Alc. denitrificans*)

Morphologie:	Stäbchen z.T. kokkoid
Oxidase:	+
OF Glukose:	-/-
Motilität:	+
Pigmentbildung:	-
H ₂ S:	-
Gelatinase:	-

Im Gegensatz zu *Alc. faecalis* sind Stämme der Spezies *Achr. xyl. denitrificans* (80% und mehr) in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren.

Psychrobacter (Pb.) spp.

Pb. immobilis und *Pb. phenylpyruvicus* (früher *Moraxella phenylpyruvica*):

Morphologie:	Stäbchen, z.T. kokkoid
Oxidase:	+
OF Glukose:	+/- oder -/-
Motilität:	-
Pigmentbildung:	-
PAD:	+
VP:	-
MR:	-

Wachstumsstimulation von *Pb. phenylpyruvicus* durch Galle (MacConkey-Agar)

Shewanella (Shew.) putrefaciens (früher *Alteromonas*)

Morphologie:	Stäbchen
Oxidase:	+
OF Glukose:	-/- oder +/-
Motilität:	+
H ₂ S:	+
Gelatinase:	+
Nitratreduktion:	+

Pseudomonas (Ps.) spp.

Ps. fragi, *Ps. lundensis*, *Ps. fluorescens* und *Ps. putida*

Morphologie:	Stäbchen
Oxidase:	+
OF Glukose:	+/-
Motilität:	+
Säure aus Ara:	+
H ₂ S:	-
Citrat:	+
PAD:	-
Indol:	-
VP:	-
MR:	-
Wachstum bei 42°C:	-

Es wurde außerdem eine Wachstumskontrolle auf den Selektivnährböden Cetrimid-Fucidin-Cephaloridin-Agar (CFC) und Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP) durchgeführt. Für die Speziesidentifizierung der Pseudomonaden wurden noch weitere Tests verwendet: Fluoreszenz in Fluoreszenz-Beweglichkeit-Nitrat(FBN)-

Agar, Caseinolyse, Lezithinase, Verwertung der Reaktionskörper Maltose-Monohydrat, D(-)-Mannit und z.T. D(-)-Ribose unter Säurebildung und die Nutzbarmachung von D(-)-Fruktose und D(+)-Xylose als einzige Kohlenstoffquellen. Ein Differenzierungsschema kann Tab. 16 entnommen werden.

Tab. 16: Differenzierung psychrotropher Pseudomonaden nach MOLIN und TERNSTRÖM (1982 und 1986)

	Fluo	Gel	Lak	Säure aus			Verwertung	
				Mal	Man	Rib	Fruk	Xyl
<i>Ps. fragi</i>	-	v	d	+	-	+	+	+
<i>Ps. lundensis</i>	v	+	-	+	-	+	+	-
<i>Ps. fluorescens</i>	+ ¹	v	-	-	d	+	+	v
<i>Ps. putida</i>	+	-	-	-	-	-	+	v

Fluo: Fluoreszenz, Gel: Gelatinase, Lak: Laktose, Mal: Maltose, Man: D(-)-Mannit, Rib: D(-)-Ribose, Fruk: D(-)-Fruktose, Xyl: D(+)-Xylose

Reaktion der Stämme: +: 85-100% positiv, v: 16-84% positiv, -: 0-15% positiv

¹: einige Stämme des Biovar 4 reagieren negativ

Aeromonas (Aer.) spp.

Aer. hydrophila, *Aer. caviae*, *Aer. veronii* Biovar *sobria*

Morphologie: Stäbchen, z.T. kokkoid
 Oxidase: +
 OF Glukose: +/-
 Säure aus myo-Inosit: -
 ODC: -

Es wurde außerdem eine Wachstumskontrolle auf dem Glutamat-Stärke-Phenolrot-Nährboden (GSP) durchgeführt. Der Reaktionskörper Stärke in diesem Nährboden wurde von *Aeromonas* unter Säurebildung abgebaut, so daß ein Umschlag des Phenolrots nach gelb erfolgte. Das geschah nicht beim Wachstum von *Pseudomonas*-Spezies.

Zur Differenzierung der im Fleisch vorkommenden Aeromonaden-Spezies boten sich die von JANDA et al. (1995) zusammengestellten biochemischen Merkmale an, die in Tab. 17 vereinfacht dargestellt werden. *Aer. hydrophila* und *Aer. veronii* Biovar *sobria* waren danach im Gegensatz zu *Aer. caviae* in der Lage, aus Glukose

Acetoin zu bilden. *Aer. veronii* Biovar *sobria* konnte dagegen nicht wie *Aer. hydrophila* und *Aer. caviae* Säure aus L-Arabinose bilden.

Tab. 17: Biochemische Eigenschaften von *Aeromonas*-Spezies nach JANDA et al. (1995)

Tests	<i>Aer. hydrophila</i>	<i>Aer. caviae</i>	<i>Aer. veronii</i> Biovar <i>sobria</i>
Indol	+	+	+
Gas aus Glukose	+	–	+
VP	+	–	+
ODC	–	–	–
Säure aus: L-Arabinose	+	+	–
myo-Inosit	–	–	–
H ₂ S	+	–	+

Flavobacteriaceae

Nach der drastischen taxonomischen Neuordnung dieser Organismen (BERNADET et al., 2002) gehören psychrotrophe Arten des *Flavobacterium*-Genus sowie neu geschaffene Genera, wie z.B. *Chryseobacterium*, zur Familie der *Flavobacteriaceae* (JOOSTE und HUGO, 1999). Letztgenannte spielen beim Verderb von Lebensmitteln eine untergeordnete Rolle (BAUMGART, 1994).

Morphologie:	Stäbchen
Oxidase:	+
OF Glukose:	+/- oder -/-
Motilität:	– (keine Flagellen, aber Beweglichkeit durch Gleiten möglich)
Pigmentbildung:	+
Wachstum bei 37°C:	verschieden
Wachstum bei 42°C:	–
Wachstum auf MacConkey-Agar:	–

Die Gram-negativen, **Oxidase-negativen** psychrotrophen Vertreter umfassen folgende Genera:

Acinetobacter (A.) spp.

Morphologie:	Stäbchen
Oxidase:	–
OF Glukose:	–/– oder +/-
Motilität:	–
VP:	–
MR:	–

Eine Speziesidentifizierung der präsumtiven *Acinetobacter*-Stämme erfolgte mit phänotypischen Tests, wie sie in Tab. 18 aufgeführt sind. Zur Bestätigung fraglicher Einstufungen wurde das im Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe Harmsen praktizierte molekularbiologische Verfahren eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.4.5) (HARMSSEN et al., 1999).

Tab. 18: Phänotypische Merkmale zur Identifizierung von *Acinetobacter*-Spezies bzw. Genospezies nach BOUVET und GRIMONT (1986), BOUVET und JEANJEAN (1989), GERNER-SMIDT et al. (1991) sowie KÄMPFER et al. (1993)

Spezies		Wachstum bei °C			Häm	Gel	Citr	Gluk
Geno-	Taxo-	37	41	44				
1	<i>A. calcoaceticus</i>	+	-	-	-	-	+	+
2	<i>A. baumannii</i>	+	+	+	-	-	+	+
3	unbenannt	+	+	-	-	-	+	+
4	<i>A. haemolyticus</i>	+	-	-	+	+	+	d
5	<i>A. junii</i>	+	+	-	d	-	d	-
6	unbenannt	+	-	-	+	+	+	d
7	<i>A. johnsonii</i>	-	-	-	-	-	+	-
8/9	<i>A. lwoffii</i>	d	-	-	-	-	-	-
10	unbenannt	+	-	-	-	-	+	+
11	unbenannt	+	-	-	-	-	+	-
12	<i>A. radioresistens</i>	+	-	-	-	-	-	d
13BJ	unbenannt	d	-	-	d	+	+	+
14BJ	unbenannt	+	-	-	+	+	+	+
15BJ	unbenannt	+	-	-	+	+	+	-
16BJ	unbenannt	+	-	-	+	+	+	-
17BJ	unbenannt	d	-	-	+	+	+	-
N 1	<i>A. ursingii</i>	+	-	-	-	-	+	-
N 2	<i>A. schindleri</i>	+	+	-	-	-	d	-

Häm: Hämolyse auf Humanblutagar; Gel: Gelatinase; Citr: Citratspaltung in Simmons-Citrat; Gluk: Säure aus D(+)-Glukose (aerob)

Reaktion der Stämme: +: 85-100% positiv; d: 16-84% positiv; -: 0-15% positiv

□ : ausschlaggebende Merkmale

BJ: Genospezies nach BOUVET und JEANJEAN (1989); N 1 und 2: NEMEC et al. (2001), die phenon-Gruppen 1 und 2 wurden als neue Spezies *A. ursingii* und *A. schindleri* vorgestellt

Enterobacteriaceae

Buttiauxella (B.) *agrestis*, *Cedeceae* (C.) *davisae*, *Citrobacter* (Cb.) *freundii*, *Enterobacter* (Eb.) *aerogenes*, *Eb. amnigenus* Biogruppe 1 und 2, *Eb. cloacae*, *Eb. intermedius*, *Escherichia* (E.) *vulneris*, *Hafnia* (H.) *alvei*, *Klebsiella* (Kl) *oxytoca*, *Kl. pneumoniae* (pn.) *ssp. ozaenae*, *Kl. pn. ssp. pneumoniae*, *Pantoea* (Pa.) *agglomerans*, *Proteus* (Pr.) *mirabilis*, *Pr. vulgaris*, *Rahnella* (R.) *aquatilis*, *Serratia* (S.) *fonticola*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. marcescens* Biogr. 1, *S. plymuthica*, *Yersinia* (Y.) *enterocolitica*

Morphologie: Stäbchen
Oxidase: –
OF Glukose: +/+
Nitratreduktion: +, mit Ausnahme einiger Stämme von *Kl. pn. ozaenae* und *S. marcescens* Biogr. 1

Eine Differenzierung der Genera und Spezies erfolgte durch die Verwertung von Aminosäuren mit Hilfe der Arginindehydrolase (ADH), Lysindecaboxylase (LDC) und Ornithindecaboxylase (ODC), Säurebildung aus Inositol und Arabinose, Indol-, Gelatinase- und Phenylalanindeaminase-Bildung, Glukonat-Oxidationstest und Methylrot-, Urease- und Voges-Proskauer-Reaktion. Als Selektivnährmedium wurde Violet-Red-Bile-Glukose-Agar (VG) unter anaeroben Bebrütungsbedingungen zur Identifizierungsbestätigung der *Enterobacteriaceae* herangezogen.

Tab. 19 stellt den Schlüssel zur Identifizierung der psychrotrophen *Enterobacteriaceae* dar. Aus Tab. 20 kann ersehen werden, wie sich die *Enterobacteriaceae*-Spezies gegenüber allen eingesetzten phänotypischen Merkmalen verhalten.

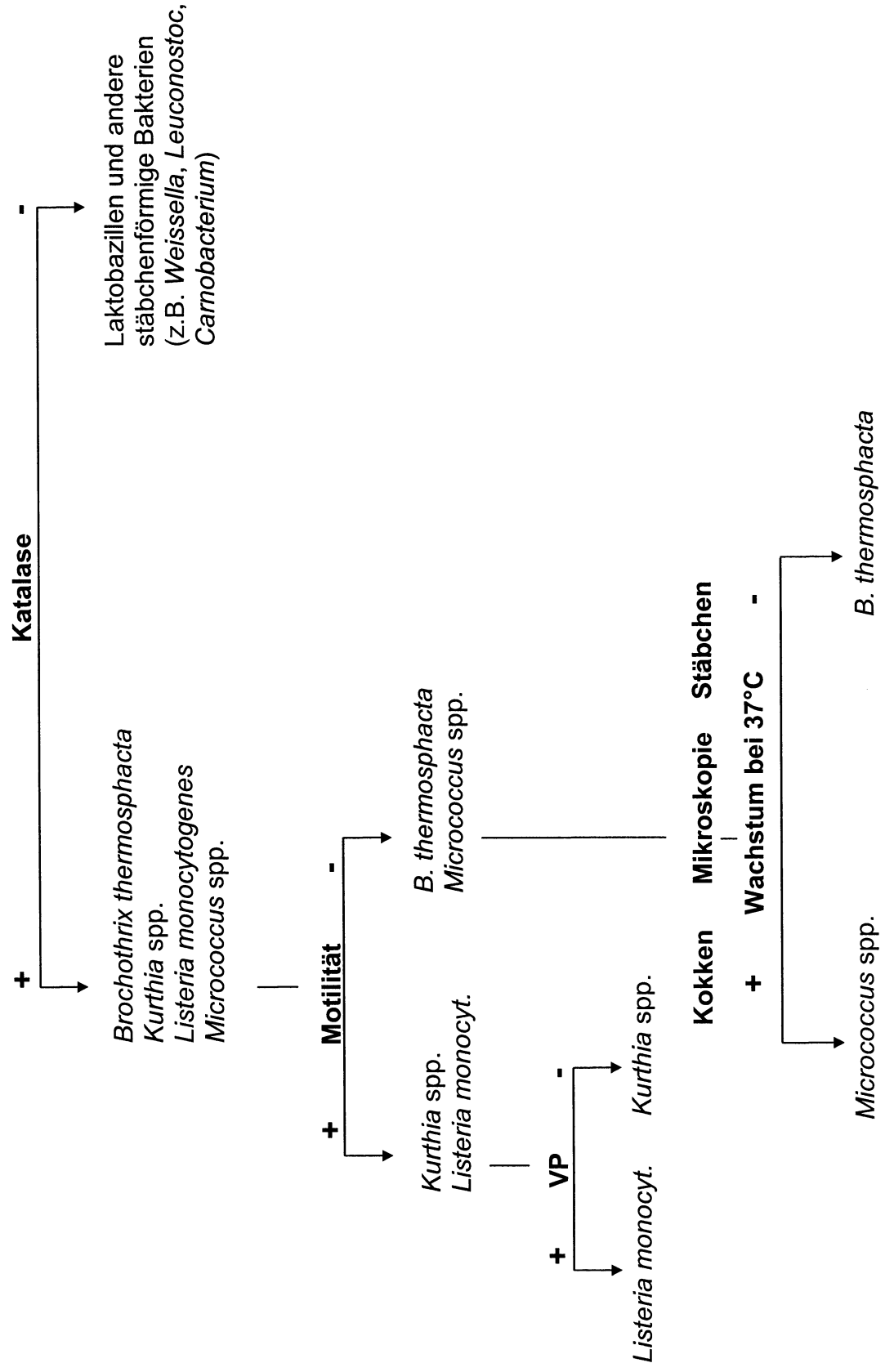


Abb. 4: Fließschema zur Identifizierung Gram-positiver psychrotropher Bakterien der Hackfleischmikroflora

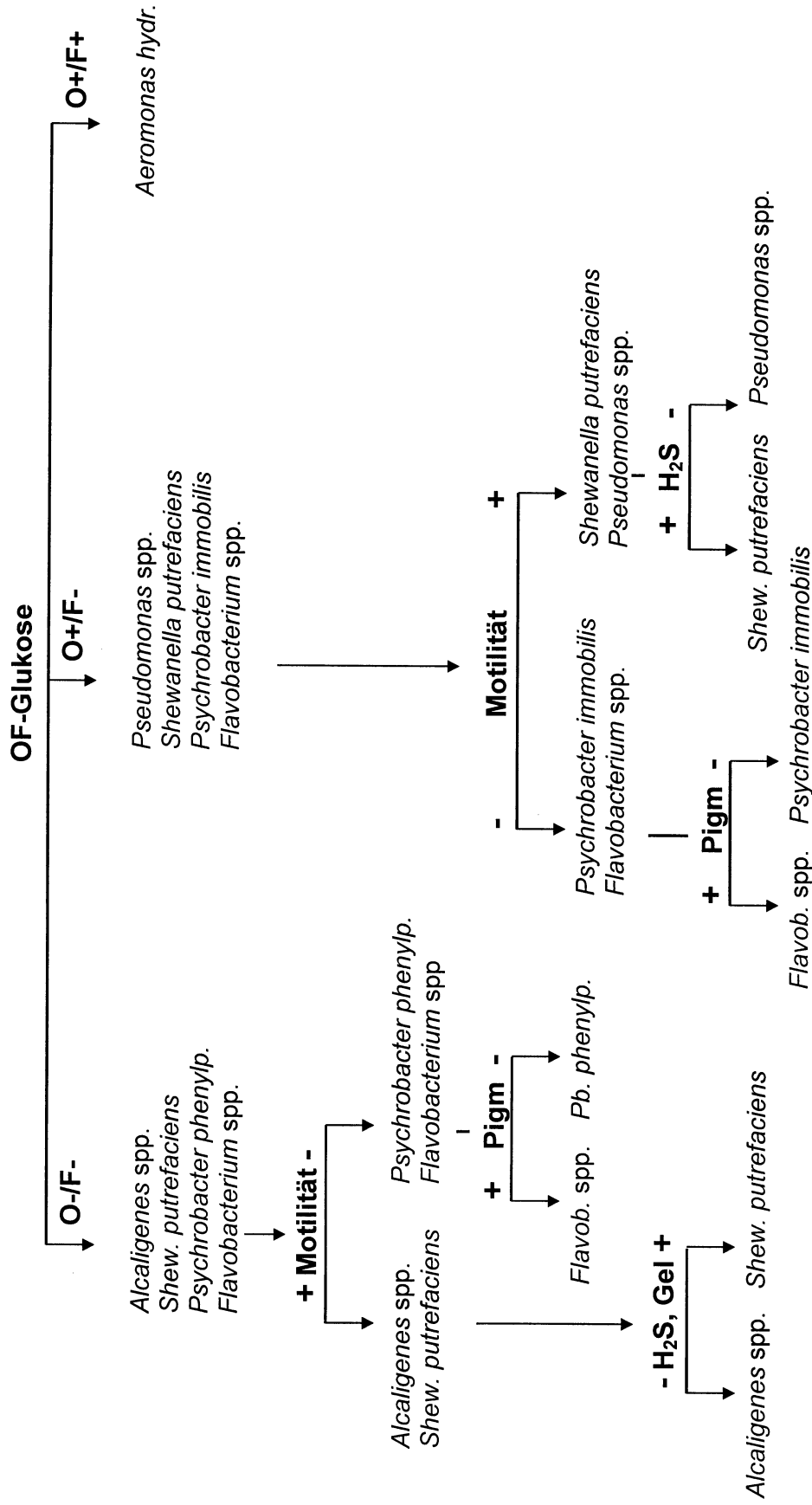


Abb. 5: Fließschema zur Identifizierung Gram-negativer, Oxidase-positiver psychrotropher Bakterien der Hackfleischmikroflora
 OF: Oxidations-Fermentations-Test; Pigm: Pigmentbildung, H₂S: H₂S-Bildung, Gel: Gelatinase