

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

angefertigt am
Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie
des Max Rubner-Institutes, Standort Kulmbach
(Dir. u. Prof. PD Dr. Dr. habil. M. Gareis)

**Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen von
Clostridium estertheticum in vakuumverpacktem Rindfleisch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Eva Ziegler
aus Bayreuth

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. h.c. Märtlbauer
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Förster

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern und Fabian

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Vakuumverpackung von Frischfleisch	3
2.1.1	Bedeutung für den internationalen Rindfleischmarkt, Import- und Exportsituation	3
2.1.2	Eigenschaften von vakuumverpacktem Rindfleisch	5
2.1.2.1	Fleischreifung im Vakuumbbeutel	5
2.1.2.2	Mikrobielle Flora	6
2.1.2.3	Haltbarkeit	7
2.1.3	Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch	9
2.1.3.1	Definition und Abgrenzung	9
2.1.3.2	Verderb ohne massive Gasbildung	10
2.1.3.2.1	Verderb bei erhöhter Lagertemperatur oder Unterbrechung der Kühlkette	11
2.1.3.2.2	Verderb bei Vakuumverpackung von DFD-Fleisch	12
2.1.3.3	„Blown Pack Spoilage“	13
2.1.3.4	Verderbspotential von Hefen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen	14
2.2	Psychrotrophe und psychrophile Mikroorganismen	15
2.2.1	Begriffsklärung	15
2.2.2	Lebensmittelrelevante psychrotrophe bzw. psychrophile Mikroorganismen	17
2.2.3	Psychrotrophe und psychrophile Clostridien auf Fleischerzeugnissen	19
2.2.4	Toxinbildungsvermögen von kältetoleranten Clostridien auf Fleisch	22
2.3	<i>Clostridium estertheticum</i> / <i>Clostridium estertheticum</i>-like Organismen	23
2.3.1	Eigenschaften von <i>C. estertheticum</i>	24
2.3.1.1	Allgemeine Eigenschaften	24
2.3.1.2	Morphologie	24
2.3.1.3	Temperaturbereich	25
2.3.1.4	Biochemische Charakteristika	26
2.3.2	Vorkommen	28
2.3.3	Nachweis	29
2.3.3.1	Kultureller Nachweis / Isolierung aus Fleisch	29
2.3.3.2	Molekularbiologischer Nachweis - Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.3.4	Dekontamination / Bekämpfung von Blown Pack Spoilage	31

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	35
3.1	Material	35
3.1.1	Bakterienstämme	35
3.1.2	Kulturelle Verfahren	35
3.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.1.4	Koloniehybridisierung	39
3.1.5	Sonstige Materialien und Geräte	40
3.1.6	Probenmaterial	41
3.1.6.1	Proben aus dem Handel	41
3.1.6.2	Verdachtsproben	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Anaerobe Arbeitstechnik	43
3.2.2	Herstellung von Sporensuspensionen	43
3.2.3	Optimierung der DNA-Aufbereitung aus Sporen	44
3.2.4	PCR-Nachweise von <i>Clostridium estertheticum</i>	45
3.2.5	Nachweisgrenze der PCR-Systeme im Fleischtropfsaft	46
3.2.5.1	Nachweisrate für vegetative Zellen und nach Anreicherung	46
3.2.5.2	Nachweisrate für Sporen	49
3.2.5.3	Überprüfung der Vergleichbarkeit der Keimzählungsverfahren	49
3.2.6	Etablierung der Kolonie-Hybridisierung	50
3.2.6.1	Herstellung der Gensonde	50
3.2.6.2	Überprüfung der Markierungsreaktion durch Gelelektrophorese	51
3.2.6.3	Spezifitätsprüfung der Gensonde	51
3.2.6.4	Überprüfung der Methode mit Reinkulturen	52
3.2.7	Etablierung der Methode zur Konservierung von <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen	52
3.2.8	Probenuntersuchungsgang	53
3.2.8.1	Überblick	53
3.2.8.2	Visuelle Überprüfung der Verpackung	55
3.2.8.3	Sensorische Beurteilung des Geruchs	55
3.2.8.4	Bakterioskopische Untersuchung	56
3.2.8.5	Allgemeine Mikrobiologische Untersuchung	56
3.2.8.5.1	Probenaufbereitung	56
3.2.8.5.2	Kulturverfahren	57
3.2.8.5.3	Ermittlung der Keimzahlen	58

3.2.8.6	pH-Wert-Messung	58
3.2.8.7	Nachweis von <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen	58
3.2.8.7.1	PCR-Screening	58
3.2.8.7.2	PCR nach Anreicherung	59
3.2.8.7.3	Anzucht kältetoleranter Clostridien	59
3.2.8.7.4	Koloniehybridisierung und gezielte Isolierung	59
3.2.8.7.5	Bestätigung und Einordnung der Isolate	60
3.2.8.7.6	Konservierung der Isolate	60
4	ERGEBNISSE	61
4.1	Optimierung der DNA-Aufbereitung aus Sporen	61
4.2	Nachweisgrenze der PCR-Systeme im Fleischtropfsaft	63
4.2.1	Vergleichbarkeit der Keimzählungsverfahren	63
4.2.2	Nachweisgrenze für vegetative Zellen	64
4.2.3	Nachweisgrenze nach Anreicherung	65
4.2.4	Nachweisgrenze für Sporen	66
4.2.5	Amplifikationskontrolle	67
4.3	Etablierung der Kolonie-Hybridisierung	68
4.3.1	Markierungsreaktion der Gensonden	68
4.3.2	Spezifität der eingesetzten Sonde	70
4.3.3	Überprüfung der Methode mit Reinkulturen	70
4.4	Etablierung der Methode zur Konservierung von <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i>-like Organismen	71
4.5	Untersuchung von vakuumverpackten Rindfleischproben	71
4.5.1	Visuelle Überprüfung der Verpackung	72
4.5.2	Sensorische Beurteilung des Geruchs	76
4.5.3	Bakterioskopische Untersuchung	79
4.5.4	Allgemeine mikrobiologische Untersuchung und pH-Wert	81
4.5.5	Nachweis von <i>C. estertheticum</i> / <i>C. estertheticum</i> -like Organismen	83
4.5.5.1	PCR-Screening	83
4.5.5.2	PCR nach Anreicherung	83
4.5.5.3	Koloniehybridisierung und gezielte Isolierung	84
4.5.6	Bestätigung und Einordnung der Isolate	85
4.5.7	Rekultivierbarkeit der Isolate	87

4.5.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	88
5	DISKUSSION	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	103
7	SUMMARY	105
8	LITERATURVERZEICHNIS	107

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
C.	<i>Clostridium</i>
CBA	Columbia Blutagar
cm ²	Quadratzenimeter
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
KbE	Koloniebildende Einheiten
ml	Milliliter
MPN	Most Probable Number
n.a.	nicht angegeben
n.d.	nicht durchgeführt
NCIMB	National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerasekettenreaktion)
PYGS	Pepton Yeast Glucose Starch
RCM	Reinforced Clostridial Medium
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
s	Sekunde
SFP	Shahidi Ferguson Perfringens Medium
V	Volt
vgl.	vergleiche

1 Einleitung

Fälle von Verderb bei vakuumverpacktem Rindfleisch durch psychrophile Vertreter des Genus *Clostridium* wurden erstmalig 1989 bekannt (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989). Solcher Verderb ist gekennzeichnet durch ein Aufblähen der Verpackung als Folge von starker Gasbildung, begleitet von massiven Geruchsabweichungen. Im Englischen wird für diese Verderbssymptomatik die Bezeichnung Blown Pack Spoilage verwendet.

In den folgenden Jahren rückten kältetolerante Clostridien vermehrt ins Interesse der Forschung, was zur Isolierung einer Vielzahl an kältetoleranten Clostridienstämmen und Erstbeschreibung einiger neuer Spezies führte. Jedoch wurde nur bei einigen dieser Stämme mit Challengeversuchen ein entsprechendes Verderbsgeschehen reproduziert.

Mittlerweile wurde diese Art von Verderb bei Fleisch aus Großbritannien, USA, Neuseeland, Südafrika, Nordamerika und Nordeuropa beobachtet, allerdings gibt es keinerlei wissenschaftliche Daten über die Häufigkeit solcher Fälle.

Der bisher am häufigsten nachgewiesene Erreger von Blown Pack Spoilage bei Kühltemperaturen ist *C. estertheticum*. Dieser Organismus ist in der Lage, vakuumverpacktes Fleisch auch bei Kühltemperaturen von -1,5 °C innerhalb weniger Wochen zu verderben.

In der deutschsprachigen Literatur sind bisher keine wissenschaftlichen Arbeiten über *C. estertheticum* verfügbar. In Standardwerken der Lebensmittelmikrobiologie finden sich allenfalls kurze Zusammenfassungen unter Verweis auf englischsprachige Arbeiten.

Die Kontamination des Fleisches mit diesem Verderberreger erfolgt wahrscheinlich mit der widerstandsfähigen versporteten Form, die Übertragungswege für diese Kontamination sind weitgehend unbekannt (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002).

Der Nachweis dieser Keime mit kulturellen Methoden ist aufwändig und langwierig. Standardisierte Methoden sind bisher nicht verfügbar, und mangels geeigneter Selektivmedien bereitet die Isolierung aus der gemischten Mikroflora von Fleischproben besondere Probleme. Mittlerweile wurden auch molekularbiologische Methoden zum Nachweis entwickelt, die einen schnelleren Nachweis ermöglichen (Broda et al.,

2003a). Jedoch wurde die Erfassung von Sporen in dieser Arbeit nicht mit einbezogen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen zuverlässigen PCR – Nachweis für Sporen von *C. estertheticum* sowie eine Methode zur gezielten Isolierung dieser Organismen von festen Nährmedien zu etablieren. Weiterhin sollten die Methoden anhand von Rindfleischproben auf ihre Praxistauglichkeit überprüft werden und erste Daten über das Vorkommen von *C. estertheticum* bei Proben aus dem deutschen Handel gewonnen werden. Darüber hinaus stellt der Literaturteil dieser Arbeit die erste umfassende Beschreibung der vorhandenen wissenschaftlichen Literatur zu diesem Thema in deutscher Sprache dar.

2 Schrifttum

2.1 Vakuumverpackung von Frischfleisch

2.1.1 Bedeutung für den internationalen Rindfleischmarkt, Import- und Exportsituation

Frisches, gekühltes Rindfleisch wird im Zuge eines zunehmend liberalisierten Welthandels heutzutage vermehrt über weite Strecken transportiert. Noch bis Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts war dies kaum der Fall, Rindfleisch wurde in Vierteln oder Hälften transportiert und der Export auf weiter entfernte Märkte war durch das sperrige Transportgut und die begrenzte Haltbarkeit limitiert.

Ende der 1970er Jahre setzte sich die Vakuumverpackung für dieses Produkt durch, da so erstmalig die volle Erhaltung der Qualität und Haltbarkeit während längerer Transporte möglich war (Husband, 1982). Diese Entwicklung ging mit der Einführung des sogenannten „boxed-beef concept“ einher, das gekennzeichnet ist durch zentralisierte Schlachtung, Zerlegung und Vakuumverpackung der Teilstücke in der Nähe der Produktionsstätten. Die Produktion und der Transport wurden durch dieses Konzept wesentlich effizienter, und schon 1982 wurden nur noch 12% des Rindfleisches im US – Großhandel in Hälften oder Vierteln (carcass beef) und 88% in Teilstücken (primal cuts) angeboten, von denen über 90% vakuumverpackt waren (Seideman und Durland, 1983). Heute ist die Vakuumverpackung nach wie vor weit verbreitet bei für den Groß- und Außenhandel bestimmten Teilstücken, während sie für Endverbraucherportionen von frischem Fleisch kaum Verwendung findet (Jeremiah, 2001).

Die größten Anbieter von Rindfleisch auf dem Weltmarkt sind derzeit Brasilien und Australien, wobei Brasilien der führende Anbieter bezogen auf das Produktvolumen ist, während Australien den führenden Exporteur bezogen auf den Produktwert darstellt (Steiger, 2006). Traditionell spielt auch Nordamerika eine entscheidende Rolle bei den wichtigsten Rindfleischexporteuren, es verlor jedoch im Zuge der BSE- Krise 2003 wesentliche Marktanteile an Brasilien (vgl. Abbildung 1).

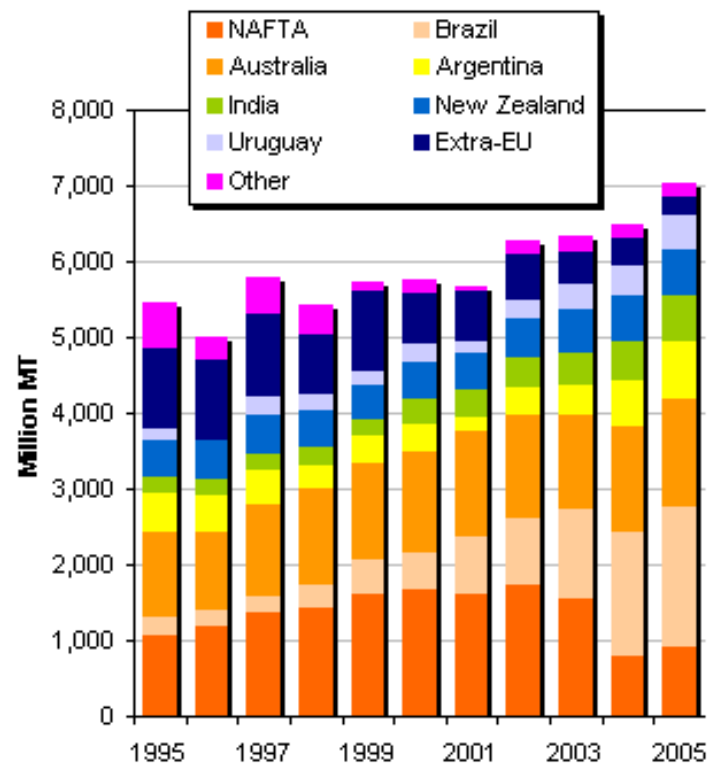


Abbildung 1: Rindfleischexporte in Millionen Tonnen nach Ländern, weltweit, von 1995 bis 2005 (Adcock et al., 2006)

(NAFTA= North American Free Trade Agreement; Mitgliedsstaaten: USA, Kanada, Mexico)

(1MT= 1 Metric ton = 1t)

Die Europäische Union ist mit einem Selbstversorgungsgrad von 99% Nettoimporteur von Rindfleisch, im Jahr 2007 führte die EU knapp 300000 Mio. t Rindfleisch ein, mehr als die Hälfte davon als frisches gekühltes Rindfleisch (Kohlmüller, 2008). Der wichtigste Lieferant bei den EU-Rindfleischeinfuhren ist Brasilien mit einem Anteil von 66%. Im europäischen Außenhandel werden hauptsächlich Verarbeitungsfleisch aus der EU aus- und edle Teilstücke eingeführt. Der Pro-Kopf-Verzehr von Rindfleisch in Deutschland liegt mit 8,3 kg unter dem europäischen Durchschnitt (Deutscher Fleischer - Verband, 2007).

2.1.2 Eigenschaften von vakuumverpacktem Rindfleisch

2.1.2.1 Fleischreifung im Vakuumbbeutel

Schlachtfrische Muskulatur vom Rind bedarf stets einer Reifungsphase, um optimale Verzehreigenschaften auszubilden. Traditionell fand die Reifung von Rindfleisch durch Abhängen von Rindervierteln oder -hälften im Kühlraum für etwa 2 Wochen statt (Böhme, 1981; Tändler und Heinz, 1970a). Dabei entwickelt das Fleisch durch die Einwirkung fleischeigener Enzyme die erwünschte Zartheit. Dies ist auf Veränderungen der myofibrillären Struktur zurückzuführen, welche durch Proteolyse des myofibrillären Proteins entstehen. Die daran beteiligten Enzymsysteme sind Calpaine, Kathepsine und eventuell multikatalytische Proteasen (Koohmaraie und Geesink, 2006). Zusätzlich zur Zartheit entwickelt sich während der Reifung der typische Rindfleischgeschmack und durch eine Zunahme des Wasserbindungsvermögens auch eine bessere Saftigkeit.

Beim klassischen Abhängen treten jedoch relativ hohe Verluste durch Verdunstung und damit verbunden eine Austrocknung sowie Oxidation der Oberfläche auf. Oberflächliche Gewebsschichten trocknen manchmal so stark ab, dass sie nicht mehr verwertbar sind und verworfen werden müssen. Mit zunehmender Reifungs- bzw. Lagerdauer kommt es außerdem zu oberflächlicher Keimvermehrung, was zu schmierigen Belägen führt und die Haltbarkeit derart gereiften Fleisches einschränkt (Tändler und Heinz, 1970a). Bei der aeroben Kühllagerung findet man als Verderbnisflora hauptsächlich psychrotrophe Gram-negative Stäbchenbakterien, wie *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* und *Moraxella* (Gill, 1983; Borch et al., 1996; Gill und Newton, 1978; Fehlhaber et al., 2005), wobei die Pseudomonaden den größten Anteil stellen.

Die Vakuumverpackung bietet die Möglichkeit, Umwelteinflüsse größtenteils auszuschalten und damit die Probleme der herkömmlichen Reifung zu umgehen. Hierbei werden entbeinte Fleischteilstücke in weitgehend gasdichte Folien verpackt, unter Vakuum verschlossen und bei Kühltemperaturen in Gefrierpunktnähe gelagert. Verluste durch Austrocknung treten nicht auf, die Verpackung bietet außerdem Schutz vor Verschmutzung, und es wird ein höherer Zartheitsgrad erreicht als bei herkömmlicher Reifung. Teilstücke, die für entfernte Märkte vorgesehen sind, können so während des Transports (z.B. auf dem Seeweg) langsam reifen und erreichen den Bestimmungsort mit dem erwünschten Reifegrad. Vakuumverpackte Teilstücke sind

zudem um ein Vielfaches länger haltbar als aerob gelagertes Fleisch (vgl. 2.1.2.3), und viele Autoren sprechen sich für einen höheren Genusswert des unter Vakuum gereiften Fleisches aus (Böhme, 1981; Heinz, 1974; Tändler und Heinz, 1970b; Tändler und Heinz, 1970a).

Die Farbe von vakuumverpacktem Fleisch ist im Gegensatz zu aerob gelagertem Fleisch ein dunkleres Rot. Die Ursache hierfür ist das weitgehend anaerobe Milieu in der Vakuumverpackung. Der Muskelfarbstoff Myoglobin liegt dann überwiegend in der reduzierten Form vor, die eine dunkelrote Farbe besitzt (Heinz, 1974; Husband, 1982; Seideman und Durland, 1983; d' Alessandria und Pagliaro, 1975). Nach dem Öffnen der Vakuumverpackung und dem damit verbundenen Sauerstoffzutritt kehrt die hellrote Farbe zurück, der Muskelfarbstoff liegt wieder als Oxymyoglobin vor. Dieser Vorgang wird als Aufrötung bezeichnet. Da Verbraucher diese Zusammenhänge im Allgemeinen nicht kennen und eine hellrote Fleischfarbe bevorzugen, wird die Vakuumverpackung für Endverbraucherportionen von frischem, nicht mariniertem Fleisch nur selten eingesetzt (Tewari, 2002; Jeremiah, 2001; Lambert et al., 1991).

2.1.2.2 Mikrobielle Flora

Durch den Ausschluss von Sauerstoff entwickelt sich in der Vakuumverpackung eine anders zusammengesetzte Mikroflora als unter aeroben Bedingungen. Die aerobe, proteolytische Verderbnisflora, welche überwiegend aus Pseudomonaden besteht, wird bei der Vakuumverpackung durch den Sauerstoffausschluss und die erhöhte CO₂- Spannung nahezu vollständig gehemmt. Das anaerobe Milieu in Kombination mit niedrigem pH- Wert und Temperaturen in Gefrierpunktnähe bietet ideale Voraussetzungen für Milchsäurebakterien, vor allem *Lactobacillus* spp., die sich in der Vakuumverpackung innerhalb von wenigen Wochen zur dominierenden Flora entwickeln (Gill und Newton, 1978; Grau, 1981; Heinz, 1974; Tändler und Heinz, 1970b; Jones, 2004; Jones et al., 2008; Kaya und Schmidt, 1990).

Auch andere auf Fleisch vorkommende Mikroorganismen sind in der Lage, sich unter anaeroben Bedingungen zu vermehren. Dazu gehören kältetolerante Vertreter der *Enterobacteriaceae*, wie *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* und *Enterobacter* spp. Diese weisen jedoch bei Temperaturen unter 10 °C auf Fleisch mit normalem pH-Wert (5,6-5,8) eine wesentlich langsamere Wachstumsrate auf als Milchsäurebakterien (Grau, 1981). Ein zusätzlicher wachstumshemmender Effekt auf diese Organis-

men entsteht durch antimikrobielle Substanzen, welche von verschiedenen Milchsäurebakterien produziert werden, wie z.B. organische Säuren und Bacteriocine (Dubois et al., 1979; Bell und Garout, 1994; Jones et al., 2008; Katikou et al., 2005). *Enterobacteriaceae* stellen daher nur geringe Anteile der Mikroflora von vakuumverpacktem Frischfleisch (Grau, 1981; Borch et al., 1996; Egan, 1983; Gill, 1996; Jones, 2004).

Brochothrix thermosphacta, (frühere Bezeichnung *Microbacterium thermosphactum*), ist ebenfalls grundsätzlich in der Lage, sich auf vakuumverpacktem Fleisch zu vermehren. Auf Fleisch herrscht jedoch nach normalem Ablauf der postmortalen Glykolyse ein pH – Wert von 5,8 oder weniger. Unter diesen Bedingungen, in Kombination mit dem anaeroben Milieu in der Vakuumverpackung, wird *Brochothrix thermosphacta* an der Vermehrung gehindert (Campbell et al., 1979). Ähnliches gilt für *Shewanella putrefaciens*, auch diese Organismen können auf vakuumverpacktem Fleisch nur wachsen, wenn der pH-Wert bei 6 oder höher liegt (Gill, 1983). Diese beiden Organismen werden für vakuumverpacktes Fleisch nur dann relevant, wenn Fleisch mit DFD-Kondition verwendet wird (vgl. Kap. 2.1.3.2.2.)

2.1.2.3 Haltbarkeit

Zur maximalen Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben, da eine Reihe von Faktoren Auswirkungen auf die Haltbarkeit haben. Als wichtigste Einflussgröße ist hier die Lagerungstemperatur zu nennen, aber auch die Sauerstoffdurchlässigkeit des verwendeten Folienmaterials sowie die Ausgangskeimbelastung und der pH-Wert des verpackten Fleisches spielen eine entscheidende Rolle für die maximale Lagerdauer dieses Produkts (vgl. 2.1.3.2.1 und 2.1.3.2.2). Hinzu kommt, dass das Ende der Haltbarkeit von verschiedenen Autoren unterschiedlich interpretiert wird (vgl. 2.1.3.1 und 2.1.3.2). Die bei verschiedenen Temperaturen und Packstoffen gewonnenen Ergebnisse zur maximalen Lagerdauer sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Haltbarkeitsfristen von vakuumverpacktem Rindfleisch bei unterschiedlichen Temperaturen und O₂-Durchlässigkeitswerten

Haltbarkeit in Wochen	Temperaturbereich	O ₂ -Permeabilität der Folie in cm ³ /m ² /24h/ bar bei 20 °C	Quelle
4-5	0 °C	n.a.	Tändler und Heinz (1970b)
3-4	+2 °C	n.a.	Tändler und Heinz (1970b)
2-3	+4 °C	n.a.	Tändler und Heinz (1970b)
bis 2	+6 °C	n.a.	Tändler und Heinz (1970b)
10	-1 bis 0 °C	Verschiedene Folien mit unterschiedlicher Permeabilität, ohne Angabe definierter Werte	Heinz (1974)
10	-1 bis 0 °C	7	d' Alessandria und Pagliaro (1975)
10	-1 bis 0 °C	150	d' Alessandria und Pagliaro (1975)
11-15	0 °C	0 - 300	Rigg et al. (1978)
6-11	0 °C	300 - 1000	Rigg et al. (1978)
bis 12	0 bis +1 °C	25	Egan, (1983)
12,8	≤0 °C	40	Bell und Garout (1994)
9,4	0 °C	n.a.	Lee und Yoon (2001)

Aus den Angaben in Tabelle 1 geht hervor, dass eine maximale Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch nur bei strikter Einhaltung von Temperaturen in Gefrierpunktnähe erreichbar ist. Als ideale Lagertemperatur gilt allgemein der Wert von $-1,5 \pm 0,5$ °C, da dies die niedrigste mögliche Temperatur ist, bei der das Fleisch noch nicht gefriert, die Wachstumsraten von Mikroorganismen jedoch generell stark verlangsamt sind (Borch et al., 1996; Gill et al., 1988; Gill, 1996). Bereits geringe Abweichungen (im Bereich von 1-2 °C) von diesem Minimum haben erhebliche Verkürzungen der maximalen Haltbarkeit zur Folge (Gill, 1996; Hess et al., 1980).

Die für die Vakuumverpackung von Fleisch verwendeten Folien bestehen aus verschiedensten Kunststoffen, meist in Verbunden (Laminate oder Coextrudate). So können die Eigenschaften der verschiedenen Materialien zu einem Film mit speziellen Sperreigenschaften für Gase und Wasserdampf kombiniert werden, die zugleich den mechanischen Belastungen im Produktionsprozess und beim Transport standhalten. Eine gute Sperrwirkung für Sauerstoff besteht bei Werten unter

100 cm³/m²/24h/bar (gemessen bei 20–25 °C und 75% relativer Feuchte) (Eustace, 1981; Egan, 1983). Bei vergleichenden Untersuchungen zur Vakuumverpackung mit praxisüblichen Folien verschiedener Sauerstoffdurchlässigkeit wurden keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der sich entwickelnden Mikroflora festgestellt, jedoch zeigten die in hochgasdichten Folien verpackten Teilstücke ein besseres Aufrötungsvermögen (d' Alessandria und Pagliaro, 1975; Rigg et al., 1978; Heinz, 1974; Tändler und Lee, 1985).

2.1.3 Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch

2.1.3.1 Definition und Abgrenzung

Die Abgrenzung der erwünschten Reifung vom unerwünschten Verderb bereitet bei vakuumverpacktem Fleisch besondere Schwierigkeiten, da diese Prozesse langsam ineinander übergehen. Der Begriff der Haltbarkeit ebenso wie des Verderbs unterliegt sehr stark der subjektiven Einschätzung durch den Verbraucher.

Die deutsche Lebensmittelkennzeichnungsverordnung definiert Haltbarkeit als die Frist, innerhalb welcher ein Lebensmittel unter angemessenen Aufbewahrungsbedingungen seine spezifischen Eigenschaften behält (LMKV, 1999). Gehen diese spezifischen Eigenschaften verloren, so beginnt der allmähliche Prozess des Verderbs, der mit einer fortschreitenden Minderung der Verzehreignung einhergeht. Massiv verdorbene Lebensmittel fallen rechtlich unter die Bezeichnung „zum Verzehr durch den Menschen nicht geeignet“, und die Europäische Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit sowie das deutsche Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch regeln, dass solche Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden dürfen. Nach Fehlhaber et al. (2005) und Sinell (2004) umfasst diese Formulierung Lebensmittel, deren Genusstauglichkeit aufgrund stofflicher Veränderungen nicht oder nicht mehr gegeben ist. Dazu gehören Veränderungen der inneren und äußeren Beschaffenheit, des Aussehens, des Geruchs und Geschmacks, die sich so nachteilig auswirken, dass nach allgemeiner Verkehrsauffassung die Verzehreignung verloren gegangen ist. Für die Beurteilung „zum Verzehr nicht geeignet“ ist keine völlige Ungenießbarkeit vorausgesetzt. Selbst ein makroskopisch und sensorisch unverändertes Produkt kann so beurteilt werden,

wenn zum Beispiel Umstände bestehen, deren Kenntnis beim Verbraucher Ekel hervorrufen würden (Fehlhaber et al., 2005).

Laut Sinell (2004) beginnt Verderb, wenn in einem Lebensmittel stoffliche Umsetzungen oder sonstige Veränderungen eintreten, die seinen Gebrauchswert einschränken. Somit stellt Verderb einen dynamischen Vorgang mit fließenden Übergängen dar, der sein Endstadium im Verdorbensein des Lebensmittels findet (Wiegner, 1985).

Die Tätigkeit von Mikroorganismen führt dann zum Verderb, wenn deren Stoffwechselprodukte bzw. Zellmasse zu sinnfälligen, unerwünschten Veränderungen führen.

Die Unterscheidung der Zustände frisch / beginnender Verderb / verdorben bereitet mitunter Schwierigkeiten, denn zum einen müssen geringfügige Abweichungen auch beim Normalzustand toleriert werden, zum anderen sind Übereinkünfte, regionale Anschauungen, wirtschaftliche Gegebenheiten und subjektives Empfinden oft für die Beurteilung ausschlaggebend (Sinell, 2004; Fehlhaber et al., 2005).

2.1.3.2 Verderb ohne massive Gasbildung

Bei einwandfreier Kühlung, guter Schlacht- und Zerlegehygiene und ungestörtem Ablauf der postmortalen Glykolyse (pH- Wert unter 6,0) entsteht im vakuumverpackten Fleisch eine langsam wachsende, vorwiegend saccharolytische Flora von Milchsäurebakterien, vor allem *Lactobacillus* spp. (vgl. 2.1.2.2). Der Verderb durch solche Organismen setzt wesentlich später ein als bei aeroben Bedingungen und äußert sich in Geruchs- und Geschmacksabweichungen in Richtung sauer bis käsig (Egan, 1983; Baumgart, 2004; Jones, 2004). Diese Abweichungen entstehen durch die Akkumulation von Stoffwechselprodukten, vor allem kurzkettigen Fettsäuren, wie Milch-, Essig- und Buttersäure (Jones, 2004; Gill, 1983; Sutherland et al., 1976).

Solche Verderbssymptome treten in aller Regel erst mehrere Wochen nach Erreichen der maximalen Keimzahl im vakuumverpackten Rindfleisch auf (Gill, 1983; Sutherland et al., 1976).

Ein leichter säuerlicher Geruch, der nur unmittelbar nach dem Öffnen der Verpackung wahrnehmbar ist und innerhalb weniger Minuten verfliegt, tritt bei vakuumverpacktem Fleisch jedoch schon innerhalb der Haltbarkeit auf und wird von

vielen Autoren als normal bezeichnet (Heinz, 1974; Husband, 1982). Persistiert der Geruch jedoch oder kommen andere, unerwünschte Nuancen hinzu, wird dies als Verderb betrachtet (Lee und Yoon, 2001).

Generell wird das Verderbspotential der Milchsäurebakterien als relativ gering eingeschätzt, jedoch gibt es unter den einzelnen Vertretern dieser Gruppe erhebliche Unterschiede. Stämme, die Buttersäure bilden, besitzen ein höheres Verderbspotential (Jones, 2004), und einige Stämme von Milchsäurebakterien können zu einer Vergrünung an der Fleischoberfläche durch Sulfmyoglobinbildung führen (Egan, 1983). Aufgrund des verzögerten Eintretens der Verderbssymptomatik bezogen auf die Keimzahlentwicklung und des unterschiedlichen Verhaltens einzelner Vertreter der Milchsäurebakterien ist die Bestimmung der Gesamtkeimzahl bzw. Zahl der Milchsäurebakterien von sehr eingeschränktem Wert für eine Aussage über den Verderb des Produktes. Hohe Keimzahlen von 10^7 KbE/cm² und mehr kommen regelmäßig bei vakuumverpacktem Fleisch vor, ohne dass Verderb sinnfällig wird (Heinz, 1974; Bell und Garout, 1994; Sinell, 2004).

Vor diesem Hintergrund ist es nachvollziehbar, dass für vakuumverpacktes Rindfleisch derzeit keine rechtlich bindenden mikrobiologischen Referenzwerte festgelegt sind. Zur Beurteilung der Genußtauglichkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch sollten daher immer mikrobiologische und sensorische Methoden kombiniert werden (Wagner, 2006).

Nach Meinung einiger Autoren wird die Haltbarkeit von vakuumverpacktem Rindfleisch bei absolut optimalen Lagerungsbedingungen nicht durch den mikrobiellen Verderb, sondern vielmehr durch einen etwa ab der 10. Lagerungswoche einsetzenden Verlust des spezifischen Rindfleischaromas, der Fleischtextur sowie des Aufrötungs- und Farbhaltevermögens begrenzt (Bell und Garout, 1994; Heinz, 1974).

2.1.3.2.1 Verderb bei erhöhter Lagertemperatur oder Unterbrechung der Kühlkette

Liegt die Lagerungstemperatur oberhalb des Optimums ($-1,5 \pm 0,5$ °C), so spielen mit zunehmender Temperatur *Enterobacteriaceae* eine größere Rolle für den Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch (Grau, 1981). Der Eintritt des Verderbs durch diese Organismen hängt zeitlich stark von der Verfügbarkeit von Glucose auf der Fleischoberfläche ab. Da Glucose vor anderen Substraten bevorzugt verstoffwech-

selt wird, wird dieses Substrat von den auf der Oberfläche befindlichen Mikroorganismen ständig entfernt, und es bildet sich ein Konzentrationsgradient zwischen Oberfläche und dem Inneren des Teilstücks aus. Fällt nun die Diffusionsgeschwindigkeit der Glucose unter die Rate der Verstoffwechselung durch die Mikroorganismen, so greifen *Enterobacteriaceae* auf andere Substrate wie Aminosäuren, Lactat, und Glucose-6-Phosphat zurück und bilden schließlich Proteasen, wodurch es zur Fäulnis kommt (Grau und Macfarlane, 1980; Newton und Gill, 1978). Durch Kühlbedingungen in Gefrierpunktnähe in Verbindung mit niedriger Anfangskontamination kann der Verderb durch diese Organismen effektiv verhindert werden (Grau, 1981; Jones, 2004).

2.1.3.2.2 Verderb bei Vakuumverpackung von DFD-Fleisch

Grundsätzlich ähnlich verläuft der Verderb, wenn Fleisch von DFD-Kondition vakuumverpackt wird. DFD steht für Dark, Firm, Dry: Solches Fleisch hat ein dunkles Aussehen sowie ein erhöhtes Wasserbindungsvermögen und eine leimige, klebrige Konsistenz (Fischer, 1988b; Fischer, 1988a). Bei Rindfleisch wird auch die Abkürzung DCB (Dark Cutting BeeF) verwendet. Ursache für diese Abweichung ist eine Erschöpfung der Kohlehydratreserven *ante mortem* durch eine erhöhte Stoffwechselbelastung des Tiers, zum Beispiel aufgrund von Transport- oder Hungerbelastung. Bei gesunden, ausgeruhten Tieren werden die vorhandenen Kohlenhydrate im Zuge der postmortalen Glykolyse zu Lactat abgebaut. Damit geht eine pH-Wert-Absenkung von etwa 7,0 im lebenden Muskel auf etwa 5,8 bis 5,4 nach 24 Stunden einher. Bei DFD-Muskulatur findet diese Säurebildung durch Mangel an Substrat nur unzureichend statt, und der pH-Wert stabilisiert sich bei Werten von 6,0 oder höher. Als definitive Grenze zur Unterscheidung von DFD- und normalem Fleisch werden unterschiedliche Werte zwischen 5,8 und 6,4 angegeben, meist liegt die genannte Grenze bei 6,0 oder 6,2 (Fischer, 1988b). Durch die verminderte Säuerung fehlt eine wesentliche Hürde für bestimmte Mikroorganismen, die sich ansonsten auf vakuumverpacktem Fleisch nicht vermehren können. Die wichtigste Rolle spielen hier *Brochothrix thermosphacta* und *Shewanella putrefaciens* (Borch et al., 1996). *Brochothrix thermosphacta* verursacht bei DFD-Fleisch innerhalb kurzer Zeit Verderb durch Säuerung und Fäulnis, die Vermehrung von *Shewanella putrefaciens* führt über die Produktion von Schwefelwasserstoff zur Bildung von grünem Sulfmyoglobin

und zu Fäulnisgeruch (Gill und Newton, 1979). Auch die bereits erwähnten kältetoleranten *Enterobacteriaceae* werden bei dem erhöhten pH-Wert von DFD-Fleisch weniger gehemmt als bei Rindfleisch mit normalem Ablauf postmortalen Prozesse (Patterson und Gibbs, 1977). Weiterhin weist Rindfleisch mit erhöhtem pH-Wert eine niedrigere Glucosekonzentration auf als solches mit normalem pH-Wert. Die Verfügbarkeit von Glucose als Substrat für die Mikroorganismen nimmt schneller ab, so dass diese schon zu einem früheren Zeitpunkt proteolytische Stoffwechselwege aktivieren, was sich schließlich in vorzeitigem Verderb mit Fäulnis äußert. DFD-Fleisch sollte aufgrund der genannten Eigenschaften und der Möglichkeit einer Vermehrung von *Listeria monocytogenes* generell nicht zur Bevorratung und somit auch nicht zur Vakuumlagerung eingesetzt werden (Bem et al., 1976; Kaya und Schmidt, 1990; Grau und Vanderlinde, 1990).

2.1.3.3 „Blown Pack Spoilage“

Der Ausdruck „Blown Pack Spoilage“ bezeichnet im englischen Sprachgebrauch den Verderb vakuumverpackten Frischfleisches unter Produktion von teilweise erheblichen Mengen Gas, was zum Aufblähen der Verpackung (Bombage) führt. Diese Art von Verderb tritt auch bei intakter Kühlkette und teilweise deutlich vor Ablauf der üblichen Haltbarkeitsfristen auf und wurde Ende der Achtziger Jahre erstmalig beschrieben (Dainty et al., 1989). Als Verursacher wurden verschiedene psychrotrophe und psychrophile Clostridienarten, vor allem *C. estertheticum*, identifiziert (vgl. 2.3.3), deren Vermehrung neben der erwähnten Gasbildung auch zu massiven Geruchsabweichungen führt. Bisher liegen wenig Daten zum Vorkommen dieser Art von Verderb und zur Verbreitung der verursachenden Clostridien vor (Broda et al., 1997). Nach aktuellen Arbeiten ist eine zunehmende Häufung von Berichten über diese Art von Abweichungen zu beobachten (Boerema et al., 2007; Broda, 2007), und Hadorn et al. (2008) dokumentierten erstmalig Blown Pack Spoilage bei Rindfleisch im deutschsprachigen Raum.

Verderb von verpacktem Frischfleisch mit Gasbildung und Geruchsabweichung nach Unterbrechung der Kühlkette wurde bereits früher beschrieben (Hanna et al., 1979), und als verursachende Mikroorganismen *Hafnia alvei* und heterofermentative *Lactobacillus* spp. genannt.

In Neuseeland wurden Fälle von Blown Pack Spoilage bei intakter Kühlung untersucht, bei denen eine Beteiligung von Clostridien ausgeschlossen wurde. Im Zuge der Untersuchungen wurden verschiedene *Enterobacteriaceae* isoliert, deren Fähigkeit zur Gasbildung in vakuumverpacktem Lammfleisch bei 4 °C nachgewiesen wurde. Die entsprechenden Mikroorganismen wurden als Vertreter der Genera *Hafnia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Rahnella* und *Ewingella* klassifiziert (Brightwell et al., 2007).

Eine ähnliche Form von Verderb kann durch *Leuconostoc gasicomitatum* in mariniertem Hühnerfleisch (Björkroth et al., 2000) verursacht werden. Auch hier kommt es zu massiver Gasproduktion und Aufblähen der Verpackung, jedoch in Verbindung mit einem starken pH-Wert-Anstieg. Diese Art von Verderb wurde in Packungen mit modifizierter Atmosphäre beobachtet. Die Gasbildung entsteht hier durch Decarboxilierung von Aminosäuren und der pH-Wert steigt aufgrund der nachfolgenden Desaminierung der Aminosäuren. Diese Form des Verderbs wird auch „protein swell“ genannt.

2.1.3.4 Verderbspotential von Hefen auf Fleisch und Fleischerzeugnissen

Hefen wurden als potentielle Verderberreger von Fleisch und Fleischerzeugnissen bis vor kurzem kaum beobachtet. Diese Organismen sind jedoch seit langem bekannt als Verderberreger von Obst, Gemüse, Milchprodukten und verschiedenen Getränken (Phaff et al., 1966; Samson et al., 1995). Es wird verschiedentlich erwähnt, dass Hefen auch auf Fleisch regelmäßig vorkommen, eine massive Vermehrung oder ein Verursachen von Verderbsgeschehen wurden in diesem Zusammenhang jedoch nicht beschrieben. Hefen können außerdem einen Hauptanteil der Mikroflora von bestimmten Fleischprodukten mit hohem Salzgehalt wie Schinken oder Speck stellen (Phaff et al., 1966), ohne dass Verderberscheinungen auftreten. Lowry und Gill (1984) fanden heraus, dass die Mikroflora von Lammfleisch bei verlängerter Lagerung bei -5 °C von Hefen dominiert wird, und wiesen auf eine potentielle Verderbsgefahr bei Fleisch durch diese Organismen hin. In der neueren Literatur wird auch der Verderb von Wurst- und Fleischwaren durch Wachstum von Hefen auf der Oberfläche mit Farbveränderungen, Gasproduktion in Verpackungen und Geruchs- bzw. Geschmacksabweichungen beschrieben (Diriye et al., 1993; Ismail et al., 2000; Loureiro und Querol, 1999; Quiros et al., 2008; Sanz et al., 2005). Derzeit liegen keine Daten

über einen Fall von Verderb durch Hefen bei vakuumverpacktem frischem Rindfleisch vor.

2.2 Psychrotrophe und psychrophile Mikroorganismen

2.2.1 Begriffsklärung

Die Vorsilbe „psychro–“ stammt von dem griechischen Wort psychròs und steht für kühl oder kalt. Mit Begriffen wie „psychrotroph“, „psychrotolerant“ oder „psychrophil“ werden Mikroorganismen bezeichnet, die auch bei Kühl- oder Gefriertemperaturen überleben und sich vermehren. Die genaue Definition dieser Begriffe wurde von verschiedenen Autoren seit Beginn des 20. Jahrhunderts mehrfach diskutiert, wobei kein Konsens für eine allgemein gültige Definition dieser Ausdrücke erzielt wurde (Köpke, 2002). In der Literatur werden die Begriffe zum Teil synonym verwendet, was mitunter zu Missverständnissen führt. In dieser Arbeit werden die Begriffe psychrotroph und psychrophil entsprechend der in Tabelle 2 dargestellten Einteilung verwendet.

Tabelle 2: Einteilung von Mikroorganismen auf der Grundlage ihrer Temperaturanforderungen für eine Vermehrung (Fehlhaber und Janetschke, 1992; ICMSF, 1980; Krämer, 2002)

Keimgruppe	Temperatur (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophile	-10 bis 5	10 bis 15	15 bis 20
Psychrotrophe	-5 bis 5	20 bis 30	30 bis 35
Mesophile	5 bis 10	30 bis 45	35 bis 47
Thermophile	25 bis 45	50 bis 80	60 bis 85

Nach dieser Tabelle werden die Organismen entsprechend der Temperaturbereiche klassifiziert, in denen ihr Wachstumsoptimum liegt, was durch die Nachsilbe –phil (philein [griech.] = lieben) zum Ausdruck kommt. Die Nachsilbe –troph (tréphein [griech.] = ernähren) wird für Organismen verwendet, die sich auch bei Temperaturen weit unterhalb ihres Optimums, wenn auch erheblich eingeschränkt, vermehren kön-

nen. In einigen Arbeiten wird für diese Keime auch der Begriff psychrotolerant verwendet.

Die Einteilung entsprechend der Temperaturbereiche wird auch in Abbildung 2 deutlich, in der die Wachstumsraten verschiedener Gruppen von Mikroorganismen bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt sind. Die Vermehrungsrate nimmt bei allen Gruppen mit sinkender Temperatur ab, jedoch können psychrophile Mikroorganismen im Bereich von wenigen Grad Celsius schneller wachsen als die psychrotrophen. Solche an Kälte adaptierten Organismen werden primär in permanent kalten Umgebungen, wie zum Beispiel Polarregionen und Ozeanen nachgewiesen (Wynn-Williams, 1990; Morita, 1975; Bowman et al., 1997; Shcherbakova et al., 2005; Gill, 2002).

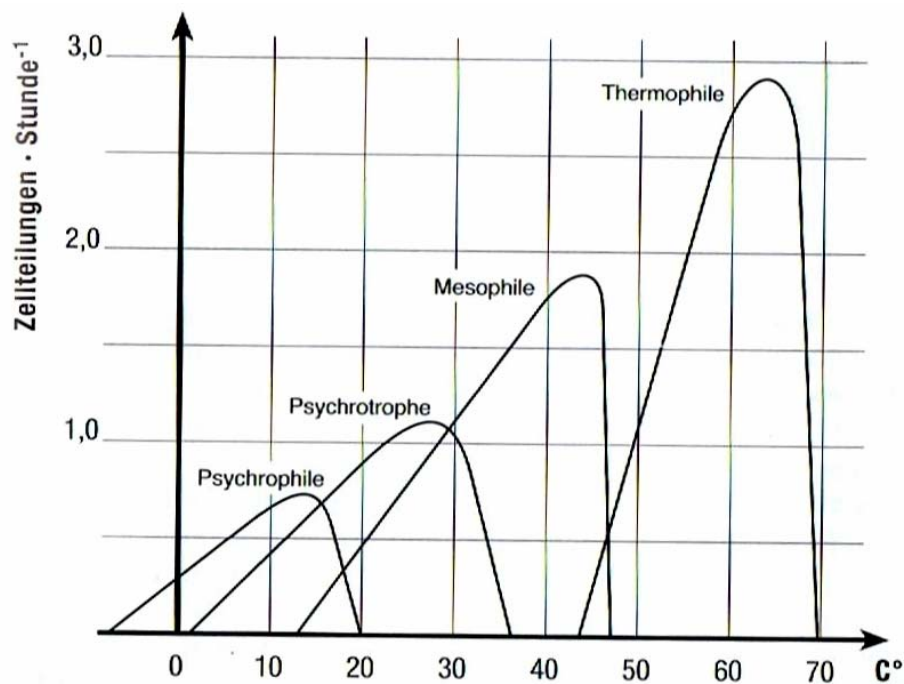


Abbildung 2: Wachstumsraten von Mikroorganismen mit unterschiedlichem Temperaturoptimum nach Schmidt-Lorenz (1979)

2.2.2 Lebensmittelrelevante psychrotrophe bzw. psychrophile Mikroorganismen

Kältetolerante Mikroorganismen spielen vor allem in gekühlten Lebensmitteln eine entscheidende Rolle. Durch die Kühlung werden sich von den auf dem jeweiligen Lebensmittel initial vorhandenen Keimen nur solche Organismen vermehren können, die dazu auch bei Kühltemperaturen fähig sind.

Da die meisten pathogenen Mikroorganismen aufgrund ihrer hohen Spezialisierung einen relativ engen Wachstumsbereich um 37 °C haben, gilt die Kühlung als effektives Mittel, um eine Vermehrung von Pathogenen auf Lebensmitteln zu verhindern. Dadurch wird die Sicherheit von Lebensmitteln wesentlich erhöht, jedoch können einige pathogene Spezies wie *Listeria monocytogenes* oder *Yersinia enterocolitica* sich auch auf gekühlten Lebensmitteln vermehren (vgl. Tabelle 3).

Die meisten Keime, die auf gekühlten Lebensmitteln vorkommen, sind Psychrotrophe, welche sowohl vor Beginn der Kühlung bei mittleren Temperaturen als auch in der Kühlphase (eingeschränkt) vermehrungsfähig sind. Zu dieser Gruppe gehören viele Verderberreger, wie die *Pseudomonas*–*Acinetobacter*–*Moraxella*-Assoziation auf eiweißreichen Lebensmitteln wie Fleisch und Fleischprodukten, aber auch auf Fisch und anderen Seetieren, Eiern und Milch (Kraft, 1992). Psychrotrophe *Bacillus*-Arten kommen z.B. auf Eiern und bestimmten Milchprodukten vor (Griffiths und Phillips, 1990; Collins, 1981). Weiterhin spielen bestimmte psychrotrophe Stämme der *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* und *Achromobacter* spp. auf verschiedenen Lebensmitteln eine Rolle. Eine überwiegend grampositive milchsäurebildende, häufig psychrotrophe Flora aus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Streptococcus* und *Pediococcus* spp. weisen Rohwurst, Pökelfleischerzeugnisse, Sauermilchprodukte und viele Käsesorten sowie Salzgemüse auf (Baumgart, 2004; Sinell, 2004). Bei diesen Lebensmitteln tragen psychrotrophe Mikroorganismen zum typischen Aroma und zur mikrobiologischen Stabilität bei und werden teilweise gezielt als Starterkulturen zugesetzt. In anderen Lebensmitteln wie zum Beispiel Brühwurst sind solche Organismen unerwünscht, und die Säurebildung wird als Verderb betrachtet (Sinell, 2004).

Psychrophile Bakterien kommen auf Lebensmitteln relativ selten vor, da deren übliche Habitate sich überwiegend fern der Lebensmittelproduktion befinden (vgl. 2.2.1). Dies gilt jedoch nicht für bestimmte Arten von Muscheln und Seefisch, da

diese zum Teil aus eben solchen Habitaten stammen. Hier können neben Pseudomonaden zum Beispiel psychrophile *Vibrio* spp. Verderb verursachen (Schmidt-Lorenz und Farkas, 1961; Makarios-Laham und Lee, 1993). Einige psychrophile Hefen und Schimmelpilze können noch bei -15 °C wachsen und zu Schwarzfleckigkeit bei Gefrierfleisch führen (Sinell, 2004; Samson et al., 1995).

Verderb durch psychrotrophe und psychrophile *Clostridium* spp. wurde außer bei Fleisch auch bei Kartoffeln und Milch beschrieben (Brocklehurst und Lund, 1982; Bhadsavle et al., 1972).

Eine Zusammenfassung verschiedener kältetoleranter Mikroorganismen, welche auf Lebensmitteln vorkommen, gibt Tabelle 3. Die angegebenen Werte sind zum Teil stammspezifisch und können nicht für alle Stämme einer Spezies verallgemeinert werden.

Tabelle 3: Minimale Wachstumstemperaturen von psychrotrophen bzw. psychrophilen pathogenen und anderen lebensmittelrelevanten Mikroorganismen (Sinell, 2004)

	Art bzw. Gattung	Minimale Wachstumstemperatur °C
Pathogene bzw. potentielle Pathogene	<i>Salmonella</i>	5,3
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0
	<i>Listeria monocytogenes</i>	1-3
	<i>Clostridium botulinum</i> Typ E**	3,3
	<i>Fusarium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	-10 bis -18
Index- und Indikatorkeime	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.	0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0
Verderberreger	<i>Enterococcus faecium</i>	0 bis 3
	<i>Lactobacillus</i> spp.	1
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-3
	<i>Achromobacter</i> spp.	-4
	<i>Bacillus psychrophilus</i> , <i>Bacillus insolitus</i>	-5 bis -7
	Hefen	-12

** und einige nichtproteolytische Typ-B- und Typ-F-Stämme

2.2.3 Psychrotrophe und psychrophile Clostridien auf Fleischerzeugnissen

Die meisten älteren Arbeiten, die sich mit Clostridien auf Fleisch und Fleischerzeugnissen beschäftigen, konzentrieren sich vor allem auf *C. botulinum* und *C. perfringens* (Hall und Angelotti, 1965; Eisgruber, 1986), welche als Lebensmittelinfektions- bzw. -intoxikationserreger von lebensmittelhygienischer Bedeutung sind. Andere Clostridien werden als häufige Verderberreger, insbesondere von Fleisch- und Wurstkonserven, genannt. Nach Eisgruber und Stolle (1992) ist die initiale Belastung von Fleisch und Fleischerzeugnissen mit Clostridien als gering anzusehen. Eine Vermehrung von Clostridien auf frischem Fleisch wurde vor allem im Zusammenhang mit unsachgemäßer Behandlung, wie schlechter Hygiene und unzureichenden Kühlmaßnahmen, thematisiert (Roberts und Mead, 1986; Gill, 1979; Eisgruber, 1992).

Der Verderb von Frischfleisch durch Clostridien wurde erstmals als Tiefenfäulnis, vor allem in Knochennähe („bone-taint“) beschrieben. Als Verursacher wurden mesophile Clostridien und *C. putrefaciens* (psychrotroph) festgestellt (Callow und Ingram, 1955; Ingram, 1952; Ross, 1965). Mit der Entwicklung leistungsfähiger Kühlsysteme wurde diese Art von Verderb als beherrschbar betrachtet (Roberts und Mead, 1986).

Die beiden ersten Studien über verderbsrelevante psychrophile Clostridien auf Frischfleisch stammen aus den USA und Großbritannien (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989). Beide beschreiben das Bild von Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Rindfleisch mit massiver Gasbildung und Verderbgeruch trotz einwandfreier Kühlung und weit vor Ablauf der erwarteten Haltbarkeitsfrist. In beiden Fällen wurden psychrophile Clostridien aus dem verdorbenen Fleisch isoliert, welche in Inokulationsversuchen den Verderb reproduzieren konnten. Die isolierten Organismen wurden jeweils als neue Spezies *Clostridium estertheticum* (Collins et al., 1992) beziehungsweise *Clostridium laramie* (Kalchayanand et al., 1993) beschrieben. Der Name *C. laramie* wurde zwischenzeitlich zu *C. laramiense* korrigiert (Trüper und DeClari, 1997). Später wurden die beiden Organismen als Subspezies *estertheticum* und *laramiense* von *C. estertheticum* zusammengefasst (Spring et al., 2003, siehe auch 2.3).

Lawson et al. (1994) beschrieben eine weitere neue Spezies von anaeroben Sporenbildnern, die aus vakuumverpacktem gekühltem Schweinefleisch isoliert wurde. In diesem Fall wurde keine Gasbildung erwähnt, jedoch traten hochgradige Geruchsabweichungen auf. Der Organismus war psychrotroph mit einem Wachstumsoptimum

im Bereich von 25-30 °C und vermehrte sich auch bei 4 °C (niedrigste getestete Temperatur). Das Isolat konnte keiner bekannten Spezies zugeordnet werden und wurde *C. algidicarnis* genannt.

1996 wurden in Neuseeland Fälle von Blown Pack Spoilage untersucht, bei denen vakuumverpackte Teilstücke vom Rind, Lamm und Wild, sowie ein erhitztes Fleischprodukt in gasdichter Folienverpackung betroffen waren (Broda et al., 1996a). Auch in diesen Fällen wurden Kühltemperaturen im Bereich von -1,5 bis +2 °C konstant eingehalten. Aus den betroffenen Produkten wurden verschiedene psychrotrophe Clostridienstämme isoliert, die zum Teil als *C. difficile*, *C. beijerinckii* und *C. lituseburense* identifiziert wurden, zum Teil jedoch keiner bekannten Spezies zugeordnet werden konnten. Nur einer der isolierten Stämme verursachte in Inokulationsversuchen eine ähnliche Art von Verderb wie in den untersuchten Produkten. Daher wurde vermutet, dass eventuell ein Synergismus mehrerer Organismen für den Verderb verantwortlich war. Alle anderen in der Arbeit untersuchten Keimgruppen waren unauffällig. Die Gesamtkeimzahl lag für die vakuumverpackten Frischfleisch-Teilstücke bei etwa 10^7 KbE/ml Tropfsaft, den Hauptanteil der Mikroflora stellten Milchsäurebakterien (10^5 bis 10^7 KbE/ml), *Enterobacteriaceae* kamen in Zahlen von $<10^2$ bis etwa 10^4 KbE/ml vor. Bei den erhitzten Produkten lag die Gesamtkeimzahl bei 10^3 KbE/ml, *Enterobacteriaceae* und *Brochothrix thermosphacta* lagen unter 10^2 KbE/ml.

Von der gleichen Arbeitsgruppe wurden Fälle von Tiefenfäulnis bei vakuumverpackten Gliedmaßen vom Lamm beobachtet (Broda et al., 1996b), bei denen ebenfalls ein Versagen der Kühlung ausgeschlossen werden konnte. Hier wurden Geruchsabweichungen in Richtung „käsig“ festgestellt, sobald das Kniegelenk eröffnet wurde. Aus diesen Proben wurden psychrotrophe Clostridien aus dem Gelenkinnenraum, nicht aber aus Tropfsaft nachgewiesen. Nach Broda et al. (1996b) befanden sich daher in diesen Fällen die Organismen zum Zeitpunkt der Schlachtung bereits im Gewebe und gelangten nicht in Folge einer nachträglichen Oberflächenkontamination auf das Fleisch.

In Neuseeland wurden daraufhin unverdorbene Teilstücke vom Rind und Lamm unterschiedlicher geographischer Herkunft innerhalb Neuseelands (n=45) erworben und nach Lagerung bei -1,5 °C beziehungsweise +15 °C mittels kultureller Methoden auf das Vorkommen von psychrophilen und psychrotrophen Clostridien untersucht

(Broda et al., 1997). Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass 51% der Proben mit Clostridien, die ein Wachstum bei 5 °C aufwiesen, kontaminiert waren. Die Mehrzahl dieser Isolate war jedoch bei -1,5 °C nicht vermehrungsfähig. Psychrophile Clostridien wurden nur vereinzelt nachgewiesen. Nach dieser Arbeit bestand kein Zusammenhang zwischen der Kontaminationsrate mit kältetoleranten Clostridien und der Herkunft der Proben aus kühleren Gebieten.

Kalinowski und Tompkin (1999) berichteten über sporadisch auftretende Fälle von Pack Blowing trotz adäquater Kühlung bei erhitzten vakuumverpackten Rindfleisch- und Putenfleischprodukten in den USA. Es konnten zwei Typen von kältetoleranten Clostridien in diesem Zusammenhang isoliert werden, von denen die Isolate aus Rindfleisch als *C. laramie* (jetzige Bezeichnung *C. estertheticum* subsp. *laramiense*) identifiziert wurden, während die Isolate aus Putenbrust keiner bis dahin beschriebenen Spezies zugeordnet werden konnten.

1999 wurde erneut eine neue Spezies kältetoleranter Clostridien beschrieben (Broda et al., 1999), die im Zusammenhang mit Blown Pack Spoilage, jedoch nach Unterbrechung der Kühlkette, isoliert wurde. Die neue Spezies wurde *Clostridium frigidicarnis* genannt. Dieser Organismus hat ein Wachstumsminimum von 3,8 °C, kann jedoch mit einem Wachstumsoptimum von 30-38,5 °C und einer maximalen Vermehrungstemperatur von 40,5 °C nicht als psychrotroph im Sinne von Tabelle 2 bezeichnet werden. Diese Organismen führten im Inokulationsversuch nicht zu Blown Pack Spoilage bei Kühltemperaturen und bilden möglicherweise einen Teil der Normalflora von gekühltem vakuumverpacktem Fleisch.

Auch *C. algidixylanolyticum* (Broda et al., 2000b) wurde aus verdorbenem, ungenügend gekühltem vakuumverpacktem Lammfleisch isoliert. Diese Spezies wurde phylogenetisch unter Cluster XIVa (Collins et al., 1994) des Genus *Clostridium* eingeordnet, welcher einige phänotypisch und phylogenetisch sehr heterogene Organismen enthält. Die Autoren halten deshalb eine taxonomische Reklassifizierung für wahrscheinlich. Diese Organismen sind psychrotroph, sie können sich bei Temperaturen von 2,5 bis 32,2 °C vermehren, das Temperaturoptimum liegt bei 25,5 bis 30,0 °C. Als besondere Eigenschaft dieser Spezies ist die Fähigkeit zur Xylan-Degradation zu nennen. Eine Beteiligung an Blown Pack Spoilage wurde für diese Spezies nicht beschrieben.

Aus vakuumverpacktem Lammfleisch wurde in Neuseeland eine weitere neue Spezies, *Clostridium gasigenes* (Broda et al., 2000c), im Zusammenhang mit Blown Pack Spoilage isoliert. Die Organismen produzierten im Inokulationsversuch Gas bei einer Kühltemperatur von 2 °C in vakuumverpacktem Fleisch. Die Gasbildung war jedoch weniger ausgeprägt als in mit *C. estertheticum* inokulierten Packungen. *C. gasigenes* hat ein Wachstumsminimum von -1,5 °C oder weniger (niedrigste überprüfte Temperatur), die optimale Temperatur beträgt 20-22 °C, Wachstumsobergrenze ist 26 °C. Der Organismus wird damit von den Autoren als psychrophil beschrieben, aufgrund bereits genannter Uneinigkeit bezüglich dieser Ausdrücke (vgl. 2.2.1) bezeichnen Spring et al. (2003) ihn als psychrotroph. Entsprechend der in Tabelle 2 beschriebenen Einteilung würde er ebenfalls als psychrotroph eingeordnet, jedoch liegt das Wachstumsmaximum leicht unter dem für Psychrotrophe angegebenen Bereich.

2.2.4 Toxinbildungsvermögen von kältetoleranten Clostridien auf Fleisch

Einige aus vakuumverpacktem Rind- und Lammfleisch isolierte kältetolerante Clostridienstämme zeigten genetische Übereinstimmungen mit *C. botulinum* (Moorhead und Bell, 1999). Diese Stämme wurden mittels PCR auf codierende Gene für Botulinumtoxin der Typen A,B,E,F und G untersucht und die Toxinproduktion im Inokulationsversuch mit Lammfleisch überprüft (Broda et al., 1998a; Moorhead und Bell, 1999). Bei den Isolaten aus vakuumverpacktem Fleisch konnten weder Toxin-codierende Gene, noch Toxinproduktion im inokulierten, vakuumverpackten Lammfleisch nachgewiesen werden. Jedoch wurde in den mit psychrotrophen toxinogenen *C. botulinum*-Referenzstämmen inokulierten Kontrollen die Produktion von Botulinumtoxin bis zu einer Temperatur von +2 °C nachgewiesen. Eine natürliche Kontamination mit toxinogenen psychrotrophen *C. botulinum* wurde bisher nicht beschrieben. Um die Produktsicherheit von vakuumverpacktem Fleisch zu gewährleisten, wurden dennoch Kühltemperaturen von maximal 0 °C gefordert (Moorhead und Bell, 1999; Moorhead und Bell, 2000).

Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es keine Hinweise auf Erkrankungen beziehungsweise Intoxikationen, die mit dem Verzehr von Fleisch assoziiert wurden, welches mit psychrophilen oder psychrotrophen Clostridien belastet war.

2.3 *Clostridium estertheticum* / *Clostridium estertheticum*-like Organismen

C. estertheticum ist neben *C. gasigenes* die einzige bisher klassifizierte Clostridienspezies, die nachweislich und reproduzierbar Blown Pack Spoilage bei Kühltemperaturen verursachen konnte (vgl. 2.2.3).

Nach der Erstbeschreibung zweier Spezies, *C. estertheticum* und *C. laramie* (Collins et al., 1992; Kalchayanand et al., 1993) wurden diese nach vergleichenden Untersuchungen von Spring et al. (2003) als *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* und *C. estertheticum* subsp. *laramiense* eingeordnet.

Das Verderbspotential von *C. estertheticum* wurde in verschiedenen Challengeversuchen bestätigt. Dainty et al. (1989) reproduzierten Gasbildung und Geruchsabweichung in sterilen, mit etwa 10^6 Zellen von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* inokulierten Steaks vom Rind, und auch Kalchayanand et al. (1993) stellten bei mit *C. estertheticum* subsp. *laramiense* inokuliertem Rindfleisch das Auftreten von Blown Pack Spoilage nach etwa 1-2 Wochen Lagerung bei 1-2 °C fest. In den von Boerema et al. (2007) mit *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* durchgeführten Lagerungsversuchen mit inokuliertem Rindfleisch bei +2, 0 und -1,5 °C und zwei verschiedenen Kontaminationsdosen (4 und 40 KbE/cm²) setzte Blown Pack Spoilage durchschnittlich zwischen dem 25. und 43. Lagerungstag ein, wobei die bei +2 °C gelagerten Stücke mit dem höheren Inokulum am frühesten Gasbildung zeigten.

Als „*Clostridium estertheticum*-like strains“ werden verschiedene in Neuseeland isolierte psychrophile Clostridienstämme bezeichnet, die ähnliche Eigenschaften wie *C. estertheticum* aufweisen, deren taxonomischer Status jedoch noch ungeklärt ist (Broda et al., 2003b; Broda et al., 2000a). Diese Stämme wurden aus vakuumverpacktem Wildfleisch isoliert, und mittels Inokulationsversuchen ihre Fähigkeit, Pack Blowing von vakuumverpacktem Fleisch bei Kühltemperaturen von 2 °C zu verursachen, bestätigt (Broda et al., 2002).

2.3.1 Eigenschaften von *C. estertheticum*

2.3.1.1 Allgemeine Eigenschaften

C. estertheticum ist ein grampositives, obligat anaerob wachsendes Stäbchenbakterium, welches phylogenetisch dem Cluster I (Collins et al., 1994) des Genus *Clostridium* zugeordnet ist. Clostridien gehören zu den endosporenbildenden Mikroorganismen. Endosporen stellen eine resistente Dauerform dar, die es Bakterien ermöglicht, bei Bedingungen, unter denen kein Wachstum möglich ist bzw. unter denen die vegetativen Formen absterben, lange Zeiträume zu überdauern und bei günstigeren Bedingungen wieder auszukeimen und sich zu vermehren. Bakterielle Sporen besitzen im Vergleich zu vegetativen Zellen generell eine erhöhte Resistenz gegenüber vielen schädlichen Umwelteinflüssen wie Hitze, ionisierender Strahlung und Chemikalien (Mardigan et al., 2000). Hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit von Sporen gegenüber verschiedenen Stressfaktoren gibt es spezies- und stammspezifische Unterschiede, wobei für *C. estertheticum* hierzu wenige Daten vorliegen (vgl. 2.3.4).

2.3.1.2 Morphologie

Die vegetativen Zellen von *C. estertheticum* sind etwa 1,3 – 1,5 µm breite und 2,4 – 6 µm, bei *C. estertheticum* subsp. *laramiense* auch bis zu 10 µm lange Stäbchen, die durch peritriche Begeißelung beweglich sind. Sie kommen einzeln, in Paaren oder gelegentlich in kurzen Ketten vor (Collins et al., 1992; Kalchayanand et al., 1993; Spring et al., 2003).

Die Endosporen sind oval und befinden sich zumeist in subterminaler, manchmal aber auch in zentraler oder terminaler Position.

Die Kolonien von *C. estertheticum* subsp. *laramiense* werden von Kalchayanand et al., (1993) als klein, grau-weißlich, glatt und konvex mit Ausbildung einer β -Hämolyse beschrieben. In der Erstbeschreibung von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (Collins et al., 1992) werden keine Angaben zur Koloniemorphologie und zum Hämolyseverhalten gemacht. Helps et al. (1999) beschreiben *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* als β -hämolytisch. Spring et al., (2003) beschreiben die Kolonien beider Subspezies als rund (1-2 mm Durchmesser), oft mit grob gekörnten Rändern, glatt, leicht erhaben, creme-weiß bis gräulich und durchscheinend bis undurchsichtig. Bei Spring et al. (2003) wurde β -Hämolyse nur bei der Subspezies *laramiense* beobachtet.

miense beobachtet, während die Subspezies *estertheticum* als nicht hämolytisch beschrieben wurde.

2.3.1.3 Temperaturbereich

Beide Subspezies von *C. estertheticum* sind psychrophil, jedoch bestehen Unterschiede hinsichtlich der optimalen und maximalen Wachstumstemperatur. Die in verschiedenen Studien ermittelten Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Temperaturbereiche für das Wachstum von *C. estertheticum*

Temperatur / °C	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>		<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>
Minimum	≤ -3	(1)	+1 (2)
Optimum	6-8	(3)	15 (2,3)
Maximum	13	(3)	21 (2,3)
		15 (1)	

(1) : Kalchayanand et al. (1993). Der als Minimum angegebene Wert stellt die niedrigste überprüfte Temperatur dar.

(2) : Collins et al. (1992). Die Arbeit enthält keine Angabe darüber, ob tiefere Temperaturen als +1 °C überprüft wurden

(3) : Spring et al. (2003)

2.3.1.4 Biochemische Charakteristika

Die biochemischen Reaktionen von *C. estertheticum* sind in Tabelle 5 unter Angabe der entsprechenden Quellen zusammengefasst. Zur Verstoffwechselung von Arabinose, Cellobiose, Glycogen, Inulin und Xylose wurden in den unterschiedlichen Studien abweichende Ergebnisse erzielt.

Beim einem Wachstum von *C. estertheticum* entstehen relativ große Mengen an Gas, dessen Hauptbestandteile Wasserstoff und Kohlendioxid stellen (Spring et al., 2003; Collins et al., 1992). Weiterhin entstehen verschiedene flüchtige Carbonsäuren, vor allem Buttersäure, aber auch Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure und andere in variablen Anteilen (Collins et al., 1992; Kalchayanand et al., 1993; Spring et al., 2003). Eine aktuelle Studie zum Stoffwechsel von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* in Meat Juice Medium (MJM) zeigte, dass bei Verstoffwechselung von Glucose vor allem Butyrat und Acetat gebildet werden, während bei Utilisation von Lactat vor allem Butanol und Butyrat entstehen (Yang et al., 2009). Bei Wachstum auf Fleisch wurde bei der Untersuchung der gasförmigen Bestandteile darüber hinaus eine komplexe Mischung von Ester- und Schwefelverbindungen nachgewiesen (Collins et al., 1992; Dainty et al., 1989).

Tabelle 5: Biochemische Reaktionen von *C. estertheticum*

Biochemische Reaktion	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>		<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>	
Verstoffwechselung von:				
Amygdalin	-	(3)	-	(3)
Arabinose	+	(1,3)	-	(2) + (3)
Cellobiose	+	(1) s (3)	-	(2) + (3)
Galactose	+	(1,3)	+	(2,3)
Glucose	+	(1,3)	+	(2,3)
Glycogen	-	(3) + (5)	+	(3)
Fructose	+	(1,3)	+	(2,3)
Inositol	+	(3)	+	(2,3)
Inulin	+	(3)	-	(2) + (3)
Lactose	-	(3)	-	(2,3)
Maltose	+	(1,3)	+	(2,3)
Mannitol	+	(1,3)	+	(2,3)
Mannose	+	(1,3)	+	(2,3)
Melezitose	-	(3)	-	(3)
Melibiose	+	(3)	+	(2,3)
Raffinose	+	(3)	+	(2,3)
Rhamnose	+	(3)	+	(2,3)
Ribose	-	(3)	-	(2,3)
Salicin	+	(1,3)	+	(3)
Sorbitol	+	(1,3)	+	(3)
Stärke	+	(1) s (3)	+	(2,3)
Sucrose	+	(3)	+	(2,3)
Trehalose	-	(3)	-	(3)
Xylose	+	(1,3)	-	(2) + (3)
Hydrolyse von:				
Stärke	s	(3)	+	(2,3)
Esculin	+	(1)	-	(2)
Gelatin	-	(3)	-	(2,3)
ß - Hämolyse	+	(4) - (3)	+	(2,3)

⁽¹⁾: Collins et al., (1992)⁽²⁾: Kalchayanand et al, (1993)⁽³⁾: Spring et al., (2003)⁽⁴⁾: Helps et al.,(1999)⁽⁵⁾: Yang et al., (2009)

+ : positive Reaktion

- : negative Reaktion

s : schwach positive Reaktion

2.3.2 Vorkommen

Über die Verbreitung von *C. estertheticum* gibt es bisher nur wenige Daten. Berichte über Blown Pack Spoilage mit Nachweis von *C. estertheticum* oder *C. estertheticum*-like Organismen stammen aus Großbritannien (Dainty et al., 1989; Helps et al., 1999), USA (Kalchayanand et al., 1993; Kalinowski und Tompkin, 1999) und Neuseeland (Broda et al., 2002; Broda et al., 2003b). In Großbritannien wurden auch Fälle von durch *C. estertheticum* verdorbenem Fleisch aus Südafrika, Nordamerika und Nordeuropa untersucht (Helps et al., 1999). *C. gasigenes* wurde dagegen bisher nur in Neuseeland nachgewiesen. In der Regel handelte es sich bei den betroffenen Produkten um rohe vakuumverpackte Teilstücke vom Rind, zum Teil waren auch vakuumverpacktes Wildfleisch und ein erhitztes Rindfleischprodukt betroffen.

Wissenschaftliche Daten über die Art und die Quelle der Kontamination von Schlachtkörpern bzw. Teilstücken mit psychrophilen Clostridien sind noch unvollständig. Die wichtigste Kontaminationsquelle für Fleisch mit verderbsrelevanten Organismen sind generell die Schlachttiere selbst, die im Gastrointestinal- und Respirationstrakt und auf der Haut Mikroorganismen in den Schlachtbetrieb einbringen (Bell, 1997; Grau, 1979; Eisgruber und Stolle, 1992). Die Bedingungen auf bzw. in warmblütigen Tieren und in deren Umgebung bei variierenden Temperatur- und Anaerobioseverhältnissen sind für psychrophile und zugleich strikt anaerobe Organismen allenfalls zeitweise geeignet. Daher wird angenommen, dass diese Bakterien vor allem als Sporen auf das Fleisch gelangen (Broda, 2007). Bei Untersuchungen in neuseeländischen Schlachtbetrieben (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002), wurden *C. estertheticum*-like Organismen und *C. gasigenes* vor allem aus Tierhäuten, aber auch aus Fäzes- und Bodenproben im Schlachtbetrieb nachgewiesen. Boerema et al. (2003) vermuteten, dass Bodenpartikel und Futtermittel im landwirtschaftlichen Betrieb die primären Quellen für diese Organismen darstellen. Hierzu gibt es derzeit keine dokumentierten Arbeiten.

Bowman et al. (1999) erwähnen in einer Untersuchung zur Zusammensetzung mikrobieller Ökosysteme in der Antarktis, dass in einem Seesediment ein großer Anteil der Population aus *C. estertheticum* besteht. Ebenfalls aus einem antarktischen See wurden *C. frigoris*, *C. lacusfryxellense*, *C. bowmanii* und *C. psychrophilum* isoliert. Diese vier psychrophilen Clostridienspezies sind phylogenetisch enge Verwandte von *C. estertheticum* (Spring et al., 2003).

2.3.3 Nachweis

2.3.3.1 Kultureller Nachweis / Isolierung aus Fleisch

Die Isolierung von *C. estertheticum* aus Fleisch- oder Umgebungsproben wird in der vorhandenen Literatur durchwegs als problematisch beschrieben, insbesondere auf festen Nährmedien (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002; Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Helps et al., 1999). Es existieren derzeit keine Standardmethoden zum Nachweis von *C. estertheticum*.

Medien, die gewöhnlich zur Isolierung von mesophilen Clostridien aus Lebensmitteln verwendet werden, basieren generell auf dem Nachweis der Sulfid-Reduktase-Aktivität, einer Eigenschaft, die außer Clostridien nur wenige andere Bakterien besitzen (Eisgruber und Stolle, 1993). Die Reduktion von Sulfid zu Sulfid führt zur Schwärzung des flüssigen Mediums bzw. zur Bildung von schwarzen Kolonien auf festen Medien. Zusätzlich können noch verschiedene selektive Hemmstoffe zur Unterdrückung von Begleitkeimen enthalten sein. Problematisch hierbei ist die hemmende Wirkung von Sulfid auf einige Clostridien. Daher ist die Eignung solcher Medien für die Isolierung von psychrophilen und psychrotrophen Vertretern fraglich (Mead, 1992; Broda et al., 1998c). Die einzige Studie, die sich mit der Eignung verschiedener Kulturmedien für die Isolierung von kältetoleranten Clostridien befasst (Broda et al., 1998c), kommt zu dem Schluss, dass die besten Ergebnisse für Clostridien mit Wachstumsoptima zwischen 15 und 20 °C mit unselektiven Medien wie Restricted Clostridial Medium (RCM), Pepton-Yeast-Glucose-Starch (PYGS)-Agar oder Columbia Blutagar (CBA) zu erwarten sind. Für Proben mit einem hohen Anteil an Begleitkeimen wird Shahidi-Ferguson Perfringens (SFP)-Agar mit Eigelbzusatz als bestes selektives Medium empfohlen. Jedoch lag die Wiederfindungsrate teilweise 4-5 Zehnerpotenzen tiefer als bei unselektiven Medien. Kalinowski und Tompkin (1999) gelang die Isolierung von *C. estertheticum* subsp. *laramiense* mit Thioglycolat Bouillon und Schafblutagar. In neueren Veröffentlichungen aus Neuseeland (Boerema et al., 2007; Boerema et al., 2003; Broda et al., 2003a; Broda, 2007) wurde zur Anzucht und Anreicherung von *C. estertheticum* PYGS Bouillon nach Lund et al. (1990) verwendet, während als festes Nährmedium zur Isolierung von einzelnen Kolonien und Subkultivierung ebenso wie für Keimzählungen im Spatelverfahren Columbia Blutagar (CBA) mit 5% Schafblut zum Einsatz kam.

Die Inkubationszeiten für PYGS Bouillon variieren je nach Zielsetzung. Um eine exponentiell wachsende Kultur von *C. estertheticum* zu erhalten, wird 96 Stunden bei 10 °C inkubiert (Broda et al., 2003a). Zur Anreicherung von *C. estertheticum* aus einer gemischten Mikroflora können 21 Tage bei 4 °C (Boerema et al., 2003) oder 7 Tage bei 10 °C (Broda et al., 2003a) angewendet werden. CBA wird zur Anzucht von *C. estertheticum* 21 Tage bei 10 °C inkubiert (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2003a; Broda, 2007).

Die Inkubation erfolgt unter anaeroben Bedingungen. Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der vegetativen Zellen und der generell schwierigen Kultivierbarkeit kältetoleranter Clostridien wird möglichst strikt anaerobe Technik auch bei der Probenöffnung empfohlen (Broda et al., 1996a; Broda et al., 1997).

Wird die Probe einer Hitze- oder Alkoholbehandlung unterzogen, so werden vegetative Zellen (auch von Begleitkeimen) abgetötet und vorhandene Sporen zu einem schnelleren und vollständigeren Auskeimen aktiviert (Broda et al., 1998b). Erst durch eine Behandlung bei 70 °C für 10 min gelang es Kalchayanand et al. (1993), *C. estertheticum* subsp. *laramiense* in Reinkultur zu isolieren. Broda et al. (1998b) untersuchten die Eignung verschiedener Hitze- und Alkoholbehandlungen für die Anzucht von Sporen kältetoleranter Clostridien. Es zeigte sich, dass von den untersuchten Stämmen mit niedrigem Temperaturoptimum vermehrt hitzesensitive Sporen gebildet wurden, während die Sporen von Stämmen mit höherem Temperaturoptimum eine größere Hitzeresistenz aufwiesen. Auf dieser Grundlage wählten Bell et al. (2001) und Boerema et al. (2007) eine Hitzebehandlung bei 60 °C für 10 min für Sporensuspensionen von *C. estertheticum*. Die neueste Studie zur Resistenz von *C. estertheticum*-Sporen (Broda, 2007) zeigte jedoch, dass die Überlebensrate auch bei Temperaturen von 80 oder 90 °C für bis zu 4 Minuten nur unwesentlich abnimmt. Solche Behandlungen sind nur dann sinnvoll, wenn zumindest ein Teil der Population als Sporen vorliegt.

2.3.3.2 Molekularbiologischer Nachweis - Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Technik, die es ermöglicht, das Vorhandensein eines bestimmten Mikroorganismus direkt aus einer Probe ohne vorhergehende Isolierung nachzuweisen. Dabei werden enzymatisch *in vitro* millionenfache Kopien einer bestimmten Nukleotidsequenz hergestellt, wodurch auch sehr geringe DNA-Mengen einer Analyse schnell zugänglich sind (Schrumpf, 2002). Die erste Veröffentlichung eines molekularbiologischen Nachweises von *C. estertheticum* mittels PCR (Helps et al., 1999) stammt aus Großbritannien, der vervielfältigte DNA-Abschnitt ist ein Teil der 16s rDNA. Eine weitere Studie aus Neuseeland (Broda et al., 2003a) stellt ebenfalls einen PCR-Nachweis auf 16s rDNA-Basis vor. Ein zweites, ebenfalls in dieser Arbeit entwickeltes PCR-System amplifiziert einen Teil der 16s-23s Internal Transcribed Spacer Region von *C. estertheticum*. Diese PCR ermöglicht eine Unterscheidung von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämmen.

2.3.4 Dekontamination / Bekämpfung von Blown Pack Spoilage

Bisher gibt es erst wenige Arbeiten, die sich mit Maßnahmen zur Bekämpfung von Blown Pack Spoilage durch *C. estertheticum* beschäftigen. Boerema et al. (2003) nennen als wichtigen Punkt die Vermeidung einer hohen Anfangskontamination während des Schlacht- und Zerlegevorgangs, insbesondere bei der Entfernung der Häute und Klauenschuhe von Schlachttieren, da diese offensichtlich eine wichtige Kontaminationsquelle darstellen. Eine geringgradige Kontamination der Schlachtkörper ist jedoch auch bei optimaler Prozesshygiene nicht zu vermeiden (Bell, 1997).

Ein weit verbreitetes Verfahren im Zusammenhang mit Vakuumverpackung ist die Verwendung sogenannter Schrumpfbeutel in Verbindung mit einer kurzzeitigen Hitzebehandlung. Durch die Hitze zieht sich die verwendete Folie zusammen und passt sich noch enger an die Fleischoberfläche an, wodurch eine Minimierung des Fleischsaftaustritts erreicht wird. Die Folie wird dabei dicker, was ihre Sperreigenschaften gegenüber Sauerstoff und anderen Gasen sowie die mechanische Stabilität verstärkt. Hitzebehandlungen können jedoch bei Sporenbildnern zu einer synchronen Aktivierung aller Sporen einer Population führen. Diese Tatsache wird auch zur Anzucht von sporenbildenden Mikroorganismen ausgenutzt (vgl. 2.3.3.1). Da Pack Blowing verursachende Clostridien wahrscheinlich zunächst als Sporen auf schlachtfischem

Fleisch vorliegen, könnte ein beschleunigtes Auskeimen und schnellere Vermehrung dieser Organismen als Folge von Hitzeeinwirkung auftreten. Den Einfluss verschiedener praxisüblicher Hitzebehandlungen auf das Auftreten von Blown Pack Spoilage untersuchten Bell et al. (2001). In der Studie wurde mit Sporen von *C. estertheticum*, *C. estertheticum*-like Stämmen und anderen Clostridienisolaten inokuliertes Rindfleisch im Vakuum-Schrumpfbeutel bei 70 °C für 15 s, 80 °C für 5 s oder 90 °C für 3s behandelt. Bei allen hitzebehandelten Packungen trat Blown Pack Spoilage signifikant früher auf als bei den unbehandelten Kontrollen. Die Hitze-Schrumpf-Technik hat also das Potential, das Einsetzen von Blown Pack Spoilage bei mit *C. estertheticum* oder *C. estertheticum*-like Organismen kontaminiertem Fleisch zu beschleunigen. Die Autoren halten daher die Entwicklung einer Methode, die die Vorzüge von Schrumpfbeuteln auf andere Weise als durch die Anwendung von Hitze erreicht, für sinnvoll.

In einer *in vitro* Studie wurde der Einfluss einer Peressigsäure-haltigen Desinfektionslösung, verschiedener Hitzebehandlungen, sowie von Ultraschallbehandlung auf das Überleben von *C. estertheticum*-Sporen untersucht (Broda, 2007). Die Peressigsäure-Behandlung wurde bei einer Konzentration von 180 ppm für 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden auch Ansätze mit Zusatz von 20% tierischen Fetten mitgeführt, um deren Einfluss auf die Wirksamkeit der Behandlung zu überprüfen. Die Ultraschallbehandlung bestand aus drei Intervallen von je einer Minute mit einer Ultraschallsonde bei 90 W. Die Erhitzung der Sporensuspensionen erfolgte bei 80, 90, 95, und 100 °C, die Dauer der Erhitzung lag zwischen 10 und 240 s. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden aus den behandelten Sporensuspensionen Keimzählungen im Spatelverfahren auf CBA durchgeführt. Die Peressigsäure-Behandlung führte in allen Ansätzen zu einer umfassenden Inaktivierung der *C. estertheticum*-Sporen, so dass die Überlebensrate jeweils unter der Nachweisgrenze von 10^2 KbE/ml lag. Bei den angewandten Hitzebehandlungen konnte nur bei massiver Erhitzung (100 °C für 240 s) eine wesentliche Abnahme der Überlebensrate beobachtet werden. Eine Kombination von Ultraschall- und Hitzebehandlung bewirkte keinen synergistischen Effekt hinsichtlich der Inaktivierung der *C. estertheticum*-Sporen, wie er z.B. für Sporen von *Bacillus subtilis* nachgewiesen wurde (Garcia et al., 1989; Raso et al., 1998).

Aufgrund der Ergebnisse der Peressigsäure-Behandlung *in vitro* wurde in einer weiteren Studie die Wirksamkeit dieser Substanz als Spray-Behandlung von mit

C. estertheticum-Sporen kontaminiertem Rindfleisch untersucht (Boerema et al., 2007). In dieser Untersuchung wurde die Wirksamkeit von Peressigsäure-Sprays bei zwei verschiedenen Sporenkonzentrationen (4 und 40 Sporen/cm² Fleischoberfläche) und drei Lagerungstemperaturen (-1,5 °C, 0 °C und 2 °C) überprüft. Die vakuumverpackten Fleischstücke wurden über einen Zeitraum von 106 Tagen regelmäßig begutachtet und mit einem Pack Blowing Score von 0 bis 5 bewertet (vgl. Tab. 17). Alle mit *C. estertheticum* inokulierten Fleischstücke der Studie (behandelt oder unbehandelt) zeigten am Ende Blown Pack Spoilage, während die unbeimpften Kontrollen kaum Gasbildung in den Vakuumbeuteln aufwiesen. Das Peressigsäure-Spray war somit nicht in der Lage, Pack Blowing durch *C. estertheticum* zu verhindern. Auch der Zeitpunkt des Auftretens von Pack Blowing konnte durch die Spray-Behandlung generell nicht signifikant verzögert werden. Eine geringe Verzögerung war lediglich bei den Ansätzen mit höherer Sporenkonzentration zu beobachten, hier setzte Pack Blowing nach durchschnittlich 33 statt 28 Tagen ein.

Die geringe Wirksamkeit der Behandlung im Vergleich zur *in vitro* Studie wird von den Autoren auf die Anheftung der Sporen an Fett- und Bindegewebsstrukturen zurückgeführt, welche in einer höheren Resistenz der Bakterien gegenüber Desinfektionsmitteln resultierte.

Im Bereich der Europäischen Gemeinschaft ist zur Zeit eine Behandlung von frischem Fleisch bzw. Schlachtkörpern mit desinfizierenden Lösungen nicht zugelassen, jedoch bietet die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 in Artikel 3 Abs. 2 die Möglichkeit, bestimmte Stoffe für solche Anwendungen zuzulassen (Hugas und Tsigarida, 2008). In USA sind nach dem Code of Federal Regulations (Title 21, 173.370) hingegen Spraybehandlungen wie oben beschrieben zur Dekontamination von Schlachtkörpern erlaubt.

Ein weiterer Ansatz, um das Auftreten von Blown Pack Spoilage zu verhindern, ist die Zugabe einer Schutzkultur. Dabei wird die Eigenschaft bestimmter Milchsäurebakterien, andere Bakterien an der Vermehrung zu hindern, ausgenutzt. Der Einsatz solcher Organismen dient der Kontrolle sowohl von Pathogenen als auch von Verderbniserregern, und die Möglichkeiten ihrer Anwendung in verschiedenen Lebensmitteln war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Holzapfel et al., 1995; Rodgers, 2001; Rodgers, 2008). Anders als bei Starterkulturen wird bei Schutzkulturen möglichst keine sensorische oder metabolische Veränderung des

Produktes gewünscht. Dem Konzept der Hürdentechnologie (Leistner und Gorris, 1995) entsprechend sollten Schutzkulturen immer nur als zusätzliche Maßnahme gegen unerwünschte Mikroorganismen in Kombination mit einwandfreier Hygiene, Verpackungs- und Kühltechnik angewendet werden.

Die Wirkung von Schutzkulturen beruht zum einen auf einem kompetitiven Wachstum und zum anderen auf der Produktion inhibitorischer Substanzen. Zu den letzteren zählen beispielsweise organische Säuren, Diacetyl, Acetoin, Hypothiocyanat, Wasserstoffperoxid und Bacteriocine (Jones, 2004; Jones et al., 2008; Holzapfel et al., 1995).

Die Wirksamkeit einiger Schutzkulturen gegen bestimmte Clostridienarten ist wissenschaftlich belegt, zum Beispiel wurde Toxinproduktion durch *C. botulinum* in verschiedenen Lebensmitteln durch Zugabe von Schutzkulturen verhindert (Hutton et al., 1991; Skinner et al., 1999). Auch das Wachstum und die Aktivität von *C. tyrobutyricum*, Verursacher der sogenannten Spätblähung in Käse, konnte durch solche Kulturen deutlich reduziert werden (Bogovic Matijasic et al., 2007; Rilla et al., 2003).

Mittlerweile berichten auch einige Arbeiten über den erfolgreichen Einsatz von Schutzkulturen bei vakuumverpacktem Rindfleisch (Castellano und Vignolo, 2006; Katikou et al., 2005; Signorini et al., 2006). Diese Studien konzentrieren sich jedoch auf die klassischen Verderberregger für dieses Produkt, wie Arten der *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* und *Shewanella putrefaciens*, beziehungsweise auf die Inhibition von *Listeria* spp.. Auf *Clostridium* spp. wird in diesen Arbeiten nicht eingegangen.

In einer aktuellen Studie (Jones et al., 2008) wurden verschiedene fleischassoziierte Milchsäurebakterien auf inhibitorische Aktivität gegenüber verschiedenen in vakuumverpacktem Frischfleisch relevanten Pathogenen und Verderbniserregern, unter anderem *C. estertheticum*, überprüft. Ein *Lactococcus lactis*-Stamm zeigte in dieser Untersuchung eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *C. estertheticum*, *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta* und *Campylobacter* spp. Die Autoren sprechen diesem Stamm daher ein mögliches Potential für die Verwendung als Schutzkultur in vakuumverpacktem Fleisch zu, jedoch steht die Reproduktion der im Agar-Stab-Test und Well-Diffusion-Assay ermittelten Ergebnisse im vakuumverpackten Fleisch noch aus.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Alle verwendeten Stämme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm-Nummer	Spezies
DSMZ 8809	<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>
DSMZ 14864	<i>Clostridium estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>
DSMZ 12272	<i>Clostridium gasigenes</i>
B 44	<i>Bacillus cereus</i>
C 64	<i>Clostridium sporogenes</i>
E 163	<i>Escherichia coli</i>
En 65	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Pr 2	<i>Proteus mirabilis</i>

Die mit „DSMZ“ bezeichneten Stämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, und die übrigen aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Standort Kulmbach, bezogen.

3.1.2 Kulturelle Verfahren

Agar-Agar (Merck, 1.01614.1000)

Anaerocult A mini Spezialbebrütungsbeutel (Merck, 1.01611.0001)

Anaerotest Anaerobiose-Indikator (Merck, 115112)

Columbia-Blut-Agar (5% Schafblut)

42 g Columbia-Agar-Basis (Merck, 1.10455.0500)

50 ml Schafblut defibriniert (Oxoid, SR0051D), nach Autoklavieren zugegeben

950 ml A. dest

CO-Reagenz: jeweils frisch zubereitete Lösung zu gleichen Teilen aus

50 mM 1-Naphtol in 50%igem Ethanol

50 mM N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin in A. dest.

DHL-Agar nach Sakazaki (Merck 1.11435.0500)

Drigalski Spatel

Glaspipetten 1 ml und 10 ml (Brand)

Glycerin 86-88% (Riedel de Haen, 33224)

Impfösen aus Platindraht

Impfösen aus Kunststoff, steril (VWR, 612-9354)

MEA + Agar,:

48 g Malzextrakt-Agar (Merck, 105398)

125 mg Novobiocin (Sigma, N1628-25G)

ad 1000 ml A. dest

MRS-Agar nach De Man, Rogosa und Sharpe (Merck 1.1.0660.0500)

Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Pipet-Boy acu)

PBS, pH=7,5

8,5 g NaCl (Merck, 106404)

1,14 g Na₂HPO₄·12 H₂O (Merck, 106579)

0,5 g KH₂PO₄ (Merck, 104873)

Natronlauge 2N (Einstellen des pH- Wertes)

ad 1000 ml A. dest

PYGS-Bouillon (Lund et al., 1990):

5 g Proteose Pepton (ACILA, ADA0420)

5 g Trypton (Pepton aus Casein pankreatisch verdaut, Merck, 1.02239.0500)

10 g Hefeextrakt granuliert (Merck, 1.03753.0500)

10 g Fleischextrakt granuliert (Merck, 1.03979.0500)

2 g Glucose-Monohydrat (Merck, 1.08342.1000)

1 g Stärke löslich (Merck, 1.01257.0050)

0,001 g Resazurin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich, 199303-5G)

40 ml Salzlösung A, Zusammensetzung pro Liter:

0,265 g CaCl * 2 H₂O (Merck, 1.02382.0250)

0,48 g MgSO₄ * 7 H₂O (Merck, 1.05886.0500)

2,0 g NaCl (Merck, 106404)

40 ml Salzlösung B, Zusammensetzung pro Liter:

1,0 g KH₂PO₄

1,3 g K₂HPO₄ *3 H₂O

10,0 g NaHCO₃

ad 1000 ml A. dest.

PYGS-Agar: Zusammensetzung wie PYGS Bouillon, zusätzlich 1,5% Agar-Agar
Sporulation Medium (Peck et al., 1992)

Untere feste Phase:

10,0 g Cooked Meat Medium (Difco, 0267-17-9)

1,5 g Agar-Agar

0,1 g Glucose (Merck, 108342)

100 ml A. dest

Obere flüssige Phase:

13,3 ml A. dest, steril.

Standard-I-Agar (Merck, 1.07881.0500)

Standard-I-Bouillon (Merck, 1.07882.0500)

Geräte:

Anaerobe Arbeitsstation (Meintrup DWS, MiniMaks)

Analysenwaage (Sartorius, KB BA 100)

Bruträume 25 °C, 30 °C und 37 °C (Weiss)

Bunsenbrenner

Gefriertrocknungsanlage (Christ, alpha 2-4, Typ-Nr. 100402)

Glasperlen, Durchmesser 3 mm (VWR; 1.04015)

Kühlraum 4 °C (Weiss)

Nährmedien-Abfülleinheit (Integra Biosciences, Tecnomat)

Schüttler (Abimed Labnet VX 100)

Stomacher (Seward, stomacher 400 circulator)

Thermostatschränke 2 °C und 4 °C (Aqualytic)

Thermostatschrank 10 °C (Ehret)

Waage (Sartorius, 2357)

Wärmeschank (WTB Binder)

Wasserbad (Memmert)

Zentrifuge (Heraeus, multifuge 1 S-R)

3.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Primer (Biometra, 120-200, Konzentration 0,1 nmol/μl):

16 SEF: 5'-TCG GAA TTT CACTTTGAG-3'

16 SER: 5'-AAG GAC TTC ACT CAT CTC TG-3'

EISRF: 5'-GTA GAT GTA TTG ACT TCG G-3'

EISRR: 5'-ACC TAT AAC ACA TCT CGT-3'

HB10: 5'-ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC-3'

HB11: 5'-GTT TCG CCA CCT CTG ACT TGA G-3'

DNA Marker „Lambda HindIII / phiX Hae III“ (Roth, CP49.1)

DNA Marker „Hyper – Ladder II“ (Bioline, BIO-33039)

DNA Polymerase (Pqclab, SAWADI Taq-DNA-Polymerase, 01-1030)

inklusive Reaktionspuffer S (15 mM MgCl₂) und MgCl₂ Lösung (25 mM)

dNTP- Set 1(Roth, K039.1), Einzellösungen 100 mM, Gebrauchslösung 10 mM

Ethidiumbromidlösung 1% (Roth, 2218.1)

E.Z.N.A. Tissue DNA Mini Kit (Pqclab, 12-3496)

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, 1 796 828)

Lysing Matrix E (MP Biomedicals, 6914-100)

Gel – Loading-Puffer:

62,5 mg Bromphenolblau (Merck, 108122)

62,5 mg Xylencyanol (Merck, 110590)

6,25 g Ficoll Typ 400 (Sigma-Aldrich, F4375-10G)

ad 25 ml A. dest.

peqGOLD Universal-Agarose (Pqclab, 35-1020)

Pipetten (ABIMED Discovery und Labmate, 2, 20, 100, 200, 1000 μl)

Pipetten-Standard-Spitzen

10 μl (Roth, P866.1)

100 μl (VWR, 613-0252)

1000 μl (Eppendorf, 0030 015.002)

PrestoSpin D DNA-Reinigungskit (Molzym, D-060)

PUC 19 DNA (Sigma, D3404)

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,2 ml (Eppendorf)

TBE-Puffer Stammlösung:

890 mmol Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 108382)

890 mmol Borat (Merck, 100165)

40 ml einer 500mM EDTA -Lösung, pH 8,0 (Merck, 108418)

ad 1000 ml A. bidest

TBE-Puffer Gebrauchslösung

100 ml TBE-Puffer Stammlösung

ad 1000 ml A. bidest

Geräte:

Elektrophoresekammern (Biometra, Agagel mini und Agagel midi-wide)

Fast-Prep-Gerät (Hybaid, Ribolyser)

Heizblock für Reaktionsgefäße (VLM, LS1)

Thermocycler (Biometra, T personal)

Transilluminator mit Fotoeinheit (Biometra)

PCR-Werkbank (erlab, biocap DNA/RNA)

Zentrifuge (Eppendorf, 5417R)

3.1.4 Koloniehybridisierung

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, 1 093 247)

X-Phosphat Lösung (BCIP) (Roche, 1 383 221)

DIG Easy Hyb Granules (Roche, 1 796 895)

DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, 1 585 762)

NBT-Lösung (4-Nitrobluetetrazoliumchloride) (Roche, 1 383 213)

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, 1 636 090)

Proteinase K als Lösung, 600 U/ml (Merck, 1.07393.0010)

Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridisation (Roche, 1 699 075)

Rundfilter Weißband, Durchmesser 110 mm (Schleicher und Schüll)

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH (Merck, Art.-Nr. 6482)

1,5 M NaCl (Merck, 106404)

A. bidest, steril

Neutralisationslösung, pH 7.4, 21 °C

1,5 M NaCl (Merck, 106404)

1,0 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, 108382)

A. bidest, steril

HCl zum Einstellen des pH-Wertes (Merck, 109970)

Sodiumdodecylsulfat (SDS) (Roth2326.2) als 10%ige Stammlösung

20x SSC (Stammlösung, pH 7.0)

3M NaCl (Merck, 106404)

0.3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat (Merck, 106448)

Geräte:

Hybridisierungssofen (UNITHERM, Hybridisation Oven 6/12)

3.1.5 Sonstige Materialien und Geräte

Autoklav (Zirbus, LSA 500-2)

Deckgläser für Objektträger (24 x 24 mm)

Dosierpumpe (Integra Biosciences, Dose-it 803)

Einmal-Küvetten für Fotometer (Brand, 7592 00)

Fotometer (Thermo, BioMate 3)

Glaspetrischalen (Schott, Durchmesser 90mm)

Heißluftsterilisator (Binder)

Kryoröhrchen (Simport Plastics, T310-2A)

Mikroskop (Leitz Diaplan)

Objektträger (Marienfeld)

pH-Messgerät (WTW; pH 526) mit Einstab-Glaselektrode (WTW, SenTix Sp)

Reagenzgläser (Schott, Durchmesser 16mm)

sterile Skalpellklingen, einzeln verpackt (martin)

Ultraschallwasserbad (Bandelin Sonorex RK 100, 160 W, 35 kHz)

Zählkammer nach Thoma

3.1.6 Probenmaterial

3.1.6.1 Proben aus dem Handel

Vakuumverpackte Teilstücke und vakuumverpackte Steaks vom Rind unterschiedlicher Herkunft wurden in einem lokalen Großmarkt oder Supermarkt erworben und in einer verschlossenen Styroporbox gekühlt in das Laboratorium transportiert. Die Proben wurden entweder sofort untersucht oder innerhalb eines Zeitraumes von bis zu 48 Stunden nach vorheriger Lagerung bei +4 °C. Eine Übersicht über Herkunft, Teilstück und Alter der Rindfleischproben zum Untersuchungszeitpunkt gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Übersicht der Handelsproben für die Untersuchung auf *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen

Proben-Nr.	Herkunftsland	Teilstück	Alter in Wochen	Haltbarkeitsangabe des Herstellers (Zeitspanne vom Produktionsdatum bis Ende MHD)
H1	Brasilien	Roastbeef	14,5	15 Wochen bei 0 bis +3 °C
H2	Argentinien	Hochrippe	13,5	22 Wochen bei -1 bis +3 °C
H3	Argentinien	Hüfte	15,5	18 Wochen bei 0 bis +3 °C
H4	Brasilien	Hüftsteaks	n.a.	Ab Kauf: 5 Tage bei unter 4 °C
H5	Argentinien	Hüfte	10,5	22,5 Wochen bei 0 bis +3 °C
H6	Argentinien	Hochrippe	21	22 Wochen bei -1 bis +3 °C
H7	Argentinien	Hüfte	7,5	22 Wochen bei 0 bis +3 °C
H8	Argentinien	Hüfte	8	18 Wochen bei unter 2 °C
H9	Brasilien	Hochrippe	12,5	17 Wochen bei 0 bis +1 °C
H10	Deutschland	Rumpsteak	n.a.	Ab Kauf: 5 Tage bei unter 4 °C
H11	Deutschland	Falsches Filet	1	6 Wochen bei 0 bis +2 °C

3.1.6.2 Verdachtsproben

Vakuumverpacktes Fleisch, das aufgrund von Gasbildung in der Packung und / oder Geruchsabweichungen in der jeweiligen Charge auffällig geworden war, wurde von verschiedenen Herstellern an das Institut geschickt (Tabelle 8). Die Verdachtsproben wurden im Folgenden ebenso behandelt und untersucht wie Proben aus dem Handel. Zwei der Verdachtsproben (V8 und V9) waren vor dieser Untersuchung bereits geöffnet worden und wurden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert. Die Altersangabe bezieht sich bei diesen Proben auf den Zeitpunkt der Erstöffnung.

Tabelle 8: Übersicht der Verdachtsproben für die Untersuchung auf *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen

Proben-Nr.	Herkunftsland	Teilstück	Alter in Wochen	Haltbarkeitsangabe des Herstellers (Zeitspanne vom Produktionsdatum bis Ende MHD)
V1	Deutschland	Hüfte	6	n.a.
V2	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V3	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V4	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V5	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V6	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V7	Brasilien	Roastbeef	8	17 Wochen bei 0 °C
V8	Deutschland	Roastbeef	16	n.a.
V9	Schweiz	Roastbeef	5	n.a.

3.2 Methoden

3.2.1 Anaerobe Arbeitstechnik

Um für das Wachstum von *C. estertheticum* strikt anaerobe Bedingungen zu erhalten fanden alle Arbeitsschritte, bei denen mit lebenden Kulturen gearbeitet wurde, in einer anaeroben Arbeitsstation statt. Sämtliche Anzuchtmedien sowie Verdünnungsflüssigkeiten wurden mindestens 48h vor Gebrauch in die anaerobe Arbeitsstation eingeschleust und so vorreduziert. Die Medien wurden vor dem Beimpfen auf etwa 4 °C gekühlt und eine Erwärmung durch Aufbewahrung auf Eis innerhalb der Werkbank vermieden. Schließlich wurden die beimpften Medien innerhalb der Arbeitsstation in anaerobe Spezialbebrütungsbeutel dicht verpackt, eingeschleust und in Kühlbrutschränken inkubiert. Die Temperatur in der Arbeitsstation wurde bei länger als 15 Minuten dauernden Arbeiten durch Einschleusen von 10 handelsüblichen Kühlakkus und Herunterregeln der Solltemperatur bei Werten von 18-21 °C gehalten. Dieses Verfahren war notwendig, da die zur Verfügung stehende Anaerobier-Werkbank nicht über eine Kühleinrichtung verfügte. Zur Überprüfung der anaeroben Bedingungen wurden Anaerotest-Indikatorstreifen verwendet.

3.2.2 Herstellung von Sporensuspensionen

Die Sporensuspensionen wurden in Anlehnung an die Methode von Peck et al. (1992) hergestellt. Das dort beschriebene zweiphasige Sporenmedium wurde mit einer 96 Stunden-Kultur in die flüssige Phase beimpft und 8 Wochen bei 10 °C im anaeroben Bebrütungsbeutel inkubiert. Die obere flüssige Phase des Mediums wurde entnommen und zunächst fünf Mal bei 10000 x g unter Kühlung bei 4 °C zentrifugiert und mit der gleichen Menge eisgekühlter steriler 0,85% NaCl Lösung gewaschen. Anschließend folgten drei Wiederholungen einer zehnminütigen Behandlung im Ultraschallwasserbad. Zwischen den Ultraschallzyklen wurde jeweils ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben durchgeführt. Nach dem letzten Waschen wurden die Sporen in 5 ml 0,85% NaCl Lösung resuspendiert um die Konzentration der Suspension zu erhöhen. Die so erhaltenen Sporensuspensionen wurden zu 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -18 °C aufbewahrt.

3.2.3 Optimierung der DNA-Aufbereitung aus Sporen

Um die Effizienz verschiedener DNA-Aufbereitungsverfahren für Sporen von *C. estertheticum* zu vergleichen, wurden aus Sporensuspensionen des Referenzstammes DSMZ 8809 dezimale Verdünnungsreihen in PBS hergestellt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden zunächst einer mechanischen Behandlung im Ribolyser Cell Disrupter in einer Matrix aus Glas- und Silicapartikeln unterzogen, welche die Lyse bakterieller Sporen unterstützt (Hammon, 2008). In diesem sogenannten Fast-Prep-Gerät kommt es zur Zerstörung der Zellen infolge von Kollisionen mit der Matrix unter starker Beschleunigung. Anschließend wurde von den einzelnen Verdünnungen parallel mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Aufreinigungskits DNA isoliert. Das verwendete Protokoll wurde nach Empfehlungen der jeweiligen Firmenvertreter ausgewählt, da keine speziellen Protokolle für Bakteriensporen verfügbar waren. Die DNA wurde in einer PCR-Reaktion amplifiziert und mittels Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung wie unter 3.2.4 beschrieben sichtbar gemacht. Das Verfahren 3, das in diesem Vergleich die höchste Empfindlichkeit aufwies (vgl. 4.1), wurde als Standardverfahren für die Probenuntersuchung gewählt und einer umfangreicheren Sensitivitätsprüfung unterzogen. Eine Übersicht über die getesteten Verfahren gibt Tabelle 9.

Tabelle 9: Getestete DNA-Aufbereitungsverfahren aus Sporensuspensionen

Verfahren	Kit	Hersteller	Protokoll, Modifikationen
1	Presto Spin D	Molzym	Herstellervorgabe zur Isolierung von DNA aus Pflanzen und Lebensmitteln
2	E.Z.N.A Tissue DNA Mini Kit	Peqlab	Herstellervorgabe zur Isolierung von DNA aus Zellsuspensionen
3	High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche	Herstellervorgabe zur Isolierung von DNA aus Säugergewebe <u>Modifikationen:</u> während des einstündigen Proteinase K-Verdau alle 20 Minuten kurz schütteln; Elution der DNA in zwei Schritten (Zugabe von 2 mal 100µl Elutionspuffer mit anschließender Zentrifugation anstelle von 1 mal 200µl)

3.2.4 PCR-Nachweise von *Clostridium estertheticum*

Der PCR-Nachweis erfolgte in Anlehnung an Broda et al. (2003a). Die beiden dort beschriebenen spezifischen Primerpaare für *C. estertheticum* binden an einer spezifischen Region des 16s-rRNA-Gens (Primer 16SEF und 16SER) beziehungsweise an der 16s-23s Internal Transcribed Spacer Region (Primer EISRF und EISRR). Das mit dem Primerpaar 16SEF/16SER gebildete Amplifikat hat eine Größe von 790 bp, die PCR mit den Primern EISRF/EISRR erzeugt ein Amplifikat von 235 bp. Pipettierschema und Cycloprogramm sind für die beiden Nachweise identisch. Der PCR-Mix wurde in der PCR-Werkbank unter Kühlung nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 10: Pipettierschema für die PCR-Systeme zum Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Reagenz	Menge pro Ansatz/ μ l
10 x Reaktionspuffer S	2,5
Primer 16SEF bzw. EISRF	0,125
Primer 16SER bzw. EISRR	0,125
dNTP – Mix	0,5
Taq-Polymerase	0,125
A. bidest, steril	16,625
Aufbereitete Proben-DNA	5,0

Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 μ l pro Ansatz. Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine Positivkontrolle (DNA des Referenzstammes DSMZ 8809) sowie eine Reagentienkontrolle (A. bidest anstelle von DNA) mitgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 11 beschriebenen Programm amplifiziert.

Tabelle 11: Cyclotherprogramm für die PCR-Systeme zum Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	93 °C	3 min
30x	Denaturierung	92 °C	1 min
	Annealing	55 °C	1 min
	Extension	72 °C	2 min
1x	Extension	72 °C	3 min

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsgefäße bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Je Reaktionsgefäß wurden 3 µl Gel-Loading-Puffer zugegeben und 10 µl der Reaktion auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung für 55 min bei 125V und eine Färbung des Gels mit Ethidiumbromid. Das Ergebnis wurde mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

3.2.5 Nachweisgrenze der PCR-Systeme im Fleischtropfsaft

3.2.5.1 Nachweisrate für vegetative Zellen und nach Anreicherung

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der beiden in dieser Arbeit verwendeten PCR-Nachweisverfahren für vegetative Zellen von *Clostridium estertheticum* wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von einer 96 Stunden-Kultur des Referenzstammes DSMZ 8809 hergestellt. Die Keimzahl in der Suspension wurde parallel mit 2 verschiedenen Verfahren bestimmt. Zum einen wurden je 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} auf CBA ausgespatelt und die Keimzahl nach Auszählen der Kolonien mittels gewogenem arithmetischem Mittel berechnet (vgl. 3.2.8.5.3). Zum anderen wurde die Keimzahl durch Auszählen in der Zählkammer nach Thoma direkt bestimmt (vgl. 3.2.5.3). Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden 0,5 ml in 4,5 ml Fleischtropfsaft beimpft, was einer Verdünnung um eine weitere Zehnerpotenz entspricht. Die im beimpften Tropfsaft vorhandenen *C. estertheticum* konnten so anhand der jeweiligen Verdünnungsstufe errechnet werden. Aus dem beimpften Tropfsaft wurde jeweils 1 ml zur DNA-Aufbereitung nach dem Verfahren 3 (Kap. 3.2.3) verwendet und beide PCR-Nachweise durchgeführt. Von dem beimpften Tropfsaft wurde außerdem je 1 ml in 9 ml PYGS Bouillon angereichert und im

Anschluss die DNA Extraktion sowie PCR-Nachweise durchgeführt. Einen Überblick über den Versuchsablauf gibt Abbildung 3.

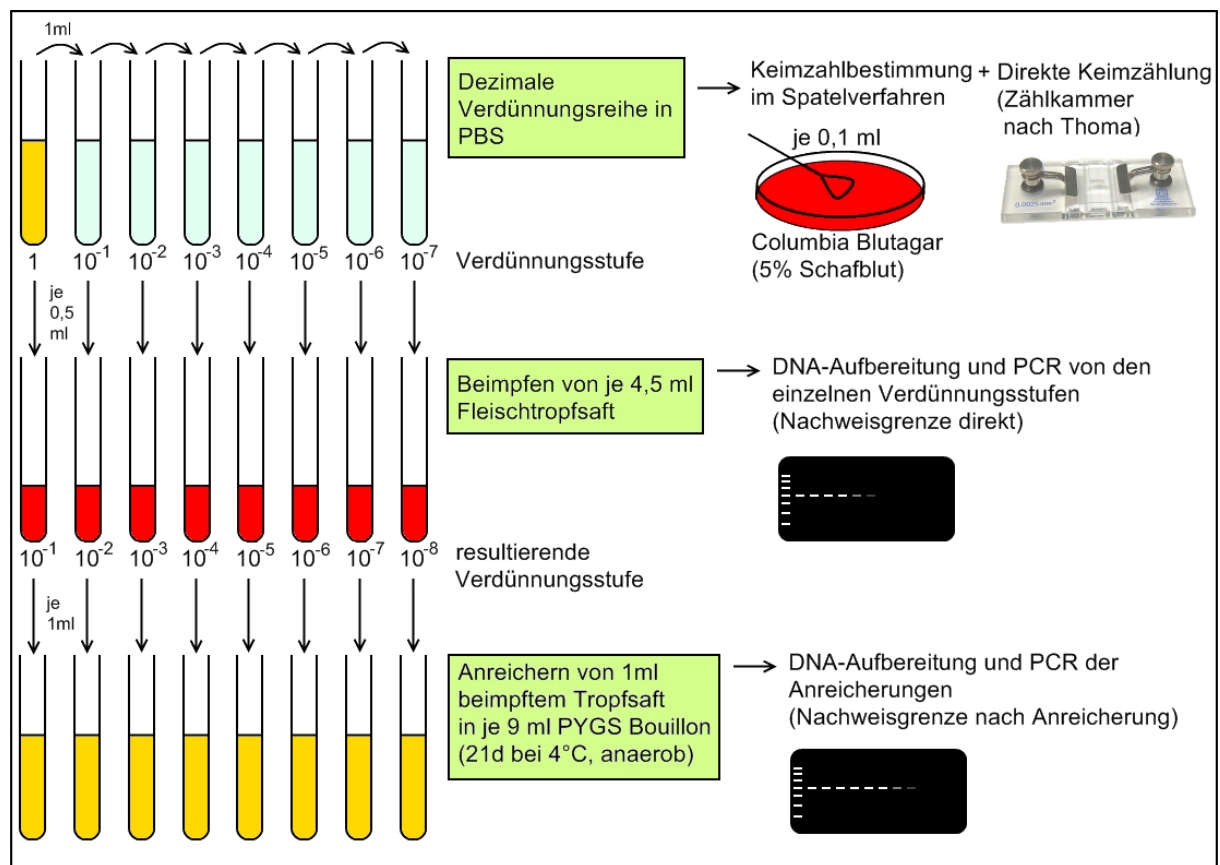


Abbildung 3: Schema zur Ermittlung der Nachweisraten von *C. estertheticum* in Tropfsaft von Rindfleischproben

Der verwendete Tropfsaft wurde aus 3 kg vakuumverpacktem Rindfleisch aus dem Handel gewonnen, indem die gesamte Flüssigkeit (ca. 100 ml) aus einem Vakuumbbeutel mittels steriler Pipette in eine sterile Schraubflasche überführt wurde. Aus 1 ml des Tropfsaftes wurde zunächst DNA extrahiert und der PCR-Nachweis durchgeführt, um eine natürliche Kontamination mit *C. estertheticum* weitgehend auszuschließen. Erst wenn das negative PCR-Ergebnis vorlag, wurde der übrige Tropfsaft für den Beimpfungsversuch verwendet. Bis zur Verwendung wurde der Tropfsaft zu 4,5 ml aliquotiert und bei -18°C aufbewahrt. Neben dem beimpften Tropfsaft wurde auch der unbeimpfte in PYGS-Bouillon angereichert und dann erneut mittels PCR überprüft, um eine natürliche Kontamination auch mit geringen Mengen an

C. estertheticum auszuschließen. Dieser Versuchsansatz wurde drei Mal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

Um die extrahierte DNA auf eventuell vorhandene inhibitorische Substanzen (Al-Soud und Radstrom, 2000; Rossen et al., 1992) zu testen, wurde außerdem bei jeder Verdünnungsstufe eine externe Amplifikationskontrolle durchgeführt (Gallien et al., 1997). Dafür wurden zu der aufbereiteten DNA der Probe geringe Mengen einer genau definierten DNA-Sequenz (PUC 19) und spezifische Primer für diese definierte Sequenz (HB 10 und HB11) zugegeben. Der PCR-Mix für die Amplifikationskontrolle wurde wie folgt hergestellt:

Tabelle 12: Pipettierschema der eingesetzten Kontroll – PCR zur Überprüfung auf inhibitorische Substanzen im Probenmaterial

Reagenz	Menge pro Ansatz/ μ l
10 x Reaktionspuffer S	2,5
Mg Cl ₂	1,5
Primer HB10	0,1
Primer HB11	0,1
dNTP – Mix	2,0
Taq-Polymerase	0,2
pUC 19 DNA	1,0
A. bidest, steril	12,6
Aufbereitete Proben - DNA	5,0

Die anschließende Amplifikation im Thermocycler erfolgte nach dem in Tabelle 13 beschriebenen Programm.

Tabelle 13: Cyclerprogramm für die externe Amplifikationskontroll-PCR

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1x	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
30x	Denaturierung	95 °C	5 min
	Annealing	65 °C	30 s
	Extension	72 °C	1 min
1x	Extension	72 °C	7 min

Es folgte die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid (vgl. 3.2.4). Waren in der aufbereiteten DNA keine PCR-Inhibitoren vorhanden, so entstand ein PCR-Produkt mit einer Länge von 429 bp.

3.2.5.2 Nachweisrate für Sporen

Die Nachweisgrenze der PCR-Verfahren für Sporen von *C. estertheticum* wurde auf ähnliche Weise bestimmt wie diejenige für vegetative Zellen. Als Ausgangsmaterial für die Verdünnungsreihe diente anstelle der exponentiell wachsenden Kultur eine gereinigte Sporensuspension (vgl. 3.2.2). Um ein möglichst vollständiges Auskeimen der Sporen für die Keimzählung im Spatelverfahren zu ermöglichen, wurde die Suspension zu Beginn des Versuches einer Hitzeaktivierung bei 60 °C für 10 min unterzogen (Bell et al., 2001). Die Nachweisrate nach Anreicherung wurde für Sporen nicht separat ermittelt.

3.2.5.3 Überprüfung der Vergleichbarkeit der Keimzählungsverfahren

Die Keimzahl in der Bakteriensuspension wurde mittels Spatelverfahren und parallel durch mikroskopische Zählung in einer Zählkammer nach Thoma ermittelt, um einen eventuellen Fehler durch unvollständiges Wachstum von *C. estertheticum* bei der Zählung im Spatelverfahren zu erfassen. Zum Ausschluss von methodisch bedingten Unterschieden der Keimzahlen wurden beide Verfahren mit einem gut kultivierbaren Organismus (*Escherichia coli*, E163) ebenfalls dreimal parallel durchgeführt. Als Ausgangsmaterial hierfür diente eine 24 Stunden-Kultur von *E. coli* in Standard-I Bouillon. Es wurde eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt, je 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-7} und 10^{-8} wurden auf Standard-I Platten ausgespatelt und bei 37 °C 24 h inkubiert. Nach Auszählen der Kolonien erfolgte die Berechnung der Keimzahl nach dem gewogenen arithmetischen Mittel (vgl. 3.2.8.5.3).

Für die Keimzählung in der Zählkammer wurde ein dickes Deckglas so mit Druck aufgelegt, dass sich Newton'sche Ringe bildeten. Die Füllung der Kammer erfolgte mit einer Pasteurpipette vom Rand aus. Für die Zählung wurde eine Verdünnungsstufe gewählt, bei der etwa 50-80 Zellen pro Großquadrat zu sehen waren (in diesem Fall Verdünnungsstufe 10^{-2}). Die Zählung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter ständiger Veränderung des Feintriebs der Höheneinstellung. Es wurden je 4

Großquadrate ausgezählt, dann die Zählung mit neu gefüllter Kammer wiederholt und anschließend das arithmetische Mittel der Mikroorganismen je Großquadrat gebildet. Die Zahl der Mikroorganismen pro ml (N) ergibt sich durch die Maße der Zählkammer nach folgender Berechnung:

$$N = \text{Zahl der Mikroorganismen je Großquadrat} \times 2,5 \times 10^5$$

3.2.6 Etablierung der Kolonie-Hybridisierung

Für eine gezielte Isolierung von *C. estertheticum* wurde die Technik der Koloniehybridisierung (Grunstein und Hogness, 1975) angewendet. Hierzu wurden entsprechend der Angaben des DIG System User's Guide for Filter Hybridisation (Boehringer Mannheim, 1995) die zu prüfenden Kolonien auf eine Nylonmembran übertragen und die DNA auf der Membran fixiert. Nach Entfernung der Zellreste wurden Kolonien von *C. estertheticum* durch Hybridisierung mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten Gensonde markiert. Die gebundene Sonde wurde anschließend in einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht und positive Kolonien nach Vergleich von Agarplatte mit der Nylonmembran gezielt isoliert.

3.2.6.1 Herstellung der Gensonde

Die verwendete Sonde wurde in einer PCR-Reaktion durch partiellen Austausch des Nukleotids dTTP mit dem Digoxigenin-markierten Nukleotid dig-dUTP hergestellt. Dies erfolgte mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit von Roche Diagnostics nach Herstelleranleitung. Als Template diente wie unter Kap. 3.2.3 beschrieben extrahierte DNA des Referenzstammes DSMZ 8809. Es wurden Sonden mit den Primersets 16SEF/16SER bzw. EISRF/EISRR (Broda et al., 2003a) hergestellt. Zur Anwendung kam die aus dem Primerpaar EISRF/EISRR entstandene markierte Sonde. Diese war somit Teil der 16s-23s internal transcribed spacer region von *C. estertheticum* mit einer Länge von 235 bp. Der DNA-Gehalt des eingesetzten Templates wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und durch Verdünnen auf 2 ng/µl eingestellt, so dass pro Ansatz die ideale Menge von 10 ng eingesetzt werden konnte. Der PCR-Mix für die markierten Sonden und die verschiedenen Kontrollen wurde nach dem in Tabelle 14 angegebenen Schema entsprechend der Vorgaben des Herstellers pipettiert:

Tabelle 14: Pipettierschema für die Herstellung von DIG-markierten Gensonden zum Nachweis von *C. estertheticum*

Reagenz	DIG labeled probe	Unlabeled DNA control	Negativkontrolle
A. bidest, steril	33,75 µl	33,75 µl	38,75 µl
PCR buffer with MgCl ₂ , 10x conc. (vial 3)	5,00 µl	5,00 µl	5,00 µl
PCR DIG Labeling Mix (vial 2)	5,00 µl	-	5,00 µl
dNTP stock solution (vial 4)	-	5,00 µl	-
Primer EISRF und EISRR	je 0,25 µl	je 0,25 µl	je 0,25 µl
Enzyme Mix (vial 1)	0,75 µl	0,75 µl	0,75 µl
Template DNA	5,00 µl	5,00 µl	-
Total	50,00 µl	50,00 µl	50,00 µl

3.2.6.2 Überprüfung der Markierungsreaktion durch Gelelektrophorese

Um die Markierung der Gensonde zu überprüfen, wurden 5 µl jedes PCR-Amplifikates auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, wie unter 3.2.4 beschrieben aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Dokumentation erfolgte fotografisch nach Visualisierung des Gels unter UV-Licht.

3.2.6.3 Spezifitätsprüfung der Gensonde

Mittels DNA-Dotblot-Verfahren wurde die Spezifität der eingesetzten Sonde mit DNA von 8 Referenzstämmen der in Tabelle 15 aufgeführten Bakterienarten nach der im DIG User's Guide (Boehringer Mannheim, 1995) beschriebenen Technik durchgeführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit der gleichen Methode wie für *C. estertheticum* (vgl. 3.2.3). Der DNA-Gehalt der Extrakte wurde durch fotometrische Messung bei 260 nm überprüft. Je Ansatz wurden zwei Spots von je einem µl DNA-Extrakt aufgetragen.

Tabelle 15: Verwendete Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung der eingesetzten Gensonde

Spot Nr.	Stamm	Spezies
1	En 65	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2	Pr 2	<i>Proteus mirabilis</i>
3	B 44	<i>Bacillus cereus</i>
4	E 163	<i>Escherichia coli</i>
5	DSMZ 8809	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>
6	DSMZ 14864	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>
7	DSMZ 12272	<i>C. gasigenes</i>
8	C64	<i>C. sporogenes</i>

3.2.6.4 Überprüfung der Methode mit Reinkulturen

Das Verfahren zur Koloniehybridisierung wurde mit Verdünnungsausstrichen des Typstammes DSMZ 8809 auf CBA etabliert. Die Methode wurde entsprechend der Angaben des DIG User's Guide (Boehringer Mannheim, 1995) mit den unter 3.1.4 genannten Materialien durchgeführt. Als Hybridisierungsgefäße dienten sterile Glaspetrischalen. Als Hybridisierungspuffer wurde DIG-Easy-Hyb verwendet. Die Gensonde wurde in 2 verschiedenen Ansätzen in einer Konzentration von 3 µl bzw 5 µl pro ml Hybridisierungspuffer zur Ermittlung der optimalen Konzentration zugegeben. Die Detektion erfolgte colorimetrisch im Anschluss an eine immunologische Reaktion mit dem Farbstoff NBT/BCIP.

3.2.7 Etablierung der Methode zur Konservierung von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen

Zur Konservierung von *C. estertheticum* wurden 3 verschiedene Methoden getestet. Einen Überblick über die unterschiedlichen Verfahren gibt Tabelle 16. Die Methoden wurden je zweimal mit dem Referenzstamm DSMZ 8809 durchgeführt und die Rekultivierbarkeit in PYGS Bouillon überprüft. Hierfür wurden die konservierten Organismen in 9 ml präreduzierte PYGS Bouillon verbracht und anschließend 21 Tage anaerob bei 10 °C inkubiert. Das Wachstum wurde anhand von Trübung des Mediums und mikroskopischem Befund im Nativpräparat (vgl. 3.2.8.3) festgestellt.

Tabelle 16: Getestete Konservierungsverfahren für *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen

Methode	Durchführung
1	Je 0,5 ml einer 96 Stunden-Kultur in PYGS Bouillon wurde in ein Kulturfläschchen mit 2 ml autoklavierter, gefriergetrockneter Magermilch pipettiert und sofort bei -18 °C eingefroren. Anschließend Gefriertrocknung nach frühestens 3-4 Stunden. Die Trocknung erfolgte bei 1,030 mbar und einer Temperatur von -20 °C. Nach Abschluss des Trocknungsvorgangs wurden die Isolate bei 4 °C aufbewahrt.
2	1 ml einer 96 Stunden-Kultur in PYGS Bouillon wurden in ein Kryoröhrchen mit 0,5 ml 86-88%igem Glyzerin und 3 mm Glasperlen pipettiert. Das Röhrchen wurde vorsichtig geschwenkt und der Überstand abpipettiert. Die Röhrchen wurden bei -70 °C aufbewahrt. Zur Wiederanzucht wurde eine Glasperle mittels steriler Einweg-Impföse entnommen und in die Bouillon überführt.
3	Wie Methode 1, jedoch mit einer Kultur als Ausgangsmaterial, die mindestens 50% Sporen enthielt (Alter etwa 4 Wochen)

3.2.8 Probenuntersuchungsgang

3.2.8.1 Überblick

Einen Überblick über den Ablauf der verschiedenen Untersuchungen gibt Abbildung 4. Die untersuchten Fleischproben wurden zur Entnahme des Materials für die Anreicherung und Isolierung von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen unter Kühlung (handelsübliche Kühlakkus) in eine Anaerobier-Arbeitsstation eingeschleust. Bei großen Teilstücken wie z.B. ganzes Roastbeef, wurde der Tropfsaft mittels steriler Einwegspritze und Kanüle aus der noch ungeöffneten, zuvor von außen mit 70%igem Ethanol desinfizierten Verpackung entnommen und unmittelbar in die vorreduzierte Bouillon überführt, welche anschließend sofort in anaerobe Spezialbebrütungsbeutel verpackt wurde.

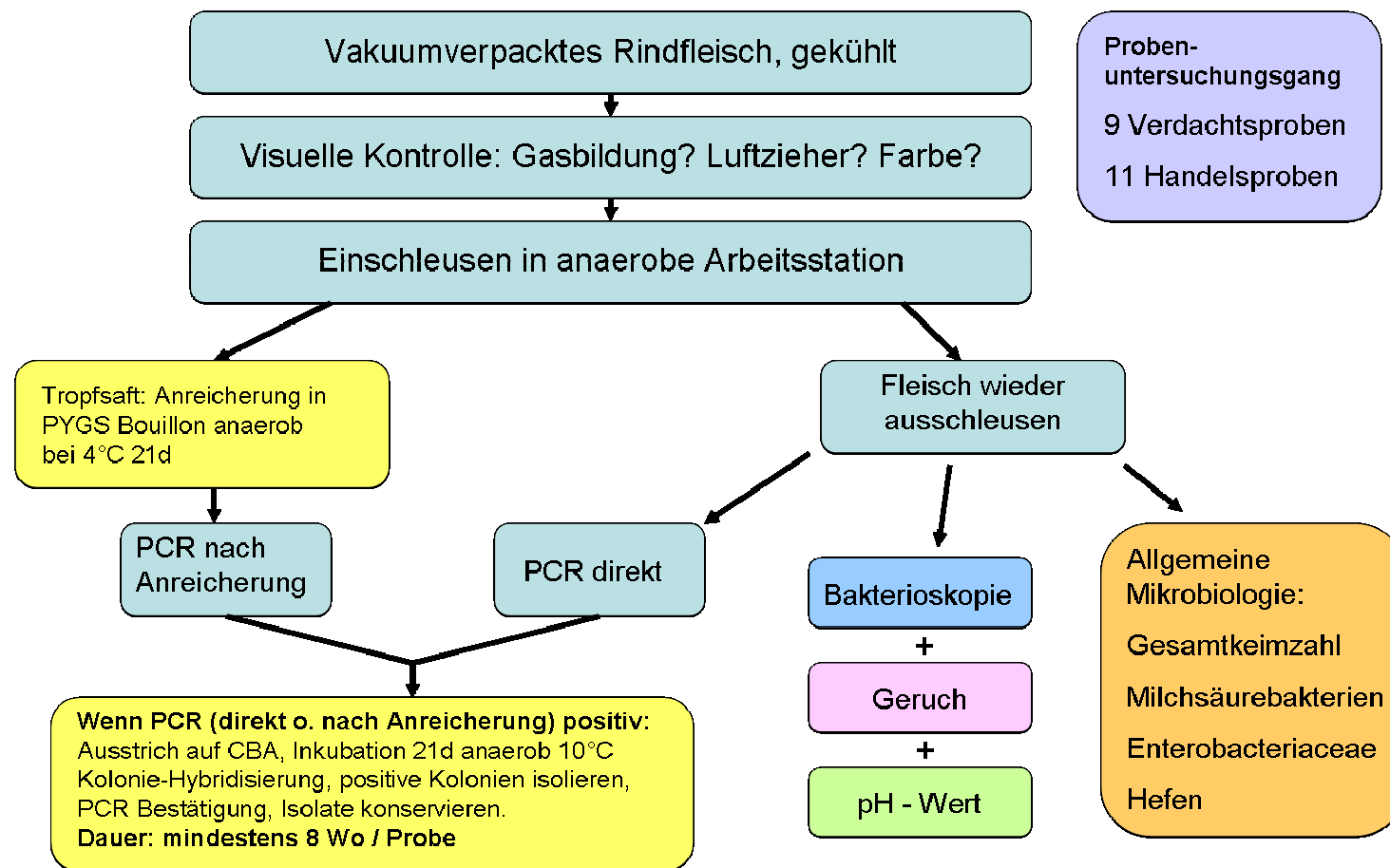


Abbildung 4: Übersicht zur Vorgehensweise bei der Untersuchung von vakuumverpackten Rindfleischproben

3.2.8.2 Visuelle Überprüfung der Verpackung

Die Vakuumbbeutel wurden visuell sorgfältig auf eventuelle Beschädigungen untersucht. In der Packung vorhandene Gasansammlungen wurden auf einer Skala von 0 bis 5, dem Pack Blowing Score entsprechend Boerema et al. (2007), wie in Tabelle 17 angegeben, beurteilt.

Tabelle 17: Pack Blowing Score nach Boerema et al. (2007)

Score	Zustand der Vakuumverpackung
0	Keine sichtbaren Gasblasen
1	Wenige kleine Gasblasen im Fleischsaft sichtbar
2	Aussehen wie bei Vakuumverlust
3	Offensichtlich aufgebläht, puffig
4	Auf volle Größe aufgebläht, noch nicht straff gespannt
5	Auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt

Die Einstufung mit Score 0 und 1 wird nach Boerema et al. (2007) als Normalzustand betrachtet, während die Scores 2 bis 5 zunehmend starke produkt-untypische Abweichungen beschreiben.

3.2.8.3 Sensorische Beurteilung des Geruchs

Die Beurteilung des Geruchs erfolgte etwa 3-5 Minuten nach dem Öffnen der Verpackung im mikrobiologischen Labor durch mindestens 3 ungeschulte Personen. Es wurde eine einfach beschreibende Prüfung in Anlehnung an L00.90-60 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach §64 LFGB durchgeführt. Im Anschluss wurde von den Prüfern noch eine Punktzahl von 1 bis 5 im Bezug auf Verderbnisgeruch vergeben. Die Unterteilung der Punkteskala zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: Punkteskala zur Bewertung von Verderbgeruch

Punktzahl	Bewertung
1	Völlig einwandfrei
2	Akzeptabel, jedoch leichte Abweichung wahrnehmbar
3	Gerade noch akzeptabel, Abweichung vorhanden
4	Nicht mehr akzeptabel, deutlicher Verderbgeruch
5	Extremer Verderbgeruch

3.2.8.4 Bakterioskopische Untersuchung

Ein Tropfen Fleischsaft von jeder Probe wurde mittels steriler Einweg-Impföse auf einen Objektträger verbracht, mit einem Deckglas versehen und als Nativpräparat bei 1250-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Das Präparat wurde mäanderförmig durchmustert und sowohl im Hellfeld als auch mittels Phasenkontrast betrachtet, um eventuell vorhandene Endosporen als stark lichtbrechende Strukturen identifizieren zu können. Die bakterielle Flora wurde auf dem Probenprotokoll beschrieben und skizziert.

3.2.8.5 Allgemeine Mikrobiologische Untersuchung

3.2.8.5.1 Probenaufbereitung

Die Verpackung der Probe wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und anschließend mit sterilem Skalpell so eröffnet, dass eine ausreichende Fläche für die Probennahme zugänglich war. Die Probennahme erfolgte entsprechend der Methode L 06.00-16 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach §64 LFGB. Mittels einer sterilen scharfen runden Edelstahlschablone wurde an 4 verschiedenen Stellen eine Fläche von je 5 cm² Fleischoberfläche markiert, so dass insgesamt 20 cm² zur Untersuchung kamen. Das Volumen der Erstverdünnung betrug 200 ml. Die Erstverdünnung wurde im Stomacher 1 min bei 260 rpm homogenisiert. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe mit 0,85%iger NaCl-Lösung hergestellt.

3.2.8.5.2 Kulturverfahren

Je 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden auf den in Tabelle 19 angegebenen Medien ausgespatelt und wie dort angegeben in Bruträumen unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Tabelle 19: Nährmedien und Inkubationsbedingungen für Keimzählungen auf der Oberfläche von Rindfleischproben

Keimgruppe	Nährmedium	Temperatur	Zeit
Aerobe Gesamtkeimzahl	Standard I - Agar	30 °C	48 Std.
Milchsäurebakterien	MRS - Agar	30 °C	48 Std.
<i>Enterobacteriaceae</i>	DHL - Agar	30 °C	48 Std.
Hefen und Schimmelpilze	MEA+ - Agar	25 °C sowie 10 °C	4 Tage (25 °C) 7 Tage (10 °C)

Zur Erfassung der Pseudomonadenkeimzahl wurden die auf DHL-Agar gewachsenen Kolonien der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe durch Überschichten der DHL-Agarplatte mit CO-Reagenz nach Gaby und Hadley (1957) von *Enterobacteriaceae* differenziert. Kolonien, die sich innerhalb einer Minute blau färbten, wurden als Oxidase-positiv beurteilt und in der Pseudomonadenkeimzahl erfasst.

3.2.8.5.3 Ermittlung der Keimzahlen

Die Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien wurden ausgezählt. Zur Berechnung der Keimzahlen wurden Agarplatten herangezogen, auf denen sich zwischen 20 und 300 gut abgrenzbare Kolonien befanden. Die Keimzahlen wurden nach dem gewogenen arithmetischen Mittel berechnet:

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

c	Gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen (cfu / cm ²)
$\sum c$	Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
n_1	Anzahl Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
n_2	Anzahl Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe
d	Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

3.2.8.6 pH-Wert-Messung

Der pH-Wert wurde mittels geeichtem pH-Meter und einer Einstab-Glaselektrode im Homogenat der Erstverdünnung für die allgemeine mikrobiologische Untersuchung bestimmt.

3.2.8.7 Nachweis von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen

3.2.8.7.1 PCR-Screening

Für das PCR-Screening wurde insgesamt 1 ml Tropfsaft an mindestens 3 verschiedenen Stellen aus dem Vakuumbbeutel entnommen. Der Tropfsaft wurde 2 Mal für 5 min bei 5200 rpm abzentrifugiert und jeweils mit 1 ml steriler PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 20 s im Ribolyser behandelt und daraus DNA extrahiert wie unter Kap. 3.2.3, Verfahren 3, beschrieben. Nachfolgend wurde die PCR mit anschließender Auswertung nach gelelektrophoretischer Auftrennung durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.4). Für das Screening wurden die Primer 16SEF/16SER verwendet, mit denen sowohl *C. estertheticum* als auch *C. estertheticum*-like-

Organismen erfasst wurden. Bei allen Proben wurde außerdem eine externe Amplifikationskontrolle (vgl. 3.2.5.1) durchgeführt.

3.2.8.7.2 PCR nach Anreicherung

Von jeder Probe wurde zu Beginn der Untersuchung 1 ml Tropfsaft anaerob entnommen und in 9 ml PYGS Bouillon bei 4 °C für 21 Tage anaerob inkubiert. Verliefe das PCR-Screening direkt aus dem Fleischsaft negativ, so wurde es nach DNA-Extraktion aus der Anreicherungsflüssigkeit wiederholt.

3.2.8.7.3 Anzucht kältetoleranter Clostridien

Bei positivem PCR-Ergebnis aus dem Fleischsaft bzw. der Anreicherungsbouillon wurde in der anaeroben Arbeitsstation ein Verdünnungsausstrich der Anreicherungsflüssigkeit auf präreduzierten CBA-Platten angefertigt und für 21 Tage bei 10 °C anaerob inkubiert (Boerema et al., 2003).

3.2.8.7.4 Koloniehybridisierung und gezielte Isolierung

Die Koloniehybridisierung wurde mit den CBA – Platten der angereicherten Proben nach Herstellerangaben, wie unter Punkt 3.2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Gensonde wurde in einer Konzentration von 3 µl pro ml Hybridisierungspuffer eingesetzt. Bei jeder Hybridisierung wurde eine Positivkontrolle (CBA-Platte mit Einzelkolonien des Typstammes DSMZ 8809) mitgeführt. Die entsprechenden Agarplatten wurden nach dem Blotten 4 Tage weiter anaerob bei 10 °C inkubiert und dann mit dem Ergebnis auf der Nylonmembran verglichen.

Wurden nach Vergleich von Agarplatte und Nylonmembran positive Einzelkolonien ermittelt, so wurden von diesen Kolonien Subkulturen auf CBA angelegt und bei 10 °C anaerob inkubiert. Die Kulturen wurden nach 7 bis 14 Tagen, sobald ein Wachstum erkennbar war, durch Beurteilung der Koloniemorphologie und des mikroskopischen Befundes mehrerer Einzelkolonien auf Reinheit überprüft und gegebenenfalls subkultiviert, bis eine Reinkultur vorlag.

Bei einigen Isolaten mit deutlicher Sporenbildung, die nicht in Reinkultur vorlagen sowie keine gut abgegrenzten Einzelkolonien gebildet hatten, wurde mit einer

Impföse Koloniematerial in PBS suspendiert, bei 60 °C für 10 min erhitzt, und schließlich erneut auf CBA bis zur Gewinnung von Reinkulturen ausgestrichen.

3.2.8.7.5 Bestätigung und Einordnung der Isolate

Die Reinkulturen wurden nach DNA-Extraktion mittels PCR und den beiden Primer-sets 16SEF/16SER und EISRF/EISRR auf ihre Zugehörigkeit zu der Spezies *C. estertheticum* bzw. zu den *C. estertheticum*-like Organismen überprüft (Broda et al., 2003a). Als *Clostridium estertheticum*-Isolate wurden diejenigen Kulturen gewertet, die ein positives Ergebnis in beiden PCR-Systemen aufwiesen. Isolate mit positivem Ergebnis in der PCR mit dem Primerpaar 16SEF/16SER und einem negativem Ergebnis in der PCR mit den Primern EISRF/EISRR wurden als *C. estertheticum*-like Organismen klassifiziert.

Alle Isolate wurden daneben auf aerobes Wachstum bei 10 °C auf CBA überprüft. Falls Sporenbildung noch nicht im Zuge der Überprüfung der Reinkultur festgestellt worden war, wurde diese auf CBA, PYGS-Agar und in PYGS-Bouillon nach mindestens 4-wöchiger Inkubation bei 10 °C mikroskopisch überprüft.

3.2.8.7.6 Konservierung der Isolate

Die Konservierung der gewonnenen *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Isolate erfolgte wie unter 3.2.7 beschrieben mit dem Verfahren 3. Alle konservierten Isolate wurden außerdem in der ebenfalls dort beschriebenen Weise hinsichtlich ihrer Rekultivierbarkeit überprüft.

4 Ergebnisse

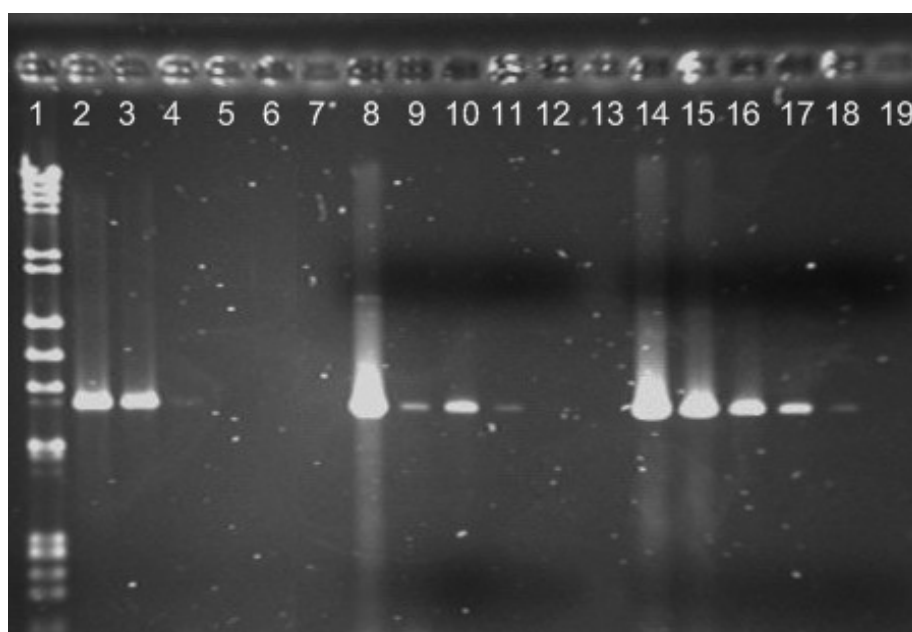
In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen mittels PCR hinsichtlich der Erfassung von Bakteriensporen optimiert. Hierfür wurden unterschiedliche DNA-Aufbereitungsverfahren an Sporensuspensionen von *C. estertheticum* überprüft. Weiterhin wurde ein Verfahren zur gezielten Isolierung dieser Keime durch Kolonie-Hybridisierung etabliert.

Im Anschluss an die methodisch orientierten Arbeiten wurden insgesamt 20 vakuumverpackte Rindfleischproben auf Kontamination mit *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen, Verderbnisgeruch, den bakterioskopischen Befund sowie allgemeine mikrobiologische Parameter und pH-Wert untersucht.

4.1 Optimierung der DNA-Aufbereitung aus Sporen

Zur DNA-Extraktion aus Sporen von *C. estertheticum* wurden 3 verschiedene kommerziell erhältliche Extraktionskits verglichen. Dazu wurden von einer Sporensuspension Dezimalverdünnungen hergestellt und die DNA nach einer Ribolyser-Behandlung parallel mit den verschiedenen Kits extrahiert. Nach PCR-Amplifikation und Gelelektrophorese wurden die Banden der einzelnen Verfahren verglichen und die in diesem Vergleich empfindlichste Methode als Standardverfahren für die Probenuntersuchung gewählt.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse der PCR von DNA-Extrakten der einzelnen Kits dokumentiert. Mit dem Verfahren 1 (Presto Spin D Kit, Firma Molzym) waren positive Ergebnisse bis zur Verdünnungsstufe 10^{-4} und insgesamt schwächere Banden als bei den anderen getesteten Kits zu beobachten (Bahn 2-6). Verfahren 2 (E.Z.N.A Tissue Mini Kit, Firma Peqlab) erbrachte bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5} positive Ergebnisse, wobei die Bandenstärke unabhängig von der Verdünnungsstufe relativ stark variierte (Bahn 8-13). Verfahren 3 (High Pure PCR Template Preparation Kit, Firma Roche) lieferte bis zur Verdünnung 10^{-6} positive Signale. Dieses Verfahren zeigte außerdem die beste Korrelation der Bandenstärke mit der Verdünnungsstufe (Bahn 14-19). Die Methode wurde daher anschließend einer umfangreicheren Sensitivitätsprüfung unterzogen und als Standardverfahren zur DNA-Extraktion in dieser Arbeit gewählt.



Bahn 2-6 Verfahren 1			Bahn 8-13 Verfahren 2			Bahn 14-19 Verfahren 3		
2	10^{-2*}	+	8	10^{-2}	+	14	10^{-2}	+
3	10^{-3}	+	9	10^{-3}	+	15	10^{-3}	+
4	10^{-4}	+(s)	10	10^{-4}	+	16	10^{-4}	+
5	10^{-5}	-	11	10^{-5}	+	17	10^{-5}	+
6	N	-	12	10^{-6}	-	18	10^{-6}	+
			13	N	-	19	N	-

*: jeweilige Verdünnungsstufe der Sporensuspension

+ = positives Ergebnis, - = negatives Ergebnis, N = Negativkontrolle,

(s) = schwach Bahn 1 = Marker, Bahn 7 = frei

Abbildung 5: Elektrophoresegel der PCR-Produkte von DNA-Extrakten verschiedener Extraktionskits aus dezimalen Verdünnungen von *C. estertheticum*-Sporensuspensionen

4.2 Nachweisgrenze der PCR-Systeme im Fleischtropfsaft

Um die Empfindlichkeit der PCR-Systeme zum Nachweis von *C. estertheticum* für Tropfsaftproben zu bestimmen, wurde unbelasteter Tropfsaft von vakuumverpacktem Rindfleisch mit dezimalen Verdünnungsstufen einer *C. estertheticum*-Suspension beimpft, anschließend DNA isoliert und der PCR-Nachweis durchgeführt. Als Inokulum diente entweder eine Kultur im exponentiellen Wachstumsstadium (Nachweisgrenze für vegetative Zellen) oder eine gereinigte Sporensuspension (Nachweisgrenze für Sporen).

4.2.1 Vergleichbarkeit der Keimzählungsverfahren

Die Ermittlung der Nachweisgrenze für die PCR-Systeme beinhaltete die Keimzahlbestimmung für *C. estertheticum* mit zwei verschiedenen, parallel durchgeführten Methoden (vgl. Abbildung 3). Es zeigte sich, dass die ermittelten Keimzahlen in Abhängigkeit von der jeweiligen Methode große Unterschiede aufwiesen. Die direkte Zellzählung mittels Thomakammer ergab eine deutlich höhere Keimzahl als die Bestimmung im Spatelverfahren. Dies galt sowohl für Sporensuspensionen als auch für exponentiell wachsende Kulturen, die nur vegetative Zellen enthielten (Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse der Keimzählungen von *C. estertheticum* mittels Spatelverfahren und Thomakammer

Durchführung Nr.	Keimzahl (KbE bzw. gezählte Zellen / ml)	
	Spatelverfahren	Thomakammer
Vegetative 1	$2,4 \times 10^5$	$1,7 \times 10^8$
Vegetative 2	$1,1 \times 10^5$	$1,6 \times 10^8$
Vegetative 3	$1,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$
Mittelwert Vegetative	$7,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^8$
Sporen 1	$1,3 \times 10^7$	$9,6 \times 10^8$
Sporen 2	$7,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^9$
Sporen 3	$9,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^9$
Mittelwert Sporen	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$

Die Überprüfung der Keimzählmethoden mit 24-Stunden-Kulturen von *E. coli* ergab hingegen eine weitgehende Übereinstimmung der im Spatelverfahren und mittels Thomakammer ermittelten Werte (vgl. Tabelle 21).

Tabelle 21: Vergleich der Ergebnisse der Keimzählungen von *E. coli* mittels Spatelverfahren und Thomakammer

Durchführung Nr.	Keimzahl (KbE bzw. gezählte Zellen / ml)	
	Spatelverfahren	Thomakammer
<i>E. coli</i> 1	$1,4 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
<i>E. coli</i> 2	$1,5 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
<i>E. coli</i> 3	$1,2 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
Mittelwert <i>E. coli</i>	$1,4 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$

Aufgrund dieser Ergebnisse dienten jeweils die direkt mittels Thomakammer ermittelten Keimzahlen als Grundlage für die Berechnung der Nachweisgrenzen der beiden PCR-Systeme für *C. estertheticum* aus Fleischtropfsaft.

4.2.2 Nachweisgrenze für vegetative Zellen

Die Nachweisgrenze der PCR für vegetative Zellen lag für das Primerpaar 16SEF/16SER im Mittel bei $2,5 \times 10^2$ Organismen pro ml Fleischtropfsaft, für das Primerpaar EISRF/EISRR bei durchschnittlich $7,6 \times 10^2$ Organismen/ml. Die einzelnen Ergebnisse der drei Versuchsdurchführungen sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Ergebnisse zur Nachweisgrenze der PCR-Systeme für vegetative Zellen von *C. estertheticum* in Fleischtropfsaft

Primerset 16SEF / 16SER		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. estertheticum</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-6}	$1,7 \times 10^2$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-6}	$1,6 \times 10^2$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-5}	$4,3 \times 10^2$
Mittelwert		$2,5 \times 10^2$
Primerset EISRF / EISRR		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. estertheticum</i> Zellen / ml Tropfsaft
Vegetative 1	Verdünnung 10^{-5}	$1,7 \times 10^3$
Vegetative 2	Verdünnung 10^{-6}	$1,6 \times 10^2$
Vegetative 3	Verdünnung 10^{-5}	$4,3 \times 10^2$
Mittelwert		$7,6 \times 10^2$

4.2.3 Nachweisgrenze nach Anreicherung

Nach Anreicherung von beimpftem Tropfsaft in PYGS Bouillon für 21 Tage bei 4 °C konnten etwa 10-100 Zellen von *C. estertheticum* pro ml Ausgangsmaterial (beimpfter Tropfsaft) nachgewiesen werden. Die erhaltenen Daten zeigt Tabelle 23.

Tabelle 23: Ergebnisse zur Nachweisgrenze der PCR-Systeme für *C. estertheticum* in Fleischtropfsaft nach Anreicherung in PYGS Bouillon

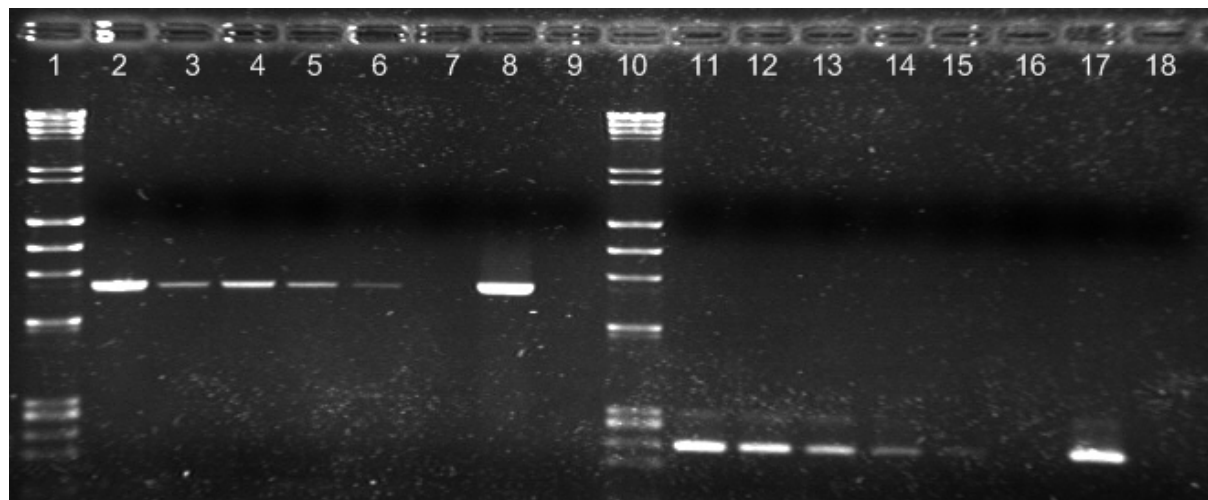
Primerset 16SEF / 16SER		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. estertheticum</i> Zellen / ml Tropfsaft
Anreicherung 1	Anreicherung der Verdünnung 10^{-7}	$1,7 \times 10^1$
Anreicherung 2	Anreicherung der Verdünnung 10^{-7}	$1,6 \times 10^1$
Anreicherung 3	Anreicherung der Verdünnung 10^{-7}	4,3
Mittelwert		$1,2 \times 10^1$
Primerset EISRF / EISRR		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. estertheticum</i> Zellen / ml Tropfsaft
Anreicherung 1	Anreicherung der Verdünnung 10^{-6}	$1,7 \times 10^2$
Anreicherung 2	Anreicherung der Verdünnung 10^{-7}	$1,6 \times 10^1$
Anreicherung 3	Anreicherung der Verdünnung 10^{-7}	4,3
Mittelwert		$6,3 \times 10^1$

4.2.4 Nachweisgrenze für Sporen

Die Ermittlung der Nachweisgrenze für Sporen ergab für beide Primersets identische Ergebnisse. Die Nachweisgrenze lag bei durchschnittlich $1,2 \times 10^3$ Sporen pro ml Tropfsaft (vgl. Tabelle 24), jedoch erschien die entsprechende Bande mit dem Primerset EISRF/EISRR in allen drei Durchführungen schwächer als mit dem Primerset 16SEF/16SER (vgl. Abbildung 6)

Tabelle 24: Ergebnisse zur Nachweisgrenze der PCR-Systeme für Sporen von *C. estertheticum* in Fleischtropfsaft

Primerset 16SEF / 16SER und Primerset EISRF / EISRR		
Durchführung Nr.	Höchste Verdünnungsstufe, bei der ein positives PCR-Ergebnis erzielt wurde	Konzentration <i>C. estertheticum</i> Sporen / ml Tropfsaft
Sporen 1	Verdünnung 10^{-6}	$1,3 \times 10^3$
Sporen 2	Verdünnung 10^{-6}	$1,3 \times 10^3$
Sporen 3	Verdünnung 10^{-6}	$1,1 \times 10^3$
Mittelwert		$1,2 \times 10^3$

**Bahn 1-9: Primerset 16SEF/16SER**

1	Marker	
2	Verdünnung 10^{-2}	+
3	Verdünnung 10^{-3}	+
4	Verdünnung 10^{-4}	+
5	Verdünnung 10^{-5}	+
6	Verdünnung 10^{-6}	+
7	Verdünnung 10^{-7}	-
8	Positivkontrolle	+
9	Negativkontrolle	-

+ = positives Ergebnis, - = negatives Ergebnis,

Bahn 10-18: Primerset EISRF/EISRR

10	Marker	
11	Verdünnung 10^{-2}	+
12	Verdünnung 10^{-3}	+
13	Verdünnung 10^{-4}	+
14	Verdünnung 10^{-5}	+
15	Verdünnung 10^{-6}	+(s)
16	Verdünnung 10^{-7}	-
17	Positivkontrolle	+
18	Negativkontrolle	-

(s) = schwach

Abbildung 6: Elektrophoresegel der PCR-Produkte von mit *C. estertheticum*-Sporen beimpftem Tropfsaft

4.2.5 Amplifikationskontrolle

Alle aus beimpftem und angereichertem Tropfsaft gewonnenen DNA-Extrakte wurden einer externen Amplifikationskontroll-PCR unterzogen. Bei allen DNA-Extrakten erschien eine Bande bei 429 bp. Abbildung 7 zeigt ein Elektrophoresegel nach Ethidiumbromidfärbung mit Amplifikaten der Kontroll-PCR von DNA-Extrakten aus beimpftem und angereichertem Tropfsaft.

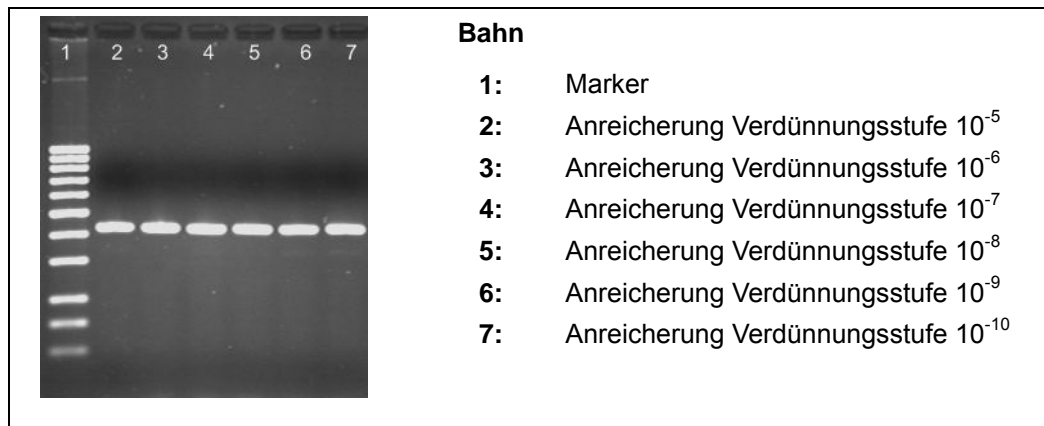


Abbildung 7: Elektrophoresegel der externen Amplifikationskontroll-PCR mit pUC 19 DNA nach Gallien et al. (1997)

4.3 Etablierung der Kolonie-Hybridisierung

4.3.1 Markierungsreaktion der Gensonden

Das Elektrophoresegel der mit dem Primerpaar EISRF/EISRR unter Verwendung von DNA des Referenzstammes DSMZ 8809 hergestellten Gensonde zeigt Abbildung 8. Entsprechend den Herstellerangaben wanderte das Digoxigenin-markierte Produkt im elektrischen Feld langsamer und bildete eine etwas schwächere Bande aus als die unmarkierte Kontrolle.

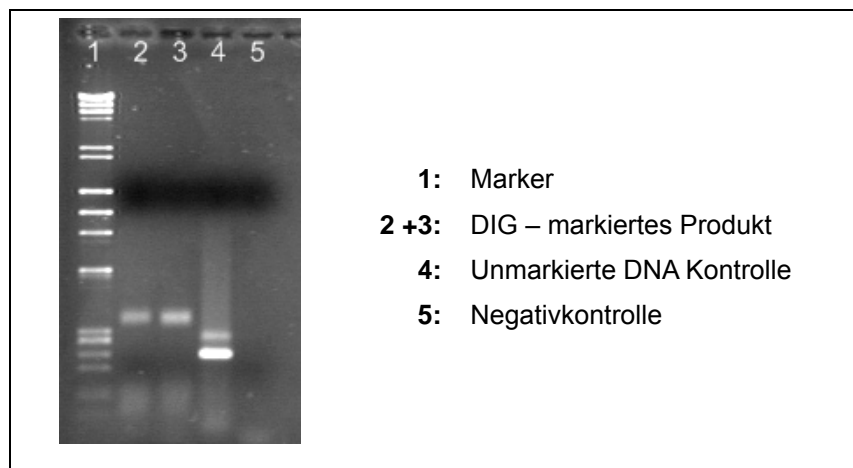


Abbildung 8: Elektrophoresegel der DIG-markierten Sonde des Primerpaars EISRF/EISRR

Das Elektrophoresegel des mit dem Primerpaar 16SEF/16SER hergestellten markierten Produktes zeigt Abbildung 9. In Anwesenheit des markierten Nukleotids bildete sich keine einzelne Bande, sondern mehrere schwer voneinander abgrenzbare Banden mit einem flächigen verwaschenen Hintergrund (Smear). Dieses Produkt wurde deshalb nicht als Gensonde verwendet.

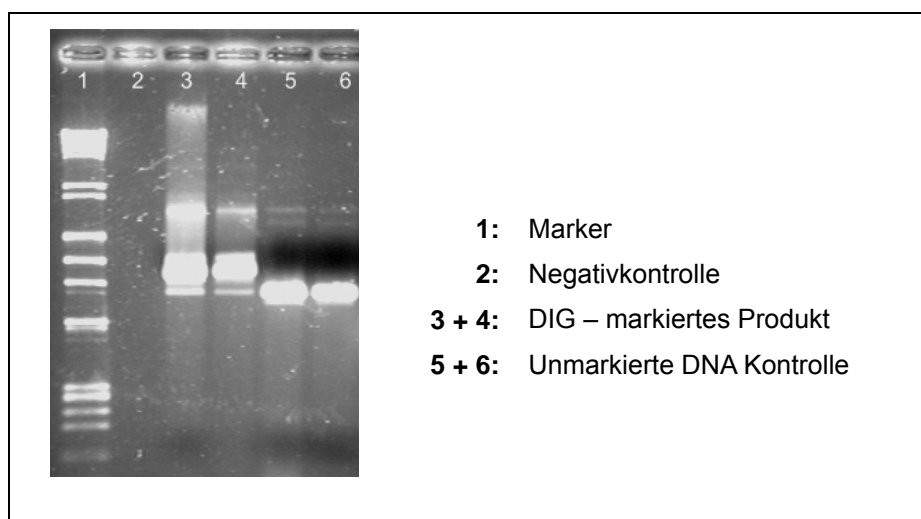


Abbildung 9: Elektrophoresegel der DIG-markierten Produkte des Primerpaars 16SEF/16SER

4.3.2 Spezifität der eingesetzten Sonde

Die Spezifität der eingesetzten DIG-markierten Gensonde (PCR-Produkt der Primer EISRF/EISRR, 16s-23s internal transcribed spacer Region, 235 bp) wurde mittels DNA-Dotblot-Technik überprüft. Die Sonde hybridisierte mit DNA der beiden Subspezies von *C. estertheticum* und konnte bei den entsprechenden Spots colorimetrisch mittels NBT / BCIP als blaues Farbpräzipitat detektiert werden. Mit DNA der übrigen Teststämme verlief die Hybridisierung negativ (Abbildung 10). Der DNA-Gehalt aller eingesetzten DNA-Extrakte lag zwischen 20 und 45 µg/ml.

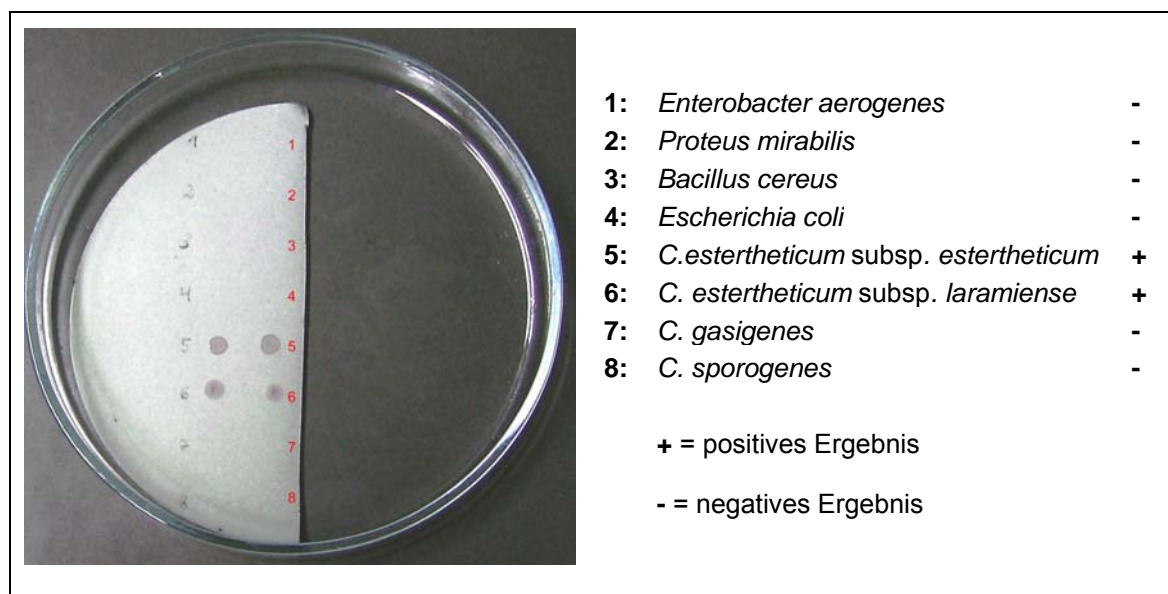


Abbildung 10: Nylonmembran nach Hybridisierung von DNA-Dotblots verschiedener Bakterienarten zur Überprüfung der Spezifität der eingesetzten Gensonde

4.3.3 Überprüfung der Methode mit Reinkulturen

Die Koloniehybridisierung mit Reinkulturen des Referenzstammes DSMZ 8809 ergab deutliche blaue Spots auf den Nylonmembranen an den Stellen, wo sich auf der zugehörigen Agarplatte Koloniematerial befand (vgl. Abbildung 11). Die beiden eingesetzten Konzentrationen (3 µl/ml und 5 µl/ml) an Gensonde lieferten dabei eine gleichwertige Intensität des Signals. Eine Konzentration von 3 µl Sonde pro ml Hybridisierungspuffer erwies sich daher als ausreichend.

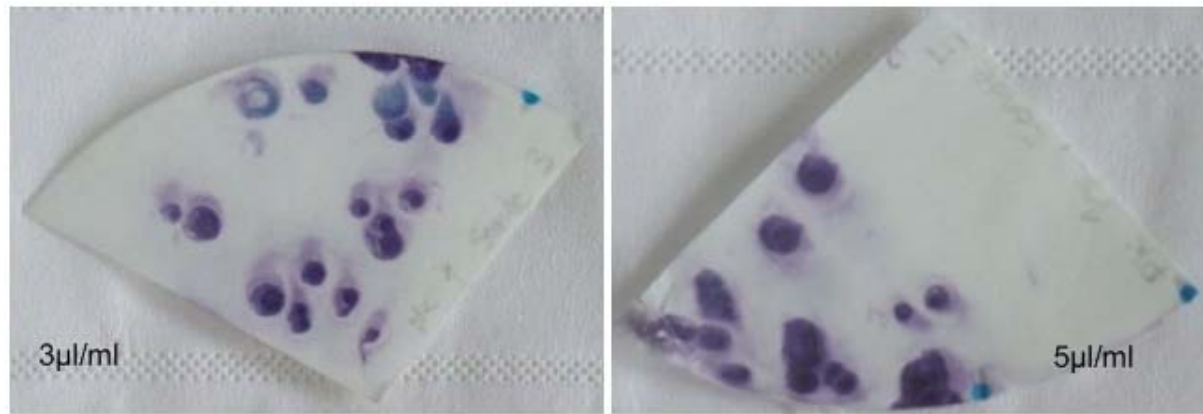


Abbildung 11: Nylonmembranen nach Koloniehybridisierung mit Reinkulturen von *C. estertheticum* mit unterschiedlichen Konzentrationen an eingesetzter Gensonde

4.4 Etablierung der Methode zur Konservierung von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen

Hierfür wurden drei verschiedene Verfahren überprüft: Gefriertrocknung (Verfahren 1) Konservierung in Kryoröhrchen mit Glycerin (Verfahren 2), jeweils mit exponentiell wachsenden Kulturen sowie Gefriertrocknung von überwiegend versporteten Kulturen (Verfahren 3).

Für die Konservierung von *C. estertheticum* war eine Rekultivierung der konservierten Organismen nur bei dem Verfahren 3 (Gefriertrocknung von überwiegend versporteten Kulturen) in beiden Testdurchläufen erfolgreich. Bei den anderen beiden Verfahren, bei denen exponentiell wachsende Kulturen konserviert wurden, war keine Wiederanzucht möglich.

4.5 Untersuchung von vakuumverpackten Rindfleischproben

Insgesamt wurden 20 vakuumverpackte Rindfleischproben auf das Vorkommen von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen, Verderbnisgeruch, bakterioskopischen Befund im Tropfsaft, allgemeine mikrobiologische Parameter und pH-Wert untersucht. Elf Proben wurden zufällig aus dem Handel gezogen, neun Proben waren als Verdachtsproben zur Untersuchung eingesendet worden.

4.5.1 Visuelle Überprüfung der Verpackung

Bis auf die Probe V6 wies keine der untersuchten Handels- und Verdachtsproben eine makroskopisch sichtbare Beschädigung der Vakuumverpackung auf. Die Verpackung der Probe V6 wurde beim Entfernen der Umverpackung beschädigt, so dass die Gasansammlung in der Packung nicht mehr beurteilt werden konnte. Die Beurteilung der übrigen Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab Scores zwischen 0 und 2 bei den Proben aus dem Handel, während die Verdachtsproben Scores von 1-2 bis 5 aufwiesen (Tabelle 25). Entsprechend dieser Einteilung wich eine der Handelsproben vom Normalzustand ab (H6), eine Handelsprobe wurde als grenzwertig beurteilt (H5), die übrigen Handelsproben waren mit Scores von 0 und 1 unauffällig. Die Verdachtsproben zeigten bis auf eine grenzwertige Probe (V7) eine produktuntypische starke Gasbildung in der Packung.

Die Abbildungen 12, 13 und 14 zeigen einzelne Proben zur Veranschaulichung der Pack Blowing Scores.

Tabelle 25: Ergebnisse der Beurteilung der Rindfleischproben nach dem Pack Blowing Score von Boerema et al. (2007)

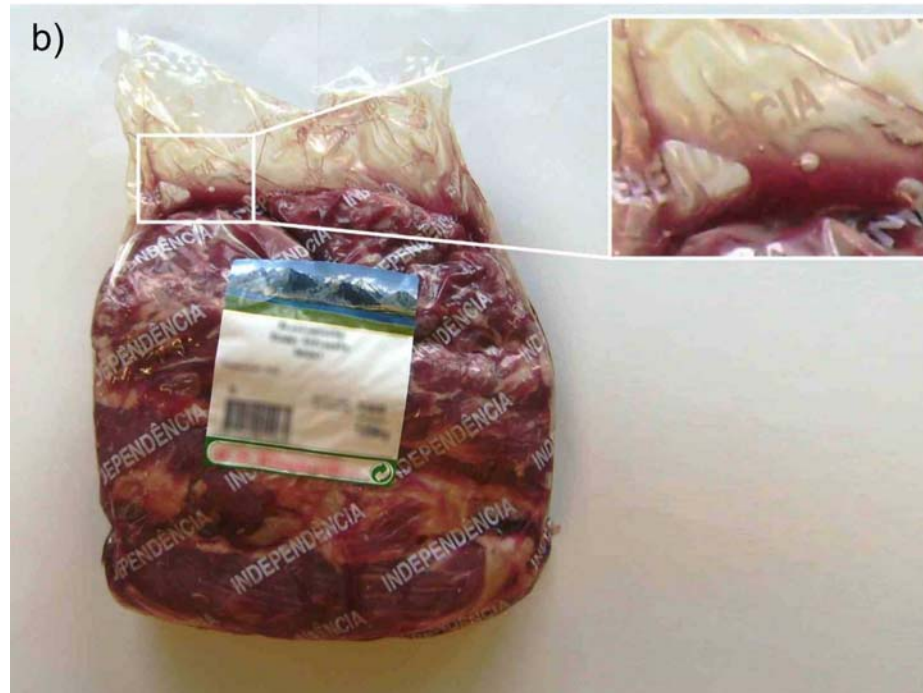
Handelsproben		Verdachtsproben	
Proben-Nr.	Score	Proben-Nr.	Score
H1	0	V1	2
H2	1	V2	4
H3	0	V3	4
H4	1	V4	3
H5	1-2	V5	3
H6	2	V6	n.d.
H7	0	V7	1-2
H8	0	V8	3
H9	1	V9	5
H10	1		
H11	0		



Probe H8:

**Pack Blowing
Score 0**

Die Vakuum-
verpackung liegt an
allen Stellen direkt
am Fleisch bzw.
Tropfsaft an, es sind
keine Gasblasen
sichtbar



Probe H9:

**Pack Blowing
Score 1**

Die Verpackung liegt
direkt am Fleisch an,
im Tropfsaft sind ein-
zelne Gasblasen
erkennbar (betreffen-
der Bereich vergrößert)

Abbildung 12: Vakuumverpackte Fleischproben mit Pack Blowing Scores 0 und 1



Abbildung 13: Vakuumverpackte Fleischproben mit Pack Blowing Scores 2 und 3



Probe V2:

**Pack Blowing
Score 4**

Die Packung ist auf ihre volle Größe aufgebläht, die Folie ist noch nicht straff gespannt



Probe V9:

**Pack Blowing
Score 5**

Die Verpackung ist auf ihre volle Größe prall aufgebläht, die Folie ist straff gespannt

Abbildung 14: Vakuumverpackte Fleischproben mit Pack Blowing Scores 4 und 5

4.5.2 Sensorische Beurteilung des Geruchs

Die Rindfleischproben wurden durch drei Prüfer sensorisch auf Geruchsabweichungen untersucht. Die Ergebnisse der sensorischen Beurteilung sind in den Tabellen 26 und 27 dokumentiert. Der Geruch der Handelsproben wurde überwiegend als leicht säuerlich, frisch und charakteristisch für Rindfleisch beschrieben. Auf der Punkteskala für Verderbnisgeruch wurden die Proben am häufigsten mit der Zahl 1, also „völlig einwandfrei“ bewertet. Drei der Handelsproben (H5, H6 und weniger ausgeprägt H9) wiesen Geruchsabweichungen in Richtung „faulig“, „muffig“, „sauer“ oder „dumpf“ auf. Diese Abweichungen wurden mit Punktzahlen von 2 und 3 zum Teil als „akzeptabel“, „gerade noch akzeptabel“ oder in einem Fall mit Punktzahl 4 als „nicht mehr akzeptabel“ bewertet (vgl. Tabellen 18 und 26).

Der Geruch der Verdachtsproben wurde vor allem mit Erbrochenem, zum Teil auch mit verdorbenen Milchprodukten assoziiert, die Adjektive „faulig“, „säuerlich“, „käsig“, und „stechend“ wurden häufig verwendet (Tabelle 27). Das Ausmaß der Geruchsabweichung wurde auf der Punkteskala überwiegend mit der Zahl 5, also „extremer Verderbnisgeruch“ bewertet.

Eine Ausnahme innerhalb der Verdachtsproben bildete die Probe V7, der Geruch dieser Probe wurde vor allem als „sauer“ beschrieben und der Verderbstatus mit 3 Punkten als „gerade noch akzeptabel“ bewertet.

Tabelle 26: sensorische Beurteilung der untersuchten Rindfleischproben (Handelsproben)

Proben-Nr.	Beschreibung durch die einzelnen Prüfer (a, b und c)	Punktzahl Verderbgeruch
H1	a: charakteristisch für Fleisch	1
	b: fleischig, frisch	1
	c: frisch, leicht säuerlich	1
H2	a: säuerlich fleischig	1
	b: säuerlich	1
	c: säuerlich / käsig	2
H3	a: leicht säuerlich fleischig	1
	b: charakteristisch für frisches Fleisch	1
	c: fleischig	1
H4	a: charakteristisch für vakuumverpacktes Fleisch, leicht säuerlich	1
	b: charakteristisch für Fleisch	1
	c: fleischig, leicht säuerlich	1
H5	a: zunächst leicht faulig, dann fleischig, leicht säuerlich	3
	b: erst leicht faulig, dann Fleischgeruch	3
	c: säuerlich, faulig	4
H6	a: leicht säuerlich	2
	b: säuerlich bis sauer, Geruch verfliegt allmählich	2
	c: fischig, flach	3
H7	a: charakteristisch für frisches Fleisch, leicht säuerlich	1
	b: aromatisch, frisches Fleisch	1
	c: typischer Reifegeruch (leicht säuerlich)	1
H8	a: leicht säuerlich, neutral fleischig, frisch	1
	b: frisch, aromatisch	1
	c: aromatisch frisch	1
H9	a: aromatisch – fleischig, aber leicht dumpfe Note	2
	b: leicht muffig	2
	c: frisch, leicht säuerlich, etwas dumpf	1
H10	a: aromatisch nach frischem Fleisch	1
	b: frisch, leicht säuerlich	1
	c: frisch, aromatisch, abgerundet	1
H11	a: aromatisch nach frischem Fleisch	1
	b: frisches Rindfleisch	1
	c: frisch, aromatisch	1

Tabelle 27: sensorische Beurteilung der untersuchten Rindfleischproben (Verdachtsproben)

Proben-Nr.	Beschreibung durch die einzelnen Prüfer (a, b und c)	Punktzahl Verderbgeruch
V1	a: säuerlich-käsig, wie Erbrochenes	5
	b: stechend, wie verdorbene Milch	5
	c: wie Erbrochenes	5
V2	a: anfangs auch faulig H ₂ S-artig, dann nach Erbrochenem, sauer	5
	b: erst faulig, dann stechend, wie Erbrochenes	5
	c: zunächst faul, dann stechend-estherartig und sauer	5
V3	a: erst faulig (verfliegt), dann wie Erbrochenes	5
	b: erst faulig, dann säuerlich, nach Erbrochenem	5
	c: erst faulig (wie H ₂ S), dann wie Erbrochenes	5
V4	a: wie Erbrochenes, stechend	4
	b: nach Erbrochenem	5
	c: wie Erbrochenes, verdorbener Käse	5
V5	a: zunächst faulig, dann sauer, nach Erbrochenem	5
	b: erst leicht faulig, sauer, nach Erbrochenem	5
	c: faulig, nach Erbrochenem	5
V6	a: faulig, nach Erbrochenem	5
	b: faulig, dann käsig, nach Erbrochenem	5
	c: faulig, nach Erbrochenem	5
V7	a: säuerlich bis sauer, fruchtig-süßlich	2
	b: sauer	3
	c: sauer, ansonsten nach Rindfleisch	3
V8	a: wie Erbrochenes	5
	b: faulig-fischig – wie Erbrochenes	5
	c: faulig-säuerlich	5
V9	a: faulig – säuerlich – etwas ranzig – zum Teil stechend	5
	b: säuerlich – faulig, nach Erbrochenem, etwas stechend	5
	c: wie Erbrochenes	5

4.5.3 Bakterioskopische Untersuchung

Die Ergebnisse der bakterioskopischen Untersuchung sind in den Tabellen 28 und 29 dokumentiert. Bei den Handelsproben bestand die Keimflora aus unterschiedlichen Anteilen kurzer bis mittellanger Stäbchen und einigen Kokken. Bei den Verdachtsproben dominierten, mit Ausnahme der Probe V7, große plumpe Stäbchen, zum Teil mit Endosporenbildung das mikroskopische Bild. Bei drei der neun Verdachtsproben wurden außerdem oval-förmige Hefen beobachtet.

Tabelle 28: Bakterioskopische Befunde der untersuchten Rindfleischproben (Handelsproben)

Proben-Nr.	Dominante Keimflora	Übrige Keimflora
H1	Viele kleine plumpe Stäbchen	Wenige kleine schlanke Stäbchen
H2	Viele kurze und mittellange schlanke Stäbchen	-
H3	Schlanke mittellange und plumpe kurze Stäbchen	-
H4	Kurze plumpe Stäbchen, oft in Paaren	Wenige Kokken
H5	Viele kurze und mittellange Stäbchen	Einzelne lange Stäbchen
H6	Viele kleine schlanke Stäbchen, z.T. in Ketten	Vereinzelt kleine Kokken
H7	Kurze plumpe Stäbchen, viele in Paaren	-
H8	Kurze plumpe Stäbchen	-
H9	Kurze und plumpe Stäbchen	Mittellange schlanke Stäbchen
H10	Wenig kurze plumpe Stäbchen	Einige Kokken
H11	Insgesamt sehr wenig, kleine Stäbchen, Kokken	-
-: keine weiteren Formen beobachtet		

Tabelle 29: Bakterioskopische Befunde der untersuchten Rindfleischproben (Verdachtsproben)

Proben-Nr.	Dominante Keimflora	Übrige Keimflora
V1	Große plumpe Stäbchen, ovale Hefen mit Sprossung	Wenige kleine Stäbchen
V2	Große plumpe Stäbchen, teilweise subterminale Endosporen	Sehr wenige kleine Stäbchen
V3	Große plumpe Stäbchen, teilweise subterminale Endosporen	Wenig Kokken und kurze Stäbchen
V4	Große plumpe Stäbchen, einzelne davon mit subterminalen Endosporen	Wenig Kokken (teilweise in Ketten), wenig schlanke Stäbchen
V5	Große plumpe Stäbchen	Wenig kleine Stäbchen, einzelne Kokken
V6	Große plumpe Stäbchen, ovale Hefen mit Sprossung	Wenige kleine plumpe Stäbchen und Kokken
V7	Kleine plumpe sowie schlanke Stäbchen	Wenige Kokken
V8	Große plumpe Stäbchen, ovale Hefen mit Sprossung	Wenige Kokken, einzelne kurze Stäbchen
V9	Große plumpe Stäbchen	Kurze plumpe und mittellange schlanke Stäbchen

Abbildung 15 zeigt ausgewählte Aufnahmen des mikroskopischen Befundes von verschiedenen Verdachtsproben. Deutlich erkennbar sind die zahlreichen großen plumpen Stäbchen, zum Teil mit subterminalen Endosporen (vgl. Abb. 15, V2 und V4).

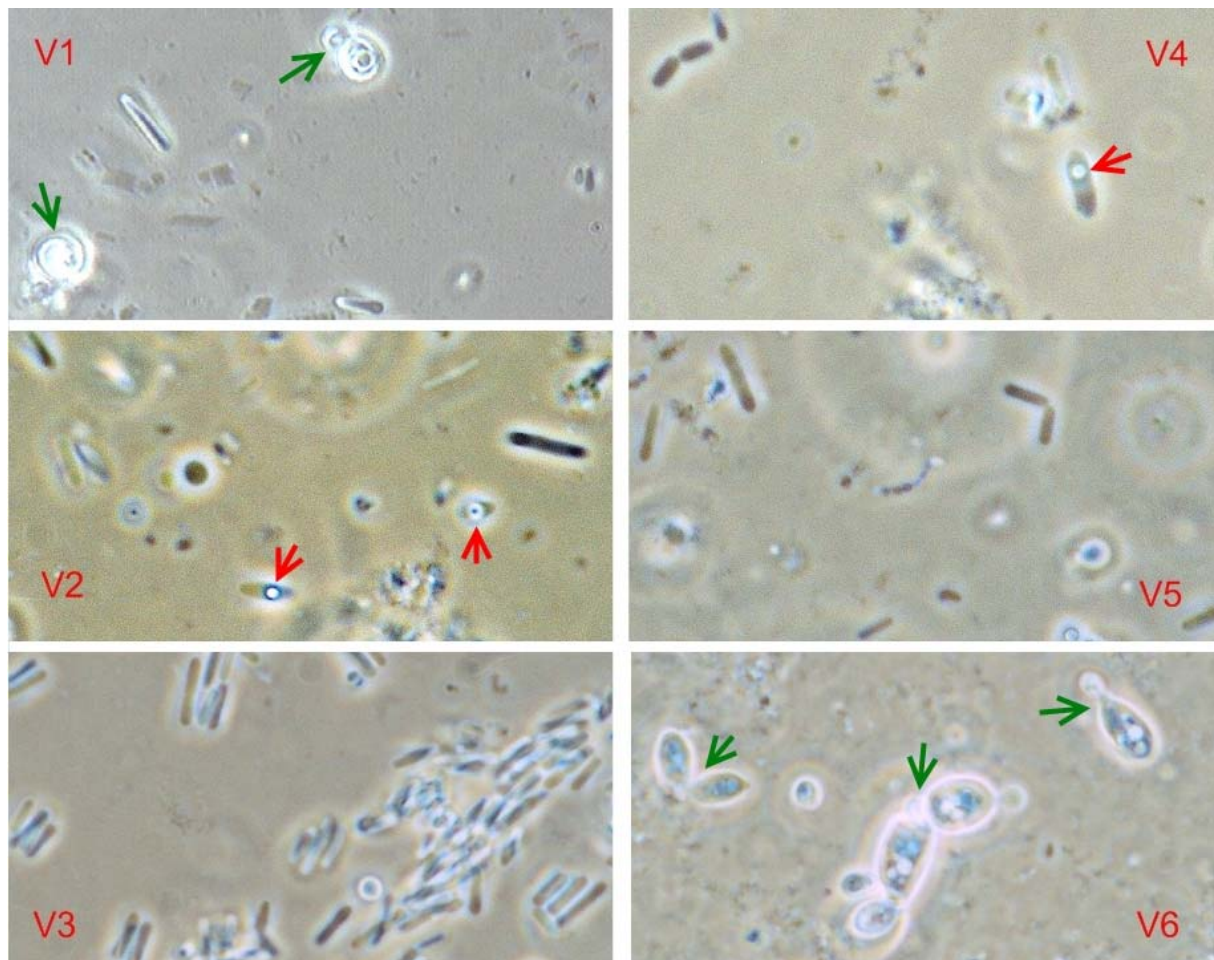


Abbildung 15: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen des Befundes in Tropfsaft-Nativpräparaten von untersuchten Verdachtsproben. Rote Pfeile: Endosporen, Grüne Pfeile: Hefen mit Sprossung

4.5.4 Allgemeine mikrobiologische Untersuchung und pH-Wert

Die Ergebnisse der allgemeinen mikrobiologischen Untersuchung sowie die gemessenen pH-Werte der 20 untersuchten Rindfleischproben sind in den Tabellen 30 und 31 dargestellt. Die Gesamtkeimzahlen waren mit Werten zwischen 10^2 und bis zu 10^8 KbE/cm² sehr unterschiedlich. Niedrige Keimzahlen von etwa 10^2 wiesen die Handelsproben H10 und H11 auf. In einem mittleren Keimzahlbereich bei etwa 10^4 bis 10^5 KbE/cm² lagen zwei Handelsproben (H3 und H4) sowie sechs Verdachtsproben (V1-V6). Hohe Keimzahlen von 10^7 bis 10^8 KbE/cm² wiesen drei Verdachtsproben (V7-V9) und sieben Handelsproben (H1, H2, H5-H9) auf. Den Hauptanteil der bakteriellen Flora stellten überwiegend Milchsäurebakterien. *Entero-*

bacteriaceae waren meist in Keimzahlen um 10^2 – 10^3 , in Einzelfällen auch bis 10^6 KbE / cm² vorhanden.

Pseudomonaden wurden nur in den Proben H4, H10 und H11 im Bereich von etwa 10^2 KbE / cm² nachgewiesen.

Hefen wurden in zwei von elf Handelsproben und in drei von neun Verdachtsproben in Keimzahlen bis zu 10^4 KbE / cm² nachgewiesen. Bei den 3 Verdachtsproben, in denen mikroskopisch viele Hefen zu sehen waren (vgl. Tabelle 29), wurden diese nach Inkubation bei 10 °C nachgewiesen. Eine Kultivierung dieser Hefen bei 25 °C war nicht möglich.

Die gemessenen pH-Werte lagen insgesamt zwischen 5,1 und 6,2. Eine Verdachtsprobe wies einen Wert von 6,2 auf, bei allen anderen Proben lagen die Werte unter 6,0.

Tabelle 30: Mikrobiologische Untersuchungsbefunde (KbE / cm²) und pH-Werte der untersuchten Rindfleischproben (Handelsproben)

Proben-Nr.	Parameter						
	GKZ	MSB	Entero	Ps	Hefen 25 °C	Hefen 10 °C	pH-Wert
H1	$2,9 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$2,7 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,5
H2	$1,0 \times 10^8$	$3,4 \times 10^7$	$3,2 \times 10^3$	$<10^2$	$<10^2$	$4,0 \times 10^2$	5,6
H3	$7,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^3$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,2
H4	$5,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$<10^2$	$7,0 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,4
H5	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,3
H6	$2,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	$<10^2$	$6,8 \times 10^4$	$8,9 \times 10^3$	5,7
H7	$1,4 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,5
H8	$4,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,7
H9	$1,0 \times 10^8$	$2,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,7
H10	$6,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$<10^2$	$1,0 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,5
H11	$4,5 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$5,0 \times 10^2$	$<10^2$	$<10^2$	5,8
GKZ=	aerobe mesophile Gesamtkeimzahl			MSB=	Milchsäurebakterien-Keimzahl		
Entero=	<i>Enterobacteriaceae</i> -Keimzahl			Ps=	Pseudomonaden-Keimzahl		

Tabelle 31: Mikrobiologische Untersuchungsbefunde (KbE / cm²) und pH-Werte der untersuchten Rindfleischproben (Verdachtsproben)

Proben-Nr.	Parameter						
	GKZ	MSB	Entero	Ps	Hefen 25 °C	Hefen 10 °C	pH-Wert
V1	6,0x 10 ⁴	2,0 x 10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	1,9 x 10 ⁴	5,6
V2	4,5 x 10 ⁵	3,5 x 10 ⁴	7,0 x 10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,9
V3	2,1 x 10 ⁵	<10 ³	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,6
V4	8,8 x 10 ⁵	<10 ³	4,0 x 10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,6
V5	4,8 x 10 ⁵	<10 ³	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,5
V6	1,5 x 10 ⁵	2,0 x 10 ³	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,6
V7	1,5 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸	<10 ²	<10 ²	<10 ²	2,0 x 10 ⁴	5,1
V8	2,1 x 10 ⁷	5,6 x 10 ⁶	3,5 x 10 ³	<10 ²	<10 ²	<10 ²	6,2
V9	3,2 x 10 ⁷	8,6 x 10 ⁶	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²	5,5
GKZ=	aerobe mesophile Gesamtkeimzahl			MSB=	Milchsäurebakterien-Keimzahl		
Entero=	<i>Enterobacteriaceae</i> -Keimzahl			Ps=	Pseudomonaden-Keimzahl		

4.5.5 Nachweis von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen

4.5.5.1 PCR-Screening

Das PCR-Screening mit dem Primerpaar 16SEF/16SER erbrachte ein positives Ergebnis bei acht der neun untersuchten Verdachtsproben, während bei allen Handelsproben der Nachweis negativ verlief.

Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Proben positiv.

4.5.5.2 PCR nach Anreicherung

Bei den Proben, die im Screening direkt aus dem Tropfsaft ein negatives PCR-Ergebnis aufwiesen, wurde die PCR nach Anreicherung wiederholt. Bei allen diesen Proben verlief der Nachweis nach Anreicherung ebenfalls negativ.

4.5.5.3 Koloniehybridisierung und gezielte Isolierung

Die Koloniehybridisierung ergab bei sechs der acht Screening-positiven Proben deutliche blaue Spots auf den Nylonmembranen, die entsprechenden Kolonien wurden nach Vergleich mit der entsprechenden Agarplatte ausgewählt und zur Herstellung von Reinkulturen ausgestrichen. Bei fünf dieser sechs Proben gelang so die Isolierung und Konservierung von Reinkulturen von *C. estertheticum* und/oder *C. estertheticum*-like Organismen. Abbildung 16 zeigt die Agarplatte mit Ausstrich der Anreicherung von Probe V2 nach erneuter Inkubation bei 10 °C und die zugehörige Nylonmembran nach durchgeführter Koloniehybridisierung.

Bei Probe V8 wurde nach Koloniehybridisierung eine Kolonie abgeimpft, die auch mit beiden PCR-Systemen (16SEF/16SER und EISRF/EISRR) bestätigt wurde. Es handelte sich jedoch um eine Mischkultur ohne mikroskopisch feststellbare Sporenbildung, aus der sich *C. estertheticum* auch nach mehrmaligem Ausstreichen nicht isolieren ließ.



rote Markierungen: gut abgegrenzte Spots auf der Nylonmembran
gelbe Markierungen: entsprechende Kolonien auf der Agarplatte

Abbildung 16: CBA-Platte, Ausstrich von angereichertem Tropfsaft der Probe V2 (rechts im Bild) und zugehörige Nylonmembran nach Kolonie-Hybridisierung (links im Bild)

4.5.6 Bestätigung und Einordnung der Isolate

Die Ergebnisse der PCR-Bestätigung und Einordnung der gewonnenen Isolate sind in Tabelle 32 zusammengefasst. Zwei Isolate, die ein positives Ergebnis in beiden PCR-Systemen erbrachten, wurden als *C. estertheticum* eingestuft. Alle anderen (n=21) Isolate waren positiv in der PCR mit den Primern 16SEF/16SER und negativ mit den Primern EISRF/EISRR. Diese Isolate wurden daher als *C. estertheticum*-like Organismen klassifiziert. Ein Isolat zeigte deutliche β -Hämolyse auf CBA, die übrigen zeigten ein Wachstum auf CBA-Agar ohne Hämolyse.

C. estertheticum subsp. *estertheticum* (Typstamm DSMZ 8809, entspricht ATCC 51377 und NCIMB 12511), dessen Hämolyseverhalten in der Literatur unterschiedlich beschrieben wurde (vgl. 2.3.1.2), zeigte in dieser Untersuchung auf CBA durchwegs deutliche β -Hämolyse (Abbildung 17). Die Hämolysezone bildete sich erst etwa 2 Tage nach dem Entstehen makroskopisch sichtbarer Kolonien aus und war auf CBA meist nach 12 bis 14 Tagen Inkubation bei 10 °C sichtbar.

Die Koloniemorphologie der einzelnen Isolate aus Rindfleisch auf CBA konnte in drei Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 32). Abbildung 17 zeigt Agarplatten mit Reinkulturen von Isolaten, welche die verschiedenen Wuchsformen ausbildeten, sowie vom Typstamm DSMZ 8809.

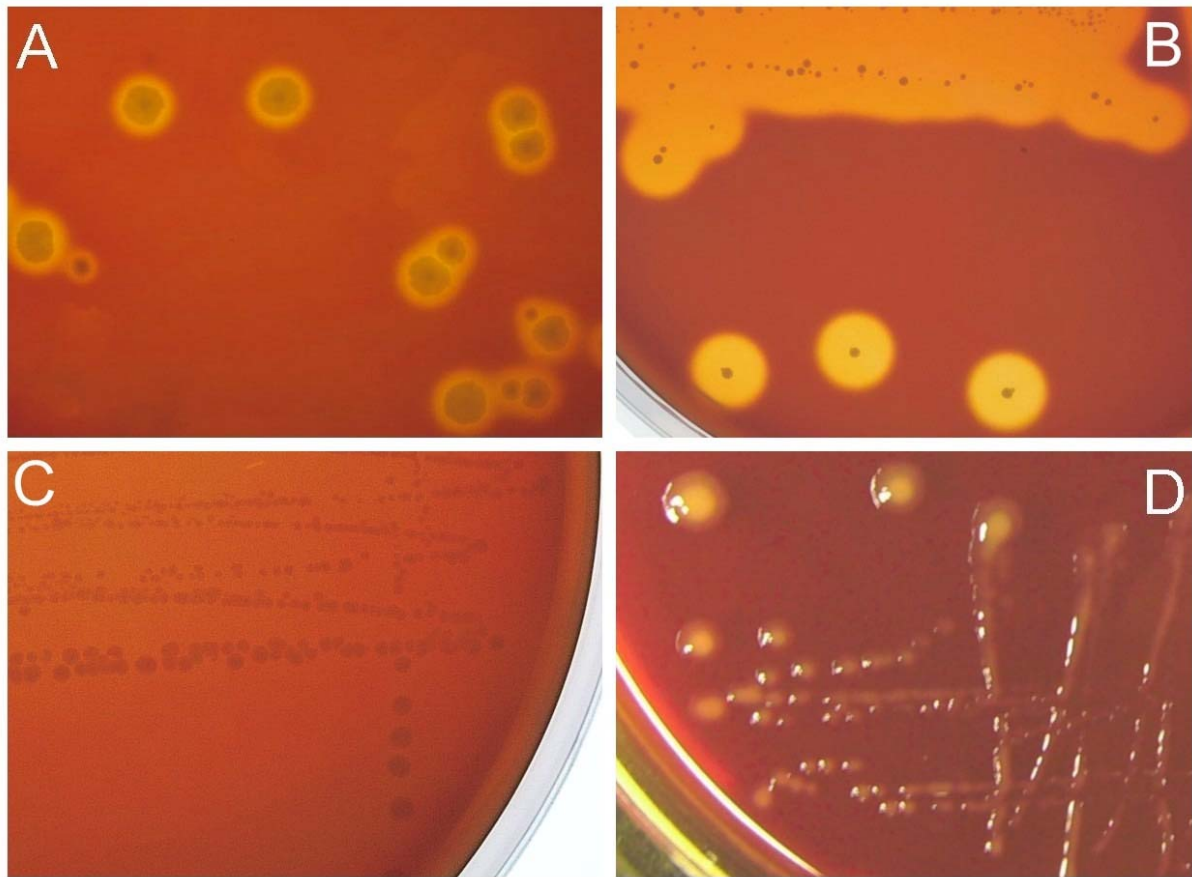
Nach 21 Tagen aerober Inkubation bei 10 °C wurde bei keinem der Isolate Wachstum auf CBA festgestellt. Somit wurden alle Isolate als obligate Anaerobier bestätigt.

Alle Isolate zeigten im mikroskopischen Bild Sporenbildung nach vierwöchiger Inkubation bei 10 °C auf CBA und PYGS Agar. Bei Isolat Nr. 3 wurde auf CBA nur sehr vereinzelt Sporenbildung beobachtet, während auf PYGS Agar der Großteil der Zellen versporst vorlagen. Die übrigen Isolate bildeten auf beiden Nährböden etwa gleiche Anteile an Sporen aus.

Tabelle 32: Überblick über die gewonnenen *C. estertheticum*- und *C. estertheticum*-like Isolate

Laufende Nr. Isolat	Proben – Nr.	PCR 16SEF/R	PCR EISRF/R	Einstufung	Aerobes Wachstum	β-Hämolyse auf CBA	Sporenbildung	Wuchsform auf CBA
1	V1	+	+	CE	-	-	+	1
2	V2	+	-	CEL	-	-	+	2
3	V2	+	+	CE	-	+	+	1
4	V2	+	-	CEL	-	-	+	2
5	V2	+	-	CEL	-	-	+	2
6	V2	+	-	CEL	-	-	+	2
7	V2	+	-	CEL	-	-	+	3
8	V3	+	-	CEL	-	-	+	3
9	V3	+	-	CEL	-	-	+	3
10	V3	+	-	CEL	-	-	+	3
11	V3	+	-	CEL	-	-	+	3
12	V3	+	-	CEL	-	-	+	3
13	V4	+	-	CEL	-	-	+	2
14	V4	+	-	CEL	-	-	+	2
15	V4	+	-	CEL	-	-	+	2
16	V4	+	-	CEL	-	-	+	2
17	V4	+	-	CEL	-	-	+	2
18	V5	+	-	CEL	-	-	+	2
19	V5	+	-	CEL	-	-	+	2
20	V5	+	-	CEL	-	-	+	2
21	V5	+	-	CEL	-	-	+	2
22	V5	+	-	CEL	-	-	+	2
23	V5	+	-	CEL	-	-	+	2

CE= *Clostridium estertheticum* **CEL=** *Clostridium estertheticum*-like Isolat. **Wuchsformen:** **1=**beige-weißlich, konvex, unregelmäßig gelappter Rand, **2=**grau-weißlich durchscheinend, flach oder knopfförmig, glatt, z.T gelappter Rand, **3=**beige mit durchsichtigem Rand, konvex, glattrandig, glänzend



-
- A:** *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSMZ 8809), entspricht Wuchsform 1
B: Isolat Nr. 3, Wuchsform 1
C: Isolat Nr. 19, Wuchsform 2
D: Isolat Nr. 8, Wuchsform 3
-

Abbildung 17: CBA-Platten mit Reinkulturen von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämmen

4.5.7 Rekultivierbarkeit der Isolate

Alle aus Rindfleisch gewonnenen *C. estertheticum*- und *C. estertheticum*-like Isolate konnten nach Konservierung mit der Methode 3 (Gefriertrocknung von versporteten Kulturen) in PYGS Bouillon nach anaerober Inkubation für 21 Tage bei 10 °C erfolgreich rekultiviert werden.

4.5.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Einen Überblick über die Ergebnisse des Nachweises von Blown Pack Spoilage durch *C. estertheticum* aus den untersuchten Rindfleischproben gibt Tabelle 33. Alle Proben, bei denen ein positiver PCR-Befund im Tropfsaft vorlag, wiesen die typischen Kennzeichen von Blown Pack Spoilage (charakteristische Geruchabweichung, Gasbildung) auf und zeigten einen bakterioskopischen Befund mit vielen großen, plumpen Stäbchen. Bei allen Proben, die nicht die typische Kombination der Symptome zeigten (außer leichter abnormer Gasbildung mit Score 2 bei Probe H6), fehlte auch der auffällige bakterioskopische Befund. Ebenso verlief bei diesen Proben das PCR-Screening sowohl direkt als auch nach Anreicherung negativ. Von den acht Screening-positiven Proben zeigten sechs ein positives Ergebnis in der Kolonie-Hybridisierung, welche bei fünf Proben auch zur Isolierung von Reinkulturen führte. *C. estertheticum* wurde aus zwei Proben isoliert, während *C. estertheticum*-like Stämme in vier Proben gefunden wurden. Die Probe V2 enthielt sowohl *C. estertheticum* als auch *C. estertheticum*-like Stämme. Die Ergebnisse der Handelsproben wurden in einer Spalte zusammengefasst.

Tabelle 33: Zusammenfassung von Verderbssymptomen und *C. estertheticum*- bzw. *C. estertheticum*-like Befunden in Rindfleischproben

Probe	H1–H11	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9
Pack Blowing Score	0-2	2	4	4	3	3	n.d.	1-2	3	5
Auffälliger bakterioskopischer Befund	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Massiver typischer Verderbgeruch	- (a)	+	+	+	+	+	+	-	+	+
PCR-Screening	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
PCR nach Anreicherung	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
Koloniehybridisierung	n.d.	+	+	+	+	+	-	n.d.	+	-
Isolierung von Reinkulturen	n.d.	+	+	+	+	+	n.d.	n.d.	- (b)	n.d.
Klassifizierung der Isolate mittels PCR	n.d.	CE	CE + CEL	CEL	CEL	CEL	n.d.	n.d.	(CE)	n.d.

CE = *Clostridium estertheticum*

CEL = *Clostridium estertheticum*-like Isolat

n.d. = nicht durchgeführt

a) bei drei Handelsproben (H5 und H6 sowie H9) wurden Geruchabweichungen festgestellt, die im Charakter außer einer leicht fauligen Komponente bei H5 nicht dem typischen Geruch der anderen Proben entsprachen, und deren Ausmaß deutlich geringer bewertet wurde als bei den anderen Proben mit sensorischen Abweichungen (vgl. Tabelle 26 und 27).

b) es wurde nach Koloniehybridisierung eine Kolonie abgeimpft, die auch mit beiden PCR-Systemen bestätigt wurde. Es handelte sich jedoch um eine Mischkultur, aus der sich *C. estertheticum* auch nach mehrmaligem Ausstreichen nicht isolieren ließ.

5 Diskussion

Clostridium estertheticum, ein psychrophiler, anaerober Sporenbildner, kann Blown Pack Spoilage bei vakuumverpacktem Rindfleisch verursachen. Bei dieser Form von Verderb entstehen in der Verpackung zum Teil erhebliche Mengen an Gas, was zum Aufblähen der Folie (Bombage) führt. Diese Erscheinung wird von starken Geruchsabweichungen begleitet, wodurch die betroffenen Produkte nicht mehr zum Verzehr geeignet sind. Die psychrophile Natur dieser Organismen ist ausschlaggebend dafür, dass Blown Pack Spoilage durch *C. estertheticum* meist trotz optimaler Kühlhaltung des Fleisches und deutlich vor Ablauf der erwarteten Haltbarkeitsfristen auftritt.

Als *C. estertheticum*-like strains werden einige Clostridienstämme bezeichnet, die ähnliche Eigenschaften wie *C. estertheticum* aufweisen, deren taxonomischer Status jedoch nicht eindeutig ist. Diese Organismen können ebenfalls das oben beschriebene Verderbgeschehen in Rindfleisch bei Kühltemperaturen verursachen.

Neben *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämmen kann auch das Wachstum von *C. gasigenes* auf Rindfleisch Blown Pack Spoilage bei Kühltemperaturen unter 2 °C verursachen. Die letztgenannte Spezies wurde bisher jedoch nur in Neuseeland nachgewiesen, während *C. estertheticum* bisher bei Fleisch aus Großbritannien, USA, Neuseeland, Südafrika, Nordamerika und Nordeuropa gefunden wurde.

Diese Verderbnisform kann zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden auf dem Rindfleischsektor führen, insbesondere weil in der Regel große und oft hochwertige Teilstücke für die Vakuumverpackung verwendet werden.

Erkrankungen bzw. Intoxikationen, die mit dem Verzehr von mit *C. estertheticum* oder anderen kältetoleranten *Clostridium* spp. belastetem Fleisch in Zusammenhang stehen, sind bisher nicht beschrieben worden. Es erscheint ohnehin wenig wahrscheinlich, dass im Falle einer massiven Vermehrung solcher Organismen betroffenes Fleisch noch verzehrt wird, da die Geruchsabweichungen den Verbraucher davon abhalten werden. Allerdings wird gerade vakuumverpackte Ware häufig im Großhandel und nur selten für den Endverbraucher angeboten. Es wäre zumindest denkbar, dass solches Fleisch z.B. nach Reinigung, Umverpackung oder Verarbeitung noch in den Verkehr gelangt, wie dies mit verdorbener Ware im Zuge verschiedener Fleischskandale schon der Fall war (Schulze et al., 2008).

Blown Pack Spoilage durch *C. estertheticum* ist bisher im deutschen Sprachraum kaum bekannt, und auch international sind nur wenige Daten zum Vorkommen dieser Art von Verderb verfügbar. Es gibt keine standardisierten Methoden zum Nachweis von *C. estertheticum*, und vor allem die Art der Übertragung dieser Keime aus der Umgebung der Schlachttiere auf das Fleisch ist noch weitgehend unerforscht.

Die Isolierung von *C. estertheticum* ist aufwändig, hierbei werden lange Inkubationszeiten bei tiefen Temperaturen benötigt und es sind keine geeigneten Selektivmedien verfügbar. Die Entwicklung von schnellen und zuverlässigen molekularbiologischen Nachweismethoden (Broda et al., 2003a) war daher ein wichtiger Schritt für die Diagnostik dieser Erreger. Die Nachweisgrenzen der durch Broda et al. (2003a) entwickelten PCR-Systeme wurden jedoch nur bei vegetativen Zellen von *C. estertheticum* überprüft. Da die Kontamination von Fleisch mit *C. estertheticum* wahrscheinlich vor allem mit Sporen erfolgt, ist auch ein direkter PCR-Nachweis aus Sporen von Interesse.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die DNA-Extraktion für den PCR-Nachweis von *C. estertheticum*-Sporen optimiert und im Anschluss die Nachweisgrenzen für Sporen und vegetative Zellen in Fleischsaft für die beiden verwendeten PCR-Systeme nach Broda et al. (2003a) bestimmt.

Für die Routinediagnostik erscheint die Isolierung dieser Keime wegen der mehrwöchigen Dauer wenig geeignet, jedoch ist sie zwingend notwendig für das wissenschaftliche Arbeiten mit diesen Erregern. Um eine gezielte Isolierung von *C. estertheticum* auch aus nicht-selektiven Medien zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit ein Kolonie-Hybridisierungsverfahren mit einer Digoxigenin-markierten Sonde etabliert.

Im Anschluss an die Etablierung der Methoden wurden insgesamt 20 vakuumverpackte Rindfleischproben auf das Vorhandensein von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen sowie hinsichtlich physikalisch-chemischer, sensorischer und mikrobiologischer Parameter untersucht.

Bei der Optimierung der DNA-Extraktion für Sporen wurden die besten Ergebnisse mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit der Firma Roche erzielt. Das verwendete Extraktionsprotokoll in Kombination mit der vorausgehenden mechanischen Aufbereitung im Ribolyser gewährleistete eine effektive Lyse der Sporen. Die mit die-

ser Methode extrahierte DNA erbrachte positive PCR-Ergebnisse bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} der verwendeten Sporensuspension. Die Bestimmung der Nachweisgrenzen der PCR-Reaktionen mit dem optimierten DNA-Extraktionsverfahren in künstlich kontaminiertem Fleischtropfsaft für Sporen und vegetative Zellen sowie nach Anreicherung (21 Tage bei 4 °C) erbrachte folgende Ergebnisse: Mit beiden PCR-Systemen konnten *C. estertheticum* im Bereich von 10^2 vegetative Zellen bzw. 10^3 Sporen je Milliliter Tropfsaft nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze nach Anreicherung lag im Bereich von 10-100 Zellen/ml Tropfsaft (vgl. Tabellen 22 bis 24).

Somit wurden mittels der erarbeiteten Methodik sowohl Sporen als auch vegetative Zellen von *C. estertheticum* erfasst. Dies ist insofern von entscheidender Bedeutung, weil bisher davon ausgegangen wurde, dass die Kontamination von Fleisch mit *C. estertheticum* hauptsächlich in Sporenform erfolgt (Broda, 2007). Eine sichere Detektion auch von Sporen mittels PCR kann zu einer möglichen Prävention von Blown Pack Spoilage beitragen, da die Organismen schon vor dem Auskeimen und damit vor dem Auftreten von Verderbniserscheinungen nachgewiesen werden können. Würde bei einem positiven Nachweis von *C. estertheticum* bei frisch gewonnenem Fleisch die entsprechende Ware nicht vakuumverpackt und zeitnah verbraucht oder kurzfristig tiefgefroren, so könnten wirtschaftliche Einbußen gemindert werden. Zudem ermöglicht die Erfassung von Sporen eine effektivere Suche nach den Kontaminationsquellen für *C. estertheticum* in der Umgebung von Schlachttieren, landwirtschaftlichen Betrieben, Futtermitteln etc..

Erste Untersuchungen in Schlachtbetrieben (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002) deuten auf Tierhäute und Fäzes als Hauptkontaminationsquelle mit psychophilen Clostridien hin. Da diese Organismen sich bei Körpertemperatur nicht vermehren können, ist demnach ein Habitat in der Umgebung der Tiere, im Futter oder auch im Tränkwasser, möglich.

Die Widerstandsfähigkeit der Sporen ermöglicht es sporenbildenden Organismen, bei für sie ungünstigen Bedingungen (für psychophile Clostridien Temperaturen oberhalb von 15 bis 20 °C) lange Zeiträume zu überdauern, bis die Verhältnisse wieder für eine Vermehrung geeignet sind. Möglicherweise benötigen daher psychophile *Clostridium* spp. nicht permanent, sondern nur vorübergehend kalte Habitate und sind eventuell sogar weit verbreitet. Eine solche Verbreitung könnte nur mit einer gezielten Untersuchung auf diese Organismen hin festgestellt werden, für die nun eine

robuste Methode zur Verfügung steht. Diese müsste allerdings auf ihre Eignung für andere Probenmatrizes noch überprüft werden.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen der PCR-Methoden wurden die Keimzahlen in den als Inokulum verwendeten Kulturen parallel mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Bei der Auswertung fiel auf, dass bei direkter Zellzählung mit Thoma-Zählkammer die Werte jeweils um einen Faktor von etwa zwei Zehnerpotenzen höher lagen als bei der Bestimmung im Spatelverfahren auf CBA (vgl. Tabelle 20). Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf das unvollständige Wachstum von *C. estertheticum* auf den verwendeten Agarplatten zurückzuführen.

Probleme bei der Kultivierung dieser Keime wurden schon mehrfach beschrieben (Boerema et al., 2003; Broda et al., 2002; Dainty et al., 1989; Helps et al., 1999; Kalchayanand et al., 1989). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Versuchsbedingungen an die Bedürfnisse von *C. estertheticum*, soweit bekannt, angepasst. Alle Pipettierschritte fanden unter Ausschluss von Sauerstoff in einer anaeroben Arbeitsstation statt. Alle Medien sowie Verdünnungsflüssigkeiten wurden mindestens 48 Stunden in der anaeroben Arbeitsstation vorreduziert und vor Gebrauch gekühlt. Mit CBA wurde zudem ein reichhaltiges Medium ohne Hemmstoffe gewählt. Offensichtlich herrschten dennoch nicht die idealen Bedingungen für ein Wachstum von *C. estertheticum*. Daher sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die optimalen Anzuchtmedien und Inkubationsbedingungen für Keimzählungen von *C. estertheticum* zu ermitteln. Vor allem bei Verwendung fester Nährmedien bereitet die Kultivierung dieser Keime Probleme (Broda et al., 1998c; Dainty et al., 1989), hier könnte die Entwicklung eines MPN-Verfahrens mit flüssigen Medien von Vorteil sein.

Um rein methodisch bedingte Ursachen für die beobachteten Unterschiede auszuschließen, wurden außerdem vergleichende Keimzählungen mit *E. coli* unter Verwendung der gleichen Techniken durchgeführt. Bei diesen Keimzählungen wurde mit Spatelverfahren und mit Thomakammer eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse erzielt (vgl. Tabelle 21). Ein methodisch bedingter Fehler kann daher als Ursache für die beobachteten Unterschiede weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Nachweisgrenzen der PCR-Systeme wurden aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse mit den beiden Keimzählungsverfahren mit der direkten Zellzählung in der Thomakammer ermittelt. Da die PCR sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare

Zellen erfasst, würde mit einer Nachweisgrenze, welche sich an der im Spatelverfahren auf festen Nährmedien ermittelten Keimzahl orientiert, eine größere Empfindlichkeit der Methode vorgetäuscht. Beispielsweise waren aus Verdünnungen, die nach dem Spatelverfahren weniger als eine KbE/ml von *C. estertheticum* enthielten, noch positive PCR-Nachweise möglich. Die direkte Zählung in der Zählkammer wies jedoch darauf hin, dass in diesen Verdünnungen etwa 10^2 Zellen bzw. Sporen/ml vorhanden waren.

Entsprechend muss bei Keimzählungen von *C. estertheticum* unter ähnlichen Bedingungen im Spatelverfahren damit gerechnet werden, dass ein Großteil der vorhandenen Mikroorganismen nicht erfasst wird. Ob diese nicht erfassten Zellen tatsächlich nicht mehr lebensfähig oder nur mit den verwendeten Methoden nicht kultivierbar sind, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In Fleisch- und anderen Lebensmittelproben kommen häufig Substanzen vor, welche durch eine Hemmung von PCR-Reaktionen zu falsch-negativen Ergebnissen führen können, sogenannte PCR-Inhibitoren (Al-Soud und Radstrom, 2000; Rossen et al., 1992). Daher wurde bei allen DNA-Extrakten, die aus beimpftem Tropfsaft bzw. aus Tropfsaft der untersuchten Rindfleischproben gewonnen wurden, eine externe Amplifikationskontrolle nach Gallien et al. (1997) durchgeführt. Der hierbei amplifizierte DNA Abschnitt von 429 bp war bei allen Proben nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel als deutliche Bande zu erkennen. Die DNA-Extrakte waren somit weitgehend frei von PCR-Inhibitoren. Negative Ergebnisse beim Nachweis von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen in Rindfleischproben wurden demzufolge als richtig negativ bestätigt. Weiterhin kann die angewandte Technik zur DNA-Extraktion als geeignet für die Untersuchung von Fleischproben angesehen werden.

Das in dieser Arbeit etablierte Kolonie-Hybridisierungs-Verfahren wurde angewendet, um eine gezielte Isolierung von *C. estertheticum* zu ermöglichen. Die dabei verwendete Gensonde war ein Digoxigenin-markiertes PCR-Amplifikat eines Teils der 16s-23s internal transcribed spacer region von *C. estertheticum* (Primer EISRF/EISRR). Die Spezifität dieser PCR-Reaktion wurde bereits umfangreich untersucht (Broda et al., 2003a). Es konnte daher angenommen werden, dass bei stringenten Hybridisierungsbedingungen die hergestellte Gensonde mindestens ebenso spezifisch an DNA von *C. estertheticum* bindet wie die beiden (in ihr enthalte-

nen) Primersequenzen in der PCR. Jedoch ist es möglich, dass beim Einbau des markierten Nukleotides unspezifische Nebenprodukte entstehen (Boehringer Mannheim, 1995; Roche Applied Science, 2003), insbesondere dann, wenn die eingesetzte Template-DNA-Menge zu hoch ist. Aus diesem Grund wurde die empfohlene Template-Menge von 10 ng in der Reaktion eingesetzt und die Spezifität der eingesetzten Sonde mit DNA von acht Referenzstämmen verschiedener Bakterienarten mittels DNA-Dotblot (vgl. Abbildung 10) überprüft. Die Sonde zeigte eine hohe Spezifität: Nur mit *C. estertheticum* wurde bei diesem Test ein positives Signal bei der Hybridisierung erzielt.

Mit Hilfe der Koloniehybridisierung wurden aus 5 von 20 untersuchten Rindfleischproben 23 kältetolerante Clostridienstämme isoliert. Die Isolate zeigten positive Ergebnisse in der PCR, welche *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämme erfasst (Primerpaar 16SEF/16SER). Somit wurden alle über das Kolonie-Hybridisierungsverfahren isolierten Stämme auch durch die PCR als *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen bestätigt. Daher erscheint die hier angewandte Methodik auch nach dem Ergebnis der Dot-Blot Spezifitätsprüfung über eine ausreichende Spezifität zur Untersuchung von Fleischproben zu verfügen.

Auffallend war, dass die Mehrzahl der Isolate in der PCR mit den Primern EISRF/EISRR negativ reagierte, obwohl sie mit der Gensonde, welche ein Amplifikat der gleichen PCR-Reaktion ist, hybridisierten. Diese Stämme wurden entsprechend Broda et al. (2003a) als *C. estertheticum*-like Stämme eingestuft.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wären Sequenzunterschiede zwischen *C. estertheticum* und den betreffenden Isolaten im Bereich einer Primerbindestelle bei ansonsten übereinstimmender Basensequenz im betreffenden Abschnitt der 16s – 23s internal transcribed spacer region. Solche Unterschiede könnten die korrekte Anlagerung der Primer und damit die Amplifikation des Genabschnitts in der PCR-Reaktion verhindern, während der übrige, homologe Abschnitt zum positiven Ergebnis der Hybridisierung führt.

Zur Bestätigung dieser Hypothese könnte eine Sequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte der betreffenden Isolate aufschlussreich sein.

Insgesamt erwies sich die Koloniehybridisierung als wertvolles Hilfsmittel bei der Isolierung, da die gezielte Isolierung bei den für psychrophile Clostridien nötigen

Arbeitstechniken und der langen Inkubationsdauer eine erhebliche Arbeits- und Zeitersparnis bedeutet.

Für die Konservierung von *C. estertheticum*-Stämmen wurden in der Literatur bisher keine Empfehlungen abgegeben. In dieser Arbeit erwies sich die Gefriertrocknung von überwiegend versporteten Kulturen in Magermilch als geeignete Methode, auch die Konservierung und Rekultivierung der Isolate aus Rindfleischproben gelang mit dieser Technik. Bei Konservierungsversuchen mit exponentiell wachsenden Kulturen war hingegen keine Rekultivierung möglich.

Die Untersuchung von vakuumverpackten Rindfleischproben umfasste neun Verdachtsproben, welche aufgrund von Gasbildung oder Geruchsabweichungen an das Institut gesendet wurden. Weiterhin wurden elf Handelsproben in lokalen Supermärkten und Großmärkten erworben. Die Proben stammten aus Brasilien, Argentinien, Deutschland und der Schweiz und waren vor der Untersuchung zwischen einer und 16 Wochen vakuumverpackt gelagert worden (vgl. Tabellen 7 und 8). Das vakuumverpackte Rindfleisch wurde mittels eines PCR-Screenings auf *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen untersucht. Daneben wurden die Probenverpackungen hinsichtlich Intaktheit und Gasbildung und nach dem Öffnen der Verpackung sensorisch der Geruch beurteilt. Weiterhin wurden der pH-Wert im Fleisch und die wichtigsten für vakuumverpacktes Fleisch relevanten Keimgruppen erfasst: Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl, die Anzahl an Milchsäurebakterien und *Enterobacteriaceae* sowie die Pseudomonaden-Keimzahl und Anzahl an Hefen bei 10 und bei 25 °C. Bei allen Proben mit positivem PCR-Ergebnis wurde außerdem versucht, *C. estertheticum* aus angereichertem Tropfsaft unter strikt anaeroben Bedingungen zu isolieren.

Insgesamt lagen die auf den untersuchten Rindfleisch-Teilstücken angegebenen Haltbarkeitsfristen teilweise erheblich über den in der Literatur dokumentierten Empfehlungen. Bei Bell und Garout (1994) werden 12,8 Wochen bei ≤0 °C bzw. bei Rigg et al. (1978) 11-15 Wochen bei 0 °C als Mindesthaltbarkeit angegeben. Die auf den untersuchten Proben angegebenen Fristen lagen bei Importware zwischen 15 und 22 Wochen. Aus logistischer Sicht ist eine solche Lagerungsdauer von frischem Rindfleisch auch bei weiten Schiffstransporten nicht notwendig und könnte aus Gründen der Qualitätssicherung vermieden werden.

Die allgemeine mikrobiologische Untersuchung der Proben ergab mit Werten von 10^2 und bis zu 10^8 KbE/cm² sehr unterschiedliche Gesamtkeimzahlen. Dies war generell zu erwarten, da die Proben unterschiedlich alt und die Ausgangskontamination sowie Lagerungsbedingungen bis zum Untersuchungszeitpunkt unbekannt und wahrscheinlich nicht identisch waren. Die besonders niedrigen Keimzahlen im Bereich von 10^2 bis 10^4 KbE/ml können mit dem geringeren Alter der betroffenen Proben erklärt werden, so zum Beispiel die Keimzahl von $4,5 \times 10^2$ KBE/ cm² bei der Handels-Probe H11, die nur eine Woche alt war. Bei den beiden anderen gering keimbelasteten Proben (H4 und H10) handelte es sich um vakuumverpackte Steaks. Das genaue Alter war bei diesen Proben mangels Angabe des Produktionsdatums nicht bekannt, jedoch werden solche Endverbraucherportionen nach dem Zuschnitt in der Regel wesentlich kürzer gelagert als Teilstücke und enthalten auf den frischen Anschnitten geringere Keimzahlen.

Mittlere Keimzahlen von etwa 10^4 bis 10^5 KbE/cm² kamen ebenso wie hohe Keimzahlen von 10^7 und 10^8 sowohl bei Handels- als auch Verdachtsproben vor, wobei die mittleren Werte bei den Verdachtsproben und die extrem hohen Zahlen bei den Handelsproben häufiger waren. Eine mögliche Erklärung für diese Verteilung ist die teilweise Unterdrückung der übrigen Mikroflora durch *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen in den belasteten Proben. Aufgrund der bereits genannten Uneinheitlichkeit des Probenmaterials und der untersuchten Probenzahl kann ein solcher Trend jedoch nur vermutet werden. Insgesamt konnte auch kein erkennbarer Zusammenhang zwischen Probenalter und Gesamtkeimzahl festgestellt werden. Den Hauptanteil der bakteriellen Flora der vakuumverpackten Rindfleischproben stellten überwiegend Milchsäurebakterien, was auch mit Angaben in der Literatur korreliert (Gill und Newton, 1978; Grau, 1981; Heinz, 1974; Jones, 2004; Jones et al., 2008; Kaya und Schmidt, 1990).

Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen lagen meist unterhalb der Nachweisgrenze bzw. bei Werten um 10^2 - 10^3 KbE / cm².

Bei zwei Handels-Proben (H6 und H9), die *Enterobacteriaceae* in Zahlen von etwa 10^6 KbE/cm² enthielten, wurden auch Geruchsabweichungen festgestellt. Diese wurden als muffig, dumpf, fischig, oder auch flach beschrieben. Die hohe Belastung mit *Enterobacteriaceae* könnte zu diesem sensorischen Befund geführt haben. Auch die beobachtete leicht erhöhte Gasbildung bei Probe H6 könnte durch

Enterobacteriaceae verursacht worden sein (Brightwell et al., 2007). Als wahrscheinlichste Ursachen für die erhöhten *Enterobacteriaceae*-Keimzahlen kommen eine hohe Ausgangskontamination und Erhöhungen der Lagertemperatur in Betracht (Grau, 1981).

Pseudomonaden wurden nur in den Handels-Proben H4, H10 und H11 im Bereich von etwa 10^2 KbE/cm² nachgewiesen. Hier handelte es sich wiederum um die Proben, die wahrscheinlich am kürzesten vakuumverpackt gelagert wurden (s.o.). Diese geringen Keimzahlen führten nicht zu Geruchsabweichungen bei den betroffenen Proben. Bei allen anderen untersuchten Teilstücken lag die Pseudomonadenkeimzahl unterhalb der Nachweisgrenze. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Aussagen in der Literatur überein, dass die aerobe psychrotrophe Verderbnisflora bei Vakuumverpackung weitgehend unterdrückt wird (Borch et al., 1996; Grau, 1981; Jeremiah, 2001; Jones, 2004; Lambert et al., 1991).

Der Nachweis von Hefen verlief bei 2 von 11 Handelsproben und 3 von 9 Verdachtsproben positiv, die ermittelten Keimzahlen betrugen bis zu 10^4 KbE/cm². Die Interpretation dieser Ergebnisse ist schwierig, da bisher wenige Daten zum Vorkommen von Hefen auf vakuumverpacktem Rindfleisch veröffentlicht wurden. In der Untersuchung von Heinz (1974) wurden Hefen in Zahlen bis etwa 10^3 KbE/cm² auf vakuumverpacktem Rindfleisch nachgewiesen, ohne dass damit Verderbnisercheinungen assoziiert wurden.

Bei den untersuchten Rindfleischproben wurden pH-Werte zwischen 5,1 und 6,2 gemessen. Der Wert von 6,2 bei einer Verdachtsprobe ist als erhöht zu betrachten, bei allen anderen Proben lagen die Werte unter 6,0 und somit im Normalbereich für Rindfleisch (Fischer, 1988b). Die screening-positiven Proben wiesen im Mittel einen pH-Wert von 5,7 auf, während der durchschnittliche pH-Wert der screening-negativen Proben bei 5,5 lag. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Dainty et al. (1989). Hier wurden Unterschiede von etwa 0,5 pH-Einheiten zwischen mit *C. estertheticum* belasteten und unbelasteten Teilstücken ermittelt. Allerdings müsste der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Trend zu etwas höheren pH-Werten an der Oberfläche bei mit *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen belasteten Proben durch eine Untersuchung einer größeren Probenanzahl statistisch abgesichert werden.

Das PCR-Screening auf *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen verlief bei allen untersuchten Handelsproben sowie bei der Verdachtsprobe V7 sowohl direkt aus dem Fleischsaft als auch nach Anreicherung negativ. Nach den hier ermittelten Nachweisgrenzen waren folglich weniger als 10-100 Zellen/ml von *C. estertheticum* oder *C. estertheticum*-like Organismen im Probenmaterial enthalten. Die Bakterioskopie ergab bei diesen Proben ein unauffälliges Bild mit kurzen bis mittellangen Stäbchen und einigen Kokken (vgl. Tabelle 28).

Sensorisch waren diese Proben überwiegend unauffällig. Die Proben H5 und V7 wiesen mit einem Pack Blowing Score von 1-2 eine grenzwertige Menge an Gasbildung und Probe H6 mit einem Pack Blowing Score von 2 eine deutlich erhöhte Gasbildung in der Verpackung auf. Diese drei Proben zeigten auch sensorisch feststellbare Geruchsabweichungen, die mit „leicht“ bis „deutlich“ bewertet wurden.

Der negative Nachweis von *C. estertheticum* in allen elf Handelsproben lässt ein insgesamt eher seltenes Vorkommen von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämmen auf vakuumverpacktem Fleisch im deutschen Handel vermuten. Für eine statistisch sichere Aussage wären hierzu jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Bei 8 von 9 Verdachtsproben war das Ergebnis des PCR-Screenings positiv. Diese Proben zeigten mit Pack Blowing Scores von 2 bis 5 produkt-untypische starke Gasbildung in der Verpackung, eine dieser Proben (V6) war aufgrund einer Verpackungsbeschädigung hinsichtlich der Gasbildung nicht mehr beurteilbar. Die Proben wiesen außerdem deutliche Geruchsabweichungen auf, welche mehrheitlich als „extrem“ eingestuft und am häufigsten mit Erbrochenem oder verdorbenen Milchprodukten assoziiert wurden. Auch ein fauliger Geruch, welcher jedoch nach einigen Minuten abnahm, wurde wahrgenommen. Dies entspricht den Beschreibungen bei Dainty et al. (1989), Kalchayanand et al. (1989) und Helps et al. (1999), die den Geruch von durch *C. estertheticum* verdorbenem Rindfleisch ähnlich beurteilt hatten.

Das bakterioskopische Bild bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Verdachtsproben wurde von großen plumpen Stäbchen dominiert, die anhand ihrer Größe und gelegentlichen Ausbildung von Endosporen von der normalerweise vorherrschenden Mikroflora aus einem überwiegenden Anteil an Milchsäurebakterien deutlich differenziert werden konnten. Einzelne liegende Sporen wurden jedoch nur sporadisch beobachtet, der Hauptanteil der Population bestand jeweils aus vegetativen Zellen (vgl. Tabelle 29 und Abbildung 15). Bei sechs der acht screening-positiven

Proben wurden über Koloniehybridisierung mehrere Kolonien isoliert. Bei fünf dieser Proben (V1-V5) konnten so Reinkulturen von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like Organismen gewonnen werden. Bei der verbleibenden Probe (V8) reagierte eine Kolonie positiv bei der Koloniehybridisierung, die daraus gewonnene Kultur stellte sich als Mischkultur heraus, bei der auch nach mehrfacher Subkultivierung keine Reinkulturen von *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen isoliert werden konnten. Die aus der Mischkultur gewonnene DNA erzeugte positive Signale in beiden PCR-Systemen.

Die Verdachtsproben V6 und V9 zeigten trotz positivem PCR-Screening negative Ergebnisse bei der Koloniehybridisierung. Das PCR-Ergebnis konnte somit nicht durch ein entsprechendes Isolat bestätigt werden. Da die PCR eine empfindliche Methode ist, wären falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Pipettierfehlern oder nachträglicher Kontamination des Probenmaterials denkbar. Jedoch gingen die positiven PCR-Resultate mit einer deutlichen und typischen Verderbssymptomatik sowie charakteristischen bakterioskopischen Befunden einher, was wiederum für eine Anwesenheit und ursächliche Beteiligung von *C. estertheticum* oder *C. estertheticum*-like Organismen am Verderb der Proben spricht. Außerdem zeigten alle anderen untersuchten Parameter keine Auffälligkeiten, die auf andere Verderbsursachen schließen lassen könnten. Demnach könnten diese Ergebnisse (PCR positiv/Hybridisierung negativ) auf das allgemein schlechte Wachstum von *C. estertheticum* in Kulturmedien zurückzuführen sein. Zusätzlich war bei diesen Proben die Verpackung nicht intakt (vgl. 3.1.6.2 und Tabelle 25), so dass die Organismen einem besonderen oxidativen Stress ausgesetzt waren: Eine so bedingte Schädigung der vegetativen Clostridien könnte zum Verlust der Kultivierbarkeit geführt haben.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 23 kältetolerante Clostridienstämme aus fünf Rindfleischproben isoliert. Die Isolate wurden mit Hilfe von zwei PCR-Systemen in zwei *C. estertheticum*- und 21 *C. estertheticum*-like Stämme eingeteilt (Broda et al., 2003a). Alle Isolate bildeten nach etwa vierwöchiger Inkubation Sporen und zeigten unter aeroben Bedingungen kein Wachstum innerhalb von 3 Wochen. Die Isolate bildeten auf CBA unterschiedliche Wuchsformen aus (vgl. Tabelle 32). Ein *C. estertheticum* Isolat zeigte deutliche β -Hämolyse, während alle übrigen Isolate

keine Hämolysezone ausbildeten. Der taxonomische Status von *C. estertheticum*-like Isolaten ist bisher noch ungeklärt (Broda et al., 2000a; Broda et al., 2003b). In der aktuell gültigen Einteilung werden bei *C. estertheticum* zwei Subspezies unterschieden: *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* und *C. estertheticum* subsp. *laramiense* (Spring et al., 2003). Als phänotypische Unterscheidungskriterien werden bei Spring et al., (2003) insbesondere die Verstoffwechselung von Glycogen und das Hämolyseverhalten genannt. Zu diesen und anderen biochemischen Reaktionen wurden jedoch in unterschiedlichen Studien (Collins et al., 1992; Helps et al., 1999; Kalchayanand et al., 1993; Spring et al., 2003; Yang et al., 2009) voneinander abweichende Aussagen getroffen (vgl. Tabelle 5). Yang et al. (2009) stellten aufgrund ihrer Ergebnisse über die gebildeten Fermentationsprodukte und die Verstoffwechselung von Glycogen die derzeitige Klassifikation dieser Organismen in Frage. Eine Unterscheidung der Subspezies von *C. estertheticum* wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verschiedenen mikrobiologischen Standard-Parameter (Gesamtkeimzahl, Anzahl an *Enterobacteriaceae* und Milchsäurebakterien-Keimzahl) in dieser Untersuchung bei den mit *C. estertheticum* / *C. estertheticum*-like Organismen belasteten Proben keine besonders auffälligen Werte zeigten, obwohl starke Verderbniserscheinungen vorhanden waren. Dies stimmt auch mit den Feststellungen von Dainty et al. (1989) überein.

Bei Fällen von Blown Pack Spoilage ist es daher von entscheidender Bedeutung, gezielt auf psychrotrophe/psychrophile Anaerobier zu untersuchen, da mit routinemäßig eingesetzten Methoden diese Verderbsverursacher nicht detektiert werden. Möglicherweise tritt bei Rindfleisch Verderb durch *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen häufiger als bisher beschrieben auf, was bislang nicht erkannt wurde, weil Verdachtsproben nicht mit den adäquaten Methoden untersucht werden.

Besondere Bedeutung hat bei Verdachtsproben die bakterioskopische Untersuchung. Diese einfache Methode kann ohne besonderen Aufwand innerhalb von wenigen Minuten durchgeführt werden. Sind im Fleischsaft große plumpe Stäbchen und eventuell Endosporen vorhanden, so ist dies ein Hinweis auf das Vorkommen von *Clostridium* spp. Da in dieser Arbeit bei den betroffenen Proben überwiegend vegetative Zellen und nur vereinzelt Sporen im bakterioskopischen Bild zu sehen waren, sollte bei der Abklärung der Ursachen die in Abbildung 4 dargestellte Reihenfolge der

Untersuchungen eingehalten werden, insbesondere die Entnahme des Materials für die Anreicherung bzw. Kultivierung von *C. estertheticum* vor allen anderen Untersuchungen nach Öffnen der Verpackung mit möglichst strikt anaerober Technik. Eine Schädigung der vegetativen Zellen durch Luftsauerstoff kann sonst eventuell einen kulturellen Nachweis verhindern. Differentialdiagnostisch kommt neben *C. estertheticum* theoretisch auch eine Kontamination mit *C. gasigenes* in Betracht, was insbesondere bei einem *C. estertheticum*-negativem Befund mit berücksichtigt werden sollte.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Resultate stellen nach eigenem Kenntnisstand den ersten dokumentierten Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämmen im deutschsprachigen Raum dar. Die betroffenen Rindfleischproben stammten aus Deutschland, Brasilien und der Schweiz. Der Nachweis dieser Organismen bei Proben aus klimatisch völlig unterschiedlichen Gegenden widerspricht der mehrfach getroffenen Aussage, dass psychrophile Mikroorganismen nur in permanent kalten Umgebungen vorkommen (Sinell, 2004; Gill, 2002; Schmidt-Lorenz, 1979). Möglicherweise wurden jedoch durch die Nutzung von Kühlanlagen in Zerlege- und Lagerräumen solche permanent kalten Umgebungen geschaffen, in denen eine Kontamination von Fleisch stattfinden könnte. Allerdings werden in Kühlräumen wenige Nischen mit strikt anaeroben Bedingungen zu finden sein, welche Clostridien für eine Vermehrung und Sporenbildung benötigen.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen und angewendeten Methoden ist ein schneller und zuverlässiger Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen in Fleischproben möglich. So können bei bereits verdorbenen Proben die wichtigsten Erreger von Blown Pack Spoilage bei Kühltemperaturen als Verursacher festgestellt bzw. ausgeschlossen werden, und auch eine Kontamination mit deren Sporen könnte schon vor dem Auskeimen detektiert werden.

6 Zusammenfassung

Clostridium estertheticum ist ein psychrophiler, anaerober Sporenbildner, der zum Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch unter Gasbildung und Entwicklung starker Verderbnisgerüche führt. Diese Art von Verderb wird im englischen Sprachgebrauch als Blown Pack Spoilage bezeichnet. Daten zum Vorkommen von *C. estertheticum* sind bisher kaum verfügbar, Standardmethoden zum Nachweis fehlen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren zum PCR-Nachweis von *C. estertheticum* hinsichtlich der Erfassung von Sporen optimiert und eine Methode zur Kolonie-Hybridisierung etabliert, die eine gezielte Isolierung dieser Erreger ermöglicht. Anschließend wurden die etablierten Methoden zur Untersuchung von insgesamt 20 vakuumverpackten Rindfleischproben eingesetzt. Diese setzten sich aus 9 Verdachtsproben und 11 Handelsproben zusammen. Neben dem Vorkommen von *C. estertheticum* wurde auch das Aussehen der Verpackung, der Geruch, die aerobe Gesamtkeimzahl, die Anzahl an *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden, Milchsäurebakterien und Hefen sowie der pH-Wert untersucht.

Mit dem optimierten DNA-Extraktionsverfahren konnten mittels PCR etwa 10^2 vegetative Zellen und 10^3 Sporen pro Milliliter Probenmaterial (Fleischsaft) nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze nach Anreicherung lag bei 10 bis 100 Zellen/ml.

Das in dieser Arbeit etablierte Verfahren für die gezielte Isolierung von *Clostridium estertheticum*, eine Kolonie-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Gensonde, erwies sich im Spezifitätstest mittels DNA-Dotblot als hochspezifisch. Bei der Untersuchung von Rindfleischproben zeigte sich, dass auch *C. estertheticum*-like Stämme mit dieser Methode erfasst wurden.

Zur Konservierung von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Isolaten wurde die Gefriertrocknung versporteter Kulturen als geeignete Methode ermittelt.

Bei der Untersuchung von Rindfleischproben reagierten im PCR-Screening acht von 20 Proben positiv. Hierbei handelte es sich durchwegs um Verdachtsproben, die typische Verderbniserscheinungen sowie ein auffälliges bakterioskopisches Bild mit großen plumpen Stäbchen zeigten. Bei sechs der acht screening-positiven Proben zeigte auch die Koloniehybridisierung einen positiven Befund, was wiederum bei fünf dieser sechs Proben zur Isolierung von Reinkulturen von *C. estertheticum* bzw.

C. estertheticum-like Organismen führte. Die aus diesen Proben detektierten 23 kältetoleranten Clostridienisolate wurden mittels PCR in zwei *C. estertheticum*- und 21 *C. estertheticum*-like Stämme differenziert.

Bei allen 11 Handelsproben und einer Verdachtsprobe verlief der Nachweis von *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Organismen negativ.

Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl, Zahl an Milchsäurebakterien, *Enterobacteriaceae* und Pseudomonaden ergaben bei den screening-positiven Proben keine Hinweise auf ein Verderbsgeschehen. Zum Nachweis von *C. estertheticum* als Verursacher von Blown Pack Spoilage sind daher gezielte Untersuchungen mit molekularbiologischen Nachweismethoden bzw. Kultivierung bei niedrigen Temperaturen, langen Inkubationszeiten und unter anaeroben Bedingungen essentiell, wie sie in dieser Arbeit etabliert wurden. Zur Ermittlung der idealen Kulturbedingungen wären jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Um statistisch gesicherte Aussagen über das Vorkommen von *Clostridium estertheticum* in vakuumverpackten Rindfleischproben treffen zu können, wären weitere Studien erforderlich. Auch sollten für gezielte Präventionsmaßnahmen die Kontaminationsquellen dieses Keimes ermittelt werden. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methodik bietet hierfür eine gute Grundlage, da mit ihr auch Sporen von *Clostridium estertheticum* zuverlässig erfasst werden können.

7 Summary

Clostridium estertheticum, a psychrophilic anaerobic sporeforming bacterium, can cause spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef due to the production of gas inside the pack and development of strong offensive odours. This spoilage condition is referred to as blown pack spoilage. There is little information available about the occurrence of *C. estertheticum*, and standard methods for its detection are lacking at present.

In this study, a PCR-detection method for *C. estertheticum* was optimized to detect spores of this organism. In addition, a colony-hybridisation procedure was established in order to facilitate specific isolation of *C. estertheticum*. Subsequently, the established methods were applied for the examination of 20 vacuum-packed beef samples, nine of which were spoiled packs whereas the remaining eleven packs were commercial samples bought from local wholesale traders and supermarkets. All samples were investigated for contamination with *C. estertheticum*, appearance of the packs, spoilage odours, aerobic plate count, counts of *enterobacteriaceae*, pseudomonads, lactic acid bacteria and yeasts as well as meat pH-value.

Using the optimized procedure for DNA-extraction, the PCR-method was capable of detecting 10^2 vegetative cells and 10^3 spores of *C. estertheticum* per ml meat drip, respectively. After enrichment, the limit of detection was 10-100 cells/ml.

The established procedure for specific isolation of *C. estertheticum* is a colony hybridisation technique using a Digoxigenin-labelled DNA probe. In a DNA dot-blot test, the probe showed high specificity for *C. estertheticum*. The following examination of meat samples revealed that *C. estertheticum*-like strains can also be detected with this method.

For conservation of *C. estertheticum* and *C. estertheticum*-like strains, freeze-drying of sporulated cultures proved to be suitable.

In the examination of vacuum packaged beef samples, eight out of 20 packs were screened positive by means of PCR detection. All of these screening-positive samples were characteristically spoiled packs which revealed to contain predominantly thick large rods when meat drip was microscopically examined. Six of the eight screening-positive samples also generated positive results with the colony hybridisa-

tion technique, which led to the isolation of pure cultures of *C. estertheticum* or *C. estertheticum*-like strains from five beef samples. The 23 cold-tolerant clostridial Isolates found in these samples were differentiated by means of two PCR-reactions into two *C. estertheticum* and 21 *C. estertheticum*-like strains.

In all 11 commercial packs and one spoiled sample, detection of *C. estertheticum* and *C. estertheticum*-like organisms was negative.

The numbers of microorganisms determined with aerobic plate count, counts of lactic acid bacteria, *enterobacteriaceae* and pseudomonads did not indicate bacterial spoilage in the screening-positive packs. This shows that the detection of *C. estertheticum* as a causative agent in cases of meat spoilage requires specific investigations. The methods applied in this study, combining molecular detection techniques and cultivation at low temperatures, extended incubation times and under anaerobic conditions were proved suitable for this purpose. Further investigations, however, are necessary to determine the optimum conditions for cultivation.

To provide statistically relevant data on the occurrence of *C. estertheticum* in beef samples, further studies should be undertaken. Furthermore, the sources of contamination with this organism should be determined in order to allow preventive measures against blown pack spoilage. The methods established in this study provide a solid foundation for such investigations, since spores of *C. estertheticum* can be detected reliably.

8 Literaturverzeichnis

Adcock, F. J.; Hudson, D.; Rosson, P.; Harris, H. M. und Herndon, C. W. (2006): The Global Competitiveness of the North American Livestock Industry, Choices Magazine (Band 21), Nr. 3, Seite 171-176.

URL: <http://www.choicesmagazine.org/2006-3/animal/2006-3-10.htm>

Al-Soud, W. A. und Radstrom, P. (2000): Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat, Journal of Clinical Microbiology (Band 38), Nr. 12, Seite 4463-4470.

Baumgart, J. (2004): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Loseblattausgabe. Grundwerk 2004, Behr's Verlag, Hamburg.

Bell, R. G. (1997): Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses, Journal of Applied Microbiology (Band 82), Nr. 3, Seite 292-300.

Bell, R. G. und Garout, A. M. (1994): The Effective Product Life of Vacuum-Packaged Beef Imported Into Saudi-Arabia by Sea, As Assessed by Chemical, Microbiological and Organoleptic Criteria, Meat Science (Band 36), Nr. 3, Seite 381-396.

Bell, R. G.; Moorhead, S. M. und Broda, D. M. (2001): Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial "blown pack" spoilage of vacuum packed chilled meat, Food Research International (Band 34), Nr. 4, Seite 271-275.

Bern, Z.; Hechelmann, H. und Leistner, L. (1976): Mikrobiologie des DFD - Fleisches, Fleischwirtschaft (Band 56), Nr. 7, Seite 985-987.

Bhadsavle, C. H.; Shehata, T. E. und Collins, E. B. (1972): Isolation and Identification of Psychrophilic Species of Clostridium from Milk, Applied and Environmental Microbiology (Band 24), Nr. 5, Seite 699-702.

Björkroth, K. J.; Geisen, R.; Schillinger, U.; Weiss, N.; De Vos, P.; Holzapfel, W. H.; Korkeala, H. J. und Vandamme, P. (2000): Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., Associated with Spoiled Raw Tomato-Marinaded Broiler Meat Strips Packaged under Modified-Atmosphere Conditions, Applied and Environmental Microbiology (Band 66), Nr. 9, Seite 3764-3772.

Boehringer Mannheim (1995): The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, ISBN: 3-88630-200-8.

Boerema, J.; Broda, D.; Penney, N. und Brightwell, G. (2007): Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in

artificially inoculated vacuum-packed chilled beef, *Journal of Food Protection* (Band 70), Nr. 6.

Boerema, J. A.; Broda, D. M. und Bell, R. G. (2003): Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures, *Letters in Applied Microbiology* (Band 36), Nr. 6, Seite 406-411.

Bogovic Matijasic, B.; Koman Rajsp, M.; Perko, B. und Rogelj, I. (2007): Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*, *International Dairy Journal* (Band 17), Nr. 2, Seite 157-166.

Böhme, C. F. (1981): Die Reifung und Lagerung von Fleisch in Verbundfolienbeuteln, *Fleischerei* (Band 32), Nr. 10, Seite 786-788.

Borch, E.; Kant-Muermans, M. L. und Blixt, Y. (1996): Bacterial spoilage of meat and cured meat products, *International Journal of Food Microbiology* (Band 33), Nr. 1, Seite 103-120.

Bowman, J. P.; McCammon, S. A.; Brown, M. V.; Nichols, D. S. und McMeekin, T. A. (1997): Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 63), Nr. 8, Seite 3068-3078.

Bowman, J. P.; Rea, S. M.; Brown, M. V.; McCammon, S. A.; Smith, M. C. und McMeekin, T. S. (1999): Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems, *Microbial Biosystems: New Frontiers - Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Brightwell, G.; Clemens, R.; Ulrich, S. und Boerema, J. (2007): Possible involvement of psychrotolerant Enterobacteriaceae in blown pack spoilage of vacuum-packaged raw meats, *International Journal of Food Microbiology* (Band 119), Seite 334-339.

Brocklehurst, T. F. und Lund, B. M. (1982): Isolation and properties of psychrotrophic and psychrophilic, pectolytic strains of *Clostridium*, *Journal of Applied Bacteriology* (Band 53), Nr. 33, Seite 355-361.

Broda, D. M. (2007): The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro, *Letters in Applied Microbiology* (Band 45), Nr. 3, Seite 336-341.

Broda, D. M.; Bell, R. G.; Boerema, J. A. und Musgrave, D. R. (2002): The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison, *Journal of Applied Microbiology* (Band 93), Nr. 5, Seite 817-824.

Broda, D. M.; Boerema, J. A. und Bell, R. G. (1998a): A PCR survey of psychrotrophic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BoNT genes, *Letters in Applied Microbiology* (Band 27), Nr. 4, Seite 219-223.

Broda, D. M.; Boerema, J. A. und Bell, R. G. (2003a): PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats, *Journal of Applied Microbiology* (Band 94), Nr. 3, Seite 515-522.

Broda, D. M.; De Lacy, K. M. und Bell, R. G. (1998b): Efficacy of heat and ethanol spore treatments for the isolation of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats, *International Journal of Food Microbiology* (Band 39), Nr. 1-2, Seite 61-68.

Broda, D. M.; De Lacy, K. M. und Bell, R. G. (1998c): Influence of culture media on the recovery of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of vacuum-packed chilled meats, *International Journal of Food Microbiology* (Band 39), Nr. 1-2, Seite 69-78.

Broda, D. M.; DeLacy, K. M.; Bell, R. G.; Braggins, T. J. und Cook, R. L. (1996a): Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings, *International Journal of Food Microbiology* (Band 29), Nr. 2-3, Seite 335-352.

Broda, D. M.; DeLacy, K. M.; Bell, R. G. und Penney, N. (1996b): Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb, *International Journal of Food Microbiology* (Band 29), Nr. 2-3, Seite 371-378.

Broda, D. M.; DeLacy, K. M.; Cook, R. L. und Bell, R. G. (1997): Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures, *New Zealand Journal of Agricultural Research* (Band 40), Nr. 1, Seite 93-98.

Broda, D. M.; Lawson, P. A.; Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (1999): *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats, *International Journal of Systematic Bacteriology* (Band 49), Seite 1539-1550.

Broda, D. M.; Musgrave, D. R. und Bell, R. G. (2000a): Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotropic clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats, *Journal of Applied Microbiology* (Band 88), Nr. 1, Seite 107-116.

Broda, D. M.; Musgrave, D. R. und Bell, R. G. (2003b): Molecular differentiation of clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis, *International Journal of Food Microbiology* (Band 84), Nr. 1, Seite 71-77.

Broda, D. M.; Saul, D. J.; Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (2000b): *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Band 50), Seite 623-631.

Broda, D. M.; Saul, D. J.; Lawson, P. A.; Bell, R. G. und Musgrave, D. R. (2000c): *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Band 50), Seite 107-118.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (1980): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB, §35 Vorläufiges Tabakgesetz und §28b Gen TG. Band I (L) Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln. Grundwerk 1980. 48. Aktualisierungs-Lieferung (Dezember 2007)

Callow, E. H. und Ingram, M. (1955): Bone taint in beef, Food (Band 24), Seite 52-55.

Campbell, R. J.; Egan, A. F.; Grau, F. H. und Shay, B. J. (1979): Growth of *Microbacterium Thermosphactum* on Beef, Journal of Applied Bacteriology (Band 47), Nr. 3, Seite 505-509.

Castellano, P. und Vignolo, G. (2006): Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins, Letters in Applied Microbiology (Band 43), Nr. 2, Seite 194-199.

Collins, E. B. (1981): Heat Resistant Psychrotrophic Microorganisms, Journal of Dairy Science (Band 64), Nr. 1, Seite 157-160.

Collins, M. D.; Lawson, P. A.; Willems, A.; Cordoba, J. J.; Fernandezgarayzabal, J.; Garcia, P.; Cai, J.; Hippe, H. und Farrow, J. A. E. (1994): The Phylogeny of the Genus *Clostridium* - Proposal of 5 New Genera and 11 New Species Combinations, International Journal of Systematic Bacteriology (Band 44), Nr. 4, Seite 812-826.

Collins, M. D.; Rodrigues, U. M.; Dainty, R. H.; Edwards, R. A. und Roberts, T. A. (1992): Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov, FEMS Microbiology Letters (Band 96), Nr. 2-3, Seite 235-240.

d' Alessandria, A. V. H. und Pagliaro, A. F. (1975): Mikrobiologisches Verhalten von vakuumverpacktem gekühltem Rindfleisch bei längerer Lagerzeit und in Beuteln unterschiedlicher Sauerstoffdurchlässigkeit, Fleischwirtschaft (Band 55), Nr. 11, Seite 1582-1584.

Dainty, R. H.; Edwards, R. A. und Hibbard, C. M. (1989): Spoilage of Vacuum-Packed Beef by A *Clostridium* Sp, Journal of the Science of Food and Agriculture (Band 49), Nr. 4, Seite 473-486.

Deutscher Fleischer - Verband (2007): Fleischverzehr, Geschäftsbericht 2007, Seite 27-30.

URL: www.fleischerhandwerk.de/front_content.php?idcat=22&lang=1&client1

Diriye, F. U.; Scorzetti, G. und Martini, A. (1993): Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed, frozen foods, *International Journal of Food Microbiology* (Band 19), Nr. 1, Seite 27-37

Dubois, G.; Beaumier, H. und Charbonneau, R. (1979): Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*, *Journal of Food Science* (Band 44), Nr. 6, Seite 1649-1652.

Egan, A. F. (1983): Lactic acid bacteria of meat and meat products, *Antonie van Leeuwenhoek* (Band 49), Seite 327-336.

Eisgruber, H. (1986): Prüfung von Verfahren zur Kultivierung und Schnellidentifizierung von Clostridien aus frischem Fleisch sowie aus anderen Lebensmitteln, *Vet. Med. Diss. FU Berlin*.

Eisgruber, H. (1992): Clostridien als Kontaminante im Fleischverarbeitungsprozess: Sicherung der hygienischen Qualität von Fleischerzeugnissen, *Fleischerei* (Band 43), Nr. 5, Seite 548-553.

Eisgruber, H. und Stolle, A. (1993): Der kulturelle Clostridiennachweis aus Fleisch und Fleischerzeugnissen - aktueller Stand und Perspektiven, *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* (Band 80), Nr. 5, Seite 148-152.

Eisgruber, H. und Stolle, F. A. (1992): Clostridien in Schlachttierkörpern und frischem Fleisch. Eine Literaturübersicht, *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B* (Band 39), Nr. 10, Seite 746-754.

Eustace, I. J. (1981): Some factors affecting oxygen transmission rates of plastic films for vacuum packaging of meat, *Journal of Food Technology* (Band 16), Nr. 1, Seite 73-80.

Fehlhaber, K. und Janetschke, P. (1992): Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Fischer Verlag, Jena.

Fehlhaber, K.; Kleer, J. und Kley, F. (2005): Handbuch der Lebensmittelhygiene. Praxisleitfaden mit wissenschaftlichen Grundlagen. Loseblattausgabe, Grundwerk 2005, 13. Aktualisierungslieferung März 2008, Behr's Verlag, Hamburg.

Fischer, K. (1988a): Qualitätsabweichungen bei Rindfleisch, *Fleischwirtschaft* (Band 68), Nr. 7, Seite 850-854.

Fischer, K. (1988b): Qualitätsabweichungen bei Rindfleisch, *Fleischwirtschaft* (Band 68), Nr. 6, Seite 740-751.

Gaby, W. L. und Hadley, C. (1957): Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* (Band 74), Nr. 3, Seite 356-358.

Gallien, P.; Richter, H.; Klie, H.; Timm, M.; Karch, H.; Perlberg, K. W.; Steinruck, H.; Riemer, S.; Djuren, M. und Protz, D. (1997): Detection of STEC and epidemiological investigations in surrounding of a HUS patient, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* (Band 110), Nr. 9, Seite 342-346.

Garcia, M. L.; Burgos, J.; Sanz, B. und Ordonez, J. A. (1989): Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*, *Journal of Applied Bacteriology* (Band 67), Nr. 6, Seite 619-628.

Gill, C. O. (1979): A review. Intrinsic bacteria in meat, *Journal of Applied Bacteriology* (Band 47), Nr. 3, Seite 367-378.

Gill, C. O. (1983): Meat Spoilage and Evaluation of the Potential Storage Life of Fresh Meat, *Journal of Food Protection* (Band 46), Nr. 5, Seite 444-452.

Gill, C. O. (1996): Extending the storage life of raw chilled meats, *Meat Science* (Band 43), Nr. S, Seite S99-S109.

Gill, C. O. (2002): Microbial Control with Cold Temperatures. In: Juneja, V.K. und Sofos, J.N.: *Control of Foodborne Microorganisms*, Marcel Dekker, New York, Basel.

Gill, C. O. und Newton, K. G. (1978): The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures, *Meat Science* (Band 2), Nr. 3, Seite 207-217.

Gill, C. O. und Newton, K. G. (1979): Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 37), Nr. 3, Seite 362-364.

Gill, C. O.; Phillips, D. M. und Harrison, J. C. L (1988): Product temperature criteria for shipment of chilled meats to distant markets, *Le froid et l'alimentation des hommes: Compte rendu des réunions des commissions C2, D1, D2/3, E1 (Science et technique du froid)*, Seite 165-173, Institut international du froid, Paris, ISBN: 2-903633-44-4.

Grau, F. H. (1979): Fresh Meats: Bacterial Association, *Archiv für Lebensmittelhygiene* (Band 30), Seite 87-92.

Grau, F. H. (1981): Microbial ecology and interactions in chilled meat, *CSIRO Food Research Quarterly* (Band 41), Nr. 1, Seite 12-18.

Grau, F. H. und Macfarlane, J. J. (1980): The end of the storage life of refrigerated meat: why does it happen and what can be done about it?, *CSIRO Food Research Quarterly* (Band 40), Nr. 3/4, Seite 60-65.

Grau, F. H. und Vanderlinde, P. B. (1990): Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef, *Journal of Food Protection* (Band 53), Nr. 9, Seite 739-741.

Griffiths, M. W. und Phillips, J. D. (1990): Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp found in raw and pasteurized milk, *Journal of the Society of Dairy Technology* (Band 43), Nr. 3, Seite 62-66.

Grunstein, M. und Hogness, D. S. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 72), Nr. 10, Seite 3961-3965.

Hadorn, R.; Schlüchter, S.; Collomb, M.; Badertscher, R. und Hummerjohann, J. (2008): Gasbildung in vakuumverpacktem Rindfleisch - ein neues Phänomen?, *Fleisch und Feinkost*, Nr. 13, Seite 8-9.

Hall, H. E. und Angelotti, R. (1965): *Clostridium perfringens* in Meat and Meat Products, *Applied Microbiology* (Band 13), Nr. 3, Seite 352.

Hammon, A. (2008): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Toxizität von *Bacillus cereus* in Gewürzen, *Vet. med. Diss, LMU München*.

Hanna, M. O.; Smith, G. C.; Hall, L. C. und Vanderzant, C. (1979): Role of *Hafnia Alvei* and *A Lactobacillus* Species in the Spoilage of Vacuum-Packaged Strip Loin Steaks, *Journal of Food Protection* (Band 42), Nr. 7, Seite 569-571.

Heinz, G. (1974): Gekühlte vakuumverpackte Teilstücke vom Rind unter den Bedingungen einer verlängerten Lagerzeit, *Fleischwirtschaft* (Band 54), Nr. 10, Seite 1635-1638.

Helps, C. R.; Harbour, D. A. und Corry, J. E. (1999): PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef, *International Journal of Food Microbiology* (Band 52), Nr. 1-2, Seite 57-65.

Hess, E.; Ruosch, W. und Breer, C. (1980): Verfahren zur Verlängerung der Haltbarkeit von verpacktem Frischfleisch, *Fleischwirtschaft* (Band 60), Nr. 8, Seite 1448-1456.

Holzapfel, W. H.; Geisen, R. und Schillinger, U. (1995): Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes, *International Journal of Food Microbiology* (Band 24), Nr. 3, Seite 343-362.

Hugas, M. und Tsigarida, E. (2008): Pros and cons of carcass decontamination: The role of the European Food Safety Authority, *Meat Science* (Band 78), Nr. 1-2, Seite 43-52.

Husband, P. M. (1982): The History of Vacuum Packaged Meat, Food Technology in Australia (Band 34), Nr. 6, Seite 272-275.

Hutton, M. T.; Chehak, P. A. und Hanlin, J. H. (1991): Inhibition of botulinum toxin production by *Pediococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods, Journal of food safety (Band 11), Nr. 4, Seite 255-267.

ICMSF (1980): (International Commission on Microbiological Specification for Foods of the International Union of Microbiological Societies) Microbial Ecology of Foods. Vol 1: Factors affecting life and death of microorganisms, Academic Press, New York.

Ingram, M. (1952): Internal bacterial taints (bone taint or souring) of cured pork legs, Journal of Hygiene (Band 50), Nr. 2, Seite 165-181.

Ismail, S. A. S.; Deak, T.; Abd El-Rahman, H. A.; Yassien, M. A. M. und Beuchat, L. R. (2000): Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature, International Journal of Food Microbiology (Band 62), Nr. 1-2, Seite 113-121.

Jeremiah, L. E. (2001): Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution, Food Research International (Band 34), Nr. 9, Seite 749-772.

Jones, R. J. (2004): Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef, International Journal of Food Microbiology (Band 90), Nr. 3, Seite 273-282.

Jones, R. J.; Hussein, H. M.; Zagorec, M.; Brightwell, G. und Tagg, J. R. (2008): Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat, Food Microbiology (Band 25), Nr. 2, Seite 228-234.

Kalchayanand, N.; Ray, B. und Field, R. A. (1993): Characteristics of Psychrotrophic *Clostridium*-Laramie Causing Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Fresh and Roasted Beef, Journal of Food Protection (Band 56), Nr. 1, Seite 13-17.

Kalchayanand, N.; Ray, B.; Field, R. A. und Johnson, M. C. (1989): Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Beef by *Clostridium*, Journal of Food Protection (Band 52), Nr. 6, Seite 424-426.

Kalinowski, R. M. und Tompkin, R. B. (1999): Psychrotrophic clostridia causing spoilage in cooked meat and poultry products, Journal of Food Protection (Band 62), Nr. 7, Seite 766-772.

Katikou, P.; Ambrosiadis, I.; Georgantelis, D.; Koidis, P. und Georgakis, S. A. (2005): Effect of *Lactobacillus*-protective cultures with bacteriocin-like inhibitory substances' producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef, Journal of Applied Microbiology (Band 99), Nr. 6, Seite 1303-1313.

Kaya, M. und Schmidt, U. (1990): Verhalten von *Listeria monocytogenes* auf vakuumverpacktem Rindfleisch, *Fleischwirtschaft* (Band 70), Nr. 5, Seite 546-550.

Kohlmüller, M. (2008): EU Fleischmarkt. Einführen erstmals gedrosselt, *ZMP Agrarwoche* (Band 15), Seite 8..

URL: <http://www.zmp.de/presse/agrarwoche/marktanalysen/ma15.pdf>

Koohmaraie, M. und Geesink, G. H. (2006): Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system, *Meat Science* (Band 74), Nr. 1, Seite 34-43.

Köpke, U. (2002): Zusammensetzung der psychrotrophen Hackfleischmikroflora "industrieller" Herstellung mit mikroökologischer und hygienischer Bewertung ihrer Hauptkomponenten, *Vet. med. Diss.*, FU Berlin.

Kraft, A. A. (1992): *Psychrotrophic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage*, CRC Press.

Krämer, J. (2002): *Lebensmittel-Mikrobiologie*, 4. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Lambert, A. D.; Smith, J. P. und Dodds, K. L. (1991): Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat - a review, *Food Microbiology* (Band 8), Nr. 4, Seite 267-297.

Lawson, P.; Dainty, R. H.; Kristiansen, N.; Berg, J. und Collins, M. D. (1994): Characterization of A Psychrotrophic *Clostridium* Causing Spoilage in Vacuum-Packed Cooked Pork - Description of *Clostridium-Algidicarnis* Sp-Nov, *Letters in Applied Microbiology* (Band 19), Nr. 3, Seite 153-157.

Lee, K. T. und Yoon, C. S. (2001): Quality changes and shelf life of imported vacuum-packaged beef chuck during storage at 0 degrees C, *Meat Science* (Band 59), Nr. 1, Seite 71-77.

Leistner, L. und Gorris, L. G. M. (1995): Food preservation by hurdle technology, *Trends in Food Science & Technology* (Band 6), Nr. 2, Seite 41-46.

Loureiro, V. und Querol, A. (1999): The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages, *Trends in Food Science & Technology* (Band 10), Seite 356-365.

Lowry, P. D. und Gill, C. O. (1984): Development of a yeast microflora on frozen lamb stored at -5 degrees C, *Journal of Food Protection* (Band 47), Nr. 4, Seite 309-311.

Lund, B. M.; Graham, A. F.; George, S. M. und Brown, D. (1990): The Combined Effect of Incubation-Temperature, Ph and Sorbic Acid on the Probability of Growth of

Nonproteolytic, Type-B Clostridium-Botulinum, Journal of Applied Bacteriology (Band 69), Nr. 4, Seite 481-492.

Makarios-Laham, I. K. und Lee, T. C. (1993): Protein hydrolysis and quality deterioration of refrigerated and frozed seafood due to obligately psychrophilic bacteria, Journal of Food Science (Band 58), Nr. 2, Seite 310-313.

Mardigan, M. T; Martinko, J. M. und Parker, J. (2000): Brock Mikrobiologie. Begründet von Thomas Brock. Aus dem Englischen übersetzt von Kurt Bechthold, Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin.

Mead, G. C. (1992): Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods, International Journal of Food Microbiology (Band 17), Nr. 2, Seite 135-143.

Moorhead, S. M. und Bell, R. G. (1999): Psychrotrophic clostridia mediated gas and botulinal toxin production in vacuum-packed chilled meat, Letters in Applied Microbiology (Band 28), Nr. 2, Seite 108-112.

Moorhead, S. M. und Bell, R. G. (2000): Botulinal toxin production in vacuum and carbon dioxide packaged meat during chilled storage at 2 and 4 °C, Journal of Food Safety (Band 20), Nr. 2, Seite 101-110.

Morita, R. Y. (1975): Psychrophilic bacteria, Bacteriological Reviews (Band 39), Nr. 2, Seite 144.

Newton, K. G. und Gill, C. O. (1978): The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures, Journal of Applied Bacteriology (Band 44), Nr. 1, Seite 91-95.

Patterson, J. T. und Gibbs, P. A. (1977): Incidence and Spoilage Potential of Isolates from Vacuum - packaged Meat of High pH Value, Journal of Applied Microbiology (Band 43), Nr. 1, Seite 25-38.

Peck, M. W.; Fairbairn, D. A. und Lund, B. M. (1992): The Effect of Recovery Medium on the Estimated Heat-Inactivation of Spores of Nonproteolytic Clostridium-Botulinum, Letters in Applied Microbiology (Band 15), Nr. 4, Seite 146-151.

Phaff, H. J.; Miller, M. W. und Mrak, E. M. (1966): The life of yeasts, Harvard University Press, Cambridge.

Quiros, M.; Martorell, P.; Querol, A.; Barrio, E.; Peinado, J. M. und de Silloniz, M. I. (2008): Four new Candida cretensis strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): Taxonomic and phylogenetic implications, FEMS Yeast Research (Band 8), Nr. 3, Seite 485-491.

Raso, J.; Palop, A.; Pagán, R. und Condón, S. (1998): Inactivation of bacillus subtilis spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment, Journal of Applied Microbiology (Band 85), Nr. 5, Seite 849-854.

Rigg, W. J.; Newton, K. G.; Moore, V. J. und Harrison, J. C. L (1978): The effect of film permeability on the storage life of vacuum packed chilled beef, MIRINZ Report, Meat Industry Research Institute of New Zealand (Band 648).

Rilla, N.; Martinez, B.; Delgado, T. und Rodriguez, A. (2003): Inhibition of Clostridium tyrobutyricum in Vidiago cheese by Lactococcus lactis ssp. lactis IPLA 729, a nisin Z producer, International Journal of Food Microbiology (Band 85), Nr. 1-2, Seite 23-33.

Roberts, T. A. und Mead, G. C. (1986): Involvement of intestinal anaerobes in the spoilage of red meats, poultry and fish, Society for Applied Bacteriology Symposium Series (Band 13), Seite 333-349.

Roche Applied Science (2003): DIG Application Manual for Filter Hybridisation.
URL: https://www.roche-applied-science.com/fst/publications.jsp?page=/PROD_INF/MANUALS/DIG_MAN/dig_toc.htm

Rodgers, S. (2001): Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review, Trends in Food Science and Technology (Band 12), Nr. 8, Seite 276-284.

Rodgers, S. (2008): Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures, Trends in Food Science & Technology (Band 19), Seite 188-197.

Ross, H. E. (1965): Clostridium putrefaciens: A Neglected Anaerobe, Journal of Applied Microbiology (Band 28), Nr. 1, Seite 49-51.

Rossen, L.; Noerskov, P.; Holmstroem, K. und Rasmussen, O. F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions, International Journal of Food Microbiology (Band 17), Nr. 1, Seite 37-45.

Samson, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C. und Filtenborg, O. (1995): Introduction to foodborne fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Sanz, A.; Martin, R.; Mayoral, M. B.; Hernandez, P. E.; Gonzalez, I. und Lacarra, G. (2005): Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham, Meat Science (Band 71), Nr. 2, Seite 230-237.

Schmidt-Lorenz, W. (1979): Mikrobiologisch - hygienische Anforderungen an die küchentechnischen Erhitzungs- und Kühlverfahren, Swiss Food (Band 1), Seite 27-41.

Schmidt-Lorenz, W. und Farkas, J. (1961): Untersuchungen über die Strahlenresistenz einiger psychrophiler Bakterien und Hefen vom Seefisch, Archives of Microbiology (Band 39), Nr. 1, Seite 1-12.

Schrimpf, G. (2002): Gentechnische Methoden, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Schulze, H.; Böhm, J.; Kleinschmit, D.; Spiller, A. und Nowak, B. (2008): Öffentliche Wahrnehmung der Primärverantwortung für Lebensmittelsicherheit: Eine Medienanalyse der Gammelfleischskandale, Agrarwirtschaft (Band 57), Nr. 7, Seite 334-345.

Seideman, S. C. und Durland, P. R. (1983): Vacuum packaging of fresh beef: a review, Journal of Food Quality (Band 6), Nr. 1, Seite 29-47.

Shcherbakova, V. A.; Chuvilskaya, N. A.; Rivkina, E. M.; Pecheritsyna, S. A.; Laurinavichius, K. S.; Suzina, N. E.; Osipov, G. A.; Lysenko, A. M.; Gilichinsky, D. A. und Akimenko, V. K. (2005): Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov, Extremophiles (Band 9), Nr. 3, Seite 239-246.

Signorini, M. L.; Ponce-Alquicira, E. und Guerrero-Legarreta, I. (2006): Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef, Journal of Muscle Foods (Band 17), Nr. 3, Seite 277-290.

Sinell, H. J. Hrsg. (2004): Einführung in die Lebensmittelhygiene, 4. Auflage, Parey Verlag, Stuttgart.

Skinner, G. E.; Solomon, H. M. und Fingerhut, G. A. (1999): Prevention of *Clostridium botulinum* Type A, Proteolytic B and E Toxin Formation in Refrigerated Pea Soup by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, Journal of Food Science (Band 64), Nr. 4, Seite 724-727.

Spring, S.; Merkhoffer, B.; Weiss, N.; Kroppenstedt, R. M.; Hippe, H. und Stackebrandt, E. (2003): Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (Band 53), Nr. 4, Seite 1019-1029.

Steiger, C. (2006): Modern Beef Production in Brazil and Argentina, Choices Magazine (Band 21), Nr. 2, Seite 105-110.
URL: www.choicesmagazine.org/2006-2/tilling/2006-2-12.htm

Sutherland, J. P.; Gibbs, P. A.; Patterson, J. T. und Murray, J. G. (1976): Biochemical changes in vacuum packaged beef occurring during storage at 0-2 degrees C, Journal of Food Technology (Band 11), Nr. 2, Seite 171-180.

- Tändler, K. und Heinz, G. (1970a): Frischfleischreifung im Vakuumbeutel. 1. Mitteilung, Fleischwirtschaft (Band 50), Nr. 9, Seite 1185-1190.
- Tändler, K. und Heinz, G. (1970b): Frischfleischreifung im Vakuumbeutel. 2. Mitteilung, Fleischwirtschaft (Band 50), Nr. 10, Seite 1371-1374.
- Tändler, K. und Lee, K. T. (1985): Haltbarkeit von Frischfleisch - Teilstücken in hochgasdichten Folienpackungen, Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach, Nr. 88, Seite 6452-6457.
- Tewari, G. (2002): Microbial Control by Packaging. In: Juneja, V.K. und Sofos, J.N.: Control of Foodborne Microorganisms, Marcel Dekker, New York, Basel.
- Trüper, H. G. und DeClari, L. (1997): Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition", International Journal of Systematic Bacteriology (Band 47), Nr. 3, Seite 908-909.
- Wagner, J. C. (2006): Messung der Farbe als Qualitätsparameter bei Rindfleisch im Hinblick auf die Festlegung von Richtwerten in der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift Lebensmittelhygiene, Vet. Med. Diss. LMU München.
- Wiegner, J. (1985): Sensorische Analyse, mikrobiologischer Befund und D(-)-Lactat-Konzentration als Parameter zur Frischecharakterisierung von vakuumverpacktem Rindfleisch, Vet. med. Diss, FU Berlin.
- Wynn-Williams, D. D. (1990): Ecological aspects of Antarctic microbiology, Advances in Microbial Ecology (Band 11), Seite 71-146.
- Yang, X.; Balamurugan, S. und Gill, C. O. (2009): Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium, International Journal of Food Microbiology (Band 128), Nr. 3, Seite 501-505.

Gesetze und Verordnungen:

Lebensmittel, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB) in der Fassung der Bekanntmachung vom 26. April 2006 (BGBl I S. 954)

Verordnung über die Kennzeichnung von Lebensmitteln (Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung – LMKV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 15.

Dezember 1999 (BGBl. I S. 2464), zuletzt geändert durch Artikel 1 der Verordnung vom 18. Dezember 2007 (BGBl. I S. 3011)

Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit (EU-Basisverordnung für Lebensmittelhygiene)

(Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L 31 / 1 vom 1.2.2002)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.

(Amtsblatt der Europäischen Union L 139 / 55 vom 30.04.2004)

Code of Federal Regulations Title 21, 173.370:

Part 173 – Secondary direct food additives permitted in food for human consumption.
US Food and Drug Administration, Government Printing Office, Washington, D.C.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer, Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich mich für die Übernahme des Themas und das Interesse an der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dir. und Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Leiter des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts, Kulmbach, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Bei Frau Dr. R. Pichner bedanke ich mich ganz herzlich für die jederzeit gewährte fachliche wie menschliche Beratung und Unterstützung, sowie für die sorgfältige Korrekturlesung dieser Arbeit.

Herrn Hansgeorg Hechelmann gilt ein spezieller Dank für die Einbringung seiner Erfahrung bei der bakterioskopischen und sensorischen Untersuchung und die herzliche Betreuung.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts, Kulmbach, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Insbesondere danke ich Frau E. Gardill für die hervorragende Einarbeitung in molekularbiologische Techniken, Frau P. Peetz für die Anfertigung der Fotografien von mikroskopischen Präparaten, Herrn J. Dresel für die Unterstützung bei der Untersuchung von Rindfleischproben, und Frau U. Becker für die Hilfe bei Layoutfragen.

Für die Bereitstellung von finanziellen Mitteln zur Durchführung der wissenschaftlichen Arbeiten bedanke ich mich sehr herzlich bei der Förderergesellschaft für Fleischforschung e.V.