

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

angefertigt  
unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis

---

**Untersuchungen zum Vorkommen  
und zur Verhinderung des Verderbsgeschehens  
durch *Clostridium estertheticum* in Fleisch**

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

von  
Verena Barbara Rosa Böhm  
aus Nabburg

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie und meinem Mann



---

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 SCHRIFTTUM</b> .....	<b>3</b>
2.1 Fleischhandel .....	3
2.1.1 Rindfleisch .....	5
2.1.2 Schweinefleisch.....	7
2.1.3 Geflügelfleisch .....	8
2.1.4 Weitere Fleischsorten.....	9
2.2 <i>Clostridium</i> spp. ....	11
2.2.1 Gattungsmerkmale .....	11
2.2.2 Krankheitserreger.....	12
2.2.3 Verderbniserreger.....	14
2.3 <i>Clostridium estertheticum</i> .....	16
2.3.1 Psychrophile Clostridien.....	16
2.3.2 Vorkommen und Eigenschaften von <i>Clostridium estertheticum</i> .....	18
2.3.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i> .....	24
2.4 Dekontamination .....	28
2.4.1 Definitionen und Grundlagen.....	28
2.4.2 Dekontamination in landwirtschaftlichen Betrieben .....	30
2.4.3 Schlachtierhygiene.....	31
2.4.4 Dekontamination in lebensmittelbe- und -verarbeitenden Betrieben.....	32
2.4.5 Bekämpfung von <i>Clostridium estertheticum</i> .....	34
<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b> .....	<b>36</b>
3.1 Material.....	36
3.1.1 Bakterien- und Hefestämme.....	36
3.1.2 Probenmaterial.....	37
3.1.3 Kulturelle Verfahren .....	39
3.1.4 Polymerasekettenreaktion .....	41
3.1.5 Koloniehybridisierung.....	43
3.1.6 Sequenzierung.....	44
3.1.7 Challengetests .....	45
3.1.8 Reinigungs- und Desinfektionsmitteltests.....	45

---

<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.1 Anaerobe Arbeitstechnik</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.2 Untersuchung von Fleischproben</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.2.1 Äußere Begutachtung</b> .....	<b>47</b>
<b>3.2.2.2 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert Messung</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2.2.4 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i></b> .....	<b>51</b>
<b>3.2.3 Sequenzierung von Isolaten aus Fleisch</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.3.1 Milchsäurebakterien</b> .....	<b>56</b>
<b>3.2.3.2 Hefen</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2.4 Challenge-tests</b> .....	<b>61</b>
<b>3.2.5 Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel</b> .....	<b>67</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1 Untersuchung von Fleischproben</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1.1 Rindfleisch</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1.1.1 Rindfleisch-Verdachtsproben</b> .....	<b>71</b>
<b>4.1.1.1.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>73</b>
<b>4.1.1.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung</b> .....	<b>74</b>
<b>4.1.1.1.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i></b> .....	<b>75</b>
<b>4.1.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>76</b>
<b>4.1.1.2 Rindfleisch-Handelsproben</b> .....	<b>77</b>
<b>4.1.1.2.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>84</b>
<b>4.1.1.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung</b> .....	<b>85</b>
<b>4.1.1.2.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i></b> .....	<b>87</b>
<b>4.1.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>93</b>
<b>4.1.2 Wildfleisch</b> .....	<b>93</b>
<b>4.1.2.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>95</b>
<b>4.1.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung</b> .....	<b>97</b>
<b>4.1.2.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i></b> .....	<b>97</b>
<b>4.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>98</b>
<b>4.1.3 Lamm- und Schaffleisch</b> .....	<b>99</b>
<b>4.1.3.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>101</b>
<b>4.1.3.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung</b> .....	<b>102</b>
<b>4.1.3.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i></b> .....	<b>102</b>
<b>4.1.4 Schweinefleisch</b> .....	<b>103</b>
<b>4.1.4.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung</b> .....	<b>105</b>

---

4.1.4.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung .....	105
4.1.4.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i> .....	106
4.1.5 Geflügelfleisch .....	107
4.1.5.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung.....	109
4.1.5.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung .....	110
4.1.5.3 Nachweis von <i>Clostridium estertheticum</i> .....	111
4.1.6 Sequenzierung von Isolaten aus Fleisch .....	112
4.1.6.1 Milchsäurebakterien.....	112
4.1.6.2 Hefen .....	113
4.2 Challengetests mit <i>Clostridium estertheticum</i> .....	115
4.2.1 Rindfleisch und <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme der DSMZ.....	115
4.2.2 Rindfleisch und weitere <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme .....	118
4.2.3 Schweinefleisch und <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme der DSMZ .....	120
4.3 Challengetests mit Milchsäurebakterien.....	121
4.3.1 <i>Lactobacillus</i> spp. und <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme der DSMZ.....	121
4.3.2 <i>Lactobacillus</i> spp. und weitere <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme .....	122
4.3.3 <i>Carnobacterium</i> spp. und <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme der DSMZ.....	124
4.3.4 <i>Carnobacterium</i> spp. und weitere <i>Clostridium estertheticum</i> -Stämme.....	125
4.4 Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel .....	128
4.4.1 Wirksamkeit auf neuen Schneidbrettern.....	128
4.4.2 Wirksamkeit auf eingeritzten Schneidbrettern .....	129
5 DISKUSSION .....	131
6 ZUSAMMENFASSUNG .....	139
7 SUMMARY .....	141
8 LITERATURVERZEICHNIS .....	143
9 DANKSAGUNG .....	158

---

**Abkürzungsverzeichnis**

A. bidest.	Aqua bidestillata
A. dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
C.	<i>Clostridium</i>
CBA	Columbia Blutagar
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V.
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft e. V.
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KbE	Koloniebildende Einheiten
L.	<i>Lactobacillus</i>
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
mmol	Millimol
nmol	Nanomol
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PYGS	Peptone Yeast Glucose Starch
rDNA	ribosomal DNA (ribosomale Desoxyribonukleinsäure)
RKI	Robert Koch-Institut
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
spp.	Spezies, Plural

## 1 Einleitung

Seit Ende der 1980er Jahre ist ein mit Gasbildung und Geruchsabweichungen einhergehender Verderb bei gekühltem, vakuumverpacktem Rindfleisch bekannt. Im Englischen wird dieses Phänomen als „Blown Pack Spoilage“ bezeichnet. Als verursachende Mikroorganismen wurden 1989 erstmals psychrophile Clostridien beschrieben (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989). Von den bisher identifizierten und bekannten Spezies ist das Bakterium *Clostridium (C.) estertheticum* dabei der am häufigsten aus „Blown Packs“ isolierte Organismus (Collins et al., 1992). *C. estertheticum* besitzt im Gegensatz zu vielen anderen psychrophilen Mikroorganismen die Fähigkeit, sich sogar bei Gefriertemperaturen von bis zu - 1,5 °C zu vermehren. Dies kann so weit führen, dass Ware, die unter strikter Einhaltung der Kühlkette gelagert wurde, noch vor dem Erreichen des Mindesthaltbarkeitsdatums verdirbt (Dainty et al., 1989; Broda et al., 1996a).

Mit dieser Art des Verderbs gehen oft hohe wirtschaftliche Verluste einher, da es sich bei den Produkten um meist hochwertige Ware, wie Entrecote oder Roast Beef handelt. Aufgrund des Herstellungsprozesses und der Vermarktungsweise dieses Fleisches ist eine Reifung in Vakuumbuteln fast unumgänglich und stellt die sehr stark exportorientierten Länder, wie Brasilien und Neuseeland, vor große Herausforderungen (Jeremiah, 2001).

Bis heute wurden mehrere Studien zum Themenkomplex „Blown Pack Spoilage“ und den verursachenden psychrophilen Clostridien durchgeführt. In verschiedenen Arbeiten wurde diese Verderbssymptomatik neben Rind- auch bei Wild- und Lammfleisch nachgewiesen. Inzwischen sind Fälle von „Blown Pack Spoilage“ sowohl in Deutschland als auch in Großbritannien, Irland, Neuseeland und den USA bestätigt (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Broda et al., 1996b; Helps et al., 1999; Broda et al., 2000b; Byrne et al., 2009; Ziegler, 2009). Andere Fleischsorten wie Schweine- oder Geflügelfleisch wurden bisher nicht im Zusammenhang mit „Blown Pack Spoilage“ erwähnt. Ebenso existieren keine Daten über das Vorkommen von *C. estertheticum* auf unverdorbenem Fleisch. Einige Studien konnten *C. estertheticum* in Ställen, Fäzes, Fell und im Schlachthofumfeld nachweisen (Broda et al., 2002; Boerema et al., 2003; Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009). Dies legt die Vermutung nahe, dass die psychrophilen Bakterien vor

allem als Sporen in die Schlacht- bzw. Zerlegebetriebe eingetragen werden. Eine eindeutige Kontaminationsquelle konnte jedoch bisher in den unterschiedlichen Arbeiten nicht identifiziert werden. Die Erkenntnis über das Vorkommen bzw. die Verbreitung des Bakteriums auf Fleischprodukten ist gerade für die fleischverarbeitenden Betriebe von enormer Bedeutung, um den Eintrag dieser Mikroorganismen besser abschätzen zu können und entsprechende Maßnahmen zur Vermeidung der Kontamination und zur Sanierung von Betrieben zu ergreifen.

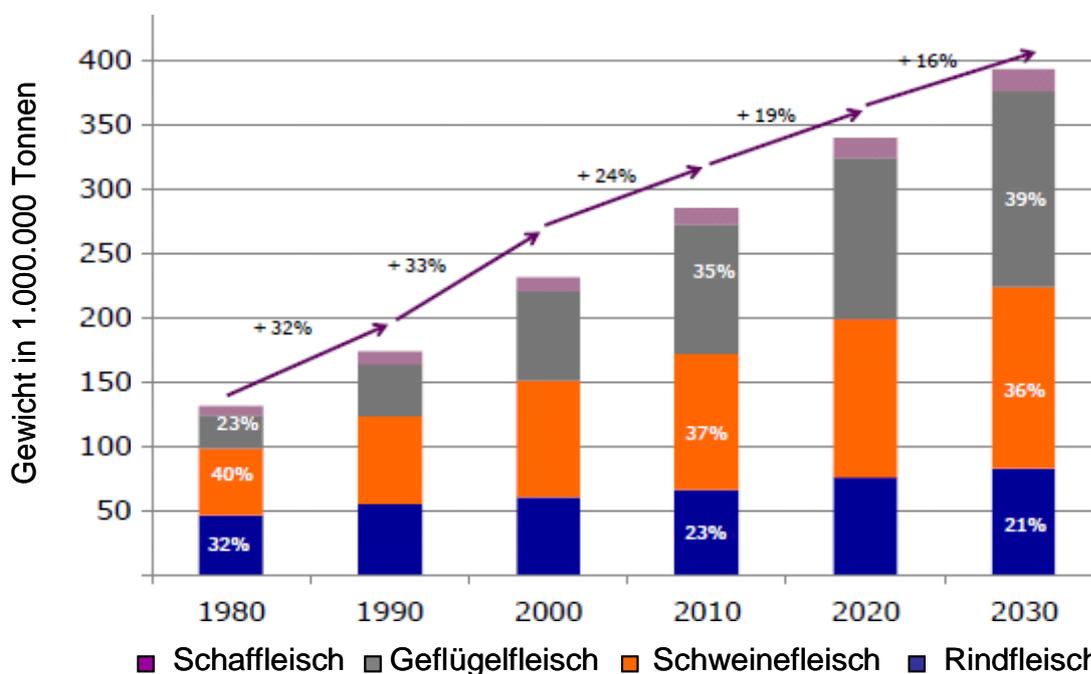
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von *C. estertheticum* auf verdorbenen und unverdorbenen Rind-, Wild-, Lamm-, Schweine- und Putenfleischproben zu untersuchen. Durch anschließende Challengeversuche mit künstlich inokuliertem Rind- und Schweinefleisch sollten zum einen das Verderbgeschehen reproduziert und zum anderen synergistische bzw. antagonistische Effekte der Begleitmikrobiota überprüft werden. Da der Sporeneintrag in die Betriebe nur schwer zu unterbinden ist, sollten in der vorliegenden Arbeit zusätzlich potentielle Schutzkulturen gegen *C. estertheticum* getestet werden.

Da neben der Reduktion des Sporeneintrages auch die Dekontamination der Betriebe eine entscheidende Rolle spielt, wurden im Rahmen der Arbeit zudem verschiedene kommerzielle Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf ihre Wirksamkeit gegenüber Sporen von *C. estertheticum* überprüft.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Fleischhandel

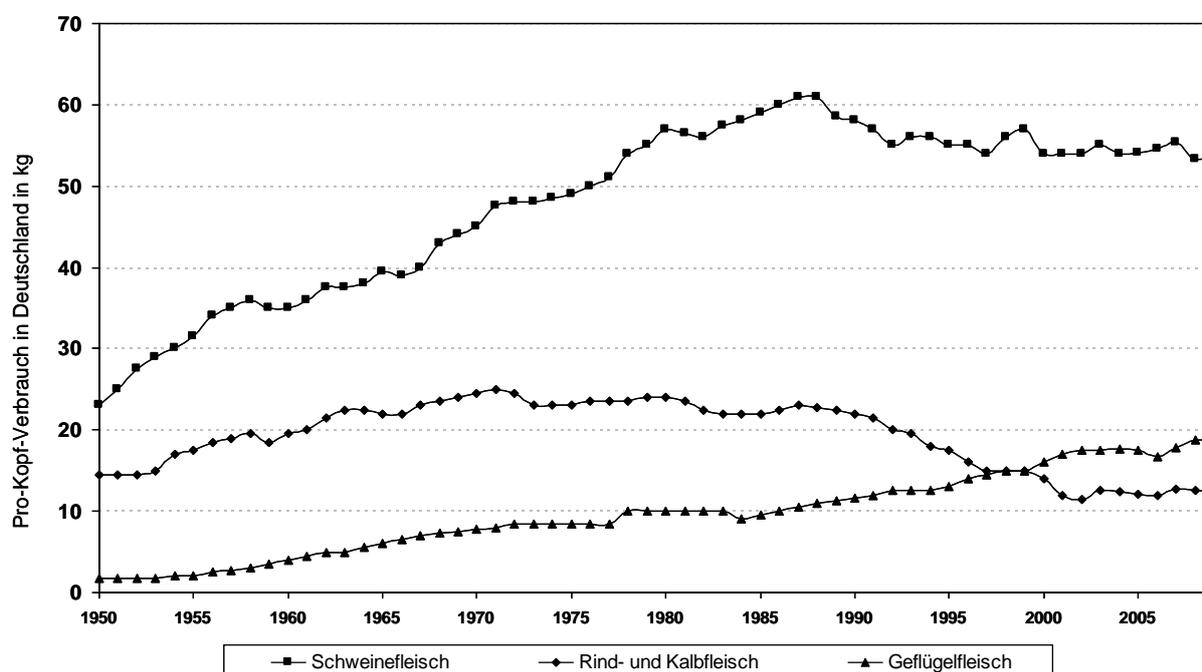
Der globale Handel verschiedener Waren, wie beispielsweise Fleisch als weltweit wichtiges Import- und Exportgut, birgt grundsätzlich das Risiko einer Verbreitung von Mikroorganismen. Eine solche Erregerverbreitung durch Handelsströme und Reisen konnte bereits im Mittelalter bei der Ausbreitung der Pest beobachtet werden (Bergdolt, 2003) und zeigte sich in der heutigen Zeit während der BSE-Krise (Windhorst, 2010a) oder der H1N1-Virus-Pandemie (Schweinegrippe) 2009/2010 (WHO, 2011). Die Dimensionen des internationalen Fleischmarktes machen die damit verbundenen Risiken deutlich, denn dieser unterliegt seit Jahrzehnten einem stetigen Wachstum (Kennes, 2010). Die globale Fleischproduktion hat sich dabei in den letzten 50 Jahren versechsfacht und ist von 71 Millionen Tonnen im Jahr 1961 auf knapp 294,6 Millionen Tonnen im Jahr 2010 gestiegen (Windhorst, 2004; Belaya und Török, 2010; Windhorst, 2010b; GIEWS, 2012). Dieser allgemeine Trend wird sich Schätzungen zufolge auch zukünftig fortsetzen, wenn auch in vermutlich geringerem Ausmaß (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Entwicklung des globalen Fleischmarktes von 1980 bis 2030 (nach Kennes, 2010)

Betrachtet man dabei den jährlichen Fleischkonsum pro Person, so werden weltweit im Mittel ca. 42 kg verbraucht, wobei diesbezüglich regionale Unterschiede bestehen. So werden in den Industrieländern zwischen 80 und 120 kg pro Person und Jahr verbraucht, wohingegen in den Entwicklungsländern durchschnittlich 30 kg pro Jahr konsumiert werden (Dusser, 2005; Belaya und Török, 2010).

In Deutschland liegt der allgemeine Fleischkonsum seit Mitte der 1980er Jahre insgesamt auf einem relativ konstanten Niveau. Der Pro-Kopf-Schweinefleischverbrauch stieg von 1950 bis 1988 deutlich an, fiel anschließend bis 2009 jedoch wieder leicht ab. Der Rind- und Kalbfleischverzehr nahm von 1950 bis 1970 zu, sank dann seit Ende der 1970er Jahre aufgrund der Preisänderungen und der BSE-Krise im Jahr 2000 und ist seit 2003 annähernd konstant bei ca. 12,5 kg Rindfleisch pro Kopf und Jahr (Hansen und Thiele, 2005; Maillard, 2009; Windhorst, 2010a). Demgegenüber erfuhr der Geflügelfleischkonsum von 1950 bis 2009 ein kontinuierliches Wachstum (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Durchschnittlicher pro-Kopf Fleischkonsum in Deutschland von 1950 bis 2009 (nach Hansen und Thiele, 2005; Deutscher Bauernverband, 2011)

### 2.1.1 Rindfleisch

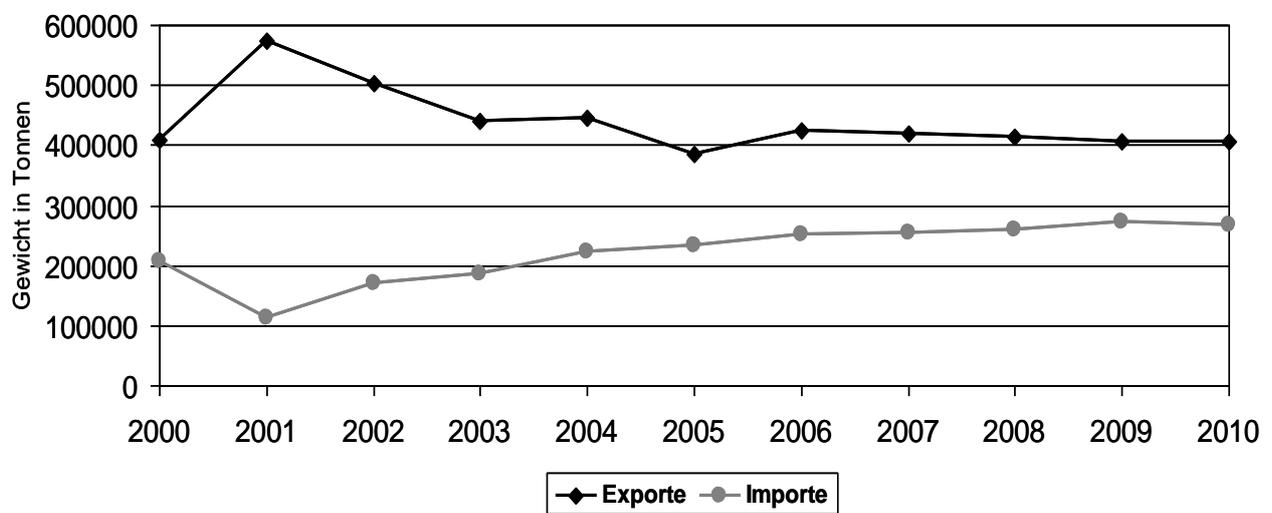
Der globale Rindfleischmarkt beträgt 23,0 % bis 26,0 % des gesamten Fleischmarktes und die weltweite Produktion ist im Zeitraum von 2000 bis 2008 von 59,5 Millionen Tonnen auf 65,1 Millionen Tonnen gestiegen (Belaya und Török, 2010). Die globalen Hauptproduzenten von Rindfleisch waren 2008 die USA, Brasilien, China und Argentinien (FAO, 2011a). Der Anteil Asiens (v. a. Chinas und Indiens) an der Weltproduktion hat sich von 1990 bis 2007 fast verdreifacht und erreichte somit nahezu die Quoten Nord- oder Südamerikas. Dagegen sank die europäische Produktion im gleichen Zeitraum um etwa 45,0 % (Windhorst, 2009).

Die globalen Hauptexporteure für Rindfleisch sind übereinstimmend mit den Hauptproduzenten seit Jahrzehnten großteils die gleichen Länder, u. a. die USA, Brasilien, Argentinien, Indien, Kanada, Uruguay, die EU (v. a. Deutschland und die Niederlande), China, Kolumbien und Mexiko. Dies soll Schätzungen zufolge in naher Zukunft ebenso bleiben (Windhorst, 2008a; Windhorst, 2009, Windhorst 2010a). Die internationalen Rindfleischexporte stiegen von 1990 bis 2006 von 4,3 auf 6,3 Millionen Tonnen (+ 46,1 %) und für den Zeitraum von 2005 bis 2015 wird ein Anstieg der gesamten Rindfleischexporte um weitere 15,1 % erwartet (Windhorst, 2006b).

Ferner nahmen die internationalen Importe von 1990 bis 2006 von 4,5 auf 6,2 Millionen Tonnen zu (+ 38,2 %) (Windhorst, 2010a). Nach Schätzungen des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums werden die Rindfleischimporte der führenden Einfuhrländer zwischen 2005 und 2015 um 17,9 % weiter ansteigen (USDA, 2011). Die USA sollen trotz eines Rückgangs der Einfuhren weltweit das wichtigste Importland für Rindfleisch bleiben. Das weltweit zweitwichtigste Land für Rindfleischimporte wird weiterhin Japan sein, gefolgt von Russland und der EU (Windhorst, 2006b). Insgesamt war bei den Importen der EU von 2004 bis 2008 ein Rückgang um etwa 40,0 % zu verzeichnen (Anonymus, 2009).

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes wurden im Jahr 2009 205.402,5 Tonnen Rind- und Kalbfleisch aus den EU-Ländern nach Deutschland verbracht. Davon hatte der größte Anteil mit 34,5 % seinen Ursprung in den Niederlanden, gefolgt von 18,5 % aus Polen und 14,6 % aus Frankreich. Zusätzlich kamen 53.215,7 Tonnen Rind- und Kalbfleisch aus Drittländern nach Deutschland, wovon mit 66,5 % die größte Menge aus Argentinien stammte.

Dagegen lieferte Deutschland 384.220,6 Tonnen Rindfleisch in die EU-Länder. Die drei Hauptempfängerländer waren die Niederlande mit 28,9 %, Frankreich mit 19,9 % und Italien mit 19,6 %. In Drittländer lieferte Deutschland 16.379,9 Tonnen Rindfleisch, wovon mit Abstand am meisten nach Russland (35,6 %), in die Schweiz (31,4 %) und nach Norwegen (15,6 %) exportiert wurde (BMELV, 2011; Statistisches Bundesamt, 2011). Insgesamt sind seit dem Jahr 2005/06 die Aus- und Einfuhrmengen von Rindfleisch jeweils annähernd konstant, wobei die Exporte mengenmäßig überwiegen (Abbildung 3).

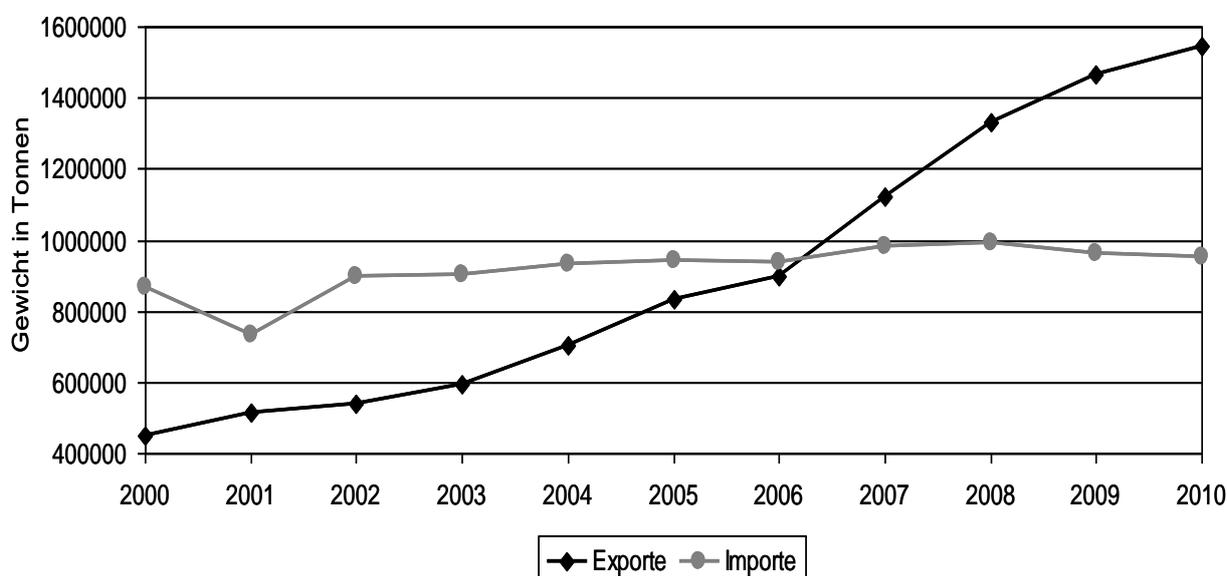


**Abbildung 3:** Rindfleischexporte und -importe Deutschlands von 2000 bis 2010 (BMELV, 2011; Statistisches Bundesamt, 2012)

### 2.1.2 Schweinefleisch

Schweinefleisch hat mit insgesamt 38,0 bis 40,0 % den größten Anteil am gesamten Weltfleischmarkt. Schätzungen zufolge werden im Jahr 2018 weltweit ca. 120 Millionen Tonnen Schweinefleisch produziert. Auch Deutschland befindet sich seit 1970 unter den führenden fünf Staaten der globalen Schweinefleischproduktion. So stand Deutschland beispielsweise im Jahr 2006 mit einer Menge von 4,5 Millionen Tonnen Schweinefleisch und einem Marktanteil von 4,3 % an dritter Stelle nach den größten Schweinefleischproduzenten China (50,1 %) und den USA (9,0 %) (Windhorst, 2004; Windhorst 2008b; Belaya und Török, 2010; Windhorst, 2010b).

Im vergangenen Jahrzehnt haben sich die Schweinefleischexporte Deutschlands mehr als verdreifacht und haben somit in 2009 ein Exportvolumen von 1.275.123,6 Tonnen in die EU-Länder sowie weitere 164.348,7 Tonnen in Drittländer erreicht. Im Gegensatz dazu sind die Importe nach Deutschland annähernd konstant geblieben und lagen 2009 bei einem Volumen von 958.911,2 Tonnen Schweinefleisch aus der EU sowie 7.195,0 Tonnen aus Drittländern (Kraus, 2009; Statistisches Bundesamt, 2011) (Abbildung 4). Die weltweit größten Abnehmer von Schweinefleisch sind u. a. Japan, gefolgt von Russland, Mexiko, den USA, Südkorea, China und Kanada (Windhorst, 2006b).

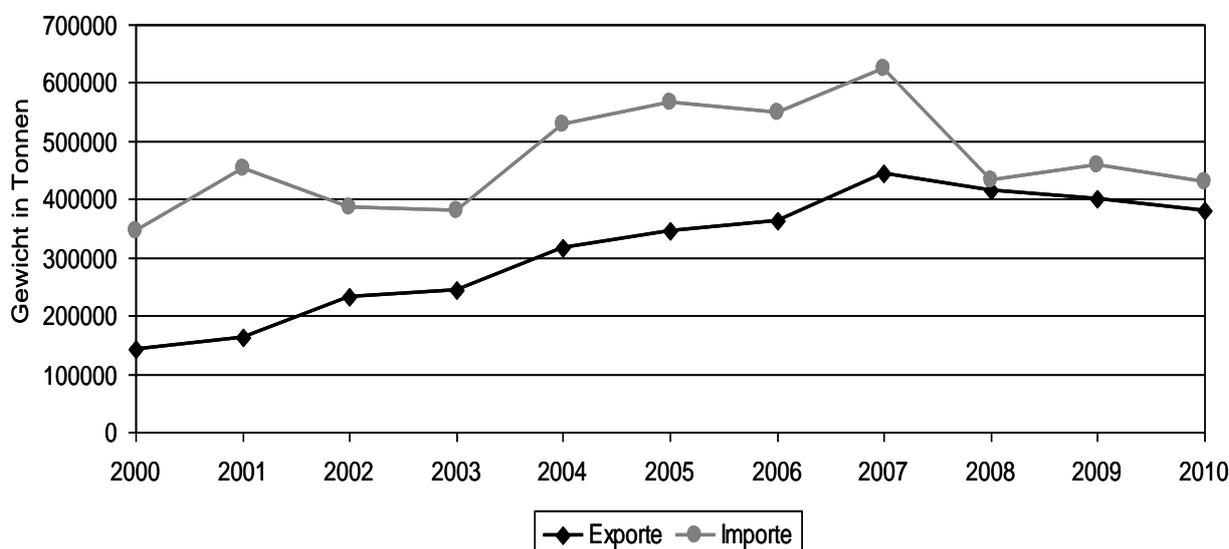


**Abbildung 4:** Schweinefleischexporte und -importe Deutschlands von 2000 bis 2010 (BMELV, 2011; Statistisches Bundesamt, 2012)

### 2.1.3 Geflügelfleisch

Geflügelfleisch – mit den beiden wichtigsten Fleischsorten Hühner- (über 80,0 %) und Putenfleisch – steht mit 29,0 bis 33,0 % Marktanteil nach Schweinefleisch an zweiter Stelle des gesamten Weltfleischmarktes (Windhorst, 2006a; Belaya und Török, 2010). Von 1970 bis 2004 nahm die Produktion weltweit von 15 auf über 78 Millionen Tonnen zu und soll bis zum Jahr 2018 mit einem Produktionsvolumen von 120 Millionen Tonnen auf gleicher Höhe mit dem von Schweinefleisch liegen (Windhorst, 2010b).

Unter den wichtigsten Ländern für den globalen Geflügelfleischhandel befindet sich auch Deutschland. Sowohl die Exporte als auch die Importe der beiden wichtigsten Geflügelfleischsorten erfuhren von 2000 bis 2010 in Deutschland ein allgemeines Wachstum, jedoch mit einigen Schwankungen (Abbildung 5). Die Bundesrepublik stand im Jahr 2009 an neunter Stelle der führenden Exportländer hinter Ländern wie beispielsweise Brasilien, China oder den USA. Deutschland stand im Jahr 2009 an zehnter Stelle unter den wichtigsten Importländern hinter beispielsweise Russland, China, Mexiko oder Japan. (Windhorst, 2005; Windhorst, 2006b; Belaya und Török, 2010; Statistisches Bundesamt, 2011; FAO, 2012).

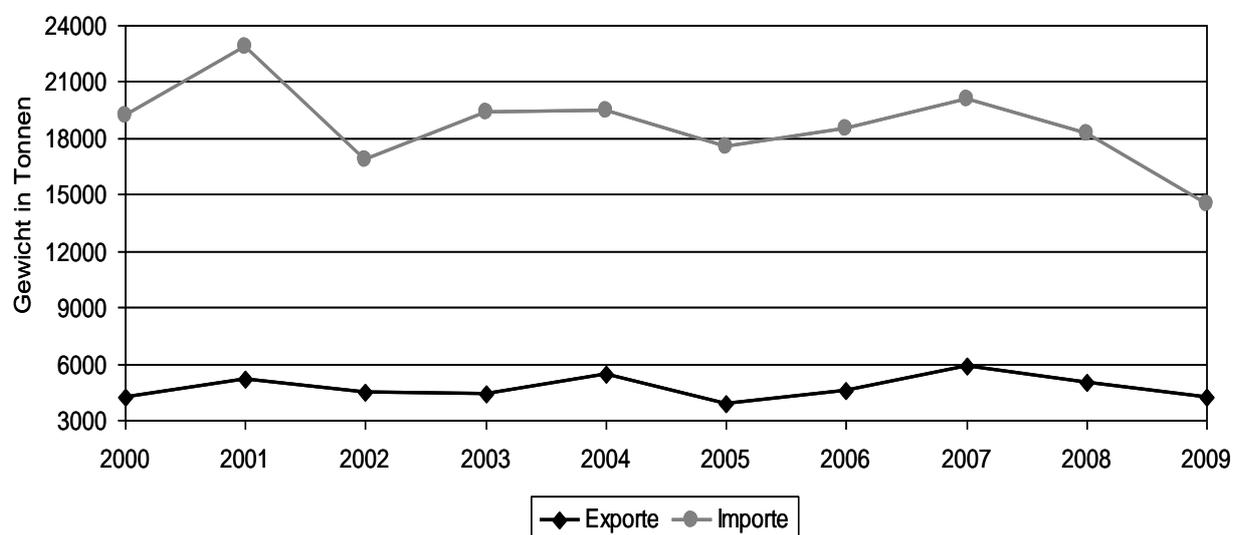


**Abbildung 5:** Geflügelfleischexporte und -importe Deutschlands von 2000 bis 2010 (BMELV, 2011; Statistisches Bundesamt, 2012)

### 2.1.4 Weitere Fleischsorten

Neben den weltweit bedeutendsten Fleischsorten wie Schweine-, Geflügel- und Rindfleisch (Belaya und Török, 2010) machen alle anderen Fleischsorten zusammen nur einen Anteil von 6,0 bis 7,0 % am Weltfleischmarkt aus. Dazu gehören Fleischsorten wie Wildfleisch oder auch Schaffleisch.

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Fleischsorten Rind, Schwein und Geflügel existieren über den Rot- und Damwildfleischhandel relativ wenige Daten, da dieses Fleisch in den meisten Statistiken und Berichten zusammen mit Kaninchenfleisch und anderen Fleischsorten unter den Begriff „sonstiges/anderes Fleisch“ fällt. Im Jahr 2008 waren die globalen Topexporteure für Rot- und Damwildfleisch Neuseeland (15.235 Tonnen), gefolgt von den Niederlanden (6.062 Tonnen) und Belgien (5.860 Tonnen) (FAO, 2011b). Der Rot- und Damwildfleischexport Deutschlands im letzten Jahrzehnt pendelte zwischen knapp 4000 und fast 6000 Tonnen pro Jahr (Abbildung 6). Beim Import von Rot- und Damwildfleisch nahm Deutschland weltweit die Spitzenstellung (18.246 Tonnen) ein, gefolgt von Frankreich (10.032 Tonnen) und Belgien (8.196 Tonnen) (FAO, 2011b).

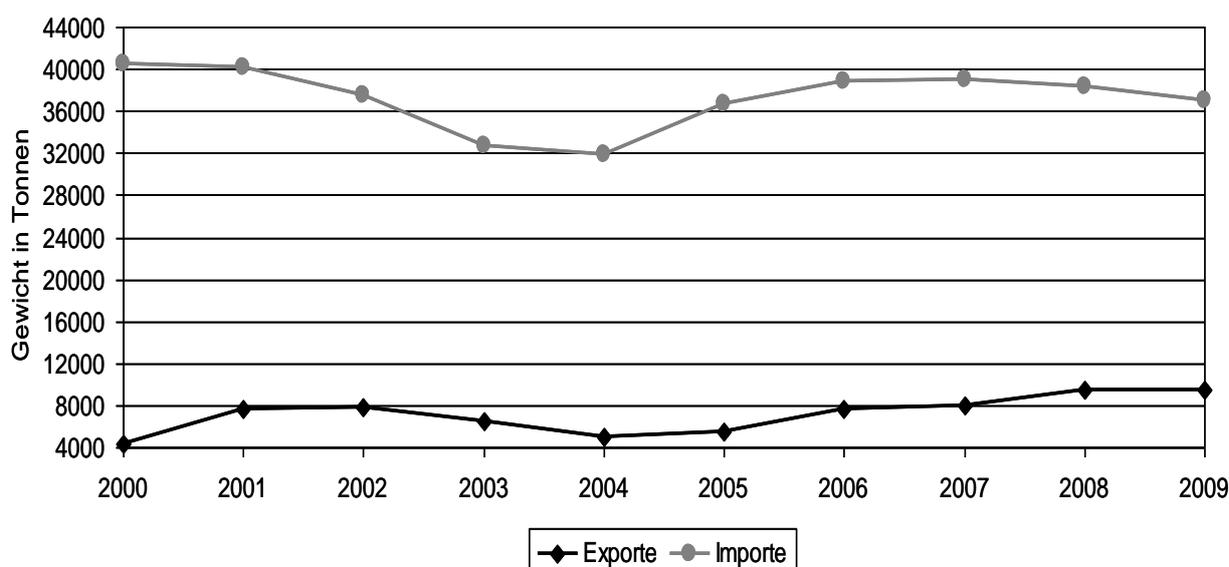


**Abbildung 6:** Rot- und Damwildfleischexporte und -importe Deutschlands von 2000 bis 2009 (FAO, 2012; Statistisches Bundesamt, 2012)

Eine weitere Fleischsorte mit vergleichsweise geringem Marktwertanteil ist das Schaffleisch. Insgesamt wird der Schaffleischmarkt von Lamm aus Neuseeland und Schaf aus Australien geprägt (Garnier, 2010). Des Weiteren gehören auch Länder wie Großbritannien, Irland, Belgien, Indien, Spanien, die Niederlande und Deutschland zu den globalen Schaffleischexporteuren (FAO, 2011b).

Der globale Schaffleischhandel ist im Allgemeinen jedoch von großen Verlusten geprägt, da die Produktionskosten die Erträge übersteigen. Gründe hierfür sind unter anderem die insgesamt relativ geringe Produktivität dieser Tierspezies und der niedrige Wollpreis. Der Schaffleischkonsum ist im Gegensatz zu anderen Fleischsorten stark produktionsabhängig.

Die weltweiten Hauptabnehmer für Schaffleisch sind Frankreich, gefolgt von Großbritannien, den USA, Belgien, Deutschland, Saudi Arabien, den Vereinigten Arabischen Emiraten, China und Italien (Garnier, 2010; FAO, 2011b). Deutschland importierte 2009 nach Angaben des Statistischen Bundesamts 30.082,7 Tonnen Schaffleisch aus Drittländern, wovon 93,0 % aus Neuseeland stammten. Außerdem wurden weitere 5.105,5 Tonnen aus EU-Ländern wie Großbritannien eingeführt. Im Gegensatz dazu wurden 2009 nur Exportmengen von 8.385,4 Tonnen für EU-Länder sowie 346,5 Tonnen Schaffleisch für Drittländer erreicht (Statistisches Bundesamt, 2011) (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Schaffleischexporte und -importe Deutschlands von 2000 bis 2009 (FAO, 2012; Statistisches Bundesamt, 2012)

## 2.2 *Clostridium* spp.

### 2.2.1 Gattungsmerkmale

Clostridien sind grampositive, meist obligate Anaerobier, die ihren Stoffwechsel an ein niedriges Redoxpotential angepasst haben (Rainey et al., 2009). Die Stäbchenbakterien gruppieren sich im mikroskopischen Bild häufig zu Paaren oder Ketten und sind mit Ausnahme von *Clostridium (C.) perfringens*, durch eine peritriche Begeißelung gekennzeichnet (Mayr, 2006). Clostridien sind ubiquitär verbreitet, d. h. viele Spezies können im Boden, in der Luft, auf der Vegetation und auch im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren nachgewiesen werden (Smith, 1975; Fehlhaber, 1992a; Ray und Bhunia, 2008). Die Gattung *Clostridium* gehört zur Familie der *Clostridiaceae*, die derzeit 25 Genera umfasst. Die Gattung *Clostridium* unterteilt sich in 203 Spezies und Subspezies, die in 19 Cluster und elf Gruppen aufgegliedert werden (Schaumann und Rodloff, 2009).

Ein wesentliches Merkmal dieser Gattung ist das Potential zur Bildung von hitzestabilen Endosporen (Schaumann und Rodloff, 2009), wodurch eine hohe Überlebensfähigkeit gewährleistet wird (Rainey et al., 2009). Die ovalen Sporen liegen in der Regel subterminal und treiben die Mutterzelle spindelförmig auf (Hatheway, 1990; Mayr, 2006). Diese Eigenschaft hat der Gruppe (griechisch: klostér = Spindel) ihren Namen gegeben (Schaumann und Rodloff, 2009). Clostridien besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit, Sporen zu bilden, einen epidemiologischen Vorteil. Zum einen wird der Spezies das dauerhafte Überleben auch in einer ungeeigneten Umwelt ermöglicht, zum anderen können sich Bakterien durch ihre Sporen passiv in der Umgebung ausbreiten und diverse Habitate besiedeln. Die Verbreitung kann über die Luft, Tiere und fließende Gewässer erfolgen (Lengeler et al., 1999; Ray und Bhunia, 2008). Durch diesen epidemiologischen Vorteil ist die Gattung *Clostridium*, wie alle Sporenbildner, weit verbreitet.

Einige Spezies der Gattung *Clostridium* besitzen die Fähigkeit zur Bildung sehr potenter Toxine. Das bekannteste Beispiel ist das Botulinumtoxin, das als giftigstes Toxin gilt (Montal, 2010). Deshalb spielen Clostridien auch in Lebensmitteln eine wichtige Rolle, da viele Prozess- und Konservierungsmethoden nicht in der Lage sind, Sporen und Toxine unschädlich zu machen (Hatheway, 1990; Lengeler et al., 1999; Ray und Bhunia, 2008).

### 2.2.2 Krankheitserreger

Die Gattung *Clostridium* beinhaltet human- und tiermedizinisch relevante Spezies wie *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens* und *C. difficile* (Brown, 2000). Hinsichtlich ihrer Pathogenitätsmechanismen werden die Vertreter der Gattung *Clostridium* in pathogene und toxinogene Spezies unterschieden. Erstere verursachen Infektionen, indem sie sich im betroffenen Organismus vermehren und nach einer Inkubationszeit zur Erkrankung führen. Toxinogene Spezies dagegen produzieren innerhalb sowie außerhalb eines Wirtsorganismus Toxine, welche eine gesundheitsschädigende Wirkung besitzen (Bülte, 2003).

Durch Clostridien ausgelöste Krankheiten können nach Pathogenität und Hauptsymptomatik in Gasödemerkrankungen, Enterotoxämien/Enteritiden und Intoxikationen durch Neurotoxine eingeteilt werden (Tabelle 1). Betroffen hiervon sind sowohl Mensch als auch Tier (Mayr, 2006).

**Tabelle 1:** Übersicht über relevante Clostridiosen (Mayr, 2006)

Erkrankungen	Erkrankungsbild	Verursachende Spezies
Gasödemerkrankungen	Rauschbrand (V)	<i>C. chauvoei</i>
	Pararauschbrand (V, H)	<i>C. septicum</i>
	Gasbrand, Wundgasödeme (V, H)	<i>C. perfringens</i>
Enterotoxämie/Enteritis	Tyzzler's disease (V)	<i>C. piliforme</i>
	Verschiedene Darmerkrankungen (V, H)	<i>C. difficile</i>
	Verschiedene Darmerkrankungen (V, H)	<i>C. perfringens</i>
Intoxikation durch Neurotoxin	Tetanus (V, H)	<i>C. tetani</i>
	Botulismus (V, H)	<i>C. botulinum</i>

V: veterinärmedizinisch bedeutsam

H: humanmedizinisch bedeutsam

### ***Clostridium botulinum***

*C. botulinum* ist weltweit verbreitet und kommt natürlicherweise im Boden und im Verdauungstrakt gesunder Menschen und Tiere vor (Mayr, 2006). Dieser Mikroorganismus gilt als Auslöser des Botulismus (von lateinisch: botulus, die Wurst), der früher auch als „Wurstvergiftung“ bezeichnet wurde (Kerner, 1842). Nach einem Krankheitsausbruch in Wildbad, Baden-Württemberg im Jahre 1793 wurde *C. botulinum* genauer erforscht. 1897 entdeckte Van Ermengen das

krankheitsverursachende, von *C. botulinum* gebildete Botulinumtoxin (Lindström, 2009). Dieses Neurotoxin ist anerkannt als das giftigste bekannte Protein (Montal, 2010) und kann deshalb auch als Biowaffe eingesetzt werden (Hakami et al., 2010). Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass *C. butyricum* und *C. baratii* ebenfalls Botulinumtoxin bilden können (Johnson, 2007).

Nach Angaben des Infektionsepidemiologischen Jahrbuches des Robert Koch-Institutes (RKI, 2011) ist das typische Krankheitsbild des Botulismus eine schwere Lebensmittelvergiftung mit Lähmungserscheinungen, die durch die Aufnahme des Botulinumtoxins ausgelöst wird. Das Toxin führt durch die Blockade der Acetylcholinfreisetzung an der neuromuskulären Endplatte zu einer schlaffen Lähmung (Caleo und Schiavo, 2009). Neben der Intoxikation kann der Erreger auch in Wunden nachgewiesen werden. Diese Variante tritt häufig im Zusammenhang mit Drogenmissbrauch auf. Das Krankheitsbild des Säuglingsbotulismus dagegen ist gekennzeichnet durch die Toxinbildung im Darmtrakt von Säuglingen (RKI, 2011). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die im vergangenen Jahrzehnt gemeldeten Fälle von Botulismus in Deutschland nach Angaben des Infektionsepidemiologischen Jahrbuches (RKI, 2011).

Gemäß § 6 Infektionsschutzgesetz (IfSG) (Meldepflichtige Krankheiten) sind der Krankheitsverdacht, die Erkrankung und der Tod an Botulismus namentlich zu melden. Außerdem ist nach § 7 IfSG (Meldepflichtige Nachweise von Krankheitserregern) der direkte oder indirekte Nachweis von *C. botulinum* oder dessen Toxinen meldepflichtig, sofern dieser Nachweis auf eine akute Infektion hinweist.

**Tabelle 2:** Übersicht über die gemeldeten Botulismusfälle in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2009 (RKI, 2011)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Fälle insgesamt	11	8	11	8	6	24	7	9	10	5
Lebensmittel- bedingter Botulismus	10	5	11	8	5	8	3	9	8	4
Säuglings- botulismus	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1
Wundbotulismus	0	0	0	0	1	16	4	0	2	0

### ***Clostridium tetani***

Neben *C. botulinum* kommt auch *C. tetani* natürlicherweise im Boden und im Verdauungstrakt von Tieren vor. Bei Verletzungen dringt dieser Mikroorganismus in die Wunden ein und bildet das Toxin Tetanospasmin. Dieses Nervengift ist eines der potentesten bekannten Toxine und führt zu einer spastischen Lähmung, dem sogenannten Wundstarrkrampf. In den Entwicklungsländern, in denen Impfungen allgemein selten vorgenommen werden, führt diese Erkrankung häufig zum Tod (Brüggemann et al., 2003; Yeh et al., 2010).

### ***Clostridium perfringens***

*C. perfringens* ist ein nicht beweglicher Vertreter der Gattung *Clostridium* und kann Ursache einer Lebensmittelinfektion aber auch einer nicht lebensmittelbedingten Infektion, des sogenannten Darmbrandes oder auch des Gasbrandes, sein. Bei der Lebensmittelinfektion bilden die aufgenommenen Mikroorganismen im Darmlumen Enterotoxine (v. a. Toxine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) und führen so zu Durchfall und Bauchkrämpfen (Shimizu et al., 2002; Harry et al., 2009; Li und McClane, 2010). Das Enterotoxin-Gen besitzen jedoch nur weniger als 5,0 % der Vertreter dieser Spezies (McClane, 2007). *C. perfringens* kann auch mikroaerophil wachsen und wird natürlicherweise im Boden und im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren gefunden (McClane, 2007; Songer, 2010).

### ***Clostridium difficile***

*C. difficile* erlangt zunehmende Bedeutung, da diese Spezies sehr häufig im Zusammenhang mit Antibiotika assoziierter, pseudomembranöser Kolitis gefunden wird. Diese Erkrankung tritt vor allem beim Einsatz von Breitspektrum-Antibiotika auf und ist als nosokomiale Infektion bekannt. Der auslösende Mikroorganismus ist fakultativ pathogen und kann bei einer gestörten Darmflora zur Erkrankung führen (Navaneethan et al., 2010; Songer, 2010; Sundriyal et al., 2010).

## **2.2.3 Verderbniserreger**

Lebensmittelverderb kann durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden. Sehr häufig sind dabei verschiedenste Verderbniserreger beteiligt. Auch nicht toxinproduzierende Sporenbildner der Gattung *Clostridium* können zum Verderb hochwertiger Lebensmittel führen (Tabelle 3), der erheblichen wirtschaftlichen Schaden

verursachen kann (Brown, 2000). So zählen diese Clostridien, neben der toxinproduzierenden Spezies *C. botulinum*, zu den Hauptverderberregern bei Konserven, die zu Bombagen führen können (Leistner, 1970; Fehlhaber, 1992a; Ray und Bhunia, 2008).

Sporen können aufgrund ihrer hohen Tenazität mit vielen herkömmlichen Dekontaminationsmethoden nicht unschädlich gemacht werden. Da Sporen ubiquitär verbreitet sind, können diese mit den Lebensmitteln oder den Mitarbeitern in den verarbeitenden Betrieb eingetragen werden. Die wirksamste Methode Sporen abzutöten stellt derzeit die Hitzeanwendung dar (Brown, 2000; Setlow und Johnson, 2007). Obwohl verdorbene Lebensmittel nicht zwangsläufig gesundheitsschädigend sein müssen, dürfen gemäß Artikel 14 der EU-Verordnung (EG) Nr. 178/2002 Lebensmittel nicht in den Verkehr gebracht werden, wenn sie „nicht sicher“ sind. Lebensmittel gelten nach der VO (EG) Nr. 178/2002 als nicht sicher, wenn davon auszugehen ist, dass sie gesundheitsschädlich sind, oder wenn davon auszugehen ist, dass sie für den Verzehr durch den Menschen nicht geeignet sind. Für den Verzehr ungeeignet sind Lebensmittel dann einzustufen, wenn sie durch „Fremdstoffe“ oder eine „auf andere Weise bewirkte Kontamination, durch Fäulnis, Verderb oder Zersetzung für den Verzehr durch den Menschen inakzeptabel geworden sind“.

**Tabelle 3:** Wichtige Verderberregere der Gattung *Clostridium* im Hinblick auf ihr Temperaturverhalten

<b><i>Clostridium</i>-Spezies</b>	<b>Lebensmittel</b>	<b>Temperaturverhalten</b>
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	Konserven	thermophil
<i>C. beijerinckii</i>	Konserven	mesophil
<i>C. butyricum</i>	Käse	mesophil
<i>C. pasteurianum</i>	Konserven	mesophil
<i>C. sporogenes</i>	Käse, pasteurisierte Lebensmittel	mesophil
<i>C. tyrobutyricum</i>	Käse	mesophil
<i>C. algidicarnis</i>	Fleisch	psychrophil
<i>C. difficile</i>	Wildfleisch	psychrophil
<i>C. estertheticum</i>	Fleisch	psychrophil
<i>C. gasigenes</i>	Fleisch	psychrophil
<i>C. putrefaciens</i>	Schinken, Lammfleisch	psychrophil

Während der Verderb durch *Clostridium* spp. bei Konserven seit langem bekannt ist, spielen zunehmend psychrophile Clostridien im Verderbsgeschehen hochwertiger, vakuumierter Fleischstücke eine Rolle. Aufgrund ihres Wachstumsvermögens bei Kühltemperaturen können sie zum Verderb bei Einhaltung der Kühlbedingungen noch innerhalb des Mindesthaltbarkeitsdatums führen. So wurde bereits *C. putrefaciens* im Zusammenhang mit verdorbenem Schinken (Ross, 1965) und vakuumverpacktem, gekühltem Lamm (Broda et al., 2009) und *C. algidicarnis* im Zusammenhang mit verdorbenem, vakuumverpacktem und gekühltem Lammfleisch (Broda et al., 1996b), Rindfleisch (De Lacy et al., 1998) und Schweinefleisch (Lawson et al., 1994) beschrieben. Besonders der in diesem Zusammenhang auftretende psychrophile Lebensmittelverderbserreger *C. estertheticum*, der zur Bildung von sogenannten „Blown Packs“ führen kann, soll im Folgenden genauer beschrieben werden.

## 2.3 *Clostridium estertheticum*

### 2.3.1 Psychrophile Clostridien

In Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten bei verschiedenen Temperaturen werden Mikroorganismen als psychrophil, mesophil und thermophil bezeichnet (Keweloh, 2008, Ray und Bhunia, 2008) (Tabelle 4). Thermophile Mikroorganismen besitzen ihr Wachstumsoptimum bei Temperaturen von +40 bis +50 °C, während mesophile Mikroorganismen bei Temperaturen zwischen +5 bis +10 °C (Minimum) und +45 bis +47 °C (Maximum) wachsen. Ihr Temperaturoptimum liegt dabei zwischen +30 bis +40 °C (Fehlhaber, 1992a). Zu dieser Gruppe zählen die meisten pathogenen Mikroorganismen (Keweloh, 2008). Wenn sich das Wachstumsspektrum von Bakterien bei tieferen Temperaturen befindet, handelt es sich um psychrophile Mikroorganismen (Fehlhaber, 1992a). Auch bei *Clostridium* spp. kommen Vertreter in allen Temperaturbereichen vor.

**Tabelle 4:** Einteilung von Mikroorganismen nach Wachstumstemperatur

	Wachstumstemperatur	
	Temperaturoptimum	Temperaturspanne
Thermophil	55 °C	45 bis 70 °C
Mesophil	35 °C	10 bis 45 °C
Psychrophil	15 °C	-5 bis 20 °C

Manche *Clostridium* spp. zeichnen sich durch psychrophile Eigenschaften aus. Psychrophile, die zu den Extremophilen gehören, sind definiert als kälteliebende Mikroorganismen. Sie sind gekennzeichnet durch ein Wachstum mit einem Temperaturoptimum unter +15 °C. Die minimale Wachstumstemperatur liegt mitunter bei unter 0 °C, die maximale bei unter +20 °C (Morita, 1975). Psychrophile Clostridien konnten bereits aus verschiedenen Matrices isoliert werden (Tabelle 5). Die Anpassung an eine kalte Umgebung spielt auf der Erde eine große Rolle, da unter Betrachtung der gesamten Landfläche zusammen mit den Wasseranteilen etwa 80 % der Weltbiosphäre permanent kalt sind (Russell et al., 1990). Dazu gehören beispielsweise die Arktis, die Antarktis, die Tundra, verschiedene Gebirge und auch die Meere und andere Gewässer.

**Tabelle 5:** Herkunft und Erstbeschreibung psychrophiler Clostridien (DSMZ, 2011)

<b>Speziesname</b>	<b>Herkunft (Land/Gebiet)</b>	<b>Erstbeschreibung</b>
<b><i>C. algidicarnis</i></b>	Gekochtes, vakuumverpacktes Schweinefleisch (Großbritannien)	Lawson et al., 1994
<b><i>C. algoriphilum</i></b>	Sole im Permafrostboden (Arktis)	Shcherbakova et al., 2005
<b><i>C. bowmannii</i></b>	Seichter Wassergraben um einen Süßwassersee (Antarktis)	Spring et al., 2003
<b><i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i></b>	Gekühltes, vakuumverpacktes Rindfleisch (USA, Südafrika)	Kalchayanand et al., 1989; Dainty et al., 1989; (Taxonomische Einordnung durch Collins et al., 1992)
<b><i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i></b>	Gekühltes, vakuumverpacktes Rindfleisch (USA)	Kalchayanand et al., 1993; (Umbenennung durch Spring et al., 2003)
<b><i>C. frigoris</i></b>	Seichter Wassergraben um einen Süßwassersee (Antarktis)	Spring et al., 2003
<b><i>C. gasigenes</i></b>	Gekühltes, vakuumverpacktes Lammfleisch (Neuseeland)	Broda et al., 2000a
<b><i>C. lacusfryxellense</i></b>	Seichter Wassergraben um einen Süßwassersee (Antarktis)	Spring et al., 2003
<b><i>C. psychrophilum</i></b>	Seichter Wassergraben um einen Süßwassersee (Antarktis)	Spring et al., 2003
<b><i>C. vincentii</i></b>	Gering salzhaltiger Teich des McMurdo-Schelfeis (Antarktis)	Mountfort et al., 1997

### 2.3.2 Vorkommen und Eigenschaften von *Clostridium estertheticum*

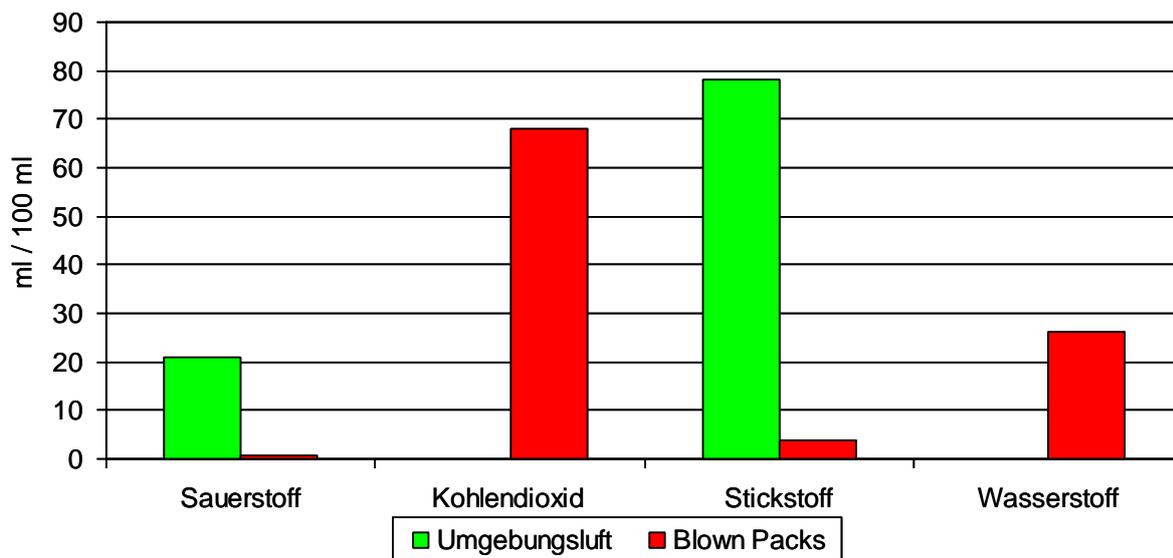
Ende der 1980er Jahre wurde von einem neuartigen Verderb gekühlten, vakuumverpackten Rindfleisches berichtet, der durch teilweise extreme Gasansammlungen in der Vakuumverpackung („Blown Packs“) und strenge Verderbsgerüche gekennzeichnet war (Dainty et al., 1989). Die Kühlkette dieser Ware war nicht unterbrochen worden und die Verpackungen waren intakt. Als auslösender Mikroorganismus konnte durch Sequenzierung der 16S rRNA in Kombination mit der Untersuchung von Mureinhydrolysaten der Zellwand, Wachstumscharakteristika und phänotypischen Eigenschaften eine *Clostridium*-Spezies des Clusters I *Clostridium sensu stricto* identifiziert werden (Rainey et al., 2009). Der gewählte lateinische Speziesname „*estertheticum*“ bedeutet „Ester produzierend“ (Collins et al., 1992). In der Literatur beschriebene „Blown Packs“ sind bisher in Ozeanien, Nordamerika und Europa aufgetreten. In Tabelle 6 sind diese Fälle unter Angabe der geografischen Lokalisation und der betroffenen Fleischsorten aufgeführt. Studien zum Vorkommen von *C. estertheticum* in der Türkei verliefen bisher mit negativen Ergebnissen (Ylmaz et al., 2009).

**Tabelle 6:** Übersicht über bisher beschriebene „Blown Packs“ und deren Herkunft

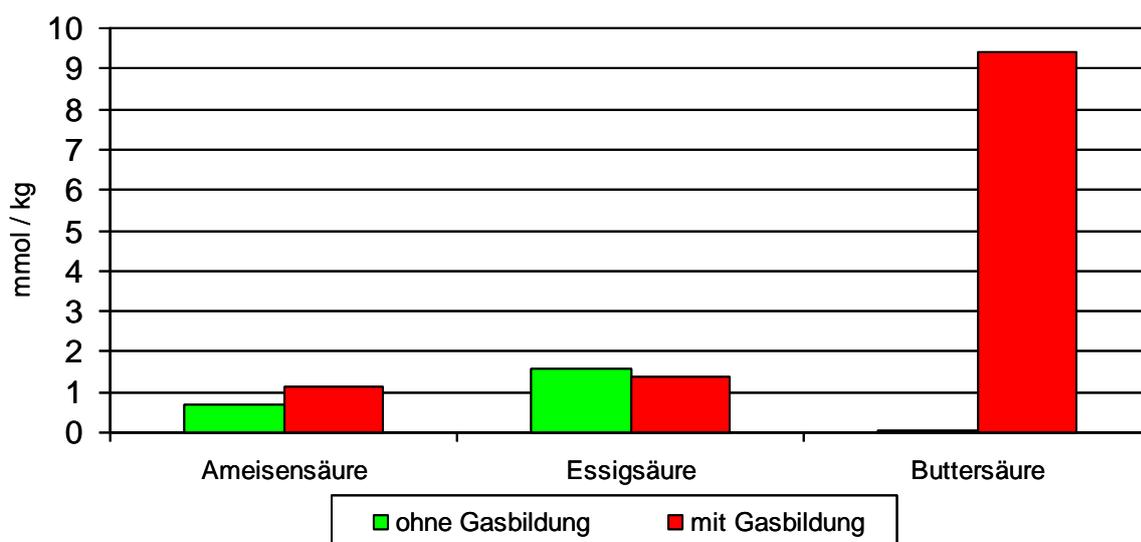
Fleischsorte	Geografische Lokalisation	Autor
Rind	Großbritannien (Import aus Südafrika)	Dainty et al., 1989
Rind	USA	Kalchayanand et al., 1989
Rind	Nordamerika	Helps et al., 1999
Rind, Lamm, Wild	Neuseeland	Broda et al., 2000a, 2002, 2003a, 2003b
Rind	Schweiz	Hadorn et al., 2009
Rind, Lamm	Irland	Byrne et al., 2009
Rind	Deutschland (teilw. Importe aus Brasilien, Schweiz)	Ziegler, 2009

Aufgrund der teilweise enormen Aufblähung der Vakuumverpackungen wurde die Gaszusammensetzung der sogenannten „Blown Packs“ untersucht. Dabei ergab sich ein Anteil von über 60 % Kohlendioxid und etwa 30 % Wasserstoff (Abbildung 8). Die dadurch mögliche Explosionsgefahr vor allem größerer Mengen verdorbener Fleischpackungen sollte in der Praxis nicht unterschätzt werden. Der Gehalt an Ameisensäure im Gas der aufgeblähten Packungen war bis zu dreimal höher als in

dem der Unverdorbenen. Mit einer Erhöhung um den Faktor 80 bis 250 im Gegensatz zu nicht verdorbenen Packungen ist jedoch der extrem hohe Gehalt an Buttersäure am charakteristischsten für „Blown Packs“ (Abbildung 9). Außerdem ist eine komplexe Mischung verschiedener Ester und Schwefelverbindungen im gebildeten Gas messbar (Dainty et al., 1989; Hadorn et al., 2009).



**Abbildung 8:** Vergleich der Gaszusammensetzung von Umgebungsluft und „Blown Packs“ (nach Hadorn et al., 2009)



**Abbildung 9:** Vergleich der Konzentration bestimmter Säuren in aufgeblähten und nicht aufgeblähten Fleischpackungen (nach Hadorn et al., 2009)

Studien zum Substratverbrauch von *C. estertheticum* ergaben, dass Glukose verstoffwechselt und außerdem Laktat fermentiert wird. Die Stoffwechselprodukte von Glukose sind Butyrat, Azetat und Formiat. Laktat wird zu 1-Butanol, Ethanol, Butyrat und Formiat verarbeitet. Das Wachstum stagniert, wenn die Glukose verbraucht ist. Ein weiterer Faktor, der die Vermehrung von *C. estertheticum* hemmt, scheint ein pH-Wert unter 5,3 zu sein (Yang et al., 2009a, 2010). Weitere Studien zum Substratverbrauch von *C. estertheticum* in einem Fleischextraktmedium bei +10 °C führten zu den in Tabelle 7 wiedergegebenen Ergebnissen (Yang et al., 2009b).

Neben Studien zum Substratverbrauch wurden u. a. Versuche mit Rind- und Lammfleisch durchgeführt, die zeigten, dass eine höhere Anzahl an Sporen und auch höhere Lagertemperaturen zu einem schnelleren Verderb und zu schnellerem Aufblähen der Vakuumverpackungen führen. Die Lagerung bei +1, +2 oder +4 °C statt bei -1,5 °C beschleunigt das Auftreten von „Blown Packs“ deutlich (Boerema et al., 2007; Clemens et al., 2010; Moschonas et al., 2010). Theoretisch führt schon eine Kontamination mit einer Spore pro Packung zu einem deutlichen Fleischverderb (Clemens et al., 2010). Hinsichtlich der gebildeten Gasmengen unterscheiden sich die verschiedenen Subspezies (Broda et al., 2002). *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* produziert dabei die größten Gasmengen (Moschonas et al., 2010).

*C. estertheticum* wurde bei verschiedenen Untersuchungen in Schlachthöfen und Zerlegebetrieben, vor allem in den Proben aus der Umgebung des Fellabzuges, der Stallungen und an der Tieranlieferung bestätigt. Außerdem konnte der Mikroorganismus in Proben von Schlachtthierhäuten und -kot und in Bodenproben nachgewiesen werden. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Schlachtthiere selbst die Eintragsquelle der Sporen in den Schlachthof sind (Broda et al., 2002; Boerema et al., 2003; Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009). Das häufige Auffinden von *C. estertheticum* in landwirtschaftlichen Betrieben stützt die Auffassung, dass es sich um extrinsische Kontaminanten handelt, die beim Schlachtprozess auf den Schlachtkörper gelangen (Broda et al., 2009). Im Jahresverlauf wurden im Mai die meisten *C. estertheticum*-positiven Proben gefunden (Moschonas et al., 2009).

Bei psychrophilen Clostridien aus „Blown Packs“ und von Schlachtvieh konnte durch eine Auswertung der Resultate der klassischen biochemischen Differenzierung und der Sequenzierung des 16S rRNA-Gens vermutet werden, dass diese Mikroorganismen zur Spezies *C. botulinum* gehören. Untersuchungen, ob psychrophile Clostridien Botulinum-Neurotoxin-Gene tragen, ergaben jedoch negative Ergebnisse (Broda et al., 1998a). Auch ein Mäuseversuch lieferte keine Hinweise auf eine Toxizität (Moorhead und Bell, 1999). Bisher gibt es in der Literatur keine Angaben zu einer möglichen Toxinbildung durch psychrophile Clostridien.

*C. estertheticum* sind grampositive, bewegliche Stäbchen, die im mikroskopischen Bild entweder einzeln oder in Paaren auftreten. Das Bakterium ist obligat anaerob und saccharolytisch. Das pH-Optimum liegt bei pH 6,5, der Guanin-Cytosin-Gehalt der DNA beträgt 33,9 mol%. Die Sporen sind oval, werden subterminal gebildet und wölben den Zellkörper der Mutterzelle auf. Das Wachstum findet zwischen +1 und +15 °C statt, während es bei +22 °C stagniert. Sporen von *C. estertheticum* können eine Erhitzung auf +80 °C für zehn Minuten überleben (Collins et al., 1992; Rainey et al., 2009). Innerhalb der Spezies wurden bisher zwei Subspezies beschrieben. Die Unterschiede zwischen *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* und subsp. *laramiense* sind in Tabelle 8 aufgeführt. Hierbei sind vor allem Differenzen bei der Sporenform und -lokalisierung, den Wachstumstemperaturen, dem Substratverbrauch und dem Guanin-Cytosin-Gehalt der DNA zu verzeichnen. Außerdem unterscheiden sich die Temperaturoptima deutlich. Auch bei der  $\beta$ -Hämolyse sind in der Literatur zwei unterschiedliche Verhalten beschrieben (Spring et al., 2003; Yang et al., 2010). Daher scheint die eindeutige Zuordnung der Subspezies nicht zweifelsfrei geklärt.

**Tabelle 7:** Substratverbrauch von *C. estertheticum* in einem Fleischextraktmedium über einen Zeitraum von zehn Tagen (nach Yang et al., 2009b)

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10
<b>Wachstum <i>C. estertheticum</i></b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
<b>pH-Wert</b>	Sinkend	Sinkend	Sinkend	Sinkend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend
<b>Glukose detektierbar</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
<b>Glykogenverbrauch</b>	Langsam	Schnell	Schnell	Schnell	Langsam	Langsam	Langsam	Langsam	Langsam	Langsam
<b>Laktatverbrauch</b>	Nein	Nein	Nein	Schnell	Schnell	Schnell	Schnell	Schnell	Langsam	Langsam
<b>Ammoniumkonzentration</b>	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend	Steigend
<b>Konzentration freier Aminosäuren</b>	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert
<b>Acetatkonzentration</b>	Steigend	Steigend	Unverändert							
<b>Butyratkonzentration</b>	Unverändert	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Langsam steigend	Langsam steigend	Langsam steigend	Langsam steigend
<b>Ethanolkonzentration</b>	Nicht messbar	Nicht messbar	Nicht messbar	Langsam steigend						
<b>Butanolkonzentration</b>	Nicht messbar	Nicht messbar	Nicht messbar	Langsam steigend	Langsam steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend	Schnell steigend

**Tabelle 8:** Gegenüberstellung der beiden *C. estertheticum*-Subspezies (nach Finster, 2011, Rainey et al., 2009)

	<b><i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i></b>	<b><i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i></b>	
Zellgröße (µm)	1,3 – 1,5 x 2,4 – 6,0	1,3 – 1,5 x 2,4 – 6,0	
Zellform	stäbchenförmig	stäbchenförmig	
Auftreten der Zellen	einzel, paarweise, kettenförmig	einzel, paarweise, kettenförmig	
Motilität	ja (peritriche Begeißelung)	ja (peritriche Begeißelung)	
Sporenform und –lokalisierung	oval subterminal	ellipsoid terminal bis subterminal	
Kolonie	Schafblutagar: eben, cremeweiß - gräulich	Schafblutagar: eben, cremeweiß - gräulich	
Temperaturoptimum (°C)	6 – 8	15	
Temperaturbereich (°C)	1 – 15	1 – 30	
pH-Optimum	6,5 – 7,2	6,5 - 6,8	
pH-Bereich	5,5 – 7,8	4,5 – 8,3	
Substratverbrauch	- Amygdalin	-	-
	- Arabinose	+	+
	- Cellobiose	+	+
	- Galaktose	+	+
	- Glukose	+	+
	- Glykogen	-	+
	- Fruktose	+	+
	- Inositol	+	+
	- Inulin	+	+
	- Laktose	-	-
	- Maltose	+	+
	- Mannitol	+	+
	- Mannose	+	+
	- Melezitose	-	-
	- Melibiose	+	+
	- Raffinose	+	+
	- Rhamnose	+	+
	- Ribose	-	-
	- Salizin	+	+
	- Sorbitol	+	+
- Stärke	+	+	
- Saccharose	+	+	
- Trehalose	-	-	
- Xylose	+	+	

**Fortsetzung Tabelle 8**

β-Hämolyse	-	+
Stärkehydrolyse	+	+
Proteinhydrolyse	-	- (Gelatine)
Aesculinhydrolyse	+	nicht beschrieben
Gelatinehydrolyse	-	-
H <sub>2</sub> -Produktion	+	+
nicht gasförmige Fermentationsprodukte	v. a. Butyrat, Azetat; Auch Formiat, Laktat, Butanol, Ethanol	v. a. Butyrat, Butanol, Laktat; Auch Azetat, Formiat, Ethanol
GC-Gehalt der DNA (mol%)	28,0 - 33,9	32,4 - 35,6
Meso-Diaminopimelinsäure als Zellwandpeptidoglykan	+	+
Quelle des Organismus	gekühltes, vakuumverpacktes Rindfleisch	gekühltes, vakuumverpacktes Rindfleisch

GC-Gehalt: Guanin-Cytosin-Gehalt

**2.3.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum***

Der Nachweis von *C. estertheticum* stellt bislang eine Herausforderung dar, da dieser Mikroorganismus mit den üblichen mikrobiologischen Routineuntersuchungen für frisches Fleisch nicht nachgewiesen werden kann. Anhand der Ergebnisse dieser bei Fleisch gängigen mikrobiologischen Diagnostik können keine Rückschlüsse auf eine Kontamination mit diesem Mikroorganismus vorgenommen werden (Dainty et al., 1989; Helps et al., 1999; Ziegler, 2009). Ein erster Hinweis auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* kann aber durch bakterioskopische Untersuchung des Fleischtropfsafts aus der Vakuumverpackung oder von Oberflächenabstrichen des Fleisches gewonnen werden, wenn dabei große, plumpe Stäbchen gefunden werden. Bei fortgeschrittenem Verderb sind das Aufblähen der Vakuumverpackung und deutliche Geruchsabweichungen – nach Erbrochenem oder nach sehr stark gereiftem Käse riechend – auffallend (Dainty et al., 1989; Broda et al., 1996a; Ziegler, 2009).

## **Polymerasekettenreaktion**

Der erste veröffentlichte molekularbiologische Nachweis von *C. estertheticum* mittels PCR erfolgte im Jahre 1999 (Helps et al., 1999). Zielsequenz dieses Nachweises war ein Abschnitt der 16S rDNA mit einem PCR-Produkt von 567 Basenpaaren. Im Laufe der oben genannten Studie wurden die spezifischen Primer optimiert und lieferten nun ein PCR-Produkt von 641 Basenpaaren. Die angewendete Annealing-Temperatur betrug +65 °C. Die Nachweisgrenze lag bei  $10^1$  bis  $10^2$  Zellen pro Milliliter Fleischtropfsaft. Durch Messung der Intensität der PCR-Banden konnte ein Zusammenhang zwischen der Bandenstärke und der Menge an Organismen pro Milliliter Fleischtropfsaft aufgezeigt werden (Helps et al., 1999).

Eine weitere Studie zum molekularbiologischen Nachweis von *C. estertheticum* beschrieb als Zielsequenz die variablen Regionen V1 (Position 207 – 223) und V6 (Position 996 – 977) der 16S rDNA mit einem PCR-Produkt von 790 bp (Broda et al., 2003b). Um *C. estertheticum* und *C. estertheticum*-like Stämme unterscheiden zu können, wurde ein zusätzliches Primerpaar eingesetzt. Die in Neuseeland isolierten *C. estertheticum*-like Stämme, deren taxonomische Zuordnung noch nicht geklärt ist, besitzen ähnliche Eigenschaften wie *C. estertheticum* (Broda et al., 2000c, 2003a). Diese PCR mit der 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer-Region als Zielsequenz gibt nur für *C. estertheticum* ein positives Signal mit einer Größe von 230 Basenpaaren. Die gewählte Annealing-Temperatur für beide Reaktionen betrug +55 °C. Als Nachweisgrenze wurden  $10^4$  Zellen pro Milliliter Fleischhomogenat für nicht angereicherte Proben und  $10^2$  Zellen pro Milliliter Fleischhomogenat für angereicherte Proben festgestellt. Vor allem für Proben mit einer erwartungsgemäß geringen Anzahl an gesuchten Mikroorganismen ist eine anaerobe Anreicherung bei niedriger Temperatur empfehlenswert (Broda et al., 2003b). Diese PCR ist auch für Probenmaterial aus Kot, Fell und der Schlachthofumgebung geeignet. Dazu sollten die Proben vor der DNA-Amplifizierung in PYGS-Bouillon (Protein-Hefeextrakt-Glukose-Stärke-Bouillon) (Lund et al., 1990) angereichert werden, um bessere und eindeutigere Ergebnisse zu erzielen (Boerema et al., 2003).

Ein Verfahren zur gezielten DNA-Aufbereitung aus Sporen wird durch die mechanische Behandlung der Sporen im „Ribolyser Cell Disrupter“ in einer Matrix aus Glas- und Silicapartikeln ermöglicht. Die DNA-Ausbeute und damit die Sensitivität der PCR wird dabei deutlich erhöht (Ziegler, 2009).

## **Kultivierung und Isolierung**

Um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen „Blown Pack Spoilage“ und *C. estertheticum* bestätigen zu können, ist der Nachweis lebender Mikroorganismen durch anaerobe Anreicherung erforderlich. Als Vorteil hat sich die Verwendung vorreduzierter Medien erwiesen. Diese erhöhen die Anzahl lebender Mikroorganismen, da vegetative Zellen sich schneller erholen und besser wachsen und auch Sporen auskeimen können (Moschonas et al., 2009).

Dass die Kultivierung und Isolierung der Bakterien nicht immer erfolgreich ist, wurde bereits von mehreren Autoren beschrieben (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Broda et al., 1998c; Helps et al., 1999; Boerema et al., 2003; Ziegler, 2009). Ein weiteres Problem ist auch die Keimzahlbestimmung durch Spatelverfahren, die um etwa zwei Zehnerpotenzen geringere Werte ergibt, als die Keimzahlbestimmung durch direkte Zellzählung mittels Thomakammer. Dies gilt sowohl für vegetative Zellen als auch für Sporen (Ziegler, 2009). Das Wachstum psychrophiler Clostridien auf verschiedenen nicht-selektiven und selektiven, festen Nährmedien ist sehr unterschiedlich. Einige Medien können als besser geeignet beurteilt werden, jedoch ist bisher kein optimales Nährmedium für alle psychrophilen Clostridien gefunden worden (Broda et al., 1998c). In aktuellen Arbeiten wird vor allem auf PYGS-Bouillon (Lund et al., 1990) und Columbia-Schafblut-Agar als festes Nährmedium verwiesen. Neben den erwähnten nicht selektiven Nährmedien sind jedoch die niedrige Temperatur ( $\leq +10$  °C) und ein strikt anaerobes Milieu entscheidend für eine erfolgreiche Kultivierung.

Um die Isolierung sporenbildender Bakterien zu verbessern, können Verfahren angewendet werden, die die möglicherweise kompetitive Begleitflora abtöten. Dies sind beispielsweise Hitzebehandlungen oder Behandlungen mit Alkohol. Da Sporen psychrophiler Clostridien jedoch hitzeempfindlich sein können und Ethanolbehandlungen weniger effektiv als Hitzebehandlungen sind, ist eine Kombination der beiden erwähnten Methoden empfehlenswert (Broda et al., 1998b).

Für eine gezielte Isolierung der Kolonie hat sich das Kolonie-Hybridisierungs-Verfahren als geeignet erwiesen (Ziegler, 2009). Als Gensonde wurde ein Digoxigenin-markiertes PCR-Amplifikat eines Abschnitts der 16s-23s Internal Transcribed Spacer-Region von *C. estertheticum* eingesetzt. Dies erleichtert die Isolierung auch aus nicht-selektiven Nährmedien. Nach der erfolgreichen Isolierung empfiehlt sich die Konservierung einer überwiegend versporteten Kultur von *C. estertheticum* durch Gefriertrocknung in Magermilch (Ziegler, 2009).

### **Genanalyse**

Zur weiteren Identifizierung isolierter, psychrophiler Clostridien können verschiedene Methoden der Genanalyse eingesetzt werden. Durch Untersuchung des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus genomischer DNA und des 16S rDNA-Gens können die Isolate genauer differenziert werden. Von einigen psychrophilen Clostridien existieren auch Gensequenzen von Abschnitten der 16S rDNA in Gendatenbanken. Diese können zum Abgleich eigener Ergebnisse genutzt werden und geben Auskunft über mögliche Verwandtschaftsverhältnisse. Allerdings besteht hier noch hoher Forschungsbedarf, da solche Daten in nur sehr geringem Umfang zur Verfügung stehen (Broda et al., 2000c). Der Polymorphismus der Internal Transcribed Spacer-Region scheint ungeeignet zur Identifizierung psychrophiler Clostridien zu sein, da sich zum Teil die Stämme einer Spezies unterscheiden, die Spezies untereinander teilweise jedoch nicht (Broda et al., 2003a). Dagegen könnte der Einsatz in der Rückverfolgung bestimmter Fleisch verderbender Clostridien eingesetzt werden, wenn sich die Stämme innerhalb der betreffenden Spezies unterscheiden. Auch hier besteht jedoch noch Forschungsbedarf (Broda et al., 2003a).

## **2.4 Dekontamination**

### **2.4.1 Definitionen und Grundlagen**

Die in der Literatur am häufigsten genannte Definition des Begriffes Reinigung ist das Aufrechterhalten und Wiederherstellen von Sauberkeit. Nach der DIN 10516 (2001) „Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion“ des Deutschen Instituts für Normung e. V. wird Reinigung als die „Entfernung unerwünschter Substanzen von Oberflächen von Räumen, Vorrichtungen und Geräten“ beschrieben. Der Duden definiert das Wort Desinfektion als die „Vernichtung von Krankheitserregern“ bzw. als „Entkeimung“ (Duden, 2010). Eine andere Begriffsbestimmung definiert Desinfektion als die Beseitigung von Infektionserregern, wobei die vegetativen Mikroorganismen, aber nicht zwingend die Sporen, nicht nur inhibiert, sondern abgetötet werden (BAG, 2011). Nach DIN 10516 (2001) ist Desinfektion definiert als ein „Verfahren zur Abtötung von Mikroorganismen auf ein Niveau, das weder gesundheitsschädlich ist, noch die Qualität der Lebensmittel beeinträchtigt“. Oft wird Desinfektion als eine Keimreduktion um mindestens 5 log-Stufen angesehen (BAG, 2011).

Allgemein bekannt ist die Tatsache, dass eine Desinfektionsmaßnahme nur dann ihre volle Wirkung entfaltet, wenn zuvor eine gründliche Reinigung durchgeführt wurde. Dies ist insbesondere dann essentiell, wenn die Oberflächen stark mit Eiweißen und anderen tierischen Rückständen belastet sind. Bei der Anwendung von Desinfektionsmitteln wird nach Angaben der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) vorausgesetzt, dass nach Ablauf der empfohlenen Einwirkzeiten mit sechs bis acht Litern Wasser von Trinkwasserqualität pro Quadratmeter gespült wird, um Rückstände auf den behandelten Flächen zu vermeiden (DVG, 2011).

Bei einem Desinfektionsmittel handelt es sich meist um ein chemisches Agens (Tabelle 9), jedoch können auch physikalische Verfahren eingesetzt werden (Block, 2001). Ebenso ist die Kombination beider Verfahren möglich. Physikalische Desinfektionsmaßnahmen sind beispielsweise Hitze, Druck und Strahlung (UV-, Beta-, Gammastrahlung).

**Tabelle 9:** Übersicht über Wirkstoffgruppen chemischer Desinfektionsmittel (Schliesser, 1981; McDonnell und Russell, 1999; Bessems, 2003; Meußdoerffer et al., 2008)

<b>Wirkstoffgruppe</b>	<b>Beispiel</b>	<b>Wirkprinzip</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Alkohole</b>	Ethanol	Proteindenaturierung	Breites Wirkungsspektrum, rückstandsfreies Verfliegen	Nicht sporizid, Eiweißfehler
<b>Aldehyde</b>	Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glyoxal	Reaktion mit Zellproteinen	Breites Wirkungsspektrum, rückstandsfreies Verfliegen, sporizid	Gesundheitsgefährdung, Resistenzen, Eiweißfehler
<b>Halogenabspaltende Verbindungen</b>	Chlorabspaltende Verbindungen, Iodophore	Oxidation von Proteinen und Nukleinsäuren	Breites Wirkungsspektrum, sporizid	Instabilität, biologisch schwer abbaubar, Eiweißfehler, Korrosivität
<b>Peroxide</b>	Wasserstoffperoxid, Peressigsäure, Ozon	Oxidation von Proteinen, Lipiden und DNA	Breites Wirkungsspektrum, sehr gut sporizid, biologisch leicht abbaubar	Instabilität, Korrosivität
<b>Phenole</b>	Alkylphenole, halogenierte Phenole, Kresole	Reaktion mit Zell- und Enzymproteinen	Kaum Eiweißfehler, materialfreundlich	Nicht sporizid, biologisch schwer abbaubar, Gesundheitsgefährdung
<b>Quartäre Ammoniumverbindungen</b>	Benzalkoniumchlorid	Proteindenaturierung	Leicht wasserlöslich, materialfreundlich	Nicht sporizid, Resistenzen, biologisch schwer abbaubar, Eiweißfehler

Unterschiedliche Faktoren können die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln beeinträchtigen bzw. beeinflussen. Vor allem chlor- und bromabspaltende Verbindungen, Iodophore und Peroxidverbindungen werden unter Praxisbedingungen durch organische Belastung in ihrer Zugkraft gemindert (sogenannter Eiweißfehler). Außerdem können die Wasserhärte, die Temperatur (sogenannter Kältefehler), der pH-Wert und der Verschmutzungsgrad die desinfizierende Wirkung beeinträchtigen (DVG, 2011). Die Einwirkzeit hat ebenfalls einen Einfluss auf die Wirksamkeit. Unter Anwendung einer definierten Desinfektionsmittelkonzentration steigt die Absterberate der Mikroorganismen mit der Einwirkdauer. Ein Anstieg der Präparatkonzentration dagegen reduziert die benötigte Anwendungsdauer. Natürlich sind all diese Faktoren abhängig von der Art der anwesenden Mikroorganismen. Deshalb müssen das Desinfektionsmittel und die Art der Anwendung auf die zu erwartenden Mikroorganismen abgestimmt sein. Aus Gründen des Umweltschutzes und der Wirtschaftlichkeit sind die negativen Einflüsse auf die Desinfektionswirkung so gering wie möglich zu halten, da dadurch die Präparate in der geringsten wirksamen Konzentration eingesetzt werden können (Bessems, 2003).

#### **2.4.2 Dekontamination in landwirtschaftlichen Betrieben**

Desinfektion in landwirtschaftlichen Betrieben bedeutet immer die bestmögliche Kombination von Reinigung und Desinfektion aufgrund der Präsenz enormer Mengen organischen Materials. Dieses würde ohne vorausgehende Reinigung jedes Desinfektionsmittel sofort neutralisieren. Durchschnittlich reduziert die Reinigung in landwirtschaftlichen Betrieben die Gesamtkeimzahl auf Oberflächen um drei Zehnerpotenzen, die Desinfektion um weitere drei. Somit bleiben in der Praxis im Durchschnitt  $10^3$  Kolonie bildende Einheiten Mikroorganismen pro Quadratzentimeter auf den Oberflächen in landwirtschaftlichen Betrieben übrig, darunter hauptsächlich Sporenbildner (Böhm, 1998).

In der Landwirtschaft eingesetzte Reinigungs- und Desinfektionsmittel sollten immer den aktuellen Empfehlungen entsprechend verwendet werden, da nur so eine hohe Effektivität und dadurch eine hohe Produktqualität gewährleistet werden kann. Die Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) testet kontinuierlich Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf die Einhaltung der Anforderungen aus der Praxis. Es sind Präparate mit dem DLG-Gütezeichen erhältlich, die geeignet sind zur Reinigung und

Desinfektion von Rohmelkanlagen und Milchbehältern und zur Melkzeugzwischen-desinfektion. Außerdem werden Mittel zur Stalldesinfektion und zur Euterhygiene getestet (DLG, 2011). Die vom Ausschuss „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der DVG erstellte Desinfektionsmittelliste für die Tierhaltung enthält auf ihre Wirksamkeit geprüfte Desinfektionsmittel für den Bereich der Tierhaltung. Zu beachten ist, dass insbesondere chlor- und bromabspaltende Verbindungen, Iodophore und Peroxidverbindungen unter Praxisbedingungen durch die spezifische Beschaffenheit und die organische Belastung der Oberflächen im Stall in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden (DVG, 2011).

Mikroorganismen und insbesondere Sporen sind nahezu in allen Gebieten der Erde zu finden und daher auch in landwirtschaftlichen Betrieben ubiquitär (Atrih und Foster, 2002). Sporen von *Clostridium* spp. sind zum Beispiel auf Pflanzen (Ercolani, 1997) und somit im Futter nachweisbar. Außerdem sind auf dem Fell und im Kot von Lebensmittel liefernden Tieren Sporen zu finden (Broda et al., 2009). Die DVG führt die Prüfung der Desinfektionsmittel bislang nicht an bakteriellen Sporen durch.

### **2.4.3 Schlachttierhygiene**

Die Schlachttierhygiene hat einen wesentlichen Einfluss auf die mikrobiologische Qualität von Schlachtkörpern (Reid et al., 2001; Gill, 2004; Antic et al., 2010). Sehr verschmutzte Schlachttiere führen zu einer höheren Kontamination mit Mikroorganismen auf dem jeweiligen Schlachtkörper. In Anbetracht dieser Tatsache wurden in einigen Ländern, wie z. B. Finnland, Großbritannien und Australien, Bestimmungen zur Schlachttiersauberkeit erlassen (McEvoy et al., 2000). Für die EU ist im Anhang I Teil A Abschnitt II Nummer 4 Buchstabe c der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 gefordert: Die Landwirte „müssen die jeweils angemessenen Maßnahmen treffen, um die Sauberkeit von Schlachttieren ... so weit wie möglich sicherzustellen“. Im Anhang III Abschnitt I Kapitel IV Nummer 4 der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 ist der Schlachthofbetreiber aufgefordert sicherzustellen, dass die Tiere sauber sind. Andernfalls dürfen diese nach Anhang I Abschnitt II Kapitel III Nummer 3 der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 „erst nach vorheriger Reinigung für den Verzehr geschlachtet werden“.

Generell herrscht die Meinung, dass die Vermeidung sichtbarer Kontaminationen auf Schlachtkörpern oder die Entfernung solcher Verschmutzungen zu einer besseren

mikrobiologischen Sicherheit des Fleisches führt. Um dieses Ziel zu erreichen, können verschiedene Maßnahmen ergriffen werden: Dekontamination der Häute der Schlachtkörper vor dem Enthäuten, Vermeidung eines Kontakts von Häuten und Schlachtkörpern, die Verhinderung des Austretens von Inhalten aus dem Verdauungstrakt und die Vermeidung indirekter Kontaminationen durch die Luft oder durch Geräte (Norrung et al., 2009).

Die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 schreibt vor, dass mit Kot verunreinigte Stellen auf Schlachtkörpern unverzüglich durch Wegschneiden oder andere Methoden mit gleicher Wirkung entfernt werden müssen. Im Schlachthof ist die Gesamtkeimzahl auf den Schlachtkörpern am Ende der Schlachtlinie ein guter Indikator für die Schlachthygiene (Whelehan et al., 1986). Die von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte zur Beurteilung von Lebensmitteln sollen dabei eine objektive Grundlage zur Beurteilung des mikrobiologisch-hygienischen Status eines Lebensmittels ermöglichen (DGHM, 2010). Diese Werte lassen Rückschlüsse auf die Hygienepraxis während der Lebensmittelgewinnung und -verarbeitung zu. Die Mehrzahl der Mikroorganismen auf Fleisch stammt aus der direkten Umgebung im Schlacht- und Zerlegebetrieb. Vor allem die Kontamination mit Bakterien aus dem Kot und Fell der Schlachtrinder spielt eine große Rolle (Gill, 1979). Da die Eviszeration meist ohne Eröffnung des Magen-Darm-Trakts erfolgt, geht die größere Kontaminationsgefahr von der Rinderhaut mit dem Fell und daran haftenden Kot- und Bodenpartikeln aus. Diese können direkt durch Kontakt oder indirekt über das Personal und die Geräte übertragen werden. Die Mikroorganismen auf dem Tierfell, z. B. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und weitere *Enterobacteriaceae* (Reid et al., 2001), stammen von Kot, Erde, Wasser und Pflanzen (Bell, 1997; McEvoy et al., 2000).

#### **2.4.4 Dekontamination in lebensmittelbe- und -verarbeitenden Betrieben**

In Deutschland ist die Hygiene in lebensmittelbe- und -verarbeitenden Betrieben auf der Grundlage mehrerer EU-Verordnungen gesetzlich verankert. Das EU-Hygienepaket regelt in der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 die Lebensmittelhygiene, in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 die spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs und in der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 die amtliche Überwachung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 legt allgemeine Grundsätze und Anforderungen des

Lebensmittelrechts fest, die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 bestimmt mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. In Anhang I Teil A Abschnitt II Nummer 4 Buchstabe a und b der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 ist gefordert, dass die Lebensmittelunternehmer, die Primärerzeugnisse tierischen Ursprungs gewinnen, die Anlagen und Ausrüstungen der Primärproduktion in angemessener Weise reinigen und desinfizieren müssen. In der oben genannten Verordnung ist außerdem festgelegt, dass Lebensmittel unter angemessenen Hygienebedingungen hergestellt werden müssen. In der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 werden unter anderem die Schlachthygiene und die Hygiene beim Zerlegen und Entbeinen bestimmt. Die Anwendung von Verfahren, die auf den HACCP-Grundsätzen beruhen, wird ebenfalls in der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 gefordert. Diese Grundsätze beinhalten die Ermittlung von Gefahren, die Bestimmung kritischer Kontrollpunkte, die Festlegung von Grenzwerten, von Verfahren zur Überwachung der kritischen Kontrollpunkte, von Korrekturmaßnahmen und von Verifizierungsverfahren.

Die vom Ausschuss „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der DVG erstellte Desinfektionsmittelliste für den Lebensmittelbereich enthält auf ihre Wirksamkeit geprüfte Desinfektionsmittel für den Bereich der Herstellung und Bearbeitung tierischer Lebensmittel. Die Prüfung erfolgt nach Richtlinien der DVG und setzt eine Mindestaufbringmenge von 0,4 Litern Desinfektionsmittel pro Quadratmeter voraus. Die Prüfungen an bakteriellen Sporen sind nicht inbegriffen. Die Liste der DGHM bezieht sich auf geeignete Desinfektionsmittel zur Händedekontamination bzw. zur speziellen Händedesinfektion, die nach den „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“ getestet werden (DGHM, 2011). Die DIN 10516 (2001) Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion gibt eine Anleitung für eine praxisnahe, korrekte und erfolgreiche Reinigung und Desinfektion. Sporizidie wird nach der DIN EN 13697 (2001) getestet.

#### 2.4.5 Bekämpfung von *Clostridium estertheticum*

Aufgrund der Verderbsproblematik ist die Fleischindustrie auf der Suche nach effektiven Methoden zur Vermeidung von „Blown Packs“. Außerdem sollen kontaminierte Fleischstücke vor einem möglichen Verderb dekontaminiert und wirksame Reinigungs- und Desinfektionsmittel gefunden werden. Da davon auszugehen ist, dass *C. estertheticum* in Sporenform auf das Fleisch gelangt, müssen diese Dauerformen effektiv bekämpft werden (Bell et al., 2001; Broda, 2007).

Da im Rinderfell haftende Kot- und Bodenpartikel als wahrscheinlichstes Reservoir für „Blown Packs“ verursachende Clostridien angenommen werden, erscheint eine konsequente und bestmögliche Hygiene vor und während des Schlachtvorgangs die wichtigste Präventionsmaßnahme zu sein (Broda et al., 2002). Dies ist von besonderer Bedeutung, da höhere Kontaminationszahlen auch zu einem schnelleren Verderb führen. Da die Kontamination des Fleisches wahrscheinlich beim Zurichten der Schlachtkörper geschieht, können die effektivsten Maßnahmen bereits im Herkunftsbetrieb bzw. vor der Schlachtung oder nach der Schlachtung, aber vor dem Zurichten getroffen werden (Boerema et al., 2007; Broda et al., 2009). Somit können die Häufigkeit und das Ausmaß des Auftretens von „Blown Packs“ durch die Elimination der Eintragsquelle und die Verhinderung der Kontamination der Schlachtkörper reduziert werden. Dies setzt gut und schnell durchführbare Methoden zur Detektion von *C. estertheticum* und das genaue Wissen um die Herkunft dieser Mikroorganismen voraus (Boerema et al., 2003).

Peressigsäure erzielt gute Ergebnisse als Desinfektionsmittel gegen Sporen von *C. estertheticum*. Dieser Effekt ist beim Einsatz als Flächendesinfektionsmittel, aber nicht bei der Schlachtkörperspülung zu beobachten (Boerema et al., 2007). Die Anzahl nachweisbarer Sporen konnte durch Peressigsäurebehandlung in vitro um mindestens  $10^5$  KbE pro Milliliter gesenkt werden. Vorgeschlagen wird, Oberflächen und Gerätschaften in Schlachthöfen und Zerlegeräumen beispielsweise monatlich mit sporiziden Desinfektionsmitteln wie Peressigsäure zu desinfizieren (Moschonas et al., 2010). Durch Hitzebehandlungen können Sporen von *C. estertheticum* nur bei sehr hohen Temperaturen ( $\geq +100$  °C) inaktiviert werden. Deshalb ist diese Methode für die Behandlung von Schlachtkörpern oder Fleischstücken ungeeignet (Broda, 2007). Nicht außer Acht gelassen werden sollte die Verbreitung von Sporen durch

---

die Luft. Aus diesem Grund sollten beispielsweise geeignete Luftfilter eingesetzt werden (Boerema et al., 2003, Broda et al., 2009). Die Unternehmer sollten alle möglichen Maßnahmen ergreifen, um eine Verbreitung bzw. den Eintrag von Sporen zu minimieren (Boerema et al., 2007).

Begünstigend auf die Bildung von „Blown Packs“ soll zum Beispiel die Verwendung von Schrumpfbeuteln sein. Deren Folie, die bei der Vakuumverpackung von Fleisch häufig eingesetzt wird, schrumpft durch Hitzebehandlung. Die Hitze (+80 °C) kann die Sporen von *C. estertheticum* aktivieren und dadurch zu einem schnelleren Verderb führen. Deshalb sollte diese Maßnahme bei der Verpackung von kontaminierten Fleischstücken nicht eingesetzt werden bzw. die Schrumpfung der Beutel durch andere Verfahren als Hitze erreicht werden (Bell et al., 2001). Die Lagerung von Fleischstücken sollte bei möglichst geringen Umgebungstemperaturen erfolgen. So führte in Studien eine Lagerung bei -1,5 °C oder bei noch tieferen Temperaturen im Vergleich zu Lagerung bei 0 °C zu einer deutlichen Abnahme von „Blown Packs“ (Bell et al., 2001, Clemens et al., 2010, Moschonas et al., 2010).

## 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterien- und Hefestämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 10 und alle verwendeten Hefestämme in Tabelle 11 aufgeführt. Die mit „DSMZ“ bezeichneten Stämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig bezogen. Der Stamm *Lactobacillus (L.) gasseri* K 7 (Lb 1338) wurde von der biotechnischen Fakultät der Universität Ljubljana, Slowenien, bereitgestellt. Des Weiteren wurden die Milchsäurebakterien Lb 1339, Lb 1340, Lb 1341 und Lb 1342 sowie die übrigen Mikroorganismen aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes bezogen.

**Tabelle 10:** Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm-Nummer	Spezies
DSMZ 8809	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>estertheticum</i>
DSMZ 14864	<i>C. estertheticum</i> subsp. <i>laramiense</i>
C 214	<i>C. estertheticum</i>
C 216	<i>C. estertheticum</i>
C 217	<i>C. estertheticum</i>
C 218	<i>C. estertheticum</i>
Lb 1212	<i>Carnobacterium divergens</i>
Lb 1338	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
Lb 1339	<i>Carnobacterium divergens</i>
Lb 1340	<i>Carnobacterium divergens</i>
Lb 1341	<i>Carnobacterium divergens</i>
Lb 1342	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
Ps 97	<i>Pseudomonas</i> spp.
Ps 98	<i>Pseudomonas</i> spp.

C. = *Clostridium*

**Tabelle 11:** Übersicht über die verwendeten Hefestämme

<b>Stamm-Nummer</b>	<b>Spezies</b>
DSMZ 70763	<i>Candida sake</i>
DSMZ 4634	<i>Mrakia frigida</i>
H 378	<i>Mrakia</i> spp.
H 381	<i>Candida zeylanoides</i>
DSMZ 70185	<i>Candida zeylanoides</i>
DSMZ 70022	<i>Cryptococcus curvatus</i>
DSMZ 3428	<i>Debaryomyces hansenii</i>
DSMZ 70561	<i>Yarrowia lipolytica</i>

### 3.1.2 Probenmaterial

Für die Untersuchungen wurde neben Rindfleisch (n = 174) auch Kalbfleisch (n = 4), Wildfleisch (n = 13; davon Hirsch: n = 9, Wild (auf der Verpackung nicht genauer angegeben): n = 3, Reh: n = 1), Lamm-/Schaffleisch (n = 10; davon Lamm: n = 9, Schaf: n = 1), Schweinefleisch (n = 12) und Putenfleisch (n = 10) auf das Vorhandensein von *C. estertheticum* überprüft. Somit ergab sich eine Gesamtprobenanzahl von 223 Proben (Tabelle 12).

Bezüglich der Quellen der Proben lässt sich das Probenkontingent in drei Gruppen einteilen. Für die Durchführung einer Marktanalyse wurden im Zeitraum von September 2008 bis Dezember 2009 insgesamt 109 teilweise vakuumverpackte Produkte zufällig im Handel erworben und untersucht. Bei einigen dieser Produkte (n = 17) handelte es sich um Verdachtsproben, die zum Teil von den betroffenen Herstellern/Discountern direkt zur Analytik eingesandt wurden. Rindfleischproben aus Südamerika wurden im Zeitrahmen der vorliegenden Arbeit nicht eingesandt. Im gleichen Zeitraum wurden in enger Zusammenarbeit mit der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Bern, Schweiz, zusätzlich Fleischproben (n = 28; davon Handelsproben: n = 20, Verdachtsproben: n = 8) aus dem schweizerischen Handel untersucht. Zur Eingrenzung einer möglichen Eintragsquelle für *C. estertheticum* wurden außerdem von Juli 2009 bis April 2010 Probenuntersuchungen in Zusammenarbeit mit einem deutschen fleischverarbeitenden Betrieb durchgeführt. Dieser Zerlegebetrieb erhielt sein Ausgangsmaterial von verschiedenen Schlachthöfen unterschiedlicher Größe. Zur Überprüfung des

möglichen Eintrags von Clostridiensporen über das Schlachttier erfolgte die Probenahme direkt in den Schlachthöfen und im Zerlegebetrieb. Dabei war die Probenanzahl (Rinderoberschale) für Schlachthof A  $n = 11$ , für Schlachthof B  $n = 20$ , für Schlachthof C  $n = 16$ , für Schlachthof D  $n = 15$  und für drei weitere Schlachthöfe zusammen  $n = 20$ . Zum Vergleich mit diesen Ergebnissen wurde außerdem Vliesfleisch ( $n = 4$ ) aus dem Zerlegebetrieb untersucht. Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollte ein Hinweis gefunden werden, ob die Kontamination des Fleisches mit *C. estertheticum* bereits im Schlachthof stattfindet, ob es Unterschiede hinsichtlich der Belastung mit Clostridiensporen zwischen den Standorten gibt oder ob es sich um eine Kreuzkontamination durch die Schneidbretter im Zerlegebetrieb mit unbekannter Herkunft des Mikroorganismus handelt. Diese 86 Proben sind im Folgenden als Rindfleischproben aus dem deutschen Handel eingestuft.

**Tabelle 12:** Übersicht über Tierart, Herkunft und Anzahl der untersuchten Fleischproben

Tierart	Herkunft [n]	Verdacht [n]	Handel [n]	Gesamtzahl [n]
Rind	Deutschland (136)	12	124	178
	Schweiz (19)	6	13	
	Südamerika (12)	0	12	
	Österreich (2)	2	0	
Bündner Fleisch	Schweiz (5)	0	5	
Kalb	Niederlande (4)	0	4	
Wild	Neuseeland (9)	4	5	13
	Deutschland (3)	1	2	
	Österreich (1)	0	1	
Schwein	Deutschland (11)	0	11	12
	Italien (1)	0	1	
Lamm	Neuseeland (8)	0	8	10
	Deutschland (1)	0	1	
Schaf	Australien (1)	0	1	
Pute	Deutschland (9)	0	9	10
	Italien (1)	0	1	
Summe		25	198	223

n: Anzahl

### 3.1.3 Kulturelle Verfahren

#### Verbrauchsmaterial:

Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.01614.1000)

Anaerocult® A mini Spezialbebrütungsbeutel (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.01611.0001)

Anaerotest® Anaerobiose-Indikator (Merck, Darmstadt, Deutschland, 115112)

Columbia-Blut-Agar (5 % Schafblut):

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

50 ml Schafblut defibriniert (Oxoid, Wesel, Deutschland SR0051D), nach Autoklavieren zugeben

950 ml A. dest.

CO-Reagenz (Gaby und Hadley, 1957):

jeweils frisch zubereitete Lösung zu gleichen Teilen aus

50 mM 1-Naphtol in 50 %igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland, 6223.0050)

50 mM N,N-Dimethyl-1,4-phenylendiamin in A. dest. (Merck, Darmstadt, Deutschland, 8.22038.0100)

DHL-Agar nach Sakazaki (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.11435.0500)

Einwegkanüle (20G, 0,9 mm) und -spritze (5 ml) (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

Impfösen aus Platindraht

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

MEA<sup>+</sup>-Agar:

48 g Malzextrakt-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland, 105398)

125 mg Novobiocin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, N1628-25G)

ad 1000 ml A. dest.

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

Natriumchlorid, reinst (AppliChem, Darmstadt, Deutschland, 2315983)

PBS, pH=7,5:

8,5 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106404)

1,14 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106579)

0,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Deutschland, 104873)

2N Natronlauge (Einstellen des pH-Wertes)

ad 1000 ml A. dest.

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

5 g Proteose Pepton (Acila, Mörfelden-Walldorf, Deutschland, ADA0420)

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

10 g Hefeextrakt granuliert (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.03753.0500)

10 g Fleischextrakt granuliert (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.03979.0500)

2 g Glucose-Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.08342.1000)

1 g Stärke löslich (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.01257.0050)

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

40 ml Salzlösung A, Zusammensetzung pro Liter:

0,265 g  $\text{CaCl} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.02382.0250)

0,48 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.05886.0500)

2,0 g NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106404)

40 ml Salzlösung B, Zusammensetzung pro Liter:

1,0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, Deutschland, 4873.1000)

1,3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt, Deutschland, 5104.1000)

10,0 g  $\text{NaHCO}_3$  (VWR, Darmstadt, Deutschland, 27775.293)

ad 1000 ml A. dest.

Standard-I-Agar (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.07881.0500)

Standard-I-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.07882.0500)

Skalpellsklingen, steril, einzeln verpackt (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

### Geräte:

Anaerobe Arbeitsstation (Meintrup DWS, Lähden, Deutschland, MiniMaks)

Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland, KB BA 100)

$a_w$ -Wert-Messgerät (Novasina, Lachen, Schweiz,  $a_w$  Sprint TH500)

Bruträume +25 °C und +30 °C (Weiss, Reiskirchen-Lindenstruth, Deutschland)

Edelstahlschablone, rund, 5 cm<sup>2</sup> (selbst hergestellt)

Glaspipetten 1 ml, 2 ml und 10 ml (Brand, Wertheim, Deutschland)

Kühlraum +4 °C (Weiss, Reiskirchen-Lindenstruth, Deutschland)

Nährmedien-Abfülleinheit (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland, Tecnomat)

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

Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland, Pipet-Boy acu)

Stomacher (Colworth, Seward, London, England)

Thermostatschrank +2 °C (Aqualytic, Dortmund, Deutschland)

Thermostatschrank +4 °C (Ehret, Emmendingen, Deutschland)

Vortex (Scientific Industries, New York, USA, Vortex-T Genie2)

Waage (Sartorius, Göttingen, Deutschland, 2357)

Wärmeschrank (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland)

Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)

### 3.1.4 Polymerasekettenreaktion

#### Verbrauchsmaterial:

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

16 SEF: 5'-TCG GAA TTT CAC TTT GAG-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'

HB 10: 5'-ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC-3'

HB 11: 5'-GTT TCG CCA CCT CTG ACT TGA G-3'

Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 840004)

DNA Marker „Hyper-Ladder II” (Bioline, Luckenwalde, Deutschland, BIO-33039)

DNA Polymerase (Peqlab, Erlangen, Deutschland, SAWADI Taq-DNA-Polymerase, 01-1020), inklusive Reaktionspuffer S (15 mM MgCl<sub>2</sub>) und MgCl<sub>2</sub> Lösung (25 mM)

dNTP-Set (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, #R0181), Einzellösungen 100 mM, Gebrauchslösung 10 mM

Ethidiumbromidlösung 1% (Roth, Karlsruhe, Deutschland, 2218.1)

Gel-Loading-Puffer:

62,5 mg Bromphenolblau (Merck, Darmstadt, Deutschland, 108122)

62,5 mg Xylencyanol (Merck, Darmstadt, Deutschland, 110590)

6,25 g Ficoll Typ 400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, F4375-10G)

ad 25 ml A. dest.

High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 1 796 828)

Lysing Matrix E (MP Biomedicals, Illkirch Cedex, Frankreich, 6914-100)

PCR-Cooler (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Pipetten-Standard-Spitzen

10 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 720031)

100 µl (VWR, Darmstadt, Deutschland, 613-0252)

1000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, 0030 000.919)

PUC 19 DNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, D3404)

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,2 ml (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

TBE-Puffer Stammlösung:

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

890 mmol Borat (Merck, Darmstadt, Deutschland, 100165)

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

ad 1000 ml A. bidest.

TBE-Puffer Gebrauchslösung:

100 ml TBE-Puffer Stammlösung

ad 1000 ml A. bidest.

### Geräte:

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

Fast-Prep-Gerät (Hybaid, Garching, Deutschland, Ribolyser)

Heizblock für Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, Thermomixer comfort)

Mikrowelle (Privileg, Quelle, Hamburg, Deutschland, 8019)

PCR-Werkbank (Peqlab, Erlangen, Deutschland, Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation)

Pipetten (Abimed, Langenfeld, Deutschland, Discovery, 2, 20, 100, 200, 1000 µl)

Power Supply (Biometra, Göttingen, Deutschland, Standard Power Pack P25)

Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland, T personal und BioRad, München, Deutschland, C 1000 Thermal Cycler)

Transilluminator mit Fotoeinheit (Biometra, Göttingen, Deutschland)

Zentrifuge (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, MiniSpin Plus)

Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen, Deutschland, Mikro 22R)

### 3.1.5 Koloniehybridisierung

#### Verbrauchsmaterial:

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

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

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland, 6482)

1,5 M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106404)

A. bidest., steril

DIG Easy Hyb Granules (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 1 796 895)

DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 1 585 762)

Glaspetrischalen (Schott, Mainz, Deutschland, Durchmesser 90 mm)

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

Neutralisationslösung, pH 7,4, +21 °C:

1,5 M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106404)

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

A. bidest., steril

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

Nylon Membranes for Colony and Plaque Hybridisation (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 1 699 075)

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 1 636 090)

Proteinase K-Lösung, 600 U/ml (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.07393.0010)

Rundfilter Weißband, Durchmesser 110 mm (Schleicher-Schüll, Dassel, Deutschland)

Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland, 2326.2) als 10%ige Stammlösung

20x SSC (Stammlösung, pH 7,0):

3 M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106404)

0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland, 106448)

### Gerät:

Hybridisierungsöfen (Unitherm, Karlsruhe, Deutschland, Hybridisation Oven 6/12)

### **3.1.6 Sequenzierung**

#### Verbrauchsmaterial:

AmpliAq<sup>®</sup> Gold (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland, 4311806)

DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 69504)

dNTP Mix, 2 mM each (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, #R0242)

Einmal-Küvetten für Photometer (Brand, Wertheim, Deutschland, 7592 00)

LAL-Reagenzwasser (Acila, Mörfelden-Walldorf, Deutschland, 1715005)

Lyticase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, L2524-10KU)

MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, Foster City, USA, N808-0170)

Mikrotiterplatten (Nunc<sup>™</sup>, Langenselbold, Deutschland, 167008)

Pipetten-Filterspitzen:

10 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 770010)

100 µl (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland, 770200)

1000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland, 0030 077.571)

Primer 10mM each (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland, Konzentration 10mM):

217: 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'

177: 5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3'

NL 1: 5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'

NL 4: 5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3'

QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, 28104)

Reaktionspuffer (Applied Biosystems, Foster City, USA, N808-0240)

Sorbitol Puffer:

1 M Sorbitol (VWR, Darmstadt, Deutschland, 36404.36)

100 mM Natrium-EDTA (VWR, Darmstadt, Deutschland, KRAF06200.2600)

14 mM 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland, 8.05740.0250)

A. bidest., steril

Gerät:

Photometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland, BioMate 3)

**3.1.7 Challengetests**

Fleisch:

- Jungbullen-Roastbeef (Herkunft: Schlacht- und Zerlegebetrieb in Nordbayern, drei Wochen gereift in der Vakuumverpackung, gekühlt)
- Schweine-Kotelett (Herkunft: Zerlegebetrieb in Nordbayern, zerlegefrisch erworben, gekühlt)

MRS-Bouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.10661.0500)

Vakuumbbeutel (Dagama, Willich, Deutschland, 0536104/71193)

**3.1.8 Reinigungs- und Desinfektionsmitteltests**Verbrauchsmaterial:

Reinigungs- und Desinfektionsmittel:

Antisept 33 PES (Ernst GmbH & Co KG, Kamen, Deutschland)

Ethanol, absolut (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.00983.2500)

Mucocit®-B (Merz, Frankfurt, Deutschland)

Pursept®-FD (Merz, Frankfurt, Deutschland)

Seewaclean (Seewald Chemie, Unna, Deutschland)

Steril (fd, Zentrag, Frankfurt, Deutschland)

Super Eiweiß- und Fettlöserpulver (Seewald Chemie, Unna, Deutschland)

Wofasteril® E 400 (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Greppin, Deutschland)

Rinderserum, steril (Acila, Mörfelden-Walldorf, Deutschland, 2202012)

Geräte:

Anaerobiertopf (Oxoid, Wesel, Deutschland)

Dampfreiniger (ito® Electronics, Wardenburg, Deutschland, Clean Xpress)

Schneidbretter, Polyethylen (Metzger Genossenschaft, Bayreuth, Deutschland, 23566)

Sterile analytische Trichter (Nalgene, Rochester, USA, 5131452)

UVC-Lichtquelle (Sankyo Denki, Kanagawa, Japan, G25T8)

Waschflasche (VWR, Darmstadt, Deutschland, 215-0112)

Wasserstrahlpumpe (Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland, 159600)

---

**Sonstige Materialien und Geräte**

Aluminium-Bördelkappen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 702805)

Autoklav (Zirbus, Bad Grund, Deutschland, LSA 500-2)

Deckgläser für Objektträger (24 x 24 mm) (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland, BB020020A1)

Dosierpumpe (Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland, Dose-it 803)

Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode am Harz, Deutschland, alpha 2-4, Typ-Nr. 100402)

Gefriertrocknungsstopfen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 702N20GT)

Heißluftsterilisator (WTB Binder, Tuttlingen, Deutschland)

Immersionsöl (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.15577)

Kapsenbergkapseln (VWR, Darmstadt, Deutschland, 391-0911)

Kühlakkus

Magermilchpulver (Merck, Darmstadt, Deutschland, 1.15363.0500)

Mikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland, Diaplan)

Mikroskopkamera mit Software (Leica, Wetzlar, Deutschland, EC3)

Objektträger (Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland)

Plastikpetrischalen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland, 633180)

Probengläser, mit Rollrand (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, 70204.36)

Reagenzgläser (Schott, Mainz, Deutschland, Durchmesser 16 mm)

Vakuuiergerät (Krämer & Grebe KG, Speikern, Deutschland, autovac)

Zählkammer nach Thoma (LO Laboroptik LTD, Lancing, UK)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anaerobe Arbeitstechnik

Alle Arbeiten wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in einer abgeschlossenen Arbeitsstation durchgeführt. Die benötigten Anzuchtmedien und Verdünnungsflüssigkeiten wurden 48 Stunden vor Gebrauch in die Arbeitsstation eingebracht, vorreduziert und mit Hilfe von Kühllakkus gekühlt (Ziegler, 2009). Um eine Erwärmung der Medien und der Proben zu vermeiden, wurden alle anschließenden Arbeiten ebenfalls auf Kühllakkus durchgeführt. Vor dem Ausschleusen aus der Arbeitsstation wurden die beimpften Medien in spezielle Anaerobierbeutel mit Gasgenerator verpackt. Zur Überprüfung der anaeroben Bedingungen wurden Anaerotest<sup>®</sup>-Indikatorstäbchen verwendet. Die Bebrütung der Kulturen zur Isolation von *C. estertheticum* fand anschließend für 21 Tage in Kühlbrutschränken bei +10 °C statt, die Inkubation der Anreicherungen bei +4 °C (Abbildung 10).

### 3.2.2 Untersuchung von Fleischproben

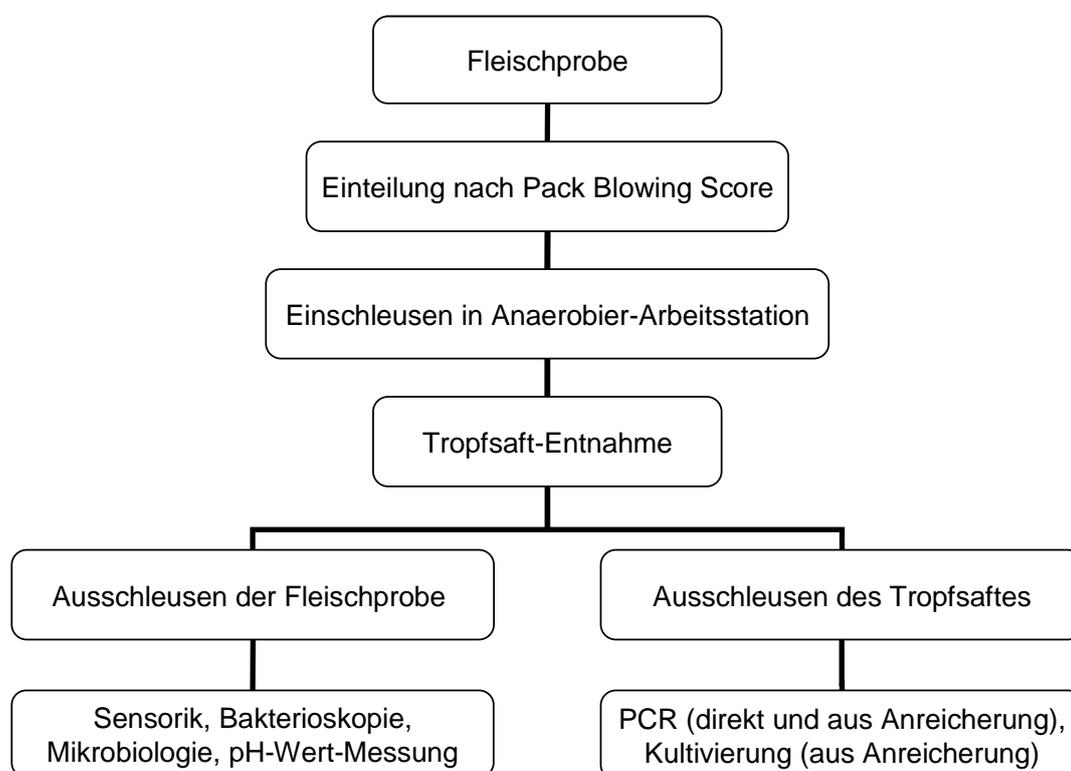
#### 3.2.2.1 Äußere Begutachtung

Vor dem Öffnen der Fleischproben erfolgte zunächst eine Überprüfung der Vakuumverpackungen auf eventuelle Beschädigungen. Anschließend wurden vorhandene Gasansammlungen mit dem sogenannten Pack Blowing Score (Tabelle 13) auf einer Skala von 0 bis 5 eingestuft (Boerema et al., 2007). Dabei ist 0 der Idealzustand, bei dem kein Gas in der Vakuumverpackung vorhanden ist. Score 1 wird als noch akzeptabel eingestuft, wenn die Gasbläschen nur sehr gering ausgebildet sind. Score 2 bis 5 geben in aufsteigender Reihenfolge produktuntypische Abweichungen vom Normalzustand infolge von Gasansammlungen an.

**Tabelle 13:** Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007)

Score	Zustand der Vakuumverpackung
0	Keine sichtbare 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 optisch untersuchten Fleischproben wurden zur weiteren Untersuchung in eine Anaerobier-Arbeitsstation eingeschleust, um mit einer sterilen Einwegspritze und Kanüle unter anaeroben Bedingungen Tropfsaft-Material sowohl für die Anreicherung als auch für die Isolierung von *C. estertheticum* (Ziegler, 2009) aus der ungeöffneten Verpackung zu entnehmen. War es aufgrund der Größe der Fleischprobe nicht möglich, diese zur Bearbeitung in die anaerobe Arbeitsstation einzuschleusen, wurde der Tropfsaft ebenso entnommen und unter anaeroben Bedingungen sofort weiter bearbeitet. Zur Vermeidung von Kreuz- und Laborkontaminationen wurden die Verpackungen in jedem Fall zuvor mit 70 % Ethanol desinfiziert. Zur weiteren Bearbeitung (Kapitel 3.2.2.2) wurde die Probe wieder aus der Arbeitsstation ausgeschleust.



**Abbildung 10:** Übersicht über die Probenbearbeitung

### 3.2.2.2 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Nach dem Ausschleusen der Fleischproben aus der Anaerobier-Arbeitsstation wurden die Farbe und der Geruch der Fleischproben beurteilt. Bei der Fleischfarbe wurde zwischen produkttypischer Farbe, Vergrünung, grauer Verfärbung und auffällig roter Farbe unterschieden. Die Beurteilung des Geruchs erfolgte nach dem Öffnen

der Packung mittels einer einfach beschreibenden Prüfung. Neben dem produkttypischen Geruch gab es je nach Alter und Pack Blowing Score viele verschiedene Nuancen von Geruchsabweichungen. Anschließend folgten die mikrobiologischen Untersuchungen (Kapitel 3.2.2.3) und die pH-Wert-Messung der Fleischprobe. Für die bakterioskopischen Untersuchungen wurde von jeder Probe mittels steriler Einweg-Impföse ein Tropfen Fleischsaft auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Dieses Nativpräparat wurde bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl mikroskopisch untersucht. Das Präparat wurde mäanderförmig durchmustert und sowohl im Hellfeld als auch mittels Phasenkontrast betrachtet, da sich Sporen im Phasenkontrast aufgrund ihrer stark lichtbrechenden Struktur besser erkennen lassen (Ziegler, 2009). Die im Fleischsaft enthaltene Mikrobiota wurde schriftlich und fotografisch dokumentiert. Einen ersten Hinweis auf *C. estertheticum* lieferte das Vorkommen großer plumper Stäbchen, die zum Teil Endosporen enthielten.

### **3.2.2.3 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert Messung**

Für die mikrobiologische Untersuchung der Fleischproben erfolgte die Probenahme analog der Methode L 06.00-16 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB. Für die Oberflächenbeprobung wurde eine sterile, scharfe, runde Edelstahlschablone mit einer Fläche von 5 cm<sup>2</sup> verwendet. Mit Hilfe dieser Schablone wurde an vier verschiedenen Stellen je eine Fläche von 5 cm<sup>2</sup> markiert. Diese wurde mit einem sterilen Skalpell und einer sterilen Pinzette so von der Fleischoberfläche abgetragen, dass 5 cm<sup>2</sup> einer Probenmenge von 5 g entsprachen. Die insgesamt gewonnenen 20 cm<sup>2</sup> (entsprechend 20 g) wurden mit 180 ml steriler, 0,85%iger NaCl-Lösung im Stomacher eine Minute lang bei 260 rpm homogenisiert. Von dieser Erstverdünnung wurde anschließend mit 0,85 %iger NaCl-Lösung eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt. Für die Kulturverfahren wurden die in Tabelle 14 angegebenen Medien mit je 0,1 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe im Spatelverfahren beimpft und in Bruträumen aerob bebrütet.

**Tabelle 14:** Nährmedien und Inkubationsbedingungen zur Bestimmung von Oberflächenkeimzahlen von Fleischproben

Keimgruppe	Nährmedium	Temperatur	Zeit
Aerobe mesophile Keimzahl (GKZ)	STD I-Agar	+30 °C	2 Tage
Milchsäurebakterien	MRS-Agar	+30 °C	2 Tage
<i>Enterobacteriaceae</i>	DHL-Agar	+30 °C	1 Tag
<i>Enterobacteriaceae</i> (psychrophil)	DHL-Agar	+ 4 °C	7 Tage
Hefen	MEA <sup>+</sup> -Agar	+25 °C	4 Tage
Hefen (psychrophil)	MEA <sup>+</sup> -Agar	+ 4 °C	7 Tage
Schimmelpilze	MEA <sup>+</sup> -Agar	+25 °C	4 Tage
Schimmelpilze (psychrophil)	MEA <sup>+</sup> -Agar	+ 4 °C	7 Tage

STD I-Agar: Standard I-Agar

MRS-Agar: Agar nach de Man, Rogosa, Sharpe

MEA<sup>+</sup>-Agar: Malzextrakt-Agar

DHL-Agar: Desoxycholat-Hydrogensulfid-Laktose-Agar

Zur Ermittlung der Keimzahlen wurden die Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien in der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe ausgezählt. Dabei wurden nur Agarplatten, auf denen sich zwischen 30 und 300 gut abgrenzbare Kolonien befanden, mit in die Auswertung einbezogen. Aus den Ergebnissen der auszählbaren Platten wurde für die jeweilige Probe das gewogene arithmetische Mittel nach folgender Formel gebildet (L 06.00-16; §64 LFGB):

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

- c** Gewogenes arithmetisches Mittel der Koloniezahlen (KbE / cm<sup>2</sup>)
- ∑c** Summe der Kolonien aller Petrischalen, die zur Berechnung herangezogen werden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)
- n<sub>1</sub>** Anzahl Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n<sub>2</sub>** Anzahl Petrischalen der nächst höheren Verdünnungsstufe
- d** Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Für die Ermittlung der Pseudomonadenzahl wurde die Cytochromoxidase-Reaktion durchgeführt. Hierfür wurden die auf DHL-Agar (Desoxycholat-Hydrogensulfid-Laktose-Agar) gewachsenen Kolonien der geeigneten Verdünnungsstufe mit CO-Reagenz (Gaby und Hadley, 1957) überschichtet. Kolonien, die sich innerhalb der ersten Minute nach dem Überschichten blau färbten, wurden als Oxidase-positiv und somit als *Pseudomonaceae* beurteilt und konnten so von den restlichen Kolonien, den *Enterobacteriaceae*, abgegrenzt werden.

Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit einem geeichten pH-Meter und einer Einstab-Glaselektrode, die in das Fleisch eingebracht wurde.

#### **3.2.2.4 Nachweis von *Clostridium estertheticum***

Der PCR-Nachweis von *C. estertheticum* erfolgte stets sowohl direkt aus dem Fleischtropfsaft als auch nach dessen Anreicherung in PYGS-Bouillon. Somit konnten auch sehr geringe Keimzahlen von 10 bis 100 KbE/ml im Ausgangsmaterial nachgewiesen werden (Ziegler, 2009). Die Anzucht psychrophiler Clostridien wurde bei jedem positivem PCR-Ergebnis der Tropfsaft-Anreicherung durchgeführt. Anschließend folgten die Koloniehybridisierung und die gezielte Isolierung.

#### **PCR-Screening**

Das Screening auf *C. estertheticum* im Fleischtropfsaft erfolgte molekularbiologisch mittels PCR (Ziegler, 2009). Für das PCR-Screening wurde 1 ml anaerob entnommener Fleischtropfsaft zweimal bei 5200 rpm fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils entsorgt und das Pellet in 1 ml steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend 20 Sekunden lang im Ribolyser Cell Disrupter in einer Matrix aus Glas- und Silicapartikeln bearbeitet. Dieser Arbeitsschritt erfolgte zur Unterstützung der Lyse der Clostridien sporen. Anschließend wurde aus dem vorbereiteten Tropfsaft mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits DNA extrahiert (Ziegler, 2009). Die Untersuchung der gewonnenen DNA erfolgte im Doppelansatz in Anlehnung an vorangegangene Studien (Broda et al., 2003b; Ziegler, 2009). Die dort verwendeten spezifischen Primerpaare für *C. estertheticum* binden an einer spezifischen Region des 16S rDNA-Gens (Primer 16SEF und 16SER) bzw. an der 16S-23S Internal Transcribed Spacer-Region (Primer EISRF und EISRR). Die entstandenen

Amplifikate lagen bei 790 bp (Primer 16SEF und 16 SER) und 230 bp (Primer EISRF und EISRR). Für beide Nachweise sind sowohl die Menge des Reaktionsansatzes als auch das Cyclerprogramm identisch. Der Reaktionsansatz wurde in einer PCR-Werkbank auf Eis pipettiert (Tabelle 15).

**Tabelle 15:** Reaktionsansatz für die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. estertheticum*

Reagenz	Menge pro Ansatz [µl]	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer S	2,500	1 x
Primer 16SEF bzw. EISRF	0,125	0,5 µM
Primer 16SER bzw. EISRR	0,125	0,5 µM
dNTP-Mix	0,500	200 µM
Taq-Polymerase	0,125	0,25 U/µl
A. bidest., steril	16,625	
Aufbereitete Proben-DNA	5,000	

Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler überführt und die DNA nach einem definierten Temperatur-Zeit-Profil amplifiziert (Tabelle 16). Als Positivkontrolle wurde stets DNA des Referenzstammes *C. estertheticum* (DSMZ 8809) und eine Reagenzienkontrolle (A. bidest. anstatt DNA) als Negativkontrolle mitgeführt.

**Tabelle 16:** Cyclerprogramm für die PCR-Systeme zum Nachweis von *C. estertheticum*

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

Nach dem Ablauf des Cyclerprogrammes wurden die Amplifikate mit je 3 µl Gel-Loading-Puffer gemischt. Je 10 µl einer Probe wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese bei 125 V für 50 Minuten getrennt. Je Gel wurden eine Positivkontrolle, der DNA-Marker und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach Färben der Gele für 10 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,05 %) wurden die Laufbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein spezifisches Amplifikat auf Höhe der Positivkontrolle (790 bzw. 230 bp) galt als positiver Nachweis. Um falsch negative Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren auszuschließen (Abu Al-Soud und Radstrom, 2000), wurden für alle Proben externe Amplifikationskontrollen (Gallien et al., 1997) mitgeführt (Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Reaktionsansatz für die Amplifikationskontrollen

<b>Reagenz</b>	<b>Menge pro Ansatz [µl]</b>	<b>Endkonzentration</b>
10 x Reaktionspuffer S	3,1	1,25 x
MgCl <sub>2</sub>	0,6	1,5 mM
Primer HB 10	0,1	1 µM
Primer HB 11	0,1	1 µM
dNTP-Mix	2,0	200 µM
Taq-Polymerase	0,2	1 U/µl
PUC 19 DNA	1,0	18,12 ng/µl
A. bidest., steril	16,9	
Aufbereitete Proben-DNA	1,0	

Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und amplifiziert (Tabelle 18). Ein spezifisches Amplifikat auf Höhe der Positivkontrolle (PUC 19 DNA, 429 bp) galt als Bestätigung für eine nicht inhibierte PCR.

**Tabelle 18:** Cyclerprogramm für die Amplifikationskontrollen

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

### PCR nach Anreicherung

Für eine Anreicherung von *C. estertheticum* wurde 1 ml des entnommenen Fleischtropfsaftes (Kapitel 3.2.2.1) 21 Tage bei +4 °C unter anaeroben Bedingungen in 9 ml PYGS-Bouillon bebrütet. Anschließend wurde mit 1 ml dieser Anreicherung eine DNA-Isolation sowie ein PCR-Screening-Nachweis durchgeführt.

### Anzucht psychrophiler Clostridien

Entsprechend den vorangegangenen Studien wurde bei jedem positiven PCR-Ergebnis aus der Anreicherung unter anaeroben Bedingungen ein 3-Ösen-Ausstrich der Tropfsaft-Anreicherung auf präreduzierten Columbia-Schafblut-Agar-Platten (CBA-Platten) durchgeführt (Boerema et al., 2003; Ziegler, 2009). Diese wurden 21 Tage lang bei +10 °C anaerob inkubiert.

### Koloniehybridisierung und gezielte Isolierung

Die Koloniehybridisierung der bebrüteten CBA-Platten der Anreicherungsausstriche erfolgte nach Ziegler (2009) und entsprechend den Angaben des DIG System User's Guide (Boehringer Mannheim, 1995). Hierbei wurden die zu untersuchenden Kolonien auf eine Nylonmembran übertragen, die DNA auf der Membran fixiert und nach Entfernung der Zellreste die Kolonien von *C. estertheticum* mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten Gensonde sichtbar gemacht (Ziegler, 2009). Die Fertigung der spezifischen Gensonde erfolgte mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kits (Ziegler, 2009). Als Template diente die DNA des Referenzstammes DSMZ 8809 (Primer EISRF/EISRR). Die Zielsequenz der Sonde war die 16S-23S Internal Transcribed Spacer Region von *C. estertheticum*. Die hergestellte Gensonde wurde mit neun Teilen *A. bidest.* verdünnt, da die Hintergrundfärbung der Nylon-

membran bei Anwendung der unverdünnten Sonde durch deren hohe Konzentration zu deutlich war. Diese verdünnte Gensonde wurde in einer Konzentration von 4 µl pro ml Hybridisierungspuffer eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte für 16 Stunden bei +42 °C in sterilen Glaspetrischalen mit DIG Easy Hyb (Lösung aus DIG Easy Hyb Granules) als Hybridisierungspuffer. Die abschließende Detektion wurde mit dem Farbstoff NBT/BCIP colorimetrisch nach einer immunologischen Reaktion durchgeführt. Als Positivkontrolle jeder Hybridisierung diente ein CBA-Platten-Ausstrich des Referenzstammes (*C. estertheticum* DSMZ 8809).

Die Ergebnisse auf den Nylonmembranen wurden mit den Kolonien auf den CBA-Platten verglichen. Konnten Einzelkolonien ermittelt werden, wurden diese erneut auf CBA-Platten angelegt und bei +10 °C anaerob inkubiert, bis Koloniewachstum sichtbar wurde. Zur Überprüfung der Hybridisierung und der Isolierung wurden von den erneut kultivierten Kolonien mikroskopische Präparate angefertigt und die Morphologie und die Reinheit der Kulturen kontrolliert. Zur Erhöhung der Reinheit der gewonnenen Isolate wurde gegebenenfalls eine Subkultivierung der Bakterien durchgeführt.

Die gewonnenen Reinkulturen der Tropfsaft-Anreicherung wurden mittels PCR als *C. estertheticum* bestätigt. Nach Suspension des Koloniematerials in 1 ml steriler PBS-Lösung erfolgten DNA-Isolierung und PCR mit anschließender Elektrophorese analog des Vorgehens zum PCR-Screening. Bei entsprechendem Ergebnis wurden die Isolate als *C. estertheticum* eingeordnet.

Zur Konservierung der isolierten und bestätigten Clostridien wurde ein Gefrier-trocknungsverfahren angewandt (Ziegler, 2009). Dazu wurden einer von einer CBA-Platte in PYGS-Bouillon überführten Kultur, die mikroskopisch zu mindestens 25 % aus Sporen bestand, 0,5 ml entnommen und in Kulturfläschchen mit 2 ml autoklavierter, gefriergetrockneter Magermilch pipettiert. Anschließend wurden die Flaschen bei -18 °C eingefroren. Pro Isolat wurden sechs Fläschchen angelegt. Die anschließende Lyophilisierung erfolgte bei -20 °C und 1,030 mbar. Danach wurden die Isolate bei +4 °C gelagert. Zur Überprüfung der Reaktivierbarkeit der Kulturen wurde eines der sechs hergestellten Fläschchen zufällig ausgewählt. Das Lyophilisat wurde in 9 ml präreduzierter PYGS-Bouillon resuspendiert und 21 Tage lang bei +10 °C anaerob inkubiert. Bei Trübung der Bouillon und entsprechendem mikroskopischem Befund im Nativpräparat (Kapitel 3.2.2.2) war die Reaktivierbarkeit des *C. estertheticum*-Isolates bestätigt.

### 3.2.3 Sequenzierung von Isolaten aus Fleisch

#### 3.2.3.1 Milchsäurebakterien

Zur Überprüfung und Identifizierung der natürlichen Milchsäurebiota auf den Fleischproben wurden entsprechende Isolate aus einzelnen zufällig ausgewählten Proben molekularbiologisch näher differenziert.

#### Isolierung

Die Isolierung der Milchsäurebakterien erfolgte aus neuseeländischen Hirschfleischproben ( $n = 3$ ), die im Handel erworben wurden. Von jeder Probe wurden 20 g in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 180 ml steriler 0,85%iger NaCl-Lösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der Milchsäurebakterienzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf MRS-Agar (pH 6,2) ausgespatelt und für 48 Stunden bei +30 °C aerob bzw. parallel anaerob inkubiert.

#### PCR

Für die molekularbiologische Identifizierung wurden anschließend von den bebrüteten Agar-Platten verschiedene Kolonien ausgewählt und aus diesen die DNA isoliert. Dazu wurden die Milchsäurebakterien-Isolate für 72 Stunden bei +10 °C in Standard-I-Bouillon kultiviert. Anschließend wurde 1 ml der Kultur entnommen, bei 5000 x g zehn Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem weiteren Schritt in 600 µl sterilen Sorbitol-Puffer aufgenommen und mit dem Protokoll für Prokaryoten (Qiagen, DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit) weiter aufgearbeitet.

Zum Nachweis von Milchsäurebakterien wurde ein universelles Prokaryoten-PCR-System eingesetzt (Olofsson et al., 2007). Das dabei verwendete universelle Primerpaar 217 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') und 177 (5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3') für Prokaryoten bindet an konservierte Regionen bakterieller 16S rRNA-Gene mit einer für die jeweilige Bakterienspezies typischen Produktlänge. Der PCR-Mix wurde unter sterilen Bedingungen in der PCR-Werkbank unter Kühlung nach dem in Tabelle 19 aufgeführten Schema unter Verwendung steriler Einweg-Filterpipettenspitzen hergestellt.

**Tabelle 19:** Reaktionsansatz für die Prokaryoten-PCR zur Identifizierung von Milchsäurebakterien

Reagenz	Menge pro Ansatz [ $\mu$ l]	Endkonzentration
Reaktionspuffer	5,0	1 x
Primer 217	1,0	0,2 mM
Primer 177	1,0	0,2 mM
dNTP-Mix	5,0	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	3,0	1,5 mM
Taq-Polymerase	0,5	0,05 U/ $\mu$ l
LAL Reagenzwasser	34,5	

Das DNA-Material wurde mit Hilfe einer sterilen Einwegspritze auf den Boden des Reaktionsgefäßes aufgebracht und anschließend der Reaktionsansatz zugegeben. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l pro Ansatz. Bei jeder Reaktion wurde eine Reagenzienkontrolle (A. bidest. anstelle von DNA) als Negativkontrolle und als Positivkontrolle DNA des Referenzstammes Lb 1212 mitgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 20 beschriebenen Programm amplifiziert.

**Tabelle 20:** Cyclerprogramm für die Amplifikation konservierter 16S rRNA-Regionen von Prokaryoten zur Identifizierung von Milchsäurebakterien

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
35 x	Denaturierung	92 °C	15 s
	Annealing	50 °C	20 s
	Extension	72 °C	50 s
1 x	Extension	72 °C	10 min

Je Ansatz wurden 10  $\mu$ l entnommen und in Mikrotiterplatten mit 2  $\mu$ l Gel-Loading-Puffer versetzt. Davon wurden jeweils 10  $\mu$ l auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Je Gel wurden der DNA-Marker, die Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische

Auftrennung für 50 min bei 125 V und eine Färbung des Gels in Ethidiumbromid-lösung. Mittels UV-Licht wurde das Ergebnis sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert. Das gebildete Amplifikat hatte eine Größe von 1300 bis 1400 bp.

### **Sequenzierung**

Die Aufreinigung erfolgte mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die DNA-Konzentration der aufgereinigten Amplifikate wurde photometrisch bestimmt und anschließend mit dem Elutionspuffer des „QIAquick® PCR Purification Kits“ nach Vorgaben von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, auf 10 ng/µl verdünnt. Voreingestellte Proben-Primergemische wurden aus 14,4 µl der Proben-DNA und den Primern 217 und 177 (Primerkonzentration 2 µM) hergestellt und an den Sequenzierservice von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, gesandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden anschließend mit Hilfe der GeneBank Database identifiziert (BLAST, 2009).

### **3.2.3.2 Hefen**

Zur Überprüfung und Identifizierung der natürlichen Hefebiota auf den Fleischproben wurden entsprechende Isolate aus einzelnen zufällig ausgewählten Proben molekularbiologisch näher differenziert.

### **Isolierung**

Die Isolierung der Hefen zur Sequenzierung erfolgte aus ausgewählten vakuumverpackten Hirsch- (n = 2), Rind- (n = 8) und Kalbfleischproben (n = 2) aus Neuseeland, Südamerika, den Niederlanden und Deutschland. Von jeder Probe wurden 20 g in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 180 ml steriler 0,85%iger NaCl-Lösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der Hefenzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf MEA<sup>+</sup>-Agar (pH 5,6) ausgespatelt und für vier Tage bei +25 °C und parallel für sieben Tage bei +4 °C aerob inkubiert.

## PCR

Für die Sequenzierung der Hefen wurden Kolonien der bebrüteten Agarplatten ausgewählt und in Standard-I-Bouillon über Nacht bei +25 °C inkubiert. Die Keimzahl dieser Übernacht-Kulturen wurde durch Auszählen in der Zählkammer nach Thoma direkt bestimmt. Die Übernacht-Kulturen wurden anschließend mit 0,85%iger NaCl-Lösung auf  $5,0 \times 10^7$  Organismen pro ml Bouillon verdünnt. Dieser Bouillon wurde 1 ml entnommen, bei 5000 x g für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem weiteren Schritt in 600 µl sterilen Sorbitol-Puffer aufgenommen und mit einem Hefe-Protokoll (Qiagen, DNeasy® Blood & Tissue Kit) weiter aufgearbeitet.

Für die Sequenzierung wurde die D1/D2-Domäne des 26S rDNA-Gens ausgewählt. Die D1/D2-Domäne am 5'-Ende der großen Untereinheit (26S) weist ausreichend Substitutionen auf, anhand derer Spezies identifiziert werden können. Für fast alle Hefespezies liegen Sequenzen dieser Domäne in Datenbanken vor. Dadurch ist eine relativ schnelle und zuverlässige Identifizierung von Hefen mit Hilfe der Sequenzierung der D1/D2-Domäne möglich. Als Primer wurden die Primer NL 1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') und NL 4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') ausgewählt (Kurtzman und Robnett, 1998) und dem PCR-Ansatz zugesetzt (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Reaktionsansatz für die PCR zur Identifizierung von Hefen

Reagenz	Menge pro Ansatz [µl]	Endkonzentration
Reaktionspuffer	5,0	1 x
Primer NL 1	1,0	0,2 mM
Primer NL 4	1,0	0,2 mM
dNTP-Mix	5,0	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	3,0	1,5 mM
Taq-Polymerase	0,5	0,05 U/µl
LAL Reagenzwasser	29,5	
Aufbereitete Proben-DNA	5,0	

Es ergab sich ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz. Bei jeder PCR-Reaktion wurden zwei Positivkontrollen (*Mrakia frigida* DSMZ 4634 und *Candida sake* DSMZ 70763) und eine Reagenzienkontrolle (A. bidest. anstelle von DNA) als Negativkontrolle mitgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 22 beschriebenen Programm amplifiziert.

**Tabelle 22:** Cyclerprogramm für die Amplifikation der D1/D2-Domäne zur Identifizierung von Hefen

Anzahl	Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
40 x	Denaturierung	92 °C	40 s
	Annealing	55 °C	40 s
	Extension	72 °C	30 s
1 x	Extension	72 °C	10 min

Nach dem Ablauf des Cyclerprogrammes wurden je 10 µl der Amplifikate mit je 2 µl Gel-Loading-Puffer in einem neuen Reagenzgefäß gemischt und davon je 10 µl auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch bei 125 V für 50 min getrennt. Je Gel wurden der DNA-Marker und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach Färben der Gele in Ethidiumbromidlösung wurden die Laufbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das gebildete Amplifikat hatte eine Größe von ca. 600 bp.

### Sequenzierung

Die Sequenzierung der D1/D2-Domäne wurde direkt von den aufgereinigten PCR-Produkten vorgenommen. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem Aufreinigungskit QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wurde die DNA-Konzentration der aufgereinigten Amplifikate photometrisch bestimmt. Nach Vorgaben von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, wurde mit dem Elutionspuffer des QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kits auf 5 ng/µl verdünnt. Danach wurden voreingestellte Proben-Primergemische mit den zwei oben angegebenen Primern (NL 1 und NL 4) hergestellt, indem 14,4 µl DNA mit 3,6 µl Primer versetzt wurden. Anschließend

wurden diese an den Sequenzierservice von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland, gesandt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden anschließend mit Hilfe der GeneBank Database identifiziert (BLAST, 2009). Die Amplifikation der Zielsequenzen sowie die Sequenzierung der ca. 600 bp großen D1/D2-Domäne wurden zur statistischen Absicherung wiederholt. Zur Kontrolle der Aufarbeitung und Sequenzierung wurden die folgenden Referenzstämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) sequenziert: *Candida zeylanoides* DSMZ 70185, *Candida sake* DSMZ 70763, *Cryptococcus curvatus* DSMZ 70022, *Debaryomyces hansenii* DSMZ 3428, *Yarrowia lipolytica* DSMZ 70561 und *Mrakia frigida* DSMZ 46348 (Typstamm).

### 3.2.4 Challengetests

Zur Überprüfung und Dokumentation des Verderbgeschehens durch psychrophile Clostridien wurden Challengetests durchgeführt. Um auszuschließen, dass Hefen und Pseudomonaden an der Ausbildung des „Pack Blowing“ beteiligt sind, wurden diese in die Untersuchungen mit einbezogen. In einem zweiten Teil wurden die Belastungstests mit künstlich zugesetzten Starter- bzw. Schutzkulturen wiederholt, um eine mögliche protektive Wirkung auf das Wachstum von *C. estertheticum* zu überprüfen. Um herauszufinden, ob *C. estertheticum* an ein bestimmtes Milieu gebunden ist, wurde in einem weiteren Versuch Schweinefleisch anstelle von Rindfleisch künstlich beimpft. Für die Challengetests wurden die in Tabelle 10 und 11 aufgeführten Stämme ausgewählt.

### Stammhaltung

Die verwendeten Clostridien (Abbildung 11 bis 14) wurden anaerob bei +10 °C in PYGS-Bouillon kultiviert und gelagert. Die Pseudomonaden (Abbildung 11 bis 14) bzw. die Milchsäurebakterien (Abbildungen 13 und 14) wurden nach einer Inkubation bei +30 °C für 24 Stunden auf Standard-I- bzw. MRS-Agar bei +4 °C aufbewahrt. Die psychrophilen Hefen (Abbildung 11 bis 14) wurden bei +4 °C für sieben Tage auf MEA<sup>+</sup>-Agar angezüchtet und anschließend bei ebenfalls +4 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Überimpfung der Kulturen, um mit frischen Kulturen arbeiten zu können. Zum Ausschluss einer Kontamination wurden in regelmäßigen Abständen Vereinzelausstriche und mikroskopische Präparate der verwendeten Stämme hergestellt und eine Prüfung auf Reinheit durchgeführt.

### Kultivierung der Inokulationsstämme

Die ausgewählten *C. estertheticum*-Stämme (Tabelle 10) wurden einer Flüssigkultur (1 ml) entnommen, in ein Reagenzglas mit 9 ml PYGS-Bouillon überführt und 7 Tage lang anaerob bei +10 °C inkubiert. Von den Hefestämmen (Tabelle 11) wurde mit Hilfe einer Impföse Zellmaterial abgenommen, in ein Reagenzglas mit 9 ml Standard-I-Bouillon überführt und für 7 Tage bei +25 °C aerob angezogen. Die Pseudomonaden- bzw. Milchsäurebakterien-Stämme (Tabelle 11) wurden 24 Stunden lang in Standard-I-Bouillon bzw. MRS-Bouillon bei +30 °C aerob bebrütet, nachdem Koloniematerial von den jeweiligen festen Nährmedien in 9 ml der Bouillons überführt wurde.

### Inkubationsansätze

Um eine gleichbleibende Qualität des Ausgangsmaterials für die Versuche zu gewährleisten, wurden vor Beginn eine mikrobiologische Untersuchung sowie eine pH-Wertmessung (Kapitel 3.2.2.3) durchgeführt. Außerdem wurde per PCR das Vorhandensein von *C. estertheticum* untersucht (Kapitel 3.2.2.4). Zur Minimierung weiterer Einflussgrößen wurde das Fleisch immer von demselben Schlacht- und Zerlegebetrieb erworben.

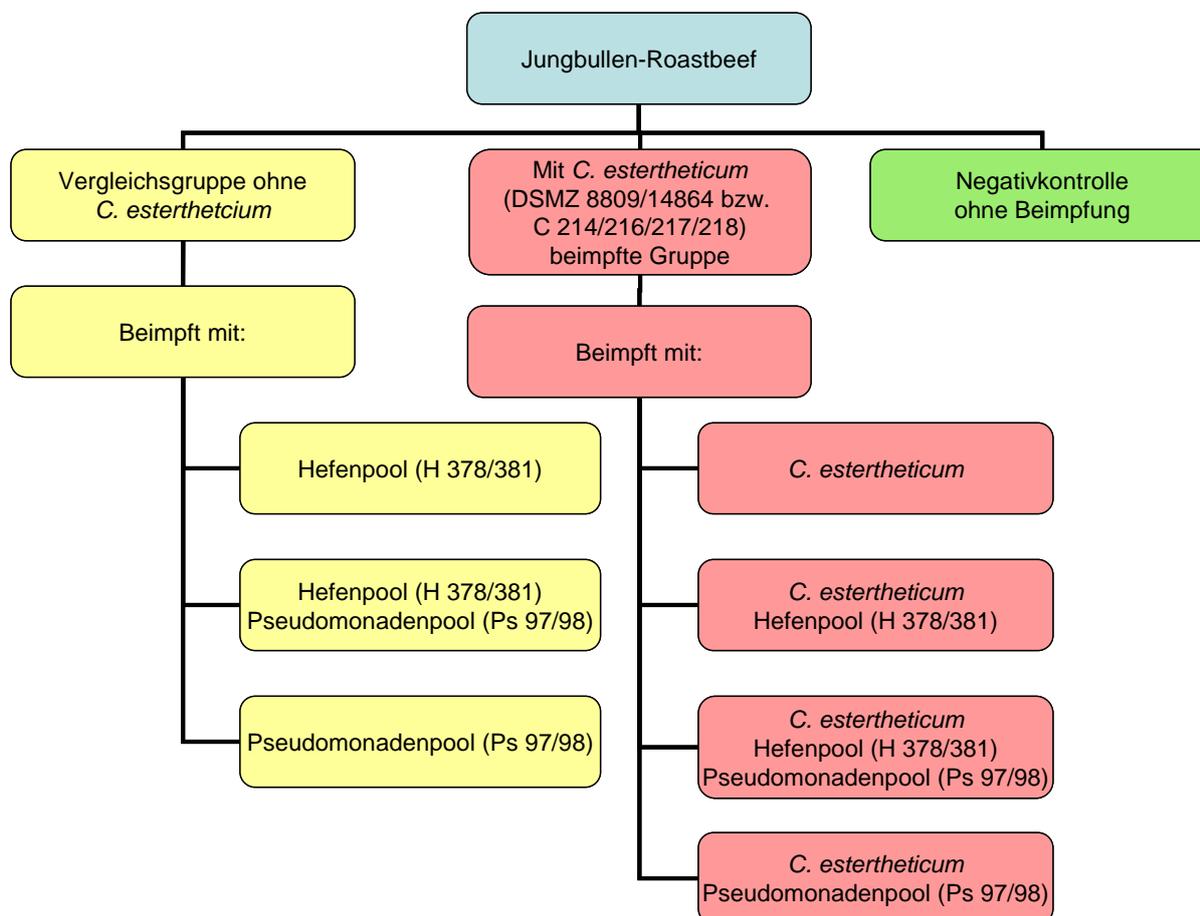
Für die einzelnen Versuchsreihen wurden je 1 ml der Mikroorganismensuspension (ca.  $1 \times 10^8$  KbE/ml; Kapitel 3.2.4.2) entnommen und in sterilen Reagenzgläsern zu verschiedenen Pools (Inokula) vereinigt. Die dabei entstandenen Inokula enthielten: *C. estertheticum* DSMZ 8809/14864, *C. estertheticum* C 214/216/217/218, *Mrakia* spp. H 378 und *Candida zeylanoides* H 381, *Pseudomonas* spp. Ps 97/98 oder *Carnobacterium divergens* Lb 1339/1340/1341 und *Carnobacterium maltaromaticum* Lb 1342. *L. gasseri* K7 (Lb 1338) wurde einzeln als Inokulum verwendet. Anschließend wurde die Keimzahl des jeweiligen Inokulums direkt in der Zählkammer nach Thoma bestimmt. Mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe wurde die Suspension so weit verdünnt, dass in 0,5 ml ca.  $10^3$  KbE bzw.  $10^7$  KbE für die Milchsäurebakterien enthalten waren.

Die ausgezählten Keimzahlen der Hefen, Pseudomonaden bzw. Milchsäurebakterien wurden durch Anzucht der Mikroorganismen auf MEA<sup>+</sup>-, Standard-I- bzw. MRS-Platten und anschließendem Auszählen der Kolonien (Kapitel 3.2.2.3) überprüft. Bei den Clostridien war die Kontrolle der Keimzahl durch Anzucht auf Agarplatten nicht möglich, da deren ungenügendes Wachstum auf Platten eine deutlich niedrigere

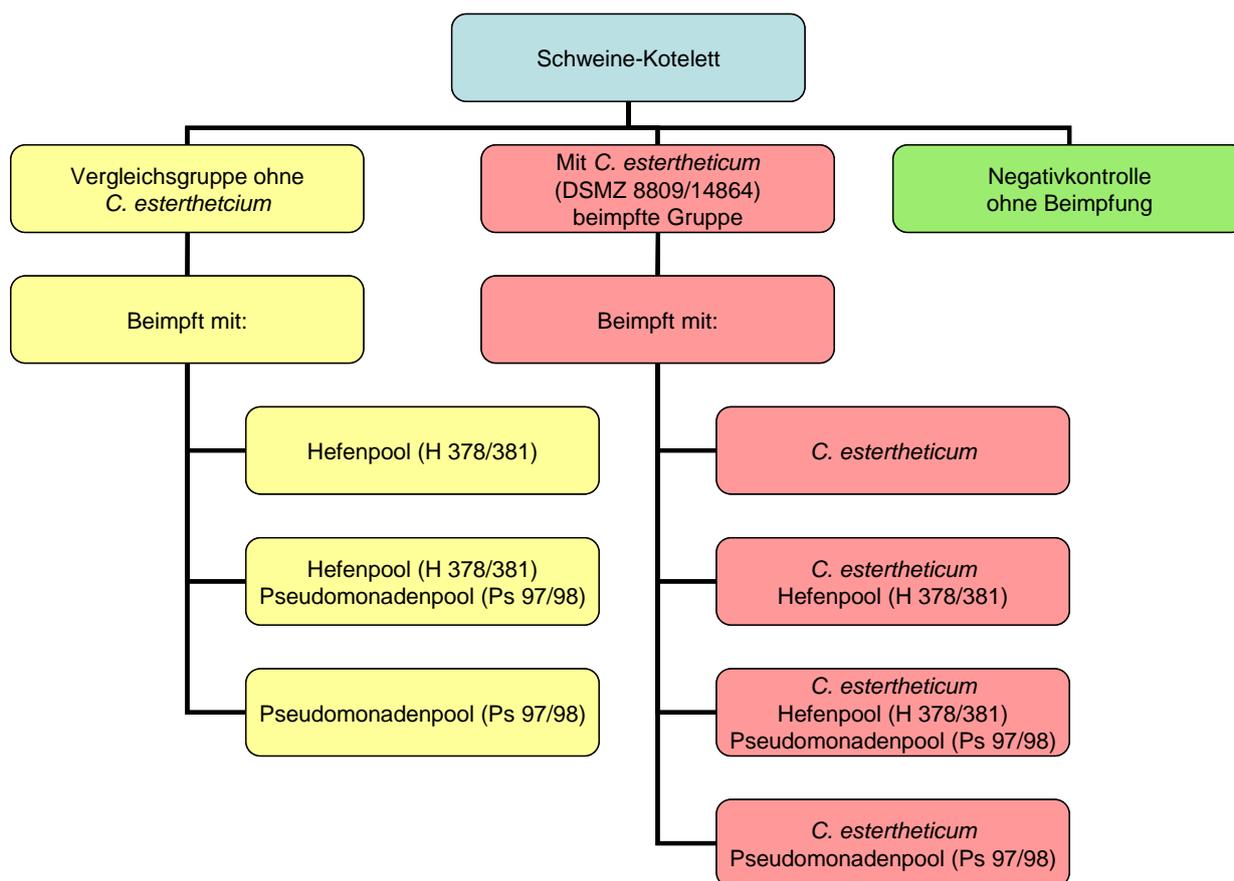
Keimzahl ergibt (Ziegler, 2009). Die Beimpfung des frischen Jungbullen-Roastbeefs erfolgte pro Inokulum mit 0,5 ml Suspension je 200 g Fleisch. Die Negativkontrollen wurden nicht beimpft.

### Ansätze ohne Schutzkulturen

Zwei bis drei Kilogramm vakuumverpacktes Jungbullen-Roastbeef bzw. Schweine-Kotelett wurden in ca. 2 cm dicke Scheiben zu je 200 g geschnitten und in Vakuumbbeutel gepackt. Je 0,5 ml des Inokulums wurden gleichmäßig auf beide Fleischseiten mit einer Pipette aufgebracht (Abbildung 11 und 12). Durch manuelles Einmassieren der Flüssigkeit konnte eine gleichmäßige Keimverteilung gewährleistet werden. Alle Versuche wurden zweimal separat voneinander wiederholt und jeweils im Doppelansatz durchgeführt.



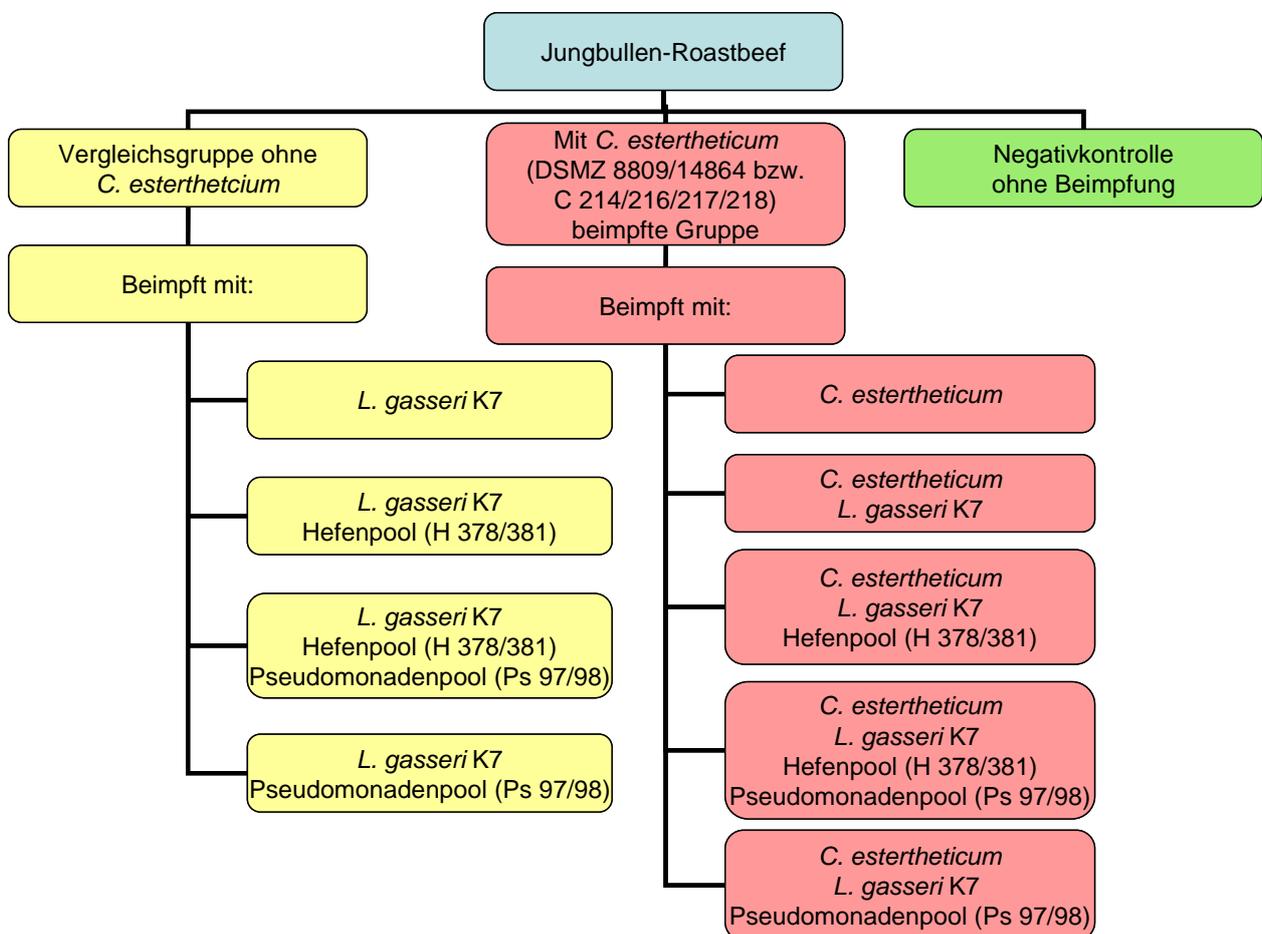
**Abbildung 11:** Beimpfungsschema von Rindfleisch mit Hefen, *Pseudomonas* spp. und den *C. estertheticum*-Stämmen DSMZ 8809 und DSMZ 14864 (erste Versuchsreihe) bzw. C 214, C 216, C 217 und C 218 (zweite Versuchsreihe)



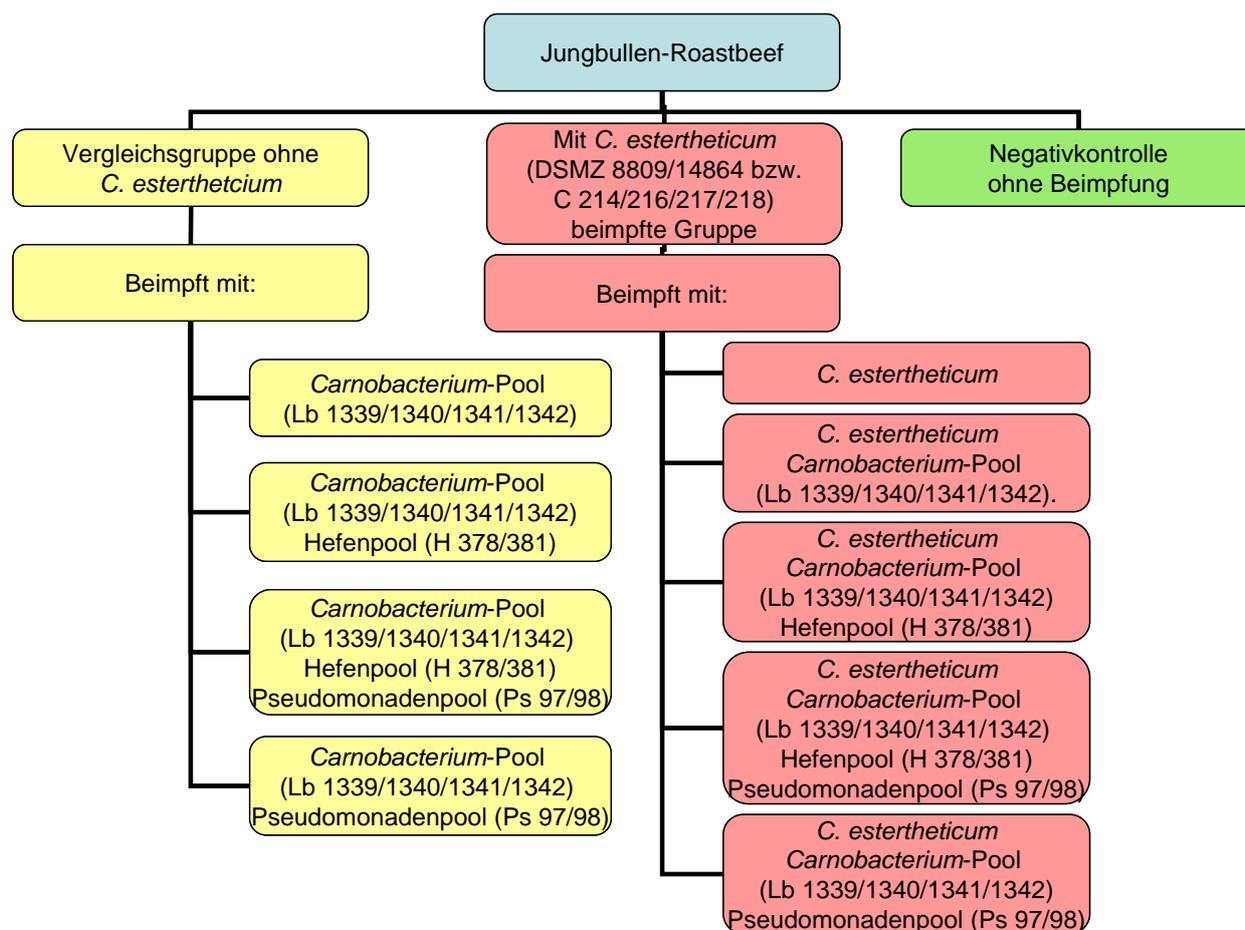
**Abbildung 12:** Beimpfungsschema von Schweinefleisch mit Hefen, *Pseudomonas* spp. und den *C. estertheticum*-Stämmen DSMZ 8809 und DSMZ 14864

## Ansätze mit Schutzkulturen

Die Untersuchungsreihen mit Schutz- bzw. Starterkulturen wurden analog den Challengeversuchen ohne Schutzkulturen durchgeführt (Abbildung 13 und 14). Als Schutzkultur diente zum einen der *L. gasseri*-Stamm K7 (Lb 1338), der eine inhibitorische Wirkung auf *C. tyrobutyricum* in Käse hat (Bogovic Matijasic et al., 2007), und zum anderen ein Pool aus *Carnobacterium divergens* (Lb 1339/Lb 1340/Lb 1341) und *Carnobacterium maltaromaticum* (Lb 1342). Alle Versuche wurden zweimal separat voneinander wiederholt und im Doppelansatz durchgeführt.



**Abbildung 13:** Beimpfungsschema von Rindfleisch mit Hefen, *Pseudomonas* spp., *L. gasseri* K7 und den *C. estertheticum*-Stämmen DSMZ 8809 und DSMZ 14864 (erste Versuchsreihe) bzw. C 214, C 216, C 217 und C 218 (zweite Versuchsreihe)



**Abbildung 14:** Beimpfungsschema von Rindfleisch mit Hefen, *Pseudomonas* spp., *Carnobacterium* spp. und den *C. estertheticum*-Stämmen DSMZ 8809 und DSMZ 14864 (erste Versuchsreihe) bzw. C 214, C 216, C 217 und C 218 (zweite Versuchsreihe)

### Lagerung und Verlaufskontrollen

Die Fleischstücke wurden unmittelbar nach dem Beimpfen vakuumiert und verschweißt. Die Lagerung erfolgte in einem Kühlbrutschrank bei +2 °C für acht Wochen. Wöchentlich wurden die Gasansammlungen in allen Fleischpackungen auf einer Skala von 0 bis 5, dem Pack Blowing Score, beurteilt und fotografisch dokumentiert.

### 3.2.5 Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel

#### Kultivierung der Clostridien

Der verwendete Clostridienstamm DSMZ 8809 (Kapitel 3.1.1) wurde sieben Monate lang in PYGS-Bouillon bei +4 °C kultiviert. Die lange Lagerzeit war notwendig, um eine stark versportete und somit realistische Mikrobiota zu erhalten.

#### Ansätze für die Wirksamkeitstests

Handelsübliche Schneidbretter aus Polyethylen wurden zur besseren Handhabung in quadratische Platten mit beidseits einer Fläche von 49 cm<sup>2</sup> geschnitten. In eine Ecke wurde ein kleines Loch gestanzt, um die Platten nach Beimpfung aufhängen und trocknen lassen zu können. Für die Untersuchungen wurden zum einen praxisübliche Bedingungen mit eingeritzten Oberflächen und zum anderen neue, glatte Oberflächen simuliert (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Zugeschnittene Schneidbrettplatten (A: glatt, B: eingeritzt)

Für die Beimpfung erfolgte eine direkte Zellzahlbestimmung der *C. estertheticum*-Kultur in der Zählkammer nach Thoma. Anschließend wurde die Sporensuspension so mit 0,85%iger NaCl-Lösung verdünnt, dass ca. 10<sup>5</sup> Sporen pro ml Suspension vorlagen. Danach wurde 1 ml dieser Sporensuspension benutzt, um eine Lösung (40 ml), die zu gleichen Teilen aus sterilem Rinderserum und steriler, 0,85%iger NaCl-Lösung bestand, zu beimpfen. Durch das Rinderserum konnte eine praxisnahe, eiweißreiche, klebrige Oberfläche simuliert werden. Das fertige Medium enthielt nun ca. 3,0 bis 6,0 x 10<sup>3</sup> Sporen pro ml.

Anschließend wurden die autoklavierten Schneidbrettplatten so in das Rinderserum-NaCl-Lösung-Gemisch gelegt, dass eine Seite mit einer Fläche von 49 cm<sup>2</sup> bedeckt

war (ca.  $3,0$  bis  $6,0 \times 10^1$  Sporen pro  $\text{cm}^2$ ). Nach vollständiger Benetzung dieser Fläche wurden die Platten mit einer sterilen Pinzette entnommen und an einem sterilen Metallhaken aufgehängt (Abbildung 16). Zur Überprüfung wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen mitgeführt. Die Negativkontrollen wurden vor der Beimpfung der Lösung im Versuchsablauf zuerst hergestellt. Die Negativ- und Positivkontrollen wurden nicht mit einem Reinigungs- oder Desinfektionsmittel behandelt. Die Schneidbretter wurden anschließend für 16 Stunden bei Raumtemperatur ( $20$  bis  $22$  °C) getrocknet.



**Abbildung 16:** A: Beimpfung der Schneidbrettplatten mit *C. estertheticum* durch Eintauchen in eine definierte Sporensuspension  
B: Trocknung der Schneidbrettplatten an Metallhaken für 16 Stunden bei Raumtemperatur

Nach der Trocknung der Platten wurden verschiedene Reinigungs- und Desinfektionsmittel nach Herstellerangaben verwendet (Tabelle 23). Für die Versuche wurden stets die höchsten angegebenen Konzentrationen und die längsten Einwirkzeiten gewählt. Um eine hohe Wirksamkeit der getesteten Mittel zu erreichen, wurden die von den Herstellern geforderten Temperaturen eingehalten. Im Anschluss an die Reinigung bzw. Desinfektion wurden die Platten gründlich mit Trinkwasser abgespült und danach in Stomacherbeutel überführt. Zur Aufarbeitung der Proben wurden 100 ml sterile, 0,85%ige NaCl-Lösung in die Beutel gegeben und diese eine Minute lang nach einem selbst festgelegten Schema massiert und geschüttelt. Die Negativ- und Positivkontrollen wurden ohne einen Reinigungs- und Desinfektionsmittelschritt parallel aufgearbeitet. Alle Versuche wurden im Dreifachansatz durchgeführt und separat voneinander einmal wiederholt.

**Tabelle 23:** Übersicht über die ausgewählten Reinigungs- und Desinfektionsmittel

Produktbezeichnung / Bezeichnung	Hersteller / Herkunft	Hauptwirkstoff	Art der Anwendung	Zugelassen in der Lebensmittel-industrie	Herstellerangaben zur Sporizidie
Warmes Wasser (45 °C)	Leitungswasser, Trinkwasser	Wasser	Großzügiges Spülen der Fläche	Ja	Keine
Heißer Wasserdampf	„Clean Xpress“, ito Electronics, Wardenburg, D	Wasserdampf	Gründliches Abdampfen der Fläche	Ja	Keine
UVC-Licht	UVC-Lichtquelle, Peqlab, Erlangen, D; Sankyo Denki G25T8, Kanagawa, Japan	UVC-Licht	1 min, 10 cm Abstand	Ja	Keine
Ethanol, 70 %	Merck, Darmstadt, D	Ethanol	70 %, Raumtemperatur, 10 min	Ja	Keine
Super Eiweiß- und Fettlöserpulver	Seewald-Chemie, Unna, D	Silikate, Phosphate	2 %, 55 °C, 15 min	Ja	Keine
Steril	Zentrag, fd, Frankfurt, D	Alkalihydroxid, Aktivchlor	0,2 %, Raumtemperatur, 10 min	Ja	Keine
Seewaclean	Seewald-Chemie, Unna, D	Quaternäre Ammoniumverbindungen	3 %, 20 °C, 30 min	Ja DVG-gelistet	Keine
Antisept 33 PES	Ernst GmbH & Co. KG, Kamen, D	Peressigsäure, 15 %	1,2 %, 50 °C, 30 min	Ja	Gegen Sporen
Wofasteril® E 400	Kesla Pharma Wolfen GmbH, Greppin, D	Peressigsäure, 35 %	0,2 %, Raumtemperatur, 30 min	Ja DVG-gelistet	Tötet Sporen sicher ab
Mucocit®-B	Merz, Frankfurt, D	Propanol, Ätzalkalien	Konzentrat, Raumtemperatur, 60 min	Nein	Sporizid
Pursept®-FD	Merz, Frankfurt, D	Glyoxal, quaternäre Ammoniumverbindungen, Formaldehyd, Glutardialdehyd	15 %, Raumtemperatur, 4 Stunden	Nein	Wirksamkeitsbereich: bakterielle Sporen

D: Deutschland

UVC-Licht: ultraviolettes Licht der Wellenlänge 100-280 nm

### Filtration der Proben

Für die weitere Bearbeitung wurden die 100 ml 0,85%ige NaCl-Lösung aus den Stomacherbeuteln in Anlehnung an Anlage 5 der Trinkwasserverordnung (2001) filtriert. Gemäß dieser wird Wasser durch Membranfiltration und anschließende anaerobe Bebrütung des Filters auf einem Selektivnährboden üblicherweise auf das Vorhandensein von *C. perfringens* einschließlich Sporen untersucht. Die dabei verwendeten Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm halten sowohl Clostridien sporen, die eine Größe von ca. 1 µm aufweisen (Schijven, 2003), als auch vegetative Mikroorganismen zurück. Jede Probe wurde separat mittels sterilem Einmaltrichter filtriert.

### Anreicherung und Nachweis

Im Anschluss an die Filtration wurden die Filter mit einer sterilen Pinzette aus den Einmaltrichtern entnommen und in 9 ml PYGS-Bouillon sechs Wochen lang anaerob bei +4 °C bebrütet. Die Verlängerung der Anreicherung wurde gewählt, um auch niedrige Sporenanzahlen nachweisen zu können (Ziegler, 2009). Die anschließende DNA-Aufbereitung und der PCR-Screening-Nachweis erfolgten wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben. Die Proben wurden semiquantitativ ausgewertet (Tabelle 24).

**Tabelle 24:** Bewertungsschema für die semiquantitative Auswertung der PCR-Ergebnisse zur Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel

<b>Bandenstärke im PCR-Nachweis (790 bp)</b>	<b>Beurteilung des PCR-Ergebnisses in Zeichen</b>	<b>Beurteilung des PCR-Ergebnisses in Worten</b>	<b>Beurteilung der Wirkung des Reinigungs- oder Desinfektionsmittels</b>
Keine Bande	-	Negativ	Sehr gute Wirkung
Schwache Bande	+	Schwach positiv	Deutliche Wirkung
Mittelstarke Bande	++	Positiv	Geringe Wirkung
Starke Bande	+++	Stark positiv	Kaum oder keine Wirkung

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchung von Fleischproben

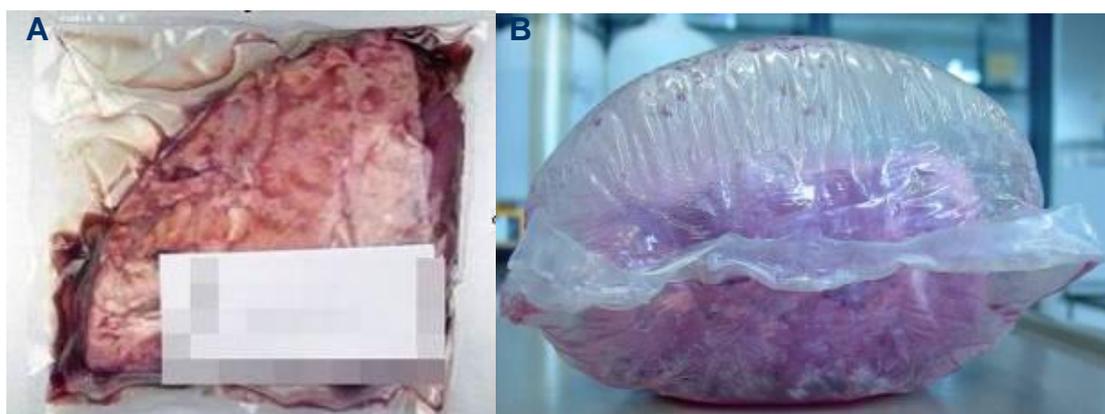
Insgesamt wurden 174 Rind-, vier Kalb-, 13 Wild-, zwölf Schweine-, zehn Puten- und neun Lammfleischproben sowie eine Schaffleischprobe auf das Vorkommen von *C. estertheticum*, sensorischen Befund einschließlich Verderbnisgeruch, bakterioskopischen Befund, allgemeine mikrobiologische Parameter und pH-Wert untersucht.

#### 4.1.1 Rindfleisch

Von den 174 untersuchten Rindfleischproben wurden 20 als Verdachtsproben vom Handel bzw. von Zerlegebetrieben eingesandt. Die übrigen 154 Rindfleischprodukte sowie die vier Kalbfleischproben wurden im regionalen und nationalen Handel erworben bzw. in Schlachthöfen und einem Zerlegebetrieb gezogen.

##### 4.1.1.1 Rindfleisch-Verdachtsproben

Bei allen untersuchten Fleischproben wurden Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakterioskopischer Befund, Geruch und Farbabweichungen erfasst bzw. ermittelt (Tabelle 25). Bei den Verdachtsproben zeigten sich große Abweichungen in Bezug auf den Gasgehalt in den Packungen (Abbildung 17). Dabei variierten die Gasmengen von gering bis hoch, so dass bei diesen Proben die Packungen verschieden stark gestrafft waren.



**Abbildung 17:** Aufgeblähte Verdachtsproben zum Zeitpunkt des Probeneingangs

- A: Probe mit geringem Gasgehalt (Probe 04-09 CH, schweizerisches Rindfleisch, Pack Blowing Score 2)
- B: Probe mit hohem Gasgehalt (Probe 36-09, deutsches Rindfleisch, Pack Blowing Score 5)

**Tabelle 25:** Rindfleischverdachtsproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
20-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	+	Nach Erbrochenem	Nein
25-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	+	Nein	Nein
26-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	+	Nein	Nein
27-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
28-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
29-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	1	+ 0	-	Nach Erbrochenem	Nein
30-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	1	+ 0	-	Nein	Nein
31-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	1	+ 0	-	Nein	Nein
32-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	1	1	+ 0	-	Nein	Nein
36-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	1	5	5	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
42-09	Deutschland	Filet	Vakuum	Nein	2	5	5	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Vergrünung
96-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Ja	11 Monate	0	3	+ 3	-	Faulig	Graue Stellen
01-09 AT	Österreich	Filet	Vakuum	Nein	1	4	4	+ 0	+	Faulig	Vergrünung
02-09 AT	Österreich	Roastbeef	Vakuum	Nein	1	5	5	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Vergrünung
05-08 CH	Schweiz	Brust	Vakuum	Nein	5	2	4	+ 2	-	Nach Erbrochenem	Nein
06-08 CH	Schweiz	Roastbeef	Vakuum	Nein	5	3	5	+ 2	+	Nach Erbrochenem	Nein
02-09 CH	Schweiz	Filet	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	+	Sauer	Graue Stellen
04-09 CH	Schweiz	Schaukel	Vakuum	Nein	1	2	3	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
11-09 CH	Schweiz	Unterschale	Vakuum	Nein	6	2	3	+ 1	+	Nein	Nein
13-09 CH	Schweiz	Rumpsteak	Vakuum	Nein	6	2	2	+ 0	+	Sauer	Graue Stellen

1) nicht beurteilbar, da Schäden in der Vakuumverpackung

+: große, plumpe Stäbchen vorhanden

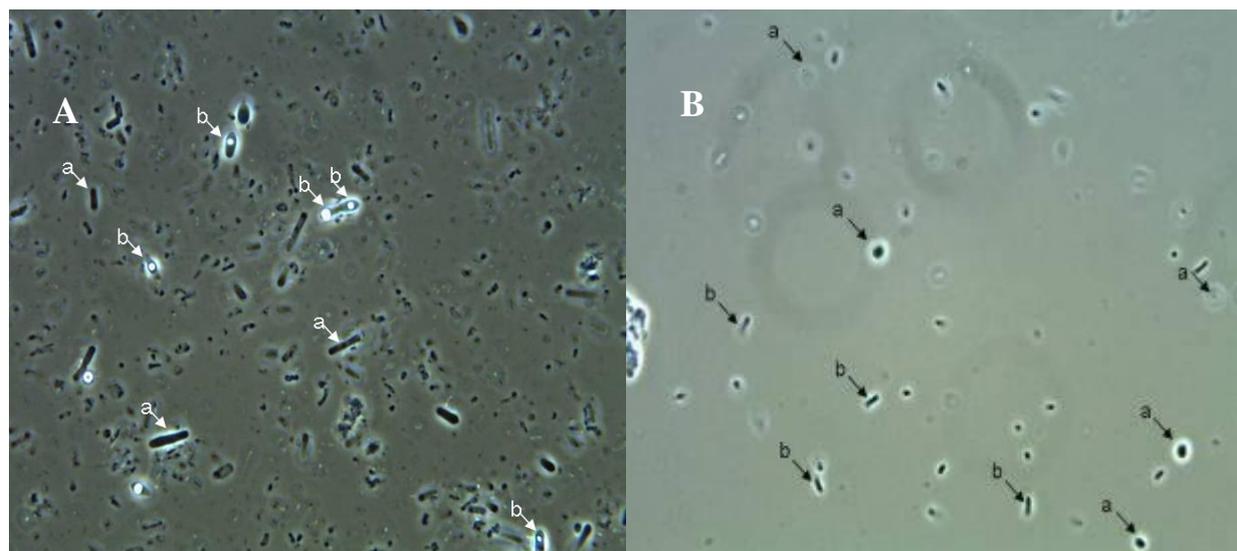
-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

#### 4.1.1.1.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Die Verdachtsprobe 20-09 wies eine Beschädigung der Vakuumverpackung auf, so dass in diesem Fall die Beurteilung einer Gasansammlung nicht möglich war. Die Bewertung der übrigen Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab zum Zeitpunkt der Untersuchung Scores zwischen 1 und 5 (Tabelle 25). Entsprechend dieser Einteilung wichen alle Verdachtsproben vom Normalzustand ab und zeigten eine produktuntypische geringe bis starke Gasbildung in der Packung. Bei der produktgemäßen Lagerung veränderte sich die Scoreeinteilung vom Eingang der Probe bis zur Untersuchung meist nicht oder nur um eine Einheit.

Der Geruch der Verdachtsproben wurde in sechs Proben (25-09, 26-09, 30-09, 31-09, 32-09, 11-09 CH) als frisch, säuerlich und charakteristisch für Rindfleisch beschrieben. Bei den Proben 96-09 und 01-09 AT wurde der Geruch als faulig und in weiteren zehn Verdachtsproben (20-09, 27-09, 28-09, 29-09, 36-09, 42-09, 02-09 AT, 05-08 CH, 06-08 CH, 04-09 CH) als nach Erbrochenem riechend charakterisiert. Gemäß Artikel 14 Abs. 1 i. V. m. Abs. 2b der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 dürften diese Produkte deshalb nicht in Verkehr gebracht werden. Die restlichen zwei Proben (02-09 CH, 13-09 CH) waren stark übersäuert, konnten jedoch als noch akzeptabel beschrieben werden (Tabelle 25). Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde in den sechs Rindfleischverdachtsproben 42-09, 96-09, 01-09 AT, 02-09 AT, 02-09 CH und 13-09 CH beobachtet (Tabelle 25). Dabei handelte es sich um grüne und graue Stellen auf der Fleischoberfläche.

In der bakterioskopischen Untersuchung bestand bei vielen Verdachtsproben die dominierende Mikrobiota aus großen, plumpen Stäbchen mit zum Teil subterminalen Endosporen (Abbildung 18), aus kurzen bis mittellangen Stäbchen und teilweise auch aus Kokken. Bei 13 der 20 Verdachtsproben (25-09 bis 32-09, 36-09, 02-09 CH, 04-09 CH, 11-09 CH, 13-09 CH) wurden außerdem ovale Hefen beobachtet. Aufgrund des mikroskopischen Befundes erschienen die Proben 20-09, 25-09, 26-09, 27-09, 28-09, 36-09, 42-09, 01-09 AT, 02-09 AT, 06-08 CH, 02-09 CH, 04-09 CH, 11-09 CH, 13-09 CH hinsichtlich des Verderbs mit *C. estertheticum* verdächtig (Tabelle 25). Aufgrund der bakterioskopischen Befunde der Proben 42-09 und 28-09, die eine hohe Zahl an großen, plumpen Stäbchen mit zum Teil subterminalen Endosporen aufwiesen, wurden diese Proben als verdächtig für einen Verderb mit *C. estertheticum* beurteilt (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** A: Nativpräparat (1250-fach) einer aufgeblähten Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 5 (Probennummer 42-09); mikroskopisches Bild: große, plumpe Stäbchen (a), teilweise mit subterminalen Endosporen (b)  
B: Nativpräparat (1250-fach) einer aufgeblähten Rindfleischprobe mit Pack Blowing Score 2 (Probennummer 28-09); mikroskopisches Bild: Hefen (a) und große, plumpe Stäbchen (b)

#### 4.1.1.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Die Mittelwerte der Keimzahlen von bei 30 °C gewachsenen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. von einigen Proben waren mikrobiologisch auffällig (Tabelle 26). Als mikrobiologisch auffällig eingestuft wurden – in Anlehnung an die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Rindfleisch (Stand 2010) – Proben, deren mikrobiologische Werte bei den *Enterobacteriaceae*  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) bzw.  $1,0 \times 10^5$  KbE/ml (Warnwert) und bei *Pseudomonas* spp.  $1,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert) überschritten. Außerdem wurden Proben vermerkt, die hohe Hefekeimzahlen (Inkubation bei 25 °C) aufwiesen (selbst gewählter Grenzwert:  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml, da Verderberscheinungen auf Fleisch ab etwa  $10^5$  KbE/ml auftreten (Reuter, 2003)) (Tabelle 26).

**Tabelle 26:** Rindfleischverdachtsproben mit hohen Keimzahlen nach mikrobiologischer Untersuchung

Probennummer	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Enterobacteriaceae	Pseudomonas spp.	Hefen
25-09	Oberschale	2	> R	< R	< SGR
26-09	Oberschale	2	> W	< R	< SGR
27-09	Oberschale	2	> W	< R	< SGR
28-09	Oberschale	2	> R	< R	< SGR
29-09	Oberschale	1	> W	< R	< SGR
31-09	Oberschale	1	> W	< R	< SGR
32-09	Oberschale	1	> W	< R	< SGR
36-09	Roastbeef	5	> R	< R	< SGR
96-09	Roastbeef	3	> W	< R	< SGR
11-09 CH	Unterschale	3	> W	< R	> SGR

> R: Keimzahl über DGHM-Richtwert für rohes Rindfleisch

< SGR: Keimzahl unter selbst gewähltem Richtwert

< R: Keimzahl unter DGHM-Richtwert für rohes Rindfleisch

> SGR: Keimzahl über selbst gewähltem Richtwert

> W: Keimzahl über DGHM-Warnwert für rohes Rindfleisch

Die pH-Werte der Verdachtsproben lagen mit einem Mittelwert von 5,57 (Minimum 5,25; Maximum 6,30) in einem für vakuumiertes Rindfleisch größtenteils typischen Bereich (Broda et al., 1997).

#### 4.1.1.1.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei 17 Proben ein positives Ergebnis (Tabelle 27). Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Verdachtsproben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Für 19 Proben konnten sowohl die positiven als auch die negativen Ergebnisse bestätigt werden. Die Proben 96-09 und 02-09 CH waren vor und nach Anreicherung negativ. Für die Probe 05-08 CH, die vor Anreicherung negativ war, wurde nach Anreicherung ein positives PCR-Signal erhalten, so dass 18 von 20 Rindfleischverdachtsproben als positiv hinsichtlich des Vorkommens von *C. estertheticum* beurteilt werden konnten (Tabelle 27).

**Tabelle 27:** Rindfleischverdachtsproben – PCR-Ergebnisse

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
20-09	Deutschland	Roastbeef	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	X		X	
25-09	Deutschland	Oberschale	2	X		X	
26-09	Deutschland	Oberschale	2	X		X	
27-09	Deutschland	Oberschale	2	X		X	
28-09	Deutschland	Oberschale	2	X		X	
29-09	Deutschland	Oberschale	1	X		X	
30-09	Deutschland	Oberschale	1	X		X	
31-09	Deutschland	Oberschale	1	X		X	
32-09	Deutschland	Oberschale	1	X		X	
36-09	Deutschland	Roastbeef	5	X		X	
42-09	Deutschland	Filet	5	X		X	
96-09	Deutschland	Roastbeef	3		X		X
01-09 AT	Österreich	Filet	4	X		X	
02-09 AT	Österreich	Roastbeef	5	X		X	
05-08 CH	Schweiz	Brust	4		X	X	
06-08 CH	Schweiz	Roastbeef	5	X		X	
02-09 CH	Schweiz	Filet	2		X		X
04-09 CH	Schweiz	Schaukel	3	X		X	
11-09 CH	Schweiz	Unterschale	3	X		X	
13-09 CH	Schweiz	Rumpsteak	2	X		X	
<b>Gesamt</b>				<b>17</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>2</b>

1) nicht beurteilbar, da Schäden in der Vakuumverpackung

#### 4.1.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus Tabelle 28 wird ersichtlich, welche PCR-Ergebnisse einer positiven Bakterioskopie folgten und welche sensorischen Befunde einer positiven Bakterioskopie und/oder einer positiven PCR vorausgingen.

**Tabelle 28:** Übersicht der Ergebnisse der Rindfleischverdachtsproben

Wenn	Bakterioskopie positiv (14 x)	dann	13 von 14 PCR positiv 8 von 14 Geruch nach Erbrochenem 3 von 14 andere produktuntypische Gerüche 5 von 14 Farbabweichungen
Wenn	PCR positiv (17 x vor Anreicherung 18 x nach Anreicherung)	dann	9 von 17 bzw. 10 von 18 Geruch nach Erbrochenem 2 von 17 bzw. 2 von 18 andere produktuntypische Gerüche 4 von 17 bzw. 4 von 18 Farbabweichungen
Wenn	Bakterioskopie und PCR positiv (13 x)	dann	8 von 13 Geruch nach Erbrochenem 2 von 13 andere produktuntypische Gerüche 4 von 13 Farbabweichungen

#### 4.1.1.2 Rindfleisch-Handelsproben

Bei den aus dem Handel bezogenen Fleischproben wurden Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakterioskopischer Befund, Geruch und Farbabweichungen erfasst bzw. ermittelt (Tabelle 29). Die Proben aus dem Handel waren verschiedene, typische Rindfleischproben, die auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* untersucht wurden (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Bilder verschiedener Rindfleischproben aus dem Handel; Tafelspitz (1), Kugel vom Kalb (2), Falsches Filet (3), Rumpsteak (4), Roastbeef (5), Bündner Fleisch (6)

**Tabelle 29:** Rindfleischhandelsproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
01-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
02-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
03-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
04-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
05-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
06-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
07-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
08-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
09-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
10-08	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
02-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
03-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
04-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
05-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
06-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
07-09	Deutschland	Brust	Vakuum	Nein	2	0	1	+ 1	-	Sauer	Nein
08-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
09-09	Deutschland	Hackfleisch	Lose	Ja	1	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
10-09	Deutschland	Hackfleisch	Lose	Ja	1	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
11-09	Deutschland	Hackfleisch	Lose	Ja	1	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
12-09	Deutschland	Rosenstück	Vakuum	Nein	2	0	1	+ 1	-	Nein	Nein
13-09	Südamerika 3)	Hüftsteak	Mod. A. 2)	Nein	2	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Sauer	Graue Stellen
14-09	Südamerika 3)	Hüftsteak	Mod. A. 2)	Nein	2	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Sauer	Graue Stellen
15-09	Deutschland	Falsches Filet	Vakuum	Nein	3	1	2	+ 1	+	Faulig	Nein

1) nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

2) modifizierte Atmosphäre

3) auf der Verpackung keine genaueren Angaben über Herkunftsland

+: große, plumpe Stäbchen vorhanden

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

## Fortsetzung Tabelle 29

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
16-09	Deutschland	Tafelspitz	Vakuum	Nein	3	1	1	+ 0	-	Sauer	Graue Stellen
17-09	Deutschland	Tafelspitz	Vakuum	Nein	3	1	1	+ 0	-	Sauer	Nein
18-09	Deutschland	Tafelspitz	Vakuum	Nein	3	1	1	+ 0	-	Sauer	Nein
19-09	Deutschland	Schildstück	Vakuum	Nein	4	1	1	+ 0	-	Faulig	Nein
35-09	Deutschland	Brust	Vakuum	Nein	0	0	1	+ 1	-	Nein	Nein
37-09	Niederlande	Kalb, Kugel	Mod. A. 2)	Nein	1	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Sauer	Vergrünung
38-09	Niederlande	Kalb, Kugel	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	-	Sauer	Nein
39-09	Niederlande	Kalb, Kugel	Mod. A. 2)	Nein	1	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Sauer	Vergrünung
40-09	Niederlande	Kalb, Kugel	Vakuum	Nein	1	1	2	+ 1	-	Faulig	Nein
41-09	Deutschland	Brust	Vakuum	Nein	2	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
43-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Ja	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
44-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Ja	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
45-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Ja	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
46-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Ja	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
47-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
48-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
49-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Faulig	Nein
50-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
51-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Ja	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
52-09	Südamerika 3)	Rumpsteak	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
55-09	Deutschland	Zubereitung	Vakuum	Ja	0	2	3	+ 1	-	Faulig	Nein
58-09	Deutschland	Zubereitung	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
59-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
60-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
61-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
62-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
63-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein

1) nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

2) Modifizierte Atmosphäre

3) auf der Verpackung keine genaueren Angaben über Herkunftsland

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

## Fortsetzung Tabelle 29

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
64-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
65-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
66-09	Deutschland	Roastbeef	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
07-08 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	Lose verpackt	Nein	6	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
08-08 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	Lose verpackt	Nein	6	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
09-08 CH	Schweiz	Hüftsteak	Vakuum	Nein	8	2	3	+ 1	-	Nach Erbrochenem	Nein
10-08 CH	Schweiz	Hackfleisch	Vakuum	Nein	4	3	3	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
11-08 CH	Schweiz	Hackfleisch	Vakuum	Nein	4	2	3	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
12-08 CH	Schweiz	Ragout	Vakuum	Nein	4	3	4	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
13-08 CH	Schweiz	Ragout	Vakuum	Nein	4	3	3	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
14-08 CH	Schweiz	Ragout	Vakuum	Nein	4	3	3	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
15-08 CH	Schweiz	Ragout	Vakuum	Nein	4	3	3	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
01-09 CH	Schweiz	Roastbeef	Vakuum	Nein	3	1	2	+ 1	+	Nein	Graue Stellen
03-09 CH	Schweiz	Roastbeef	Vakuum	Nein	3	1	2	+ 1	+	Nein	Graue Stellen
05-09 CH	Schweiz	Roastbeef	Vakuum	Nein	3	2	3	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
06-09 CH	Schweiz	Hüfte	Vakuum	Nein	4	1	2	+ 1	-	Nein	Nein
07-09 CH	Schweiz	Entrecote	Vakuum	Nein	4	2	3	+ 1	+	Nach Erbrochenem	Nein
08-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	Lose verpackt	Nein	7	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	+	Nein	Nein
09-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	Lose verpackt	Nein	7	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	+	Nein	Nein
10-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	Lose verpackt	Nein	7	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	+	Nein	Nein
12-09 CH	Schweiz	Oberschale	Vakuum	Nein	4	1	2	+ 1	+	Nein	Nein

1) nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

+: große, plumpe Stäbchen vorhanden

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

## Fortsetzung Tabelle 29

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
Schlachthof A:										
98-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
99-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
100-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
101-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
102-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
103-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
104-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
105-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
106-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
107-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
108-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
Schlachthof B:										
109-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
110-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
111-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
112-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
113-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
114-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
115-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
116-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
117-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
118-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
119-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
120-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
121-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
122-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
123-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
124-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
125-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
126-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
127-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
128-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

## Fortsetzung Tabelle 29

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
Schlachthof C:										
129-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
130-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
131-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
132-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
133-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
134-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
135-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
136-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
137-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
138-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
139-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
140-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
141-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
142-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
143-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
144-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
Schlachthof D:										
145-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
146-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
147-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
148-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
149-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
150-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
151-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
152-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
153-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
154-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
155-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
156-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
157-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
158-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
159-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

## Fortsetzung Tabelle 29

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
Weitere Schlachthöfe										
160-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
161-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
162-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
163-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
164-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
165-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
166-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
167-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
168-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
169-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
170-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
171-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
172-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
173-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
174-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
175-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
176-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
177-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
178-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
179-09	Deutschland	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
Vliesfleisch										
180-09	Deutschland	Vliesfleisch	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
181-09	Deutschland	Vliesfleisch	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
182-09	Deutschland	Vliesfleisch	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein
183-09	Deutschland	Vliesfleisch	Vakuum	Nein	1	0	0	-	Nein	Nein

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

#### 4.1.1.2.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Keine der untersuchten Proben wies eine sichtbare Beschädigung der Vakuumverpackung auf. Die Proben 09-09, 10-09 und 11-09 stammten aus einer Frischetheke, die Proben 13-09, 14-09, 37-09 und 39-09 wurden unter modifizierter Atmosphäre verpackt und die Proben 07-08 CH, 08-08 CH, 08-09 CH, 09-09 CH und 10-09 CH wurden produkttypisch in lose Folie eingeschweißt, so dass die Beurteilung einer Gasansammlung bei all diesen Proben nicht möglich war (Tabelle 29). Die Bewertung der übrigen Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab zum Zeitpunkt der Untersuchung Scores zwischen 0 und 4 (Tabelle 29). Entsprechend dieser Einteilung wichen einige Handelsproben vom Normalzustand ab und zeigten eine produktuntypische geringe bis starke Gasbildung in der Packung. Bei der sachgemäßen Lagerung der Proben änderte sich die Scoreeinteilung vom Eingang der Probe bis zur Untersuchung in den meisten Fällen nicht. Bei 16 Rindfleischhandelsproben nahm die Gasmenge im Lagerungszeitraum um eine Einheit zu.

Der Geruch der Handelsproben wurde in den meisten Fällen als frisch, säuerlich und charakteristisch für Rindfleisch beschrieben. In fünf Produkten wurde der Geruch als faulig und in weiteren neun als nach Erbrochenem riechend charakterisiert. Diese Proben sind somit als nicht mehr akzeptabel zu bewerten (Ziegler, 2009). Neun andere Proben waren stark übersäuert, konnten jedoch als noch akzeptabel beschrieben werden. Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde in sieben Rindfleischhandelsproben beobachtet (Tabelle 29). Dabei handelte es sich um grüne und graue Stellen auf der Fleischoberfläche.

Bei der bakterioskopischen Untersuchung der Handelsproben bestand die dominierende Mikrobiota aus kurzen bis mittellangen Stäbchen und teilweise auch aus Kokken. Aufgrund des mikroskopischen Befundes erschienen 14 Proben aus der Schweiz und eine Probe aus Deutschland hinsichtlich des Verderbs mit *C. estertheticum* verdächtig (Tabelle 29).

#### 4.1.1.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Die Mittelwerte der Keimzahlen von bei +30 °C gewachsenen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. und bei den Hackfleischproben zusätzlich die Mittelwerte der aeroben mesophilen Keimzahl von den Proben, die mikrobiologisch auffällig waren, wurden erfasst (Tabelle 30). Als mikrobiologisch auffällig eingestuft wurden – in Anlehnung an die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Rindfleisch und Hackfleisch (Stand 2010) – Proben, deren mikrobiologische Werte bei der aeroben mesophilen Keimzahl von Hackfleisch  $5,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert), bei den *Enterobacteriaceae*  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) bzw.  $1,0 \times 10^5$  KbE/ml (Warnwert) und bei *Pseudomonas* spp.  $1,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert) überschritten. Außerdem wurden Proben vermerkt, die hohe Hefekeimzahlen (Inkubation bei +25 °C) aufwiesen (selbst gewählter Grenzwert:  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml, da Verderbserscheinungen auf Fleisch ab etwa  $10^5$  KbE/ml auftreten (Reuter, 2003)).

Die pH-Werte der Handelsproben lagen mit einem Mittelwert von 5,75 (Minimum 5,07; Maximum 6,35) in einem für gereiftes Rindfleisch größtenteils typischen Bereich (Broda et al., 1997).

**Tabelle 30:** Rindfleischhandelsproben mit hohen Keimzahlen in mikrobiologischer Untersuchung

Probennummer	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Aerobe mesophile Keimzahl (für Hackfleisch)	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Hefen
01-08	Roastbeef	0		> W	< R	< SGR
02-08	Roastbeef	0		> W	< R	< SGR
03-08	Roastbeef	0		> W	< R	< SGR
04-08	Roastbeef	0		> R	< R	< SGR
06-08	Roastbeef	0		> R	< R	< SGR
07-08	Roastbeef	0		> W	< R	< SGR
08-08	Roastbeef	0		> R	< R	< SGR
09-08	Roastbeef	0		> W	< R	< SGR
07-09	Brust	1		> W	< R	< SGR
09-09	Hackfleisch	n. b.	> R	> W	> R	< SGR
10-09	Hackfleisch	n. b.	> R	> W	> R	> SGR
11-09	Hackfleisch	n. b.	> R	> W	> R	> SGR
12-09	Rosenstück	1		> W	< R	< SGR
15-09	Falsches Filet	2		> W	> R	< SGR
16-09	Tafelspitz	1		> W	< R	< SGR
17-09	Tafelspitz	1		> W	> R	< SGR
18-09	Tafelspitz	1		> R	< R	< SGR
19-09	Schildstück	1		> W	< R	< SGR
35-09	Brust	1		> W	< R	< SGR
37-09	Kalb, Kugel	n. b.		< R	< R	> SGR
38-09	Kalb, Kugel	2		> W	< R	< SGR
39-09	Kalb, Kugel	n. b.		> W	< R	> SGR
40-09	Kalb, Kugel	2		> R	< R	> SGR
44-09	Rumpsteak	0		< R	< R	> SGR
46-09	Rumpsteak	0		< R	< R	> SGR
47-09	Rumpsteak	0		< R	< R	> SGR
48-09	Rumpsteak	0		> R	< R	< SGR
49-09	Rumpsteak	0		< R	< R	> SGR
10-08 CH	Hackfleisch	3	> R	< R	< R	> SGR
11-08 CH	Hackfleisch	3	> R	> R	< R	< SGR
01-09 CH	Roastbeef	2		> R	< R	> SGR
03-09 CH	Roastbeef	2		> R	< R	> SGR
05-09 CH	Roastbeef	3		> R	< R	< SGR
12-09 CH	Oberschale	2		> W	< R	> SGR

< R: Keimzahl unter DGHM-Richtwert für rohes Rindfleisch/Hackfleisch

> R: Keimzahl über DGHM-Richtwert für rohes Rindfleisch/Hackfleisch

> W: Keimzahl über DGHM-Warnwert für rohes Rindfleisch/Hackfleisch

< SGR: Keimzahl unter selbst gewähltem Richtwert

> SGR: Keimzahl über selbst gewähltem Richtwert

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

#### **4.1.1.2.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum***

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei 85 Proben ein positives Ergebnis (Tabelle 31). Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Handelsproben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Für 138 Proben konnten sowohl die positiven (n = 79) als auch die negativen (n = 59) Ergebnisse bestätigt werden. Die Proben 41-09, 01-09 CH, 03-09 CH, 06-09 CH, 08-09 CH, 09-09 CH, 105-09 bis 108-09, 129-09 bis 167-09, 169-09, 170-09, 173-09, 175-09 bis 177-09, 179-09 und 181-09 bis 183-09 waren vor und nach Anreicherung negativ. Für die Proben 10-08, 12-09, 15-09, 55-09, 58-09 und 65-09, 98-09 bis 103-09, 174-09 und 178-09, die vor Anreicherung negativ waren, war das PCR-Signal nach Anreicherung positiv. Sechs Proben (50-09, 51-09, 52-09, 168-09, 171-09, 172-09), die vor Anreicherung positiv waren, ergaben nach derselben ein negatives PCR-Ergebnis.

Somit waren insgesamt 93 von 158 Rindfleischhandelsproben nach der Anreicherung positiv hinsichtlich des Vorkommens von *C. estertheticum* (Tabelle 31).

**Tabelle 31:** Rindfleischhandelsproben – PCR-Ergebnisse

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
01-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
02-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
03-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
04-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
05-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
06-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
07-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
08-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
09-08	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
10-08	Deutschland	Roastbeef	0		X	X	
02-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
03-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
04-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
05-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
06-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
07-09	Deutschland	Brust	1	X		X	
08-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
09-09	Deutschland	Hackfleisch	n. b.	X		X	
10-09	Deutschland	Hackfleisch	n. b.	X		X	
11-09	Deutschland	Hackfleisch	n. b.	X		X	
12-09	Deutschland	Rosenstück	1		X	X	
13-09	Südamerika	Hüftsteak	n. b.	X		X	
14-09	Südamerika	Hüftsteak	n. b.	X		X	
15-09	Deutschland	Falsches Filet	2		X	X	
16-09	Deutschland	Tafelspitz	1	X		X	
17-09	Deutschland	Tafelspitz	1	X		X	
18-09	Deutschland	Tafelspitz	1	X		X	
19-09	Deutschland	Schildstück	1	X		X	
35-09	Deutschland	Brust	1	X		X	
37-09	Niederlande	Kalb, Kugel	n. b.	X		X	
38-09	Niederlande	Kalb, Kugel	2	X		X	
39-09	Niederlande	Kalb, Kugel	n. b.	X		X	
40-09	Niederlande	Kalb, Kugel	2	X		X	
41-09	Deutschland	Brust	0		X		X
43-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
44-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
45-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
46-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
				<b>34</b>	<b>4</b>	<b>37</b>	<b>1</b>

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

## Fortsetzung Tabelle 31

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
47-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
48-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
49-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X		X	
50-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X			X
51-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X			X
52-09	Südamerika	Rumpsteak	0	X			X
55-09	Deutschland	Zubereitung	3		X	X	
58-09	Deutschland	Zubereitung	0		X	X	
59-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
60-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
61-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
62-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
63-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
64-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
65-09	Deutschland	Roastbeef	0		X	X	
66-09	Deutschland	Roastbeef	0	X		X	
07-08 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	n. b.	X		X	
08-08 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	n. b.	X		X	
09-08 CH	Schweiz	Hüftsteak	3	X		X	
10-08 CH	Schweiz	Hackfleisch	3	X		X	
11-08 CH	Schweiz	Hackfleisch	3	X		X	
12-08 CH	Schweiz	Ragout	4	X		X	
13-08 CH	Schweiz	Ragout	3	X		X	
14-08 CH	Schweiz	Ragout	3	X		X	
15-08 CH	Schweiz	Ragout	3	X		X	
01-09 CH	Schweiz	Roastbeef	2		X		X
03-09 CH	Schweiz	Roastbeef	2		X		X
05-09 CH	Schweiz	Roastbeef	3	X		X	
06-09 CH	Schweiz	Hüfte	2		X		X
07-09 CH	Schweiz	Entrecote	3	X		X	
08-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	n. b.		X		X
09-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	n. b.		X		X
10-09 CH	Schweiz	Bündner Fleisch	n. b.	X		X	
12-09 CH	Schweiz	Oberschale	2	X		X	
				<b>26</b>	<b>8</b>	<b>26</b>	<b>8</b>

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

## Fortsetzung Tabelle 31

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Schlachthof A:							
98-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
99-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
100-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
101-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
102-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
103-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
104-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
105-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
106-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
107-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
108-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
Schlachthof B:							
109-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
110-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
111-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
112-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
113-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
114-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
115-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
116-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
117-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
118-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
119-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
120-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
121-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
122-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
123-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
124-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
125-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
126-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
127-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
128-09	Deutschland	Oberschale	0	X		X	
				<b>21</b>	<b>10</b>	<b>27</b>	<b>4</b>

## Fortsetzung Tabelle 31

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Schlachthof C:							
129-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
130-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
131-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
132-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
133-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
134-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
135-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
136-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
137-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
138-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
139-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
140-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
141-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
142-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
143-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
144-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
Schlachthof D:							
145-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
146-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
147-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
148-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
149-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
150-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
151-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
152-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
153-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
154-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
155-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
156-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
157-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
158-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
159-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
				<b>0</b>	<b>31</b>	<b>0</b>	<b>31</b>

## Fortsetzung Tabelle 31

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
weitere Schlachthöfe:							
160-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
161-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
162-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
163-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
164-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
165-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
166-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
167-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
168-09	Deutschland	Oberschale	0	X			X
169-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
170-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
171-09	Deutschland	Oberschale	0	X			X
172-09	Deutschland	Oberschale	0	X			X
173-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
174-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
175-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
176-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
177-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
178-09	Deutschland	Oberschale	0		X	X	
179-09	Deutschland	Oberschale	0		X		X
Vliesfleisch:							
180-09	Deutschland	Vliesfleisch	0	X		X	
181-09	Deutschland	Vliesfleisch	0		X		X
182-09	Deutschland	Vliesfleisch	0		X		X
183-09	Deutschland	Vliesfleisch	0		X		X
				<b>4</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>21</b>
<b>Gesamt</b>				<b>85</b>	<b>73</b>	<b>93</b>	<b>65</b>

#### 4.1.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus Tabelle 32 wird ersichtlich, welche PCR-Ergebnisse einer positiven Bakterioskopie folgten und welche sensorischen Befunde einer positiven Bakterioskopie und/oder einer positiven PCR vorausgingen. Die Proben 98-09 bis 183-09 wurden nicht in diese Auswertung einbezogen, da bei allen diesen Proben sowohl die Bakterioskopie als auch die sensorischen Befunde keine Hinweise auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* oder Abweichungen vom Normalzustand aufwiesen.

**Tabelle 32:** Übersicht der Ergebnisse der Rindfleischhandelsproben

Wenn	Bakterioskopie positiv (15 x)	dann	10 bzw. nach Anreicherung 11 von 15 PCR positiv 8 von 15 Geruch nach Erbrochenem 1 von 15 andere produktuntypische Gerüche 2 von 15 Farbabweichungen
Wenn	PCR positiv (60 x vor Anreicherung 63 x nach Anreicherung)	dann	9 von 60 bzw. 9 von 63 Geruch nach Erbrochenem 12 von 60 bzw. 14 von 63 andere produktuntypische Gerüche 5 von 60 bzw. 5 von 63 Farbabweichungen
Wenn	Bakterioskopie und PCR positiv (10 x vor Anreicherung 11 x nach Anreicherung)	dann	8 von 10 bzw. 8 von 11 Geruch nach Erbrochenem 0 von 10 bzw. 1 von 11 andere produktuntypische Gerüche 0 von 10 bzw. 0 von 11 Farbabweichungen

#### 4.1.2 Wildfleisch

Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakterioskopischer Befund, Geruch und Farbabweichungen wurden auch für Wildfleischverdachts- und -handelsproben erfasst bzw. ermittelt (Tabellen 33 und 34).

**Tabelle 33:** Wildfleischverdachtsproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
56-09	Deutschland	Hirscheule	Vakuum	Nein	1	0	3	+ 3	-	Faulig	Vergrünung
93-09	Neuseeland	Hirschschulter	Vakuum	Nein	1	5	5	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
94-09	Neuseeland	Hirschbraten	Vakuum	Nein	1	4	4	+ 0	+	Nach Erbrochenem	Nein
03-08 CH	Neuseeland	Hirschfilet	Vakuum	Nein	5	4	4	+ 0	+	Faulig	Nein
04-08 CH	Neuseeland	Wildoberschale	Vakuum	Nein	5	5	5	+ 0	+	Faulig	Nein

+: große, plumpe Stäbchen vorhanden

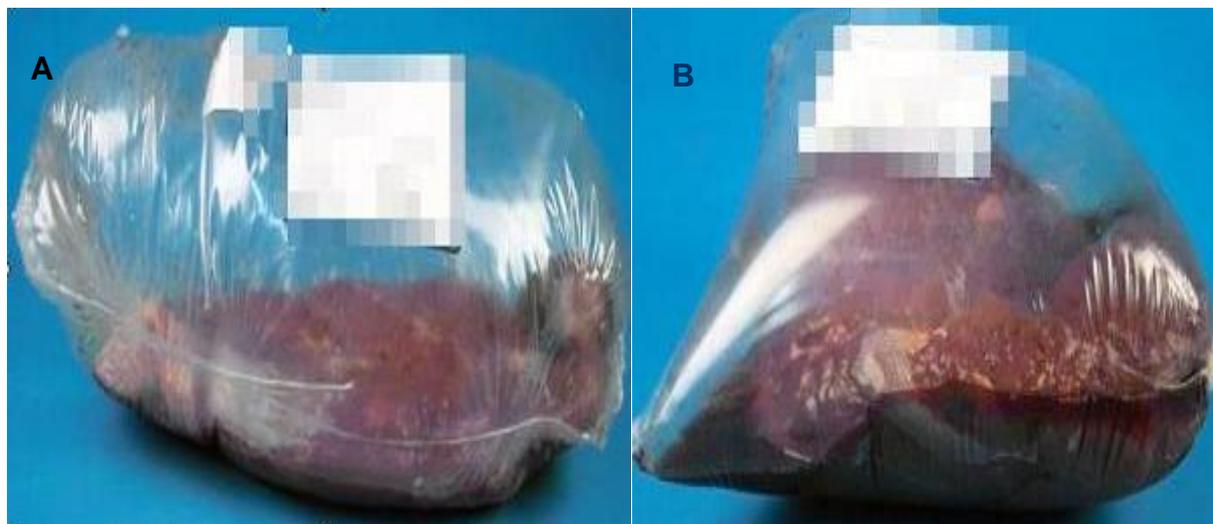
-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

**Tabelle 34:** Wildfleischhandelsproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
01-09	Neuseeland	Hirschbraten	Vakuum	Nein	3	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
21-09	Neuseeland	Hirschgulasch	Vakuum	Nein	2	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
22-09	Neuseeland	Hirschsteak	Vakuum	Nein	2	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
71-09	Österreich	Hirschgulasch	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
85-09	Deutschland	Rehrollbraten	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
97-09	Deutschland	Wildoberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
01-08 CH	Neuseeland	Wildoberschale	Vakuum	Nein	6	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
02-08 CH	Neuseeland	Hirschentrecote	Vakuum	Nein	6	0	2	+ 2	-	Nein	Nein

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

Bei den Wildfleischverdachtsproben wiesen einige Proben zum Zeitpunkt des Probeneingangs einen Pack Blowing Score von 4 (Probe 03-08 CH) bzw. 5 (Probe 04-08 CH) auf (Abbildung 20). Die Packungen waren auf die volle Größe aufgebläht und bei der Probe 04-08 CH war zusätzlich die Folie straff gespannt.



**Abbildung 20:** Aufgeblähte Wildfleischverdachtsproben zum Zeitpunkt des Probeneingangs

A: neuseeländisches Hirschfilet, Score 4 (Probe 03-08 CH)

B: neuseeländische Wildoberschale, Score 5 (Probe 04-08 CH)

#### 4.1.2.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Keine der untersuchten Proben wies eine sichtbare Beschädigung der Vakuumverpackung auf. Die Bewertung aller Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab zum Zeitpunkt der Untersuchung Scores zwischen 0 und 5 (Tabellen 33 und 34). Entsprechend dieser Einteilung wichen alle Verdachtsproben vom Normalzustand ab und zeigten eine produktuntypische geringe bis starke Gasbildung in der Packung. Bei den Handelsproben wies nur die Probe 02-08 CH am Untersuchungstag eine geringe Menge Gas in der Packung auf. Nur je eine der Verdachts- und Handelsproben veränderte den Pack Blowing Score während der produktgemäßen Lagerung der Proben.

Bei der sensorischen Untersuchung wurde der Geruch der Verdachtsproben 56-09, 03-08 CH und 04-08 CH als faulig und der der Verdachtsproben 93-09 und 94-09 als nach Erbrochenem riechend charakterisiert. Dagegen wurde der Geruch der Handelsproben als frisch und produkttypisch für Wildfleisch eingestuft (Tabellen 33 und 34). Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde nur bei der Verdachtsprobe 56-09 beobachtet (Tabellen 33 und 34). Dabei handelte es sich um grüne Stellen auf der Fleischoberfläche.

Bei vier von fünf Verdachtsproben (93-09, 94-09, 03-08 CH, 04-08 CH) bestand die dominierende Mikrobiota aus großen, plumpen Stäbchen mit zum Teil subterminalen Endosporen (Abbildung 21), aus kurzen bis mittellangen Stäbchen und teilweise auch aus Kokken. Aufgrund des mikroskopischen Befundes erschienen diese Proben hinsichtlich des Verderbs mit *C. estertheticum* verdächtig. Die Verdachtsprobe 56-09 und alle Handelsproben lieferten keinen Hinweis auf eine Kontamination mit *C. estertheticum*.



**Abbildung 21:** Nativpräparat (1250-fach) einer aufgeblähten Wildfleischprobe mit Score 5, mikroskopisches Bild: große, plumpe Stäbchen dominierend (a), Stäbchen (b), Kokken (c) (Probennummer 04-08 CH)

#### 4.1.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Die Mittelwerte der Keimzahlen von bei +30 °C gewachsenen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. von den Proben, die mikrobiologisch auffällig waren, wurden ermittelt (Tabelle 35). Als mikrobiologisch auffällig eingestuft wurden – in Anlehnung an die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Rindfleisch, da keine Richt- und Warnwerte für Wildfleisch existieren (Stand 2010) – Proben, deren mikrobiologische Werte bei den *Enterobacteriaceae*  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) bzw.  $1,0 \times 10^5$  KbE/ml (Warnwert) und bei *Pseudomonas* spp.  $1,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert) überschritten. Aufgrund fehlender Richt- und Warnwerte für Wildfleisch wären diese Produkte jedoch verkehrsfähig.

**Tabelle 35:** Übersicht über Wildfleischproben mit hohen Keimzahlen

Proben-nummer	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Probenart	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
93-09	Hirschschulter	5	Verdacht	> R	< R
94-09	Hirschbraten	4	Verdacht	> R	< R
85-09	Rehrollbraten	0	Handel	> W	> R

> R: Keimzahl über DGHM-Richtwert für rohes Rindfleisch

> W: Keimzahl über DGHM-Warnwert für rohes Rindfleisch

Die pH-Werte der Verdachtsproben mit einem Mittelwert von 5,78 (Minimum 5,31; Maximum 6,05) und die pH-Werte der Handelsproben mit einem Mittelwert von 5,81 (Minimum 5,58; Maximum 5,99) lagen in einem für Wildfleisch größtenteils typischen Bereich (Fink, 1992).

#### 4.1.2.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei allen Verdachts- und sieben von acht Handelsproben (Tabelle 36) ein positives Ergebnis. Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Proben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Für alle Verdachts- und sieben Handelsproben konnten sowohl die positiven als auch die negativen Ergebnisse bestätigt werden. Die Handelsprobe 97-09 war vor und nach Anreicherung negativ. Die Handelsprobe 85-09, die vor Anreicherung ein positives PCR-Signal gab, lieferte nach Anreicherung ein negatives PCR-Ergebnis (Tabelle 36).

**Tabelle 36:** Wildfleischproben – PCR-Ergebnisse

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
56-09	Deutschland	Hirschkeule	3	X		X	
93-09	Neuseeland	Hirschschulter	5	X		X	
94-09	Neuseeland	Hirschbraten	4	X		X	
03-08 CH	Neuseeland	Hirschfilet	4	X		X	
04-08 CH	Neuseeland	Wildoberschale	5	X		X	
01-09	Neuseeland	Hirschbraten	0	X		X	
21-09	Neuseeland	Hirschgulasch	0	X		X	
22-09	Neuseeland	Hirschsteak	0	X		X	
71-09	Österreich	Hirschgulasch	0	X		X	
85-09	Deutschland	Rehrollbraten	0	X			X
97-09	Deutschland	Wildoberschale	0		X		X
01-08 CH	Neuseeland	Wildoberschale	0	X		X	
02-08 CH	Neuseeland	Hirschentrecote	2	X		X	
<b>Gesamt</b>				<b>12</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>2</b>

#### 4.1.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus Tabelle 37 wird ersichtlich, welche PCR-Ergebnisse einer positiven Bakterioskopie folgten und welche sensorischen Befunde einer positiven Bakterioskopie und/oder einer positiven PCR vorausgingen. Die Handelsproben wurden nicht in diese Übersicht einbezogen, da bei allen diesen Proben weder die Bakterioskopie noch die sensorischen Befunde Hinweise auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* oder Abweichungen vom Normalzustand aufwiesen.

**Tabelle 37:** Übersicht der Ergebnisse der Wildfleischverdachtsproben

Wenn	Bakterioskopie positiv (4 x)	dann	4 von 4 PCR positiv 2 von 4 Geruch nach Erbrochenem 2 von 4 andere produktuntypische Gerüche 0 von 4 Farbabweichungen
Wenn	PCR positiv (5 x)	dann	2 von 5 Geruch nach Erbrochenem 3 von 5 andere produktuntypische Gerüche 1 von 5 Farbabweichungen
Wenn	Bakterioskopie und PCR positiv (4 x)	dann	2 von 4 Geruch nach Erbrochenem 2 von 4 andere produktuntypische Gerüche 0 von 4 Farbabweichungen

### 4.1.3 Lamm- und Schaffleisch

Zehn zufällig ausgewählte Proben (Lamm: n = 9, Schaf: n = 1) aus dem deutschen Handel wurden auf das Vorkommen von *C. estertheticum* untersucht (Abbildung 22). Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakterioskopischer Befund, Geruch und Farbabweichungen wurden erfasst bzw. ermittelt (Tabelle 38).



**Abbildung 22:** Geringgradig aufgeblähte neuseeländische Lammvorderhaxe, Score 1 zum Zeitpunkt der Untersuchung (Probe 74-09)

**Tabelle 38:** Lamm- und Schaffleischproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

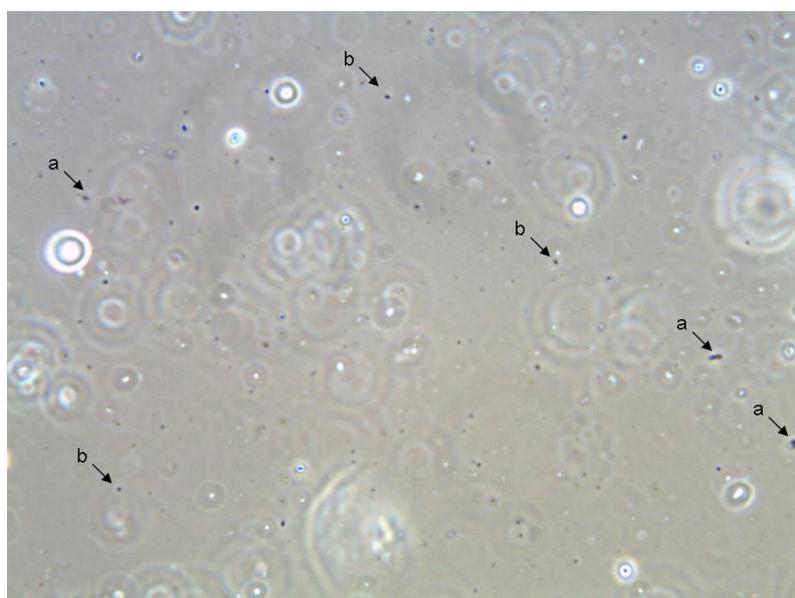
Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
23-09	Neuseeland	Lammschulter	Vakuum	Nein	3	0	0	+0	-	Nein	Nein
57-09	Deutschland	Lammrücken	Vakuum	Nein	1	0	0	+0	-	Nein	Nein
72-09	Neuseeland	Lammkeule	Vakuum	Nein	1	0	0	+0	-	Nein	Nein
73-09	Neuseeland	Lammhinterhaxe	Vakuum	Nein	1	0	0	+0	-	Nein	Nein
74-09	Neuseeland	Lammvorderhaxe	Vakuum	Nein	1	0	1	+1	-	Nein	Nein
75-09	Australien	Schafsrücken	Vakuum	Nein	1	0	0	+0	-	Nein	Nein
77-09	Neuseeland	Lammkotelett	Vakuum	Nein	1	0	2	+2	-	Nein	Nein
86-09	Neuseeland	Lammkeule	Vakuum	Nein	0	0	0	+0	-	Nein	Nein
88-09	Neuseeland	Lammkeule	Vakuum	Nein	1	0	0	+0	-	Nein	Nein
89-09	Neuseeland	Lammlachse	Vakuum	Nein	0	0	0	+0	-	Nein	Nein

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

#### 4.1.3.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Keine der untersuchten Proben wies eine sichtbare Beschädigung der Vakuumverpackung auf. Die Bewertung der zehn Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab zum Zeitpunkt des Erwerbs ausschließlich Scores von 0 (Tabelle 38). Die Proben 74-09 und 77-09 zeigten zum Untersuchungszeitpunkt eine produktuntypische geringe Gasbildung in der Packung. Während der produktgemäßen Lagerung der Fleischproben veränderten somit zwei Proben den Pack Blowing Score. Der Geruch der Lamm- und Schaffleischproben wurde in allen Fällen als produkttypisch frisch riechend charakterisiert. Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde bei keiner Lamm- oder Schaffleischprobe beobachtet (Tabelle 38).

Bei der bakterioskopischen Untersuchung lieferte keine der Lamm- oder Schaffleischproben einen Hinweis auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Nativpräparat (1250-fach) einer Lammfleischprobe mit Score 1, mikroskopisches Bild: kleine Stäbchen (a) und Kokken (b) (Probennummer 74-09)

#### 4.1.3.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Keine der untersuchten Lamm- oder Schaffleischproben war mikrobiologisch auffällig oder wies hohe Hefekeimzahlen auf. Zur Beurteilung wurden die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Rindfleisch (Stand 2010) herangezogen.

Die pH-Werte der Proben lagen mit einem Mittelwert von 5,85 (Minimum 5,74; Maximum 6,38) in einem für Lamm- und Schaffleisch größtenteils typischen Bereich (Probst et al., 2009).

#### 4.1.3.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei den Proben 23-09, 57-09, 77-09, 86-09, 88-09 und 89-09 ein positives, bei den übrigen Proben ein negatives Ergebnis (Tabelle 39). Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Proben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Die Probe 73-09, die vor Anreicherung negativ in der spezifischen PCR war, ergab nach Anreicherung ein positives PCR-Ergebnis. Die Lammfleischproben 88-09 und 89-09 gaben vor Anreicherung ein positives und nach Anreicherung ein negatives PCR-Signal. Für die übrigen Proben wurden sowohl die positiven als auch die negativen Ergebnisse bestätigt (Tabelle 39).

**Tabelle 39:** Lamm- und Schaffleischproben – PCR-Ergebnisse

Proben-nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
23-09	Neuseeland	Lammschulter	0	X		X	
57-09	Deutschland	Lammrücken	0	X		X	
72-09	Neuseeland	Lammkeule	0		X		X
73-09	Neuseeland	Lammhinterhaxe	0		X	X	
74-09	Neuseeland	Lammvorderhaxe	1		X		X
75-09	Australien	Schafsrücken	0		X		X
77-09	Neuseeland	Lammkotelett	2	X		X	
86-09	Neuseeland	Lammkeule	0	X		X	
88-09	Neuseeland	Lammkeule	0	X			X
89-09	Neuseeland	Lammlachse	0	X			X
<b>Gesamt</b>				<b>6</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

#### 4.1.4 Schweinefleisch

Zwölf zufällig ausgewählte Proben aus dem deutschen Handel wurden auf das Vorkommen von *C. estertheticum* untersucht. Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakteriologischer Befund, Geruch und Farbabweichungen wurden bei den Fleischproben erfasst bzw. ermittelt (Tabelle 40). Bei den Schweinefleischproben zeigte eine Probe zum Zeitpunkt der Untersuchung eine deutlich aufgeblähte Verpackung (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Stark aufgeblähte Verpackung eines deutschen Schweinekotelettes, Score 4 zum Zeitpunkt der Untersuchung, (Probe 95-09)

**Tabelle 40:** Schweinefleischproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
24-09	Deutschland	Kotelett	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
33-09	Deutschland	Schnitzel	Lose	Ja	3	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
34-09	Deutschland	Schnitzel	Lose	Ja	3	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
68-09	Deutschland	Minutensteak	Mod. A. <sup>2)</sup>	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
76-09	Italien	Oberschale	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
80-09	Deutschland	Rückensteak	Lose Folie	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
81-09	Deutschland	Oberschalensteak	Lose Folie	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
82-09	Deutschland	Lachse	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
87-09	Deutschland	Krustenbraten	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
90-09	Deutschland	Nackensteak	Mod. A. <sup>2)</sup>	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
92-09	Deutschland	Schinkenschnitzel	Mod. A. <sup>2)</sup>	Nein	0	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	Nicht beurteilbar <sup>1)</sup>	-	Nein	Nein
95-09	Deutschland	Kotelett	Vakuum	Ja	4 Monate	0	4	+ 4	-	Faulig	Nein

1) nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

2) modifizierte Atmosphäre

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

#### 4.1.4.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung

Keine der untersuchten, vakuumverpackten Proben wies eine sichtbare Beschädigung der Verpackung auf. Die Bewertung der Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab in vier von zwölf Proben Scores von 0 (Tabelle 40). Abweichend davon zeigte die Probe 95-09 zum Untersuchungszeitpunkt eine produktuntypische mittelgradige Gasbildung in der Packung. Sieben Proben (33-09, 34-09, 68-09, 80-09, 81-09, 90-09, 92-09) konnten nicht beurteilt werden, da sie entweder unter modifizierter Atmosphäre verpackt waren oder von einer Frischetheke stammten. Der Geruch der Schweinefleischproben wurde in elf von zwölf Fällen als produkttypisch frisch riechend charakterisiert. Für die Probe 95-09, die vakuum-verpackt war, wurde ein fauliger Geruch festgestellt (Tabelle 40). Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde bei keiner Schweinefleischprobe beobachtet. Keine Schweinefleischprobe lieferte während der mikroskopischen Untersuchung einen Hinweis auf eine Kontamination mit *C. estertheticum*.

#### 4.1.4.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Die Mittelwerte der aeroben mesophilen Keimzahl und der bei +30 °C gewachsenen *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas* spp. von den Proben, die mikrobiologisch auffällig waren, sind in Tabelle 41 wiedergegeben. Als mikrobiologisch auffällig eingestuft wurden – in Anlehnung an die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Schweinefleisch (Stand 2010) – Proben, deren mikrobiologische Werte bei der aeroben mesophilen Keimzahl  $5,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert), bei den *Enterobacteriaceae*  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) bzw.  $1,0 \times 10^5$  KbE/ml (Warnwert) und bei *Pseudomonas* spp.  $1,0 \times 10^6$  KbE/ml (Richtwert) überschritten. Außerdem wurden Proben vermerkt, die hohe Hefekeimzahlen (Inkubation bei +25 °C) aufwiesen (selbst gewählter Grenzwert:  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml, da Verderberscheinungen auf Fleisch ab etwa  $10^5$  KbE/ml auftreten (Reuter, 2003)).

**Tabelle 41:** Übersicht über Schweinefleischproben mit hohen Keimzahlen

Probennummer	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Aerobe mesophile Keimzahl	Enterobacteriaceae	Pseudomonas spp.	Hefen
24-09	Kotelett	0	> R	< R	> R	< SGR
33-09	Schnitzel	n. b.	> R	> W	> R	> SGR
34-09	Schnitzel	n. b.	> R	> W	> R	> SGR
95-09	Kotelett	4	> R	> W	< R	< SGR

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

< R: Keimzahl unter DGHM-Richtwert für rohes Schweinefleisch

> R: Keimzahl über DGHM-Richtwert für rohes Schweinefleisch

> W: Keimzahl über DGHM-Warnwert für rohes Schweinefleisch

< SGR: Keimzahl unter selbst gewähltem Richtwert

> SGR: Keimzahl über selbst gewähltem Richtwert

Die pH-Werte der Proben lagen mit einem Mittelwert von 5,96 (Minimum 5,78; Maximum 6,30) in einem für Schweinefleisch typischen Bereich (Beutling, 1992b).

#### 4.1.4.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei den Proben 33-09, 34-09, 80-09, 81-09, 82-09, 87-09, 90-09 und 92-09 ein positives, bei den übrigen Proben ein negatives Ergebnis (Tabelle 42). Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Proben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Die Schweinefleischproben 87-09 und 92-09 gaben vor Anreicherung ein positives und nach Anreicherung ein negatives PCR-Signal. Für die übrigen Proben konnten sowohl die positiven als auch die negativen Ergebnisse bestätigt werden (Tabelle 42).

**Tabelle 42:** Schweinefleischproben – PCR-Ergebnisse

Proben- nummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
24-09	Deutschland	Kotelett	0		X		X
33-09	Deutschland	Schnitzel	n. b.	X		X	
34-09	Deutschland	Schnitzel	n. b.	X		X	
68-09	Deutschland	Minutensteak	n. b.		X		X
76-09	Italien	Oberschale	0		X		X
80-09	Deutschland	Rückensteak	n. b.	X		X	
81-09	Deutschland	Oberschalensteak	n. b.	X		X	
82-09	Deutschland	Lachse	0	X		X	
87-09	Deutschland	Krustenbraten	0	X			X
90-09	Deutschland	Nackensteak	n. b.	X		X	
92-09	Deutschland	Schinkenschnitzel	n. b.	X			X
95-09	Deutschland	Kotelett	4		X		X
<b>Gesamt</b>				<b>8</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>6</b>

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

#### 4.1.5 Geflügelfleisch

Zehn zufällig ausgewählte Proben aus dem deutschen Handel wurden auf das Vorkommen von *C. estertheticum* untersucht. Herkunft und Fleischart, Art der Verpackung, Angaben zum MHD sowie Einteilung nach dem Pack Blowing Score, bakteriologischer Befund, Geruch und Farbabweichungen wurden bei den Fleischproben erfasst bzw. ermittelt (Tabelle 43).

**Tabelle 43:** Putenfleischproben – Ergebnisse der sensorischen und bakterioskopischen Untersuchungen

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Art der Verpackung	MHD überschritten	Zeitraum von Eingang bis Untersuchung [Wochen]	Pack Blowing Score bei Eingang	Pack Blowing Score bei Untersuchung	Veränderung Score Eingang-Untersuchung	Befund der Bakterioskopie	Geruchsabweichungen	Abweichung von produkttypischer Farbe
53-09	Deutschland	Schnitzel	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
54-09	Deutschland	Schnitzel	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
67-09	Italien	Schnitzel	Mod. A. 2)	Nein	0	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
69-09	Deutschland	Brustfilet	Vakuum	Nein	1	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
70-09	Deutschland	Schnitzel	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
78-09	Deutschland	Brustfilet	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
79-09	Deutschland	Schnitzel	Mod. A. 2)	Nein	0	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
83-09	Deutschland	Schnitzel	Vakuum	Nein	0	0	0	+ 0	-	Nein	Nein
84-09	Deutschland	Schnitzel	Mod. A. 2)	Nein	0	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein
91-09	Deutschland	Schnitzel	Mod. A. 2)	Nein	0	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	Nicht beurteilbar 1)	-	Nein	Nein

1) nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung  
 2) modifizierte Atmosphäre

-: keine großen, plumpen Stäbchen vorhanden

Alle aus dem Handel bezogenen, vakuumverpackten Putenfleischproben wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung einen Pack Blowing Score von 0 auf (Abbildung 25).

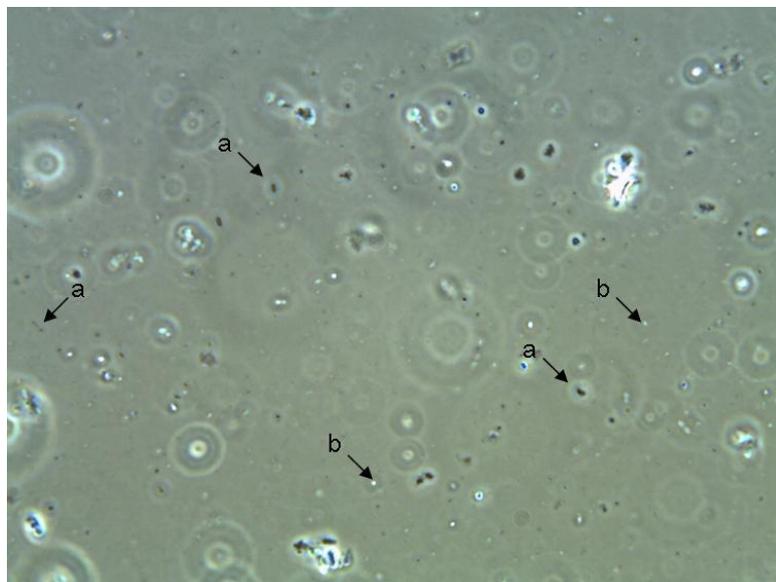


**Abbildung 25:** deutsches Putenbrustfilet, Score 0 zum Zeitpunkt der Untersuchung (Probe 78-09)

#### **4.1.5.1 Sensorische und bakterioskopische Untersuchung**

Keine der untersuchten Proben wies eine sichtbare Beschädigung der Vakuumverpackung auf. Die Bewertung der Proben mittels Pack Blowing Score (Boerema et al., 2007) ergab Scores von 0, sowohl zum Zeitpunkt des Probeneingangs als auch zum Zeitpunkt der Untersuchung (Tabelle 43). Etwa die Hälfte der Proben (67-09, 79-09, 84-09, 91-09) konnte jedoch nicht beurteilt werden, da sie unter modifizierter Atmosphäre verpackt war. Der Geruch der Putenfleischproben wurde in allen zehn Fällen als produkttypisch frisch riechend charakterisiert. Ein Abweichen der Fleischfarbe wurde bei keiner Putenfleischprobe beobachtet (Tabelle 43).

Keine Putenfleischprobe lieferte in der Bakterioskopie einen Hinweis auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Nativpräparat (1250-fach) einer Putenfleischprobe mit Score 0, mikroskopisches Bild: kleine Stäbchen (a) und Kokken (b) (Probennummer 78-09)

#### 4.1.5.2 Mikrobiologische Untersuchungen und pH-Wert-Messung

Nur die Probe 83-09 war mikrobiologisch auffällig, indem die Zahl der bei +30 °C gewachsenen *Enterobacteriaceae* über  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) lag. Als mikrobiologisch auffällig eingestuft wurden – in Anlehnung an die von der DGHM veröffentlichten mikrobiologischen Richt- und Warnwerte für rohes Geflügelfleisch (Stand 2010) – Proben, deren mikrobiologische Werte bei den *Enterobacteriaceae*  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml (Richtwert) bzw.  $1,0 \times 10^5$  KbE/ml (Warnwert) überschritten.

Die pH-Werte der Proben lagen mit einem Mittelwert von 6,01 (Minimum 5,91; Maximum 6,14) in einem für Putenfleisch größtenteils typischen Bereich (Obanor et al., 2005).

#### 4.1.5.3 Nachweis von *Clostridium estertheticum*

Der direkte Nachweis aus Fleischtropfsaft mittels PCR (Kapitel 3.2.2.4) erbrachte bei den Proben 79-09, 83-09 und 91-09 ein positives, bei den übrigen Proben ein negatives Ergebnis (Tabelle 44). Die externe Amplifikationskontrolle war bei allen untersuchten Proben positiv. Alle Proben wurden zur Bestätigung des Ergebnisses wie unter Kapitel 3.2.2.4 beschrieben für 21 Tage bei +4 °C angereichert und anschließend erneut molekularbiologisch untersucht. Die Putenfleischproben 79-09 und 83-09 gaben vor Anreicherung ein positives und nach Anreicherung ein negatives PCR-Signal. Die Proben 53-09, 54-09, 69-09, 70-09 und 84-09 waren vor Anreicherung *C. estertheticum*-negativ, nach Anreicherung jedoch positiv in der spezifischen PCR. Für die übrigen Proben konnten sowohl die positiven als auch die negativen Ergebnisse bestätigt werden (Tabelle 44).

**Tabelle 44:** Putenfleischproben – PCR-Ergebnisse

Probennummer	Herkunft	Teilstück	Pack Blowing Score bei Untersuchung	PCR-Ergebnis vor Anreicherung		PCR-Ergebnis nach Anreicherung	
				Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
53-09	Deutschland	Schnitzel	0		X	X	
54-09	Deutschland	Schnitzel	0		X	X	
67-09	Italien	Schnitzel	n. b.		X		X
69-09	Deutschland	Brustfilet	0		X	X	
70-09	Deutschland	Schnitzel	0		X	X	
78-09	Deutschland	Brustfilet	0		X		X
79-09	Deutschland	Schnitzel	n. b.	X			X
83-09	Deutschland	Schnitzel	0	X			X
84-09	Deutschland	Schnitzel	n. b.		X	X	
91-09	Deutschland	Schnitzel	n. b.	X		X	
<b>Gesamt</b>				<b>3</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>4</b>

n. b.: nicht beurteilbar, aufgrund der Art der Verpackung

## 4.1.6 Sequenzierung von Isolaten aus Fleisch

### 4.1.6.1 Milchsäurebakterien

Drei Packungen Wildfleisch aus Neuseeland wurden mikrobiologisch näher untersucht. Ziel war es, die so erhaltenen 21 Milchsäurebakterien-Isolate zu sequenzieren und zu identifizieren (Tabelle 45) und diese *Lactobacillus*-Spezies zu einem späteren Zeitpunkt (Kapitel 4.2) auf ihre antimikrobielle Wirkung gegenüber verschiedenen *C. estertheticum*-Stämmen zu testen.

**Tabelle 45:** Ergebnisse der Milchsäurebakterien-Sequenzierung

Fleischart	Herkunftsland	Aerobe/Anaerobe Bebrütung	Isolatnummer	Ergebnis Sequenzierung
Hirsch 01-09	Neuseeland	Anaerob	MS 01	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 02	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 03	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 04	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 05	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 06	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 07	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 08	<i>Carnobacterium divergens</i>
		Aerob	MS 09	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 10	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 11	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 12	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 13	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 14	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 15	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 16	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 17	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 18	<i>Carnobacterium divergens</i>
Hirsch 21-09	Neuseeland	Aerob	MS 19	<i>Carnobacterium divergens</i>
			MS 20	<i>Carnobacterium divergens</i>
Hirsch 22-09	Neuseeland	Aerob	MS 21	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>

MS = Milchsäurebakterien

Von den 21 zufällig ausgewählten und isolierten Milchsäurebakterien wurden 20 der Art *Carnobacterium divergens* und ein Isolat der Art *Carnobacterium maltaromaticum* zugeordnet.

#### 4.1.6.2 Hefen

Im Zusammenhang mit dem Verderbsgeschehen des „Blown Pack Spoilage“ wurden des Öfteren psychrophile Hefen mit zum Teil mehr als  $1,0 \times 10^4$  KbE/ml in den Proben nachgewiesen (Abbildung 27). Von elf Proben wurden zufällig ausgewählte Hefen unter Kühlbedingungen isoliert und anschließend sequenziert (Tabelle 46).



**Abbildung 27:** Nativpräparat (1000-fach) einer Rindfleischhandelsprobe, mikroskopisches Bild: sehr viele Hefen (Pfeile) (Probe 13-08 CH)

**Tabelle 46:** Ergebnisse der Hefen-Sequenzierung

Fleischart	Herkunftsland	Isolat-nummer	Ergebnis Sequenzierung
Rind 01-08	Deutschland	H 01	<i>Candida zeylanoides</i>
Rind 02-08	Deutschland	H 02	<i>Candida zeylanoides</i>
Rind 03-08	Deutschland	H 03	<i>Candida zeylanoides</i>
Rind 13-09	Südamerika	H 04	<i>Candida spp.</i>
Rind 14-09	Südamerika	H 05	<i>Kluyveromyces lodderae</i>
Hirsch 21-09	Neuseeland	H 06	<i>Cryptococcus curvatus</i>
Hirsch 22-09	Neuseeland	H 07	<i>Rhodotorula glutinis</i>
		H 08	<i>Candida zeylanoides</i>
Kalb 37-09	Niederlande	H 09	<i>Candida sake</i>
		H 10	<i>Candida sake</i>
Kalb 39-09	Niederlande	H 11	<i>Candida sake</i>
		H 12	<i>Candida sake</i>
		H 13	<i>Candida sake</i>
Rind (fremdes Isolat)	Brasilien	H 14	<i>Candida zeylanoides</i>
Rind (fremdes Isolat)	Brasilien	H 15	<i>Kluyveromyces lodderae</i>

---

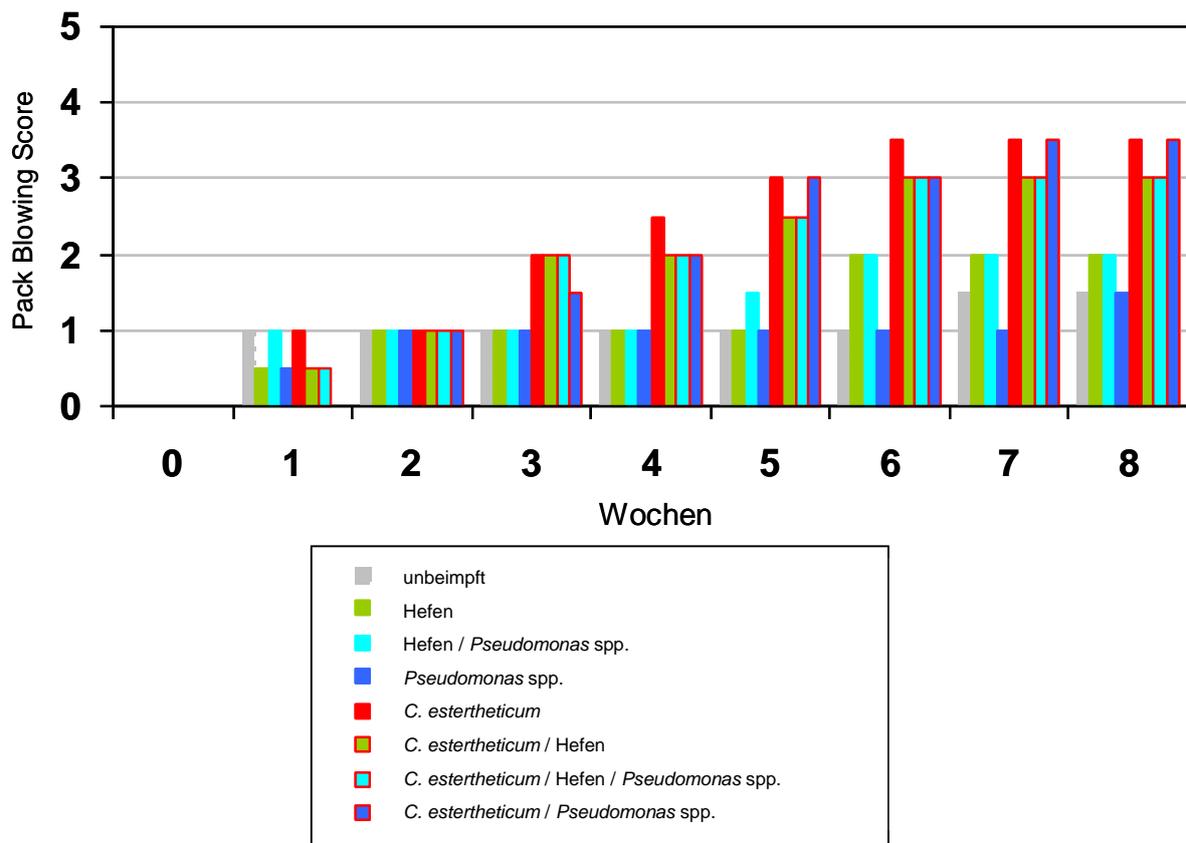
Von den 15 isolierten und identifizierten Hefen wurden elf Isolate der Gattung *Candida* zugeordnet. Von diesen elf Hefen gehörten fünf zur Spezies *Candida sake* und fünf zu *Candida zeylanoides*, während ein Hefeisolat von einer Rindfleischprobe aus Brasilien nur als *Candida* spp. identifiziert wurde. Neben *Candida*-Arten konnten noch vier weitere Hefen aus den Proben isoliert werden. Davon wurden zwei als *Kluyveromyces lodderae* und jeweils eine als *Cryptococcus curvatus* und *Rhodotorula glutinis* bestimmt.

## **4.2 Challengetests mit *Clostridium estertheticum***

Um das Verderbgeschehen durch *C. estertheticum* nachverfolgen zu können, wurden Challengeversuche mit Rind- und Schweinefleisch durchgeführt. In den Untersuchungen wurden zum einen DSMZ-Stämme und zum anderen Umweltisolate verwendet. Ziel war es, zu überprüfen, ob durch Stämme, die an das Lebensmittel Rindfleisch adaptiert sind, eine vorzeitige Aufgasung von vakuumverpacktem Fleisch stattfindet. Gleichzeitig sollte in den Versuchen auch untersucht werden, inwiefern Hefen und Pseudomonaden einen Einfluss auf das Verderbgeschehen haben. In weiteren Versuchen sollte eine mögliche Schutzwirkung bestimmter Milchsäurebakterien gegen den Verderb durch *C. estertheticum* getestet werden.

### **4.2.1 Rindfleisch und *Clostridium estertheticum*-Stämme der DSMZ**

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbuteln gelagerten Rindfleischstücken, die nach einem definierten Beimpfungsschema mit den *C. estertheticum*-Stämmen DSMZ 8809 und DSMZ 14864 sowie festgelegten Hefen- und Pseudomonadenstämmen kontaminiert wurden, wurde über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen bestimmt (Abbildungen 28 und 29). Die Daten sind Medianwerte der Ergebnisse der im Doppelansatz durchgeführten und wiederholten Challengeversuche.



**Abbildung 28:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen (DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Innerhalb der ersten zwei Wochen nahm der Pack Blowing Score aller Beimpfungsansätze von 0 auf 1 zu. Ein Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den kontaminierten Fleischstücken war bis zu diesem Zeitpunkt nicht festzustellen (Abbildung 28). Danach nahm die Aufblähung in den Packungen mit *C. estertheticum* stark zu, so dass nach achtwöchiger Lagerung ein Score von 3 bis 3,5 erreicht wurde (Abbildung 29). Hierbei gasten die Packungen, die Hefen enthielten, etwas weniger stark auf (Medianwerte um 0,5 kleiner). Der Pack Blowing Score der Negativkontrollen stieg im selben Zeitraum auf 1,5 an. Bei den Packungen ohne Clostridien blähten diejenigen, die Hefen enthielten, stärker auf (Medianwerte um 0,5 höher) als diejenigen ohne Hefen. Die Medianwerte des Pack Blowing Score erreichten hier am Ende der Lagerzeit 1,5 ohne Hefen und 2 mit Hefen.

Die stärkste Aufgasung fand bei den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *C. estertheticum* + Hefen und mit *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren (Abbildung 29). Im Vergleich dazu konnte in den nicht mit *C. estertheticum* kontaminierten Proben eine geringere Bläschenbildung beobachtet werden. Pseudomonaden und Hefen trugen auch in Kombination nicht zu einer Verstärkung der Aufgasung bei (Abbildung 29).



Woche 0, Score 0



Woche 1, Score 1



Woche 2, Score 2



Woche 3, Score 3

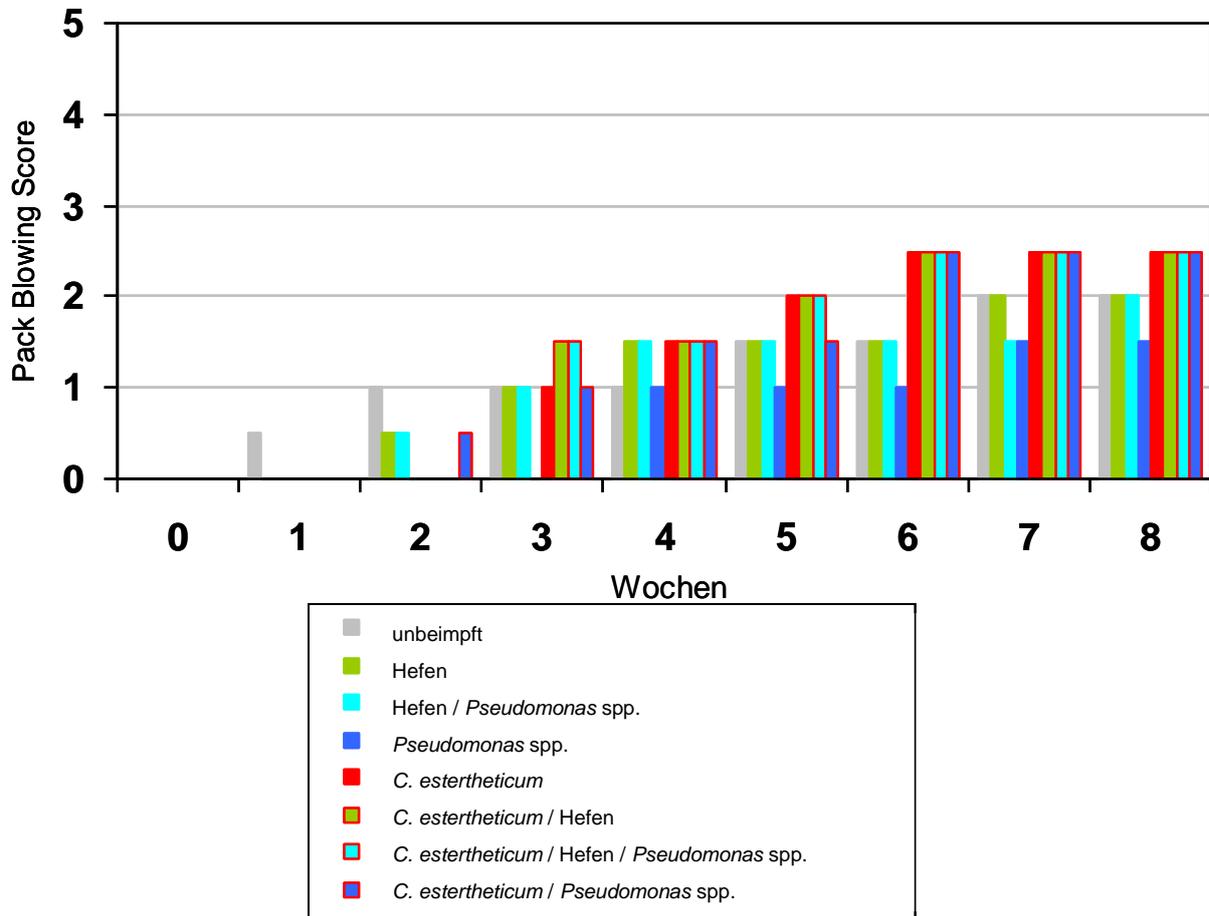


Woche 4 bis 8, Score 4

**Abbildung 29:** Entwicklung des Pack Blowing Score von Score 0 bis Score 4 im Verlauf der Lagerung von acht Wochen einer mit *C. estertheticum* beimpften Rindfleischprobe

#### 4.2.2 Rindfleisch und weitere *Clostridium estertheticum*-Stämme

Neben Beimpfungsversuchen mit *C. estertheticum*-Stämmen der DSMZ wurden identische Versuche mit anderen *C. estertheticum*-Stämmen (im Folgenden Nicht-DSMZ-Stämme genannt) durchgeführt. Auch hier wurde der Verlauf des Pack Blowing Score über einen Zeitraum von acht Wochen beobachtet (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen (Nicht-DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Innerhalb der ersten zwei Wochen stieg der Pack Blowing Score der unbeimpften Proben und der Beimpfungsansätze mit Hefen, mit Hefen und *Pseudomonas* spp. und mit *C. estertheticum* und *Pseudomonas* spp. an, wohingegen die übrigen Proben keine Bläschenbildung zeigten. Die Negativkontrollen gaben in diesem Zeitraum am stärksten auf (Abbildung 31). Danach nahm die Aufblähung in den Packungen mit

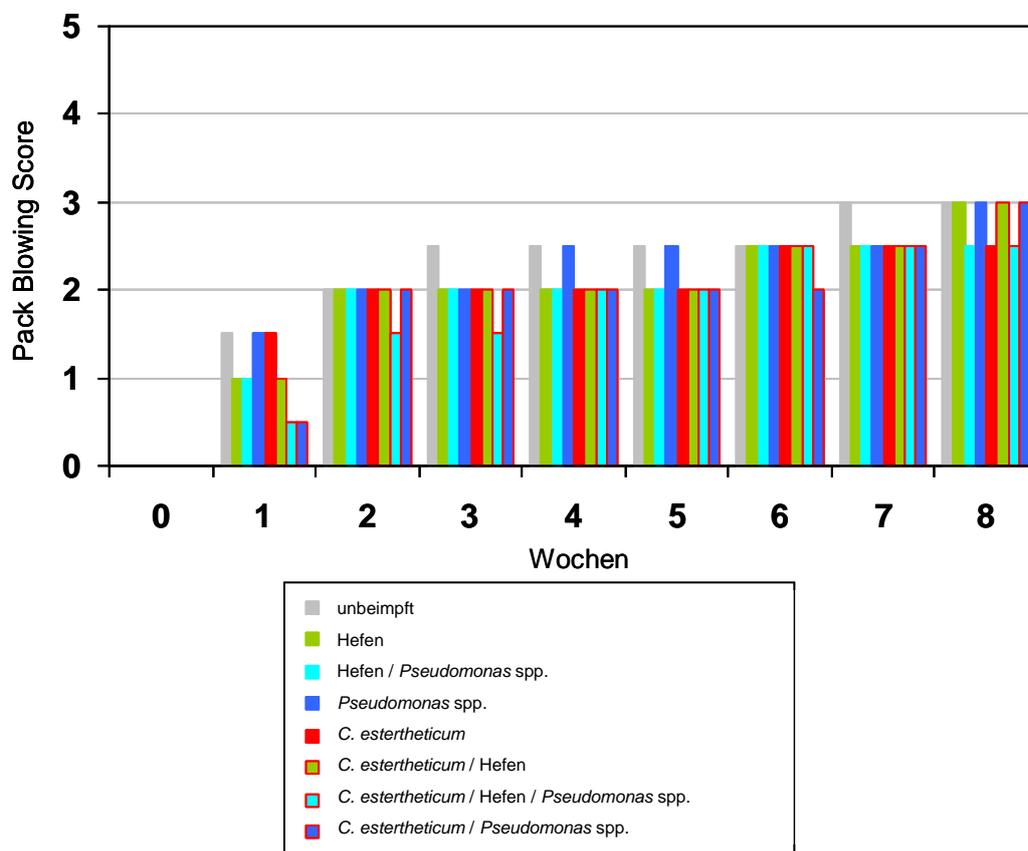
*C. estertheticum* stärker zu, so dass bei diesen Proben nach achtwöchiger Lagerung ein Score von 2,5 erreicht wurde.

Bei den Packungen ohne Clostridien blähten diejenigen, die Hefen enthielten, etwas schneller und stärker auf als die ohne Hefen. Die Endwerte des Pack Blowing Score aller Packungen ohne *C. estertheticum* lagen zwischen 1,5 und 2. Im Vergleich dazu stieg der Pack Blowing Score der Negativkontrollen ebenfalls auf Werte von 2.

Die stärkste Aufgasung fand in den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *C. estertheticum* + Hefen und mit *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren. Eine geringere Aufblähung wurde bei allen Proben beobachtet, die nicht mit *C. estertheticum* kontaminiert wurden. Pseudomonaden und Hefen trugen auch in Kombination nicht zu einer Verstärkung der Aufgasung bei (Abbildung 30).

#### 4.2.3 Schweinefleisch und *Clostridium estertheticum*-Stämme der DSMZ

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbuteln gelagerten Schweinefleischstücken, die nach einem definierten Beimpfungsschema kontaminiert wurden, wurde über einen Zeitraum von acht Wochen beobachtet (Abbildung 31).



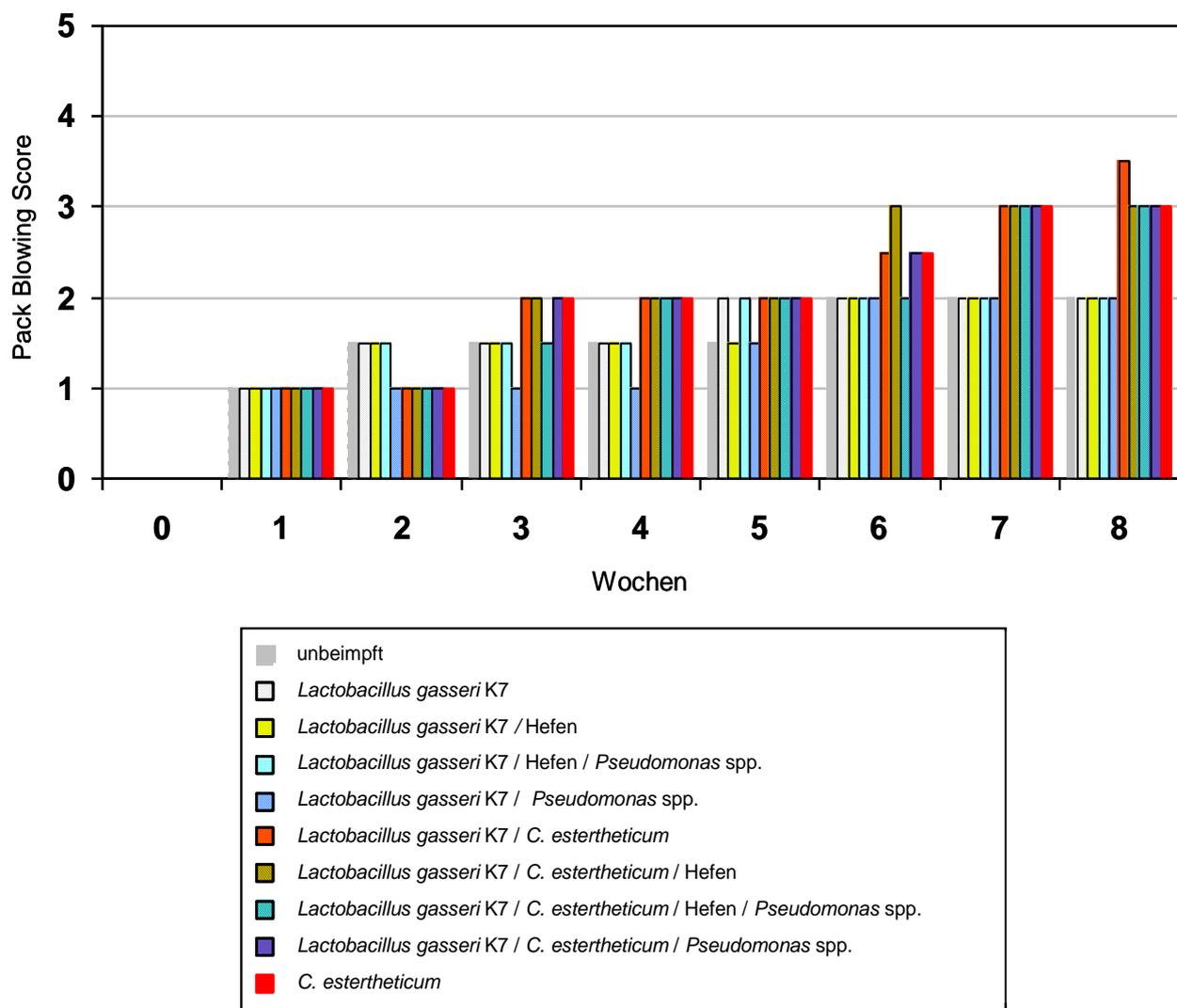
**Abbildung 31:** Medianwert des Pack Blowing Score bei beimpften Schweinefleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen (DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Innerhalb der ersten zwei Wochen nahm der Pack Blowing Score der Beimpfungsansätze von 0 bis auf maximal 2 zu. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den kontaminierten Koteletts war bis zu diesem Zeitpunkt nicht festzustellen (Abbildung 31). Danach nahm die Aufblähung in allen Packungen nur noch leicht zu, so dass nach achtwöchiger Lagerung Scores zwischen 2,5 und 3 erreicht wurden. Hierbei gasten alle Packungen annähernd gleich stark und gleich schnell auf (Abbildung 31). Der Pack Blowing Score der Negativkontrollen stieg im selben Zeitraum auf 3 an.

### 4.3 Challengetests mit Milchsäurebakterien

#### 4.3.1 *Lactobacillus* spp. und *Clostridium estertheticum*-Stämme der DSMZ

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbuteln gelagerten Rindfleischstücken, die nach einem definierten Beimpfungsschema mit verschiedenen Mikroorganismen, u. a. den DSMZ-Stämmen 8809 und 14864, und der potentiellen Schutzkultur *L. gasseri* K7 (Bogovic Matijasic et al., 2007) kontaminiert wurden, wurde über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen bestimmt (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen bei Einsatz von *L. gasseri* K7 als Schutzkultur (DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Innerhalb der ersten zwei Wochen nahm der Pack Blowing Score der Proben von 0 auf maximal 1,5 zu. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Negativkontrollen und den kontaminierten Fleischstücken war bis zu diesem Zeitpunkt nicht festzustellen (Abbildung 33). Danach nahm die Aufblähung in den Packungen mit *C. estertheticum* stark zu, so dass nach achtwöchiger Lagerung ein Score zwischen 3 und 3,5 erreicht wurde. Hierbei gasten alle Packungen mit *C. estertheticum* annähernd gleich stark und gleich schnell auf. Der Pack Blowing Score der Negativkontrollen stieg im selben Zeitraum auf 2 an. Bei den Packungen ohne Clostridien blähten ebenfalls alle Proben annähernd gleich stark und gleich schnell auf bis zu einem Pack Blowing Score von 2. Eine alleinige Beimpfung mit *L. gasseri* K7 führte zu keinen deutlichen Unterschieden im Vergleich zu den anderen Packungen ohne *C. estertheticum*.

Die stärkste Aufgasung fand bei den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum*, mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + Hefen und mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren (Abbildung 32).

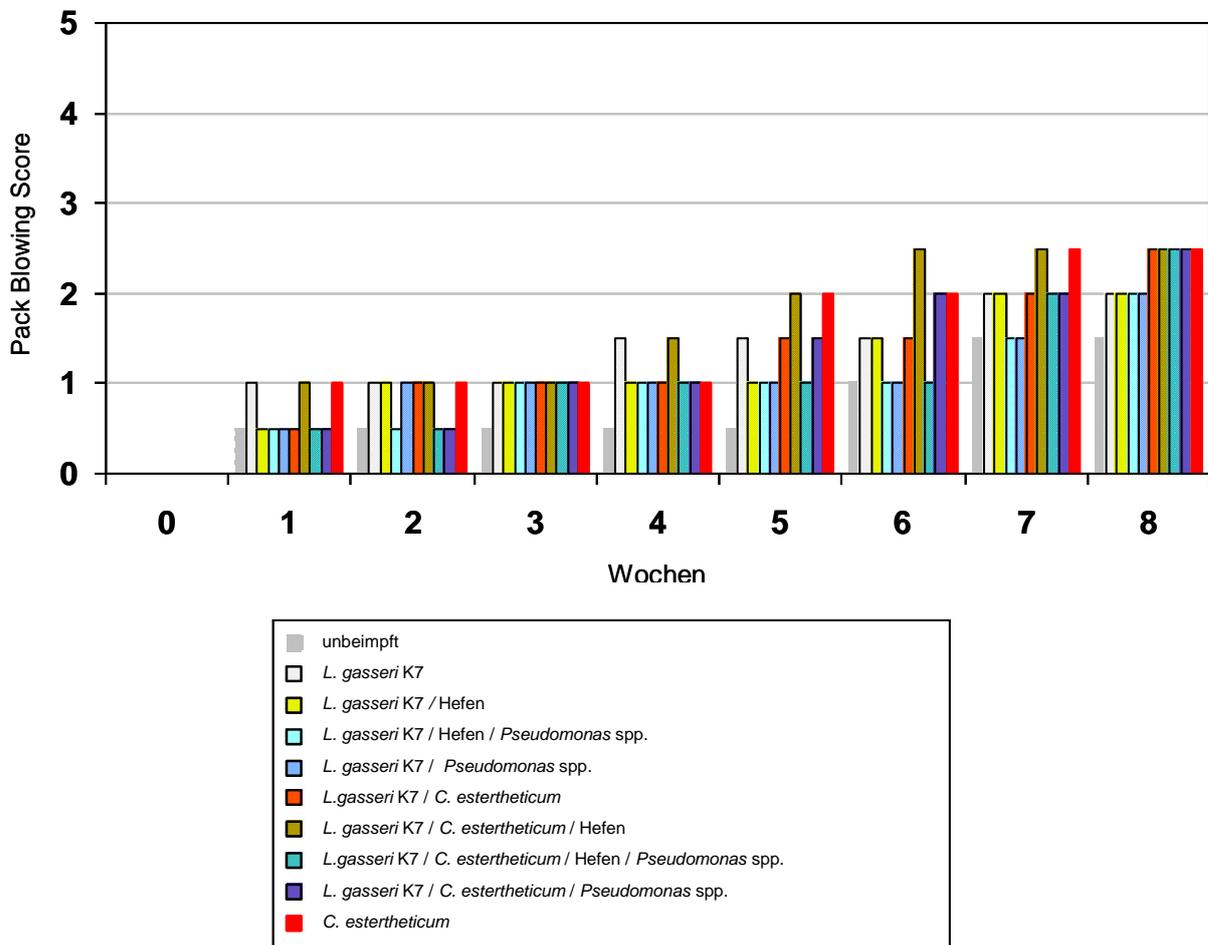
#### **4.3.2 *Lactobacillus* spp. und weitere *Clostridium estertheticum*-Stämme**

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbeuteln gelagerten Rindfleischstücken, die nach einem definierten Beimpfungsschema mit verschiedenen Mikroorganismen, u. a. den Nicht-DSMZ-*C. estertheticum*-Stämmen C 214, C 216, C 217 und C 218, und der potentiellen Schutzkultur *L. gasseri* K7 (Bogovic Matijasic et al., 2007) kontaminiert wurden, wurde über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen bestimmt (Abbildung 33).

Die Aufblähung aller Packungen nahm bis zur dritten Woche annähernd gleich stark zu, wobei Pack Blowing Scores von durchschnittlich 1 erreicht wurden. Ab der vierten Woche gasten die Proben mit *C. estertheticum* stärker auf als die übrigen Packungen. Nach achtwöchiger Lagerung wurde bei ersteren ein Pack Blowing Score von 2,5 erreicht. Hierbei gasten die Packungen, die *L. gasseri* K7, Clostridien und Hefen enthielten, etwas schneller, aber am Ende der Lagerzeit nicht stärker auf (Abbildung 33).

Bei den Packungen ohne Clostridien blähten alle Proben annähernd gleich stark und gleich schnell auf. Dabei wurde ein Pack Blowing Score von 2 erreicht. Der Pack Blowing Score der Negativkontrolle nahm im selben Zeitraum auf 1,5 zu. Eine alleinige Beimpfung mit *L. gasseri* K7 führte nach achtwöchiger Lagerung zu

denselben Werten wie bei den anderen Packungen ohne *C. estertheticum* (Abbildung 33).

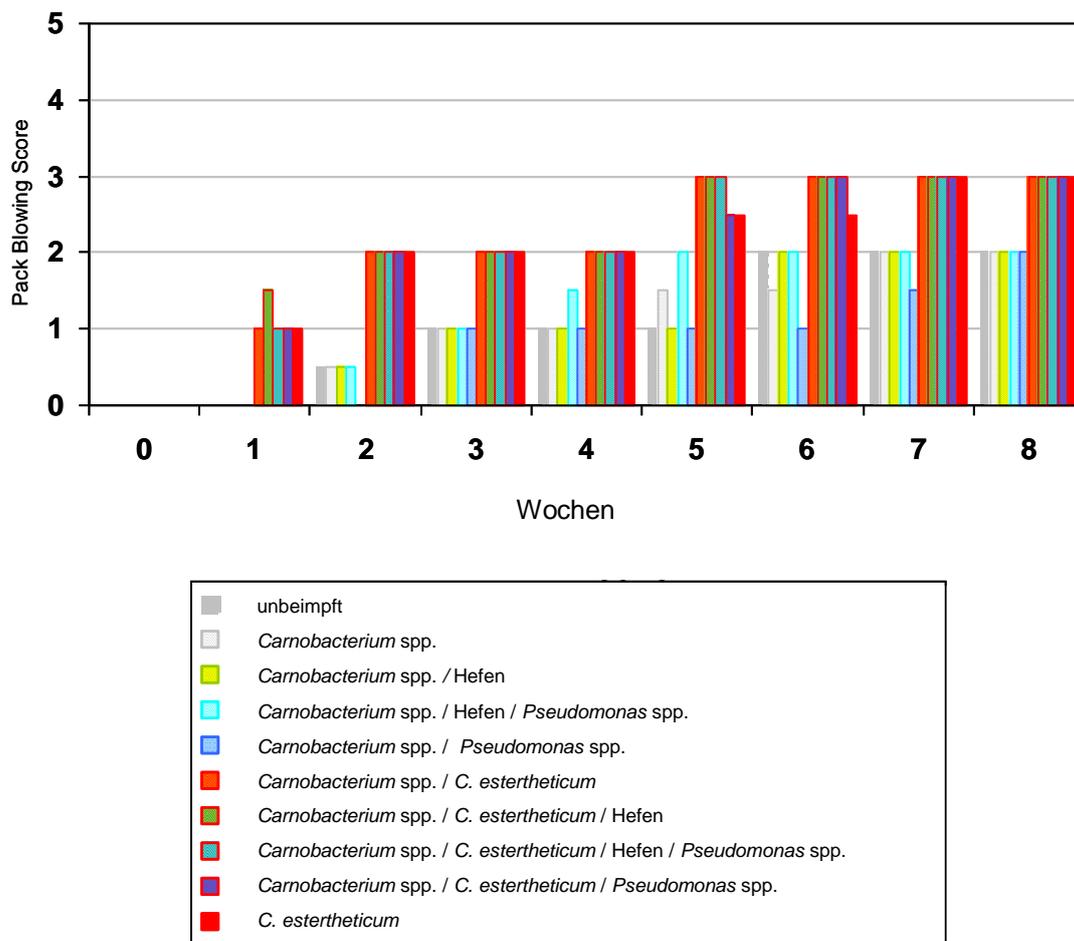


**Abbildung 33:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen bei Einsatz von *L. gasseri* K7 als Schutzkultur (Nicht-DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Die stärkste Aufgasung fand bei den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum*, mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + Hefen und mit *L. gasseri* K7 + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren. Eine geringere Aufblähung bis zu einem Pack Blowing Score von 1,5 bis 2 wurde bei allen Proben beobachtet, die nicht mit *C. estertheticum* kontaminiert wurden (Abbildung 33).

### 4.3.3 *Carnobacterium* spp. und *Clostridium estertheticum*-Stämme der DSMZ

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbuteln gelagerten Rindfleischstücken, die nach einem definierten Beimpfungsschema mit verschiedenen Mikroorganismen, u. a. den DSMZ-Stämmen 8809 und 14864 und den potentiellen Schutzkulturen *Carnobacterium divergens* und *Carnobacterium maltaromaticum* (Brillet et al., 2005; Laursen et al., 2006) als Pool kontaminiert wurden, wurde über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen bestimmt (Abbildung 34).

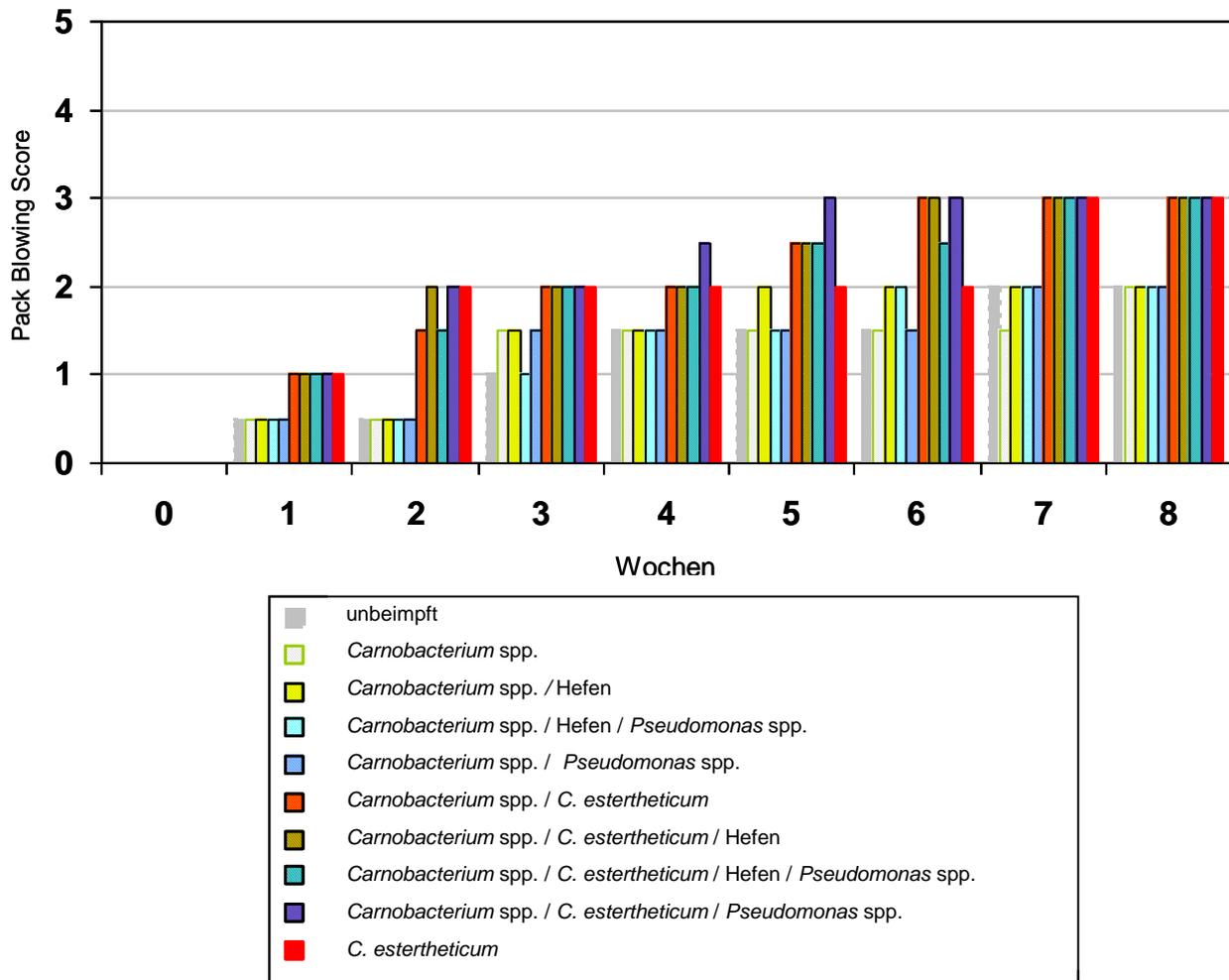


**Abbildung 34:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen unter Einsatz von *Carnobacterium* spp. als Schutzkultur (DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Innerhalb der ersten Woche nahm nur der Pack Blowing Score der Proben mit *C. estertheticum* zu (Abbildung 34). Die Aufblähung in den Packungen mit *C. estertheticum* nahm im weiteren Verlauf stark zu, so dass nach achtwöchiger Lagerung ein Pack Blowing Score von 3 erreicht wurde. Hierbei gaben alle Packungen mit *C. estertheticum* annähernd gleich stark und gleich schnell auf. Bei den Packungen ohne Clostridien blähten die Proben, die *Carnobacterium* spp., Hefen und *Pseudomonas* spp. enthielten, am schnellsten auf. Die Beimpfungsansätze mit *Carnobacterium* spp. und *Pseudomonas* spp. zeigten den langsamsten Anstieg des Pack Blowing Score. Insgesamt erreichten jedoch alle Proben ohne Clostridien einen Endwert des Pack Blowing Score von 2. Der Pack Blowing Score der Negativkontrolle nahm im selben Zeitraum ebenfalls auf 2 zu. Die stärkste Aufgasung fand bei den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum*, mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + Hefen und mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren. Eine geringere Aufblähung bis maximal Score 2 wurde bei allen Proben beobachtet, die nicht mit *C. estertheticum* kontaminiert wurden (Abbildung 34).

#### **4.3.4 *Carnobacterium* spp. und weitere *Clostridium estertheticum*-Stämme**

Der Verlauf des Pack Blowing Score von in Vakuumbeuteln gelagerten Rindfleischstücken, die nach einem bestimmten Beimpfungsschema mit verschiedenen Mikroorganismen, u. a. den Nicht-DSMZ-*C. estertheticum*-Stämmen C 214, C 216, C 217, C 218 und den potentiellen Schutzkulturen *Carnobacterium divergens* und *Carnobacterium maltaromaticum* (Brillet et al., 2005; Laursen et al., 2006) im Pool kontaminiert wurden, wurde über einen Beobachtungszeitraum von acht Wochen bestimmt (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Medianwerte des Pack Blowing Score bei beimpften Rindfleischstücken über einen Zeitraum von acht Wochen unter Einsatz von *Carnobacterium* spp. als Schutzkultur (Nicht-DSMZ-Stämme von *C. estertheticum*)

Die Aufblähung der Packungen mit *C. estertheticum* nahm stark zu, so dass nach achtwöchiger Lagerung ein Pack Blowing Score von 3 erreicht wurde. Hierbei erreichten die Packungen, die *Carnobacterium* spp., *C. estertheticum* und *Pseudomonas* spp. enthielten, am schnellsten den Endwert (Abbildung 35). Bei den Packungen ohne Clostridien gab es keine deutlichen Unterschiede der Aufgasung. All diese Proben erreichten Endwerte des Pack Blowing Score von 2. Der Pack Blowing Score der Negativkontrolle nahm im selben Zeitraum gleichfalls auf 2 zu (Abbildung 35).

---

Die stärkste Aufgasung fand bei den Proben statt, die mit *C. estertheticum*, mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum*, mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp., mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + Hefen und mit *Carnobacterium* spp. + *C. estertheticum* + *Pseudomonas* spp. + Hefen beimpft waren. Eine geringere Aufblähung bis Score 2 wurde bei allen Proben beobachtet, die nicht mit *C. estertheticum* kontaminiert wurden (Abbildung 35).

## 4.4 Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel

### 4.4.1 Wirksamkeit auf neuen Schneidbrettern

Die PCR-Ergebnisse der Untersuchungen auf Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf mit *C. estertheticum* beimpften Schneidbrettern mit neuer, glatter Oberfläche wurden semiquantitativ ermittelt (Tabelle 47). Dabei wurden die Resultate der zweimal im Dreifachansatz durchgeführten Versuche bestimmt.

**Tabelle 47:** Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf glatter Oberfläche von mit *C. estertheticum* beimpften Schneidbrettplatten (zweimal im Dreifachansatz durchgeführt)

Behandlung mit	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Negativkontrolle	- / -	- / -	- / -
Positivkontrolle	+++ / +++	+++ / +++	- / +++
Wasser, 45 °C	- / -	- / ++	- / -
Wasserdampf	- / +++	- / +++	- / +++
UVC-Licht	++ / -	- / -	- / -
Antisept 33 PES	- / -	- / -	- / -
Seewaclean	- / -	+ / +	- / -
Steril fd	- / -	+ / -	+ / -
Super Eiweiß- und Fettlöserpulver	+ / -	+ / -	- / -
Mucozit B	- / -	- / -	+ / -
Pursept-FD	- / +	- / +	- / ++
Wofasteril	- / +	- / +	- / -
Ethanol, 70%	+++ / +++	- / +++	+++ / +++

-: PCR negativ

+: PCR positiv, schwache Bande  
 ++: PCR positiv, mittelstarke Bande  
 +++: PCR positiv, starke Bande

Die Negativkontrollen waren in allen Fällen negativ. Die Positivkontrollen waren in fünf Ansätzen positiv mit einer starken Bande im PCR-Nachweis. Ein Ergebnis war negativ. Ethanol führte in einer Probe zu einer Verminderung der Sporen bis unter die Nachweisgrenze. Die anderen fünf Proben zeigten starke Banden. Wasserdampf und Pursept-FD waren in der Lage, bei der Hälfte der Proben die Sporen auf den Schneidbrettplatten bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Die andere Hälfte zeigte für Wasserdampf starke Banden, für Pursept-FD eine mittelstarke und zwei schwache Banden. Die Anwendung der Präparate Seewaclean, Steril fd, Super Eiweiß- und Fettlöserpulver und Wofasteril konnte in vier von sechs Fällen eine

Verminderung der Sporenanzahl bis unter die Nachweisgrenze bewirken. Die übrigen zwei Proben zeigten bei allen vier Reinigungs- und Desinfektionsmitteln schwache Banden in der PCR.

Durch warmes Wasser, UVC-Licht und Mucozit B konnten die *C. estertheticum*-Sporen in fünf von sechs Proben so stark reduziert werden, dass sie nicht mehr nachweisbar waren. Eine Probe zeigte bei den ersten beiden Methoden eine mittelstarke Bande, bei Mucozit B eine schwache Bande. Das Desinfektionsmittel Antisept 33 PES konnte als einzige Methode die Sporen auf allen verwendeten, glatten Schneidbrettplatten bis unter die Nachweisgrenze eliminieren.

#### 4.4.2 Wirksamkeit auf eingeritzten Schneidbrettern

Die PCR-Ergebnisse der Untersuchungen auf Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf mit *C. estertheticum* beimpften Schneidbrettern mit eingeritzter Oberfläche wurden semiquantitativ bestimmt (Tabelle 48). Dabei wurden die Resultate der zweimal im Dreifachansatz durchgeführten Versuche ermittelt.

**Tabelle 48:** Wirksamkeit ausgewählter Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf eingeritzter Oberfläche von mit *C. estertheticum* beimpften Schneidbrettplatten (zweimal im Dreifachansatz durchgeführt)

Behandlung mit	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Negativkontrolle	- / -	- / -	- / -
Positivkontrolle	+++ / +++	+++ / +++	+ / +++
Wasser, 45 °C	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
Wasserdampf	+++ / +++	+++ / +++	+++ / +++
UVC-Licht	+ / +++	++ / -	+++ / +++
Antisept 33 PES	- / +	- / -	- / +
Seewaclean	- / +	- / ++	- / ++
Steril fd	- / +++	- / +++	- / +++
Super Eiweiß- und Fettlöserpulver	+++ / +++	++ / +++	+++ / +++
Mucozit B	- / -	- / +	- / -
Pursept-FD	- / -	- / -	- / +
Wofasteril	- / +	- / -	- / +
Ethanol, 70%	++ / +++	++ / +++	+++ / +

-: PCR negativ

+: PCR positiv, schwache Bande

++: PCR positiv, mittelstarke Bande

+++ : PCR positiv, starke Bande

Die Negativkontrollen waren in allen Fällen negativ und die Positivkontrollen in mit fünf starken Banden und einer schwachen Bande immer positiv. Warmes Wasser, Wasserdampf, Super Eiweiß- und Fettlöserpulver und Ethanol führten in keiner Probe zu einer Verminderung der Sporen bis unter die Nachweisgrenze. Eine mit Super Eiweiß- und Fettlöserpulver bearbeitete Probe zeigte eine mittelstarke Bande. Bei der Ethanolbehandlung wiesen zwei Proben mittelstarke Banden und darüber hinaus eine Probe eine schwache Bande auf. Die restlichen Ergebnisse der mit diesen Präparaten behandelten Proben zeigten starke Banden. UVC-Licht führte bei einer Schneidbrettplatte zu einer Verminderung der Sporen bis unter die Nachweisgrenze. Für die übrigen Proben waren eine schwache, eine mittelstarke und drei starke Banden zu verzeichnen. Seewaclean und Steril fd konnten bei der Hälfte der Proben die *C. estertheticum*-Sporen bis unter die Nachweisgrenze reduzieren.

Die übrigen Proben mit Seewaclean-Behandlung wiesen zwei mittelstarke und eine schwache Bande auf. Die weiteren Ansätze mit Steril fd-Anwendung zeigten starke Banden. Antisept 33 PES und Wofasteril waren in der Lage, bei vier von sechs Proben die Sporen auf den Schneidbrettplatten bis unter die Nachweisgrenze zu reduzieren. Die anderen Proben zeigten für beide Präparate schwache Banden. Durch Mucozit B und Pursept-FD konnten die *C. estertheticum*-Sporen in fünf von sechs Proben so stark reduziert werden, dass sie nicht mehr nachweisbar waren. Die sechste Probe zeigte bei beiden Desinfektionsmitteln eine schwache Bande. Keines der getesteten Präparate konnte die Sporen auf allen verwendeten, eingeritzten Schneidbrettplatten bis unter die Nachweisgrenze eliminieren.

#### **4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Verminderung der Sporen auf glatten Schneidbrettplatten besser gelang als auf eingeritzten. Mit weniger als sechs negativen Proben für alle zwölf Ansätze zeigten Ethanol, Wasserdampf, Super Eiweiß- und Fettlöserpulver und warmes Wasser die geringsten Erfolge bei der Reduzierung der Sporen auf den Schneidbrettplatten. UVC-Licht führte in sechs Fällen, Seewaclean und Steril fd in sieben Fällen zu negativen PCR-Ergebnissen. Pursept-FD und Wofasteril verminderten in acht Fällen die Sporen auf den Schneidbrettplatten bis unter die Nachweisgrenze. Durch die Anwendung von Antisept 33 PES und Mucozit B konnten in zehn von zwölf Proben negative PCR-Ergebnisse erzielt werden.

## 5 DISKUSSION

In den letzten Jahren rückte das Verderbsgeschehen des sogenannten „Blown Pack Spoilage“ bei vakuumverpacktem Rindfleisch durch *C. estertheticum* vermehrt in den Vordergrund. Allen vorangegangenen Studien zu dieser Verderbsproblematik fehlen bislang Aussagen über das Vorkommen dieser psychrophilen Clostridien auf unverdorbenen Fleischstücken. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neben den Untersuchungen von Verdachtsproben einen Überblick über das Vorkommen dieser *Clostridium* spp. auf im Handel erhältlichen unverdorbenen Rind-, Lamm- und Wildfleischwaren zu erhalten. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob auch andere Fleischsorten, wie Schweine- oder Geflügelfleisch, mit *C. estertheticum* kontaminiert sein könnten und ob dieser Mikroorganismus somit weiter verbreitet ist als bisher vermutet

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren 20 Rind- und fünf Wildfleisch-Verdachtsproben von „Blown Pack Spoilage“ betroffen. Auffällig war, dass es sich bei diesen Produkten immer um Fleisch von Wiederkäuern handelte. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Art des Futters und die Verdauung einen Zusammenhang mit dem Verderb durch psychrophile Clostridien haben könnten.

Eine Kontamination mit *C. estertheticum* konnte zudem in vielen unverdächtigen Proben (darunter auch Fleisch von Nicht-Wiederkäuern) aus dem deutschen und schweizerischen Handel nachgewiesen werden. Bei den nach Anreicherung PCR-positiv getesteten Fleischstücken handelte es sich um Rind- ( $n = 63$  von insgesamt 158), Wild- ( $n = 6$  von insgesamt 8), Lamm- ( $n = 5$  von insgesamt 10), Schweine- ( $n = 6$  von insgesamt 12) und Putenfleisch ( $n = 6$  von insgesamt 10). Bei den sensorischen Untersuchungen dieser Fleischproben waren ein Pack Blowing Score  $\geq 1$ , der typische Geruch nach Erbrochenem sowie große, plumpe, meist paarweise auftretende Stäbchen in der bakterioskopischen Untersuchung hinweisend auf eine Kontamination mit *C. estertheticum*. Traten diese Hinweise zusammen auf, waren die PCR-Ergebnisse in der vorliegenden Studie zu 100 % positiv. Das Fehlen hinweisender Faktoren schloss jedoch, wie die molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, eine Kontamination mit *C. estertheticum* nicht aus. Diese Tatsache wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Dainty et al., 1989; Helps et al., 1999; Ziegler, 2009), in denen ebenfalls kein eindeutiges Faktorenmuster, das auf eine

Kontamination mit *C. estertheticum* eindeutig hinweisend wäre, festgestellt werden konnte.

Der überwiegende Teil der untersuchten Rindfleischproben war in der *C. estertheticum*-spezifischen PCR vor und nach Anreicherung positiv, unabhängig davon, ob die Proben als *C. estertheticum*-verdächtig aufgefallen waren oder ob es sich um im Handel zufällig ausgewählte Fleischproben handelte. Dies dokumentiert die weite Verbreitung des Bakteriums sowie dessen wirtschaftliches Gefährdungspotential. Weder bei den eingesandten noch bei den erworbenen Rindfleischproben konnte ein geografischer Zusammenhang zwischen der Herkunft der Probe und dem Ergebnis der *C. estertheticum*-spezifischen PCR festgestellt werden. Für die untersuchten Wildfleischproben kann die oben ausgeführte Beurteilung der Rindfleischproben übernommen werden, auch wenn für eine umfassende Beurteilung die Anzahl der Proben zu gering war.

In der Literatur wurden neben Rind- und Wildfleisch- auch Lammfleischproben als von „Blown Pack Spoilage“ betroffen beschrieben (Broda et al., 2000a; Boerema et al., 2002; Byrne et al., 2009), die alle aus Neuseeland stammten (Broda et al., 1997; Broda et al., 2009). Da im Untersuchungszeitraum der vorliegenden Studie keine verdächtigen Lammfleischproben eingesandt wurden, wurden lediglich zufällig ausgewählte Fleischstücke aus dem deutschen Einzelhandel untersucht. Sensorische Hinweise auf eine Kontamination mit *C. estertheticum* oder ein Pack Blowing Score über 1, wie bei den Rind- oder Wildfleischproben, konnten bei diesen Proben nicht festgestellt werden. Wie die molekularbiologischen Untersuchungen zeigten, bedeutete dies jedoch nicht zwingend, dass keine Kontamination mit *C. estertheticum* vorlag. Die Gründe hierfür können ein nur geringer Kontaminationsgrad sein oder auch die Tatsache, dass die Fleischproben häufig tiefgekühlt waren. Auch bei den Lammfleischproben konnte kein geografischer Zusammenhang zwischen der Herkunft der Probe und dem Ergebnis der *C. estertheticum*-spezifischen PCR festgestellt werden.

Im Gegensatz zu anderen Studien (Dainty et al., 1989; Kalchayanand et al., 1989; Helps et al., 1999; Broda et al., 2000a; Boerema et al., 2002; Broda et al., 2003b; Byrne et al., 2009; Ziegler, 2009) wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem Schweine- und Putenfleisch in die Untersuchung einbezogen. Die Ergebnisse der

untersuchten Proben zeigen erstmalig, dass *C. estertheticum* auch auf Fleisch von anderen Tieren als Rind, Wild und Lamm vorkommen kann, und dass auch hier der Nachweis mit den spezifischen Methoden möglich ist. Dies ist nach eigenen Erkenntnissen der erste in der Literatur erwähnte Beweis, dass auch Schweine- und Putenfleisch mit *C. estertheticum* kontaminiert sein können. Da Clostridien sporen ubiquitär vorkommen (Atrih und Foster, 2002), könnten diese im Verlauf des Schlachtvorgangs von der äußeren Oberfläche der Schlachttiere auf das Fleisch gelangen. Dieser Übertragungsweg ist für mehrere Bakterien beschrieben (Bell, 1997). Jedoch erscheint auch möglich, dass ursprünglich *C. estertheticum*-freies Fleisch beim Zerlegeprozess mit diesem Bakterium kontaminiert wurde. Dies könnte durch mit Sporen behaftete Arbeitsmaterialien wie Messer, Schneidbretter und Transportbehälter geschehen. Vor allem von Schneidbrettern können beim Zerlegen viele Mikroorganismen auf das Fleisch gelangen (Carpentier, 1997; Gough und Dodd, 1998). Ein Verderbsgeschehen wie bei Rind-, Wild- und Lammfleisch bleibt für Schweine- und Putenfleisch dennoch fraglich. Zum einen ist die Lagerungs- und Haltbarkeitsdauer kürzer sowie die Art der Verpackung dieser Fleischsorten anders als bei Rindfleisch (Beutling, 1992b; Fehlhaber, 1992b; Schuchmann und Schuchmann, 2008), zum anderen stellt sich die Frage, ob dieses Fleisch ein optimales Milieu für das Wachstum von *C. estertheticum* darstellt. Da bei keiner Putenfleischprobe und nur bei einer Schweinefleischprobe die Isolierung eines *C. estertheticum*-Stammes möglich war, ist es denkbar, dass bei den PCR-positiven Schweine- und Putenfleischproben keine vegetativen Formen von *C. estertheticum* vorhanden waren, da der PCR-Nachweis auch subletal geschädigte und tote Mikroorganismen erfasst (Josephson et al., 1993; Rudi et al., 2002). Somit bleibt offen, ob diese Fleischstücke nur kontaminiert waren oder ob darüber hinaus auch Verderb durch *C. estertheticum* auf Schweine- oder Putenfleisch ausgelöst werden kann. Allerdings wirft dieser *C. estertheticum*-Nachweis sehr interessante Fragen über die Herkunft und die tatsächliche Verbreitung dieses Bakteriums sowie die Bedeutung von Kreuzkontaminationen in Schlacht- und Zerlegebetrieben auf.

Die Kontamination des Fleisches während des Schlachtvorgangs ist für verschiedenste Bakterien beschrieben (Bell, 1997; Antic et al., 2010). Auch Sporen von *C. estertheticum* gelangen wahrscheinlich bei der Schlachtung auf das Fleisch (Bell et al., 2001; Broda, 2007). Aus diesem Grund wurden ein fleischverarbeitender

Betrieb sowie einige zuliefernde Schlachthöfe unterschiedlicher Größe im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Untersuchungspool mit einbezogen, um auf diesem Weg mögliche Kontaminationsquellen von *C. estertheticum* eingrenzen zu können. Bei den Untersuchungen der Proben aus diesen Betrieben war besonders die ungleichmäßige Verteilung positiver und negativer PCR-Ergebnisse auffällig. Die allgemeine Schlachthygiene hat sicherlich Auswirkungen auf den Kontaminationsgrad des Fleisches mit *C. estertheticum*. Darüber hinaus spielen das Alter und die unterschiedlichen baulichen Gegebenheiten der Betriebe eine große Rolle. Neuere Materialien sind aufgrund der geringeren Abnutzung und verbesserter Eigenschaften leichter zu reinigen und zu desinfizieren (Beutling, 1992a). Außerdem steigt mit den Jahren – auch bei guter Hygiene – die mikrobielle Grundbelastung der Umgebung (Ray et al., 2008). Beispielsweise handelt es sich bei dem Schlachthof D um einen neueren Betrieb mit einem Alter von unter zehn Jahren. Die erzielten Ergebnisse der PCR waren hier alle negativ. Der Schlachthof B dagegen, mit durchwegs *C. estertheticum*-positiven Proben, wurde vor über 30 Jahren gebaut und in den letzten Jahren nicht grundlegend renoviert. Da diese Schlachthöfe ein und denselben fleischverarbeitenden Betrieb beliefern, stellte das aus diesem Betrieb untersuchte Vliesfleisch eine Sammelprobe unterschiedlicher Fleischstücke dar.

Ein detailliertes Wissen zur Herkunft und zum Eintragsweg von *C. estertheticum* in der Lebensmittelkette ist unerlässlich, um Kontaminationen von Fleisch mit *C. estertheticum*-Sporen zu vermeiden und somit Präventionsmaßnahmen zur Vermeidung des „Blown Pack Spoilage“ festlegen zu können. Da die Inaktivierung von Sporen allgemein schwierig ist (Atrih und Foster, 2002; Grand et al., 2010), sollten so viele Hürden wie möglich geschaffen werden, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen (Atrih und Foster, 2002; Brown, 2000). Zu empfehlen wäre, die Tiere vor dem Schlachten nicht nur vom Schmutz zu befreien, wie in VO (EG) Nr. 853/2004 vorgeschrieben, sondern mit Wasser zu waschen, um einen Sporeneintrag so gering wie möglich zu halten (Kotula et al., 1974; Byrne et al., 2000; Boerema et al., 2003). Da das Waschen der Tiere jedoch gesetzlich nicht vorgeschrieben und mit einem hohen Arbeitsaufwand und folglich mit zusätzlichen Kosten verbundenen ist, wird diese Präventionsmaßnahme noch nicht routinemäßig durchgeführt. Die allgemeine Hygiene bei der Schlachtung mit besonderem Augenmerk auf den Hautabzug kann die Kontamination des Fleisches mit Sporen, die auf dem Fell

haften, verhindern (Broda et al., 2002). Bei der Lagerung des Fleisches spielt für die Bildung von „Blown Packs“ die Umgebungstemperatur eine große Rolle (Bell et al., 2001; Clemens et al., 2010; Moschonas et al., 2010). Deshalb sollte die Temperatur so gering wie möglich gehalten werden. Darüber hinaus wären weiterführende Untersuchungen von Interesse, die analysieren inwieweit die Verpackung von Fleisch unter modifizierter Atmosphäre oder die Verwendung antimikrobieller Verpackungen einen Schutz vor dem Wachstum von *C. estertheticum* bieten könnten.

Aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Daten stellte sich außerdem die Frage, inwiefern der Verderb durch *C. estertheticum* durch Schutzkulturen verhindert werden kann. In der Milchwirtschaft kann zum Beispiel die Käseblähung durch *C. tyrobutyricum* mit Hilfe der Schutzkultur *L. gasseri* K7 vermieden werden (Bogovic Matijasic et al., 2007). In Anlehnung an diese Verwendung von Schutzkulturen wurde untersucht, ob nicht aufgeblähte, aber mit *C. estertheticum* kontaminierte Fleischpackungen eine spezielle Lactobacillenmikrobiota aufweisen, die einen möglicherweise hemmenden Einfluss auf das Wachstum dieser *Clostridium* spp. hat (Jones et al., 2008; Jones et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Sequenzierung von Milchsäurebakterien-Isolaten aus nicht aufgeblähten Wildfleischproben in der vorliegenden Studie durchgeführt. Die isolierten Milchsäurebakterien kommen natürlicherweise auf Fleisch vor. Einige Vertreter dieser Milchsäurebakterien können zwar Bacteriocine produzieren, jedoch sind nicht alle Vertreter dazu in der Lage (Laursen et al., 2006). Obwohl die isolierten Milchsäurebakterien natürlicherweise auf Fleisch vorkommen, ist eine Schutzwirkung dieser Mikroorganismen im Zusammenhang mit diesem Verderbsgeschehen nicht auszuschließen, weshalb hierzu im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Challengeversuche durchgeführt wurden. Da neben den Milchsäurebakterien in vielen Verdachtsproben hohe Hefekeimzahlen nachgewiesen werden konnten, stellte sich außerdem die Frage, ob Hefen einen Beitrag zum Verderb durch *C. estertheticum* leisten. Deshalb wurden ebenfalls einige Hefen aus den Fleischproben isoliert und sequenziert. Da die isolierten Hefengattungen auch häufig in Bodenproben nachzuweisen sind, ist eine Kontamination des Fleisches während des Schlachtvorganges anzunehmen (Antic et al., 2010). Die isolierten Hefen stellen also die üblicherweise auf Fleisch zu findende Mikrobiota dar, weshalb eine Beeinflussung des Verderbsgeschehens durch diese Hefen nicht vermutet wurde. Da Hefen jedoch relativ langsam wachsen (Marshall und Bal'a, 2001) können sie in frischem Fleisch häufig nicht nachgewiesen werden, weil sie von

der übrigen Mikrobiota kompetitiv gehemmt werden. Aus diesem Grund sind hier ebenfalls weitere Studien nötig, um einen Zusammenhang von Hefen und „Blown Pack Spoilage“ durch *C. estertheticum* sicher ausschließen zu können.

Im Rahmen der Challengeversuche wurde das Verderbsgeschehen reproduzierend untersucht. Dabei wurde Rindfleisch mit verschiedenen Mikroorganismen beimpft. Ziel war es außerdem, das Gasbildungsvermögen verschiedener *C. estertheticum*-Stämme zu beurteilen sowie eine mögliche hemmende Beeinflussung bestimmter Bacteriocin-bildender Milchsäurebakterien auf das Wachstum von *C. estertheticum* zu überprüfen.

Sowohl bei den Challengeversuchen mit *C. estertheticum*-Isolaten der DSMZ als auch bei den Versuchen mit Umweltisolaten von *C. estertheticum* konnte ein deutlicher Unterschied der Gasmenge zwischen den Proben mit und denen ohne Clostridienbeimpfung festgestellt werden. Deshalb konnte die vermehrte Gasbildung eindeutig auf eine hohe *C. estertheticum*-Zahl zurückgeführt werden. Dies wurde auch von Bell et al. (2001) und Boerema et al. (2007) beschrieben. Beim Vergleich der Gasmenge in den Versuchen mit DSMZ-Stämmen und mit Umweltisolaten fiel auf, dass die Proben mit den letzteren deutlich weniger stark aufblähten. Das unterschiedliche Gasbildungsvermögen verschiedener *C. estertheticum*-Stämme wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Bell et al., 2001; Broda et al., 2002; Moschonas et al., 2010).

Die Umweltisolate von Hefen und Pseudomonaden wurden mit in die Versuche einbezogen, da diese Begleitflora in teilweise sehr hohen Keimzahlen bei der Untersuchung der Fleischproben gefunden wurde und so eine Beteiligung am Verderbsgeschehen nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Isolate, die zur Beimpfung eingesetzt wurden, stammten aus *C. estertheticum*-positiven Proben und wurden jeweils als Pool mehrerer verschiedener Isolate eingesetzt. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte kein Zusammenhang zwischen „Blown Pack Spoilage“ und Hefen und/oder Pseudomonaden gefunden werden.

Bei den Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass bei allen Versuchen auch die Negativkontrollen eine geringfügige Bläschenbildung in den Vakuumverpackungen zeigten. Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass das erworbene Fleisch mit einer sehr geringen Sporenkonzentration nativ belastet war. Ein Nachweis dieser geringen Sporenbelastung war jedoch erst nach Anreicherung bzw. nach Beendigung des Challengeversuches möglich. Da in der Anfangsphase des

vorliegenden Projektes kein vollständig *C. estertheticum*-freies Fleisch gefunden werden konnte, musste mit Fleisch gearbeitet werden, das eine geringgradige Kontamination mit *C. estertheticum* aufwies. Die durchgeführten Challengeversuche mit *L. gasseri* K7 bzw. *Carnobacterium* spp. in Verbindung mit *C. estertheticum*, Hefen und Pseudomonaden auf Roastbeefscheiben zeigten eine Reproduzierbarkeit des „Blown Pack Spoilage“. Sowohl bei der Verwendung von *C. estertheticum* der DSMZ als auch von Umweltisolaten von *C. estertheticum* konnte eine stärkere Aufgasung der Proben beobachtet werden, die nur Clostridien enthielten. Wie in den Challengeversuchen ohne Milchsäurebakterien (Kapitel 4.2) zeigten die DSMZ-Stämme eine stärkere Gasbildung als die Umweltisolate. Ein antimikrobieller Effekt von *L. gasseri* K7 konnte nicht beobachtet werden. Die Proben blähten mit und ohne Milchsäurebakterien gleichermaßen auf. Gründe hierfür könnten sein, dass die antimikrobielle Wirkung von *L. gasseri* K7 auf *C. tyrobutyricum* beschränkt ist (Bogovic Matijasic et al., 2007) oder auch, dass *L. gasseri* K7 auf dem Habitat Fleisch nicht oder nur schlecht wachsen und somit keine protektive Wirkung entfalten kann. Bei *Carnobacterium* spp. war ebenfalls kein antimikrobieller Effekt zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle *Carnobacterium* spp., sondern nur einzelne Stämme in der Lage sind, Bacteriocine zu bilden (Laursen et al., 2006) und sich außerdem die Bacteriocine verschiedener Stämme in ihrer Wirkung unterscheiden (Drider et al., 2006).

Challengeversuche mit Schweinefleisch sollten ermitteln, ob *C. estertheticum* auch auf dieser Fleischsorte wachsen kann und zur Gasbildung führt, da in der Literatur dazu keine Angaben zu finden sind. Die Versuche zeigten, dass auch Schweinefleisch aufgasen kann, wenn es vakuumverpackt über längere Zeit gelagert wird. Diese Art der Verpackung und die lange Lagerungsdauer sind jedoch für diese Fleischsorte nicht üblich (Beutling, 1992b). Auffällig in den Versuchen war, dass alle Fleischstücke, egal nach welchem Schema sie beimpft worden waren, in gleicher Geschwindigkeit und demselben Umfang aufgasten. Möglicherweise ist Schweinefleisch nicht das geeignete Habitat für *C. estertheticum*. Neben psychrophilen Clostridien können auch andere Mikroorganismen, wie beispielsweise *Enterobacteriaceae*, zur Bildung von „Blown Packs“ führen (Brightwell et al., 2007). Die Gasbildung in den Versuchen mit Schweinefleisch könnte auch durch schon auf dem Fleisch vorhandene Mikroorganismen ausgelöst worden sein. Eine eindeutige weiter-

führende Identifizierung der *Enterobacteriaceae* auf Schweinefleisch wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Eine weitere Möglichkeit der Verhinderung von „Blown Pack Spoilage“ ist, neben einer kompetitiven Schutzflora, die Belastung mit *C. estertheticum*-Sporen in den Betrieben so gering wie möglich zu halten. Dazu sollte stets eine bestmögliche Reinigung und Desinfektion durchgeführt werden, um den Keimdruck niedrig zu halten und eventuell sogar Sporen von unter anderem *C. estertheticum* unschädlich zu machen.

Die sporizide Wirkung der angewendeten Präparate ist dabei von entscheidender Bedeutung. Um der Frage nachzugehen, welche Desinfektionsmittel zur Prävention eingesetzt werden können, wurden verschiedene Reinigungs- und Desinfektionsmethoden auf ihre Wirksamkeit gegen *C. estertheticum* und dessen Sporen überprüft. Die Untersuchungen wurden mit neuen und eingeritzten Schneidbrettern durchgeführt. Letztere sollten praxisnahe Bedingungen schaffen und zeigten eine insgesamt schlechtere Reduktion der Belastung mit *C. estertheticum*. In der Lebensmittelindustrie zugelassene Desinfektionsmittel auf Peressigsäurebasis sind den Untersuchungen dieser Studie zufolge als Mittel der Wahl gegen *C. estertheticum* und dessen Sporen zu betrachten. Diese Beobachtung stützen Angaben vorangegangener Studien (Boerema et al., 2007; Broda, 2007). Ein weiterer Vorteil von Peressigsäure ist das breite Wirkspektrum und die einfache Entsorgung. Peressigsäure ist biologisch leicht abbaubar. Nachteilig werden aber die Instabilität der Verbindung und deren Korrosivität gesehen (Schliesser, 1981; McDonnell und Russell, 1999; Bessems, 2003; Meußdoerffer et al., 2008). Die Untersuchungen zu Reinigungs- und Desinfektionsmitteln machen deutlich, dass sowohl der verwendete Wirkstoff als auch die behandelte Oberfläche entscheidenden Einfluss auf eine Wirkung gegen *C. estertheticum* und dessen Sporen haben. Geeignete Präparate und glatte Flächen sind, neben einer allgemeinen Betriebshygiene, Voraussetzung für eine zufriedenstellende Keimreduktion (Prechter et al., 2002).

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Verderb von vakuumverpackten Fleischstücken, der mit Gasbildung und starken Geruchsabweichungen einhergeht, ist im Englischen auch als „Blown Pack Spoilage“ bekannt. Verursachender Mikroorganismus ist hauptsächlich der anaerobe Sporenbildner *C. estertheticum*. Über das Vorkommen dieser Spezies auf unverdorbenem Fleisch existierten bisher keine Daten. Des Weiteren lagen vor Beginn der vorliegenden Arbeit keine Erkenntnisse über das Vorkommen dieser psychrophilen *Clostridium* spp. auf Schweine- und Geflügelfleisch vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden Verdachts- und Handelsproben verschiedener Fleischsorten auf das Vorkommen von *C. estertheticum* untersucht. Die Proben stammten von Rind, Wild, Lamm, Schwein und Pute. Bei diesen Fleischstücken wurden darüber hinaus die Unversehrtheit der Verpackung, der Geruch, die aerobe Gesamtkeimzahl und die Anzahl von *Enterobacteriaceae*, Pseudomonaden, Milchsäurebakterien und Hefen sowie der pH-Wert untersucht. Anschließende Challengeversuche mit *C. estertheticum*-Isolaten verschiedener Herkunft sollten das Verderbsgeschehen reproduzieren und mögliche synergistische bzw. antagonistische Effekte mit Hefen und Pseudomonaden als Begleitflora aufzeigen. Ein weiterer Teil der Arbeit war die Überprüfung von potentiellen Schutzkulturen hinsichtlich ihrer hemmenden Wirkung auf *C. estertheticum*. Dazu wurden zum einen Isolate von Milchsäurebakterienspezies genutzt, die bekannt sind für die Bildung von Bacteriocinen, und zum anderen Isolate, von denen eine antagonistische Wirkung gegenüber *Clostridium* spp. bekannt ist.

In den Untersuchungen konnte ein Vorkommen von *C. estertheticum* in 17 von 20 (85 %) Verdachts-Rindfleischproben sowie in allen fünf (100 %) Verdachts-Wildfleischproben festgestellt werden. Darüber hinaus waren auch Handelsproben vom Rind, Wild und Lamm häufig mit *C. estertheticum* kontaminiert. In dieser Arbeit konnte erstmals auch das Vorkommen dieser *Clostridium* spp. auf Schweine- und Putenfleisch nachgewiesen werden.

In den durchgeführten Challengeversuchen mit verschiedenen *C. estertheticum*-Isolaten konnte das Verderbsgeschehen von „Blown Pack Spoilage“ zweifelsfrei reproduziert werden. Ein synergistischer bzw. antagonistischer Effekt von Hefen und/oder Pseudomonaden konnte im Hinblick auf das Verderbsgeschehen nicht festgestellt werden.

Challengeversuche mit den potentiellen Schutzkulturen *L. gasseri* K7, *Carnobacterium divergens* und *Carnobacterium maltaromaticum* ergaben keine hemmende bzw. verzögernde Wirkung auf die Vermehrung der zugesetzten *C. estertheticum*-Isolate.

Die abschließende Überprüfung verschiedener kommerzieller Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf ihre Wirkung gegen Sporen von *C. estertheticum* zeigte, dass glatte Oberflächen grundsätzlich besser zu desinfizieren sind, als die jedoch in der Praxis üblicherweise vorkommenden stark eingeritzten Zerlege- und Schneidbretter. In den Untersuchungen zeigte sich, dass unter den in der Lebensmittelindustrie zugelassenen Desinfektionsmitteln Präparate auf Peressigsäurebasis die besten Ergebnisse erzielten.

## 7 SUMMARY

Spoilage of vacuum-packaged refrigerated meat, including production of gas inside the pack and development of strong offensive odours, is referred to as “Blown Pack Spoilage”. *C. estertheticum*, an anaerobic psychrophilic sporeformer, has been found to be the main cause of this spoilage condition. However, there is no information available about the occurrence of *C. estertheticum* in unspoiled meat as well as in pork or turkey.

In this study spoiled as well as unspoiled commercially vacuum-packaged meat samples were investigated for contamination with *C. estertheticum*. The meats examined were beef, venison, lamb, pork and turkey. In addition, the appearance of intactness of the packs was examined as well as the existence of spoilage odours. The aerobic plate count, counts of *Enterobacteriaceae*, pseudomonads, lactic acid bacteria and yeasts as well as the pH value were determined for each meat pack. Challenge-studies using different *C. estertheticum* strains were used to reproduce spoilage conditions and to show possible synergistic or antagonistic effects with yeasts or pseudomonads as secondary microbiota. Another part of this study was to investigate whether protective cultures showed an inhibitory effect against growth of *C. estertheticum*. For this purpose selected lactic acid bacteria strains were applied. Finally, to establish efficient methods for prevention of “Blown Pack Spoilage” different commercial detergents and disinfectants were tested for their activity against spores of *C. estertheticum*.

The results have shown a prevalence of *C. estertheticum* in 17 out of 20 (85 %) spoiled beef samples and in all 5 (100 %) venison samples. Moreover, unspoiled beef, venison and lamb samples were often contaminated with *C. estertheticum*. For the first time ever, the occurrence of this microorganism was verified in pork and turkey.

The challenge studies with different *C. estertheticum* strains doubtlessly reproduced “Blown Pack Spoilage”. However, no synergistic or antagonistic effects with yeasts or pseudomonads could be determined.

---

Challenge studies with the potential protective cultures *L. gasseri* K7, *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* showed no inhibitory or deferring effects on the growth of *C. estertheticum* strains.

The examination of different commercial detergents and disinfectants regarding their action against the spores of *C. estertheticum* revealed generally better effects on smooth surfaces than on incised chopping boards which are mainly found in food industry. Peroxyacetic acid based disinfectants which are permitted in food industry showed the best results in this study.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abu Al-Soud, W. und Radstrom, P. (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology* **38(12)**, 4463-4470.
- Anonymus (2009). Defizit der EU bei Rindfleisch wird größer. *Allgemeine Fleischer Zeitung* **126(50)**, 4.
- Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Nastasijevic, I., Mitrovic, R. und Buncic, S. (2010). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control* **21(7)**, 1025-1029.
- Atrih, A. und Foster, S. (2002). Bacterial endospores the ultimate survivors. *International Dairy Journal* **12(2-3)**, 217-223.
- BAG (2011). Bundesamt für Gesundheit, Schweiz, Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 4/2006, URL: [http://www.bag.admin.ch/suchen/index.html?keywords=keimreduktion&lang=de&site\\_mode=intern&nsb\\_mode=yes&search\\_mode=AND#volltextsuche](http://www.bag.admin.ch/suchen/index.html?keywords=keimreduktion&lang=de&site_mode=intern&nsb_mode=yes&search_mode=AND#volltextsuche) (Zugriffsdatum: 14. Januar 2011).
- Belaya, V. und Török, T. (2010). Import dependency on meat products grows. *Fleischwirtschaft International* **25(1)**, 51-57.
- Bell, R. (1997). Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *Journal of Applied Microbiology* **82(3)**, 292-300.
- Bell, R., Moorhead, S. und Broda, D. (2001). Influence of heat shrink treatments on the onset of clostridial "blown pack" spoilage of vacuum packed chilled meat. *Food Research International* **34(4)**, 271-275.
- Bergdolt, K. (2003). Der schwarze Tod in Europa, 2. Auflage, C. H. Beck Verlag.
- Bessems, E. (2003). Desinfektionsmittel für die Lebensmittel- und Veterinärhygiene, 1. Auflage, Behr's Verlag.
- Beutling, D. (1992a). Hygieneregime im Lebensmittelverkehr. In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 173-187.
- Beutling, D. (1992b). Fleisch. In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 191-241.

- BLAST (2009). Basic Local Alignment Search Tool (National Center for Biotechnology Information), URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Zugriffsdatum: Juli bis Dezember 2009).
- Block, S. (2001). Definition of Terms. *In* Disinfection, Sterilization, and Preservation, Block, S., 5. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins Verlag, 19-28.
- BMELV (2011). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Daten & Tabellen / Suche, Außenhandelsstatistik, URL: <http://www.bmelv-statistik.de/de/daten-tabellen-suche/> (Zugriffsdatum: 10.-13. Januar 2011).
- Boehringer Mannheim (1995). The DIG system user's guide for filter hybridisation, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland.
- Boerema, J., Broda, D. und Bell, R. (2002). PCR detection of psychrotolerant *Clostridia* associated with deep tissue spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Letters in Applied Microbiology* **35(5)**, 446-450.
- Boerema, J., Broda, D. und Bell, R. (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* **36(6)**, 406-411.
- 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* **70(6)**, 1434-1439.
- Bogovic Matijasic, B., Koman Rajsp, M., Perko, B. und Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal* **17(2)**, 157-166.
- Böhm, R. (1998). Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41(3-4)**, 217-224.
- 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* **119(3)**, 334-339.
- Brillet, A., Pilet, M.-F., Prevost, H., Cardinal, M. und Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **104(3)**, 309-324.

- Broda, D., De Lacy, K., Bell, R., Braggins, T. und Cook, R. (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* **29(2-3)**, 335-352.
- Broda, D., De Lacy, K., Bell, R. und Penney, N. (1996b). Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb. *International Journal of Food Microbiology* **29(2-3)**, 371-378.
- Broda, D., De Lacy, K., Cook, R. und Bell, R. (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* **40(1)**, 93-98.
- Broda, D., Boerema, J. und Bell, R. (1998a). A PCR survey of psychrotrophic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BoNT genes. *Letters in Applied Microbiology* **27(4)**, 219-223.
- Broda, D., De Lacy, K. und Bell, R. (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* **39(1-2)**, 61-68.
- Broda, D., De Lacy, K. und Bell, R. (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* **39(1-2)**, 69-78.
- Broda, D., Saul, D., Lawson, P., Bell, R. und Musgrave, D. R. (2000a). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50(1)**, 107-118.
- Broda, D., Saul, D., Bell, R. und Musgrave, D. (2000b). *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50(2)**, 623-631.
- Broda, D., Musgrave, D. und Bell, R. (2000c). Use of restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate strains of psychrophilic and psychrotrophic clostridia associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Journal of Applied Microbiology* **88(1)**, 107-116.
- Broda, D., Bell, R., Boerema, J. und Musgrave, D. (2002). The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison. *Journal of Applied Microbiology* **93(5)**, 817-824.

- Broda, D., Musgrave, D. und Bell, R. (2003a). Molecular differentiation of *Clostridia* associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats using internal transcribed spacer polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology* **84(1)**, 71-77.
- Broda, D., Boerema, J. und Bell, R. (2003b). PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology* **94(3)**, 515-522.
- Broda, D. (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* **45(3)**, 336-341.
- Broda, D., Boerema, J. und Brightwell, G. (2009). Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *Journal of Applied Microbiology* **107(1)**, 178-186.
- Brown, K. L. (2000). Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* **56(1)**, 158-171.
- Brüggemann, H., Bäumer, S., Fricke, W., Wiezer, A., Liesegang, H., Decker, I., Herzberg, C., Martinez-Arias, R., Merkl, R., Henne, A. und Gottschalk, G. (2003). The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100(3)**, 1316-1321.
- Bülte, M. (2003). Pathogene und toxinogene Mikroorganismen - Zoonose-Erreger. In *Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch – Fisch – Feinkost*, Weber, H., 1. Auflage, Behr's Verlag, 223-248.
- Byrne, C., Bolton, D., Sheridan, J., McDowell, D. und Blair, I. (2000). The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Letters in Applied Microbiology* **30(2)**, 142-145.
- Byrne, B., Monaghan, A., Lyng, J., Sheridan, J. und Bolton, D. J. (2009). A case of 'blown pack' meat linked to *Clostridium estertheticum* in Ireland. *Journal of Food Safety* **29(4)**, 629-635.
- Caleo, M. und Schiavo, G. (2009). Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* **54(5)**, 593-599.
- Carpentier, B. (1997). Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiology* **14(1)**, 31-37.

- Clemens, R., Adam, K. und Brightwell, G. (2010). Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat. *Letters in Applied Microbiology* **50(6)**, 591-596.
- Collins, M., Rodrigues, U., Dainty, R., Edwards, R. und Roberts, T. (1992). Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters* **96(2-3)**, 235-239.
- Dainty, R., Edwards, R. und Hibbard, C. (1989). Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49(4)**, 473-486.
- De Lacy, K., Broda, D. und Bell, R. (1998). In vitro assessment of psychrotrophic *Clostridium* spp. as possible causative agents of bone-taint in beef. *Food Microbiology* **15(6)**, 583-589.
- Deutscher Bauernverband (2011). Nahrungsmittel – Verbrauch und Preise, URL: <http://www.situations-bericht.de/index.asp?seite=1&kapitel=3> (Zugriffsdatum: 11. Januar 2011)
- DGHM (2010). Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V., Mikrobiologische Richt- und Warnwerte für Lebensmittel, URL: [www.dghm.de/](http://www.dghm.de/) (Zugriffsdatum: 3. Januar 2010).
- DGHM (2011). Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V., Desinfektionsmittelliste, URL: <http://www.ihph.de/vah-online/index.php?page=desinfektionsmittel-liste-2> (Zugriffsdatum: 14. Januar 2011).
- DLG (2011). Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V., DLG-Gütezeichen für Reinigungs- und Desinfektionsmittel für die Milchwirtschaft, URL: <http://www.dlg.org/reinigungsmittel.html> (Zugriffsdatum: 20. Januar 2011).
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. und Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70(2)**, 564-582.
- DSMZ (2011). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Katalog der Mikroorganismen, URL: <http://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html> (Zugriffsdatum: Januar 2009 bis Januar 2011).
- Duden (2010). Duden - Die deutsche Rechtschreibung, 25. Auflage, Dudenverlag, 338.
- Dusser, P. (2005). La réorganisation des échanges internationaux de produits agricoles. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **12(3)**, 203-210.

- DVG (2011). Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., Desinfektionsmittellisten der DVG, URL: <http://www.dvg.net/index.php?id=169> (Zugriffsdatum: 14. Januar 2011).
- Ercolani, G. (1997). Note: occurrence and persistence of culturable clostridial spores on the leaves of horticultural plants. *Journal of Applied Microbiology* **82(1)**, 137-140.
- FAO (2011a). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Daten globale Produktion, URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Zugriffsdatum: Januar/Februar 2011).
- FAO (2011b). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Daten globaler Handel, URL: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> (Zugriffsdatum: Januar/Februar 2011).
- FAO (2012). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Daten globaler Handel, URL: <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx> (Zugriffsdatum: Januar 2012).
- Fehlhaber, K. (1992a). Ursachen von Gesundheitsschädigungen durch Lebensmittel. *In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 23-125.
- Fehlhaber, K. (1992b). Geflügel und Geflügelfleischprodukte. *In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 347-379.
- Fink, H.-G. (1992). Wild. *In Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*, Fehlhaber, K., Janetschke, P., 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, 412-448.
- Finster, K. (2008). Anaerobic bacteria and archaea in cold ecosystems. *In Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*, Margesin, R., Schinner, F., Marx, J.-C. und Gerday, C., 1. Auflage, Springer Verlag, 103-120.
- Finster, K. (2011). Characteristics *Clostridium*, URL: <http://www.bio.au.dk/KaiFinster/tables/Kai%20Finster%20Table%201%20CharacteristicsClostridiumtablefinal.pdf> (Zugriffsdatum: 7. Oktober 2009).
- Gaby, W. und Hadley, C. (1957). Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **74(3)**, 356-358.
- Gallien, P., Richter, H., Klie, H., Timm, M., Karch, H., Perlberg, K. W., Steinrück, H., Riemer, S., Djuren, M. und Protz, D. (1997). Detection of STEC and epidemiological investigations surrounding of a HUS patient. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* **110(9)**, 342-346.

- Garnier, J.-P. (2010). Prospects in a declining production. *Fleischwirtschaft International* **25(2)**, 103-106.
- GIEWS (2012). Global information and early warning system (FAO), globale Marktanalyse Mai 2012, URL: <http://www.fao.org/docrep/015/al989e/al989e00.pdf> (Zugriffsdatum: 12. Juli 2012).
- Gill, C. (1979). A Review: Intrinsic Bacteria in Meat. *Journal of Applied Bacteriology* **47(3)**, 367-378.
- Gill, C. (2004). Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat. *Journal of Food Protection* **67(2)**, 413-419
- Gough, N. und Dodd, C. (1998). The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control* **9(6)**, 363-368.
- Grand, I., Bellon-Fontaine, M.-N., Herry, J.-M., Hilaire, D., Moriconi, F.-X. und Naitali, M. (2010). The resistance of *Bacillus atrophaeus* spores to the bactericidal activity of peracetic acid is influenced by both the nature of the solid substrates and the mode of contamination. *Journal of Applied Microbiology* **109(5)**, 1706-1714.
- Hadorn, R., Schlüchter, S., Collomb, M., Badertscher, R. und Hummerjohann, J. (2009). Gas formation in vacuum-packed beef - a new-old phenomenon? ICoMST 2009, 16.-21. August 2009, Kopenhagen, Dänemark.
- Hakami, R., Ruthel, G., Stahl, A. und Bavari, S. (2010). Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. *Trends in Microbiology* **18(4)**, 164-172.
- Hansen, A. und Thiele, H. (2005). Die Märkte für Vieh und Fleisch. *Agrarwirtschaft* **54(1)**, 49-68.
- Harry, K., Zhou, R., Kroos, L. und Melville, S. (2009). Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation-specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* **191(8)**, 2728-2742.
- Hatheway, C. (1990). Toxigenic *Clostridia*. *Clinical Microbiology Reviews* **3(1)**, 66-98.
- Helps, C., Harbour, D. und Corry, J. (1999). PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. *International Journal of Food Microbiology* **52(1-2)**, 57-65.
- Jeremiah, L. (2001). Packaging alternatives to deliver fresh meats using short- or long-term distribution. *Food Research International* **34(9)**, 749-772.

- Johnson, E. A. (2007). *Clostridium botulinum*. In Food microbiology: fundamentals and frontiers, Doyle, M. und Beuchat, L., 3. Auflage, ASM Press Verlag, 401-421.
- Jones, R., Hussein, H., Zagorec, M., Brightwell, G. und Tagg, J. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology* **25(2)**, 228-234.
- Jones, R., Zagorec, M., Brightwell, G. und Tagg, J. (2009). Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. *Food Microbiology* **26(8)**, 876-881.
- Josephson, K., Gerba, C. und Pepper, I. (1993). Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **59(10)**, 3513-3515.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Field, R. und Johnson, M. (1989). Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. *Journal of Food Protection* **52(6)**, 424-426.
- Kennes, D. J. (2010). A dynamic meat market towards 2020. VIV Europe 2010, 20. April 2010, Utrecht, Niederlande.
- Kerner, J. (1842). Zu den Vergiftungen durch verdorbene Würste. *Medicinisches Correspondenz-Blatt des Württembergischen Ärztlichen Vereins* **12**, 39-40.
- Keweloh, H. (2008). Wachstumsfaktoren der Mikroorganismen und Verderb von Lebensmitteln. In Mikroorganismen in Lebensmitteln, Keweloh, H., 2. Auflage, Pfanneberg Verlag, 103-104.
- Kotula, A., Lusby, W., Crouse, J. und de Vries, B. (1974). Beef carcass washing to reduce bacterial contamination. *Journal of Animal Science* **39(4)**, 674-679.
- Kraus, M. (2009). Die Chance liegt im Export. *Fleischwirtschaft* **89(1)**, 56-57.
- Kurtzman, C. und Robnett, C. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73(4)**, 331-371.
- Laursen, B., Leisner, J. und Dalgaard, P. (2006). *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochotrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54(10)**, 3604-3611.
- Lawson, P., Dainty, R., Kristiansen, N., Berg, J. und Collins, M. (1994). Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Letters in Applied Microbiology* **19(3)**, 153-157.

- Leistner, L. (1970). Vorkommen und Bedeutung von Clostridien in Fleischkonserven. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **21**, 145-148.
- Lengeler, J., Drews, G. und Schlegel, H. (1999). Biology of the prokaryotes, 1. Auflage, Blackwell Science Verlag, 44-46.
- Li, J. und McClane, B. (2010). Evaluating the involvement of alternative sigma factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* sporulation and enterotoxin synthesis. *Infection and Immunity* **78(10)**, 4286-4293.
- Lindström, M. (2009). *Clostridium botulinum* research in the University of Helsinki. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **60(2)**, 44-51.
- Lund, B., Graham, A., George, S. und Brown, D. (1990). The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Microbiology* **69(4)**, 481-492.
- Maillard, R. (2009). Händler kämpfen gegen die Krise. *Fleischwirtschaft* **89(6)**, 18-22.
- Marshall, D. und Bal'a, M. (2001). Microbiology of meats. In Meat science and applications, Hui, Y., Nip, W.-K., Rogers, R. und Young, O., 1. Auflage, Marcel Dekker Verlag, 149-170.
- Mayr, A. (2006). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8. Auflage, Enke Verlag, 524-536.
- McClane, B. (2007). *Clostridium perfringens*. In Food microbiology: fundamentals and frontiers, Doyle, M. und Beuchat, L., 3. Auflage, ASM Press Verlag, 423-444.
- McDonnell, G. und Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12(1)**, 147-179.
- McEvoy, J., Doherty, A., Finnerty, M., Sheridan, J., McGuire, L., Blair, I., McDowell, D. und Harrington, D. (2000). The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Letters in Applied Microbiology* **30(5)**, 390-395.
- Meußdoerffer, F., Schmidt, A. und Wohn, H. (2008). Das ABC von R + D, Lexikon Reinigung und Desinfektion, Universität Bayreuth.
- Montal, M. (2010). Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 591-617.

- Moorhead, S. und Bell, R. (1999). Psychrotrophic *Clostridia* mediated gas and botulinal toxin production in vacuum-packed chilled meat. *Letters in Applied Microbiology* **28(2)**, 108-112.
- Morita, R. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* **39(2)**, 144-167.
- Moschonas, G., Bolton, D., Sheridan, J. und McDowell, D. (2009). Isolation and sources of 'blown pack' spoilage *Clostridia* in beef abattoirs. *Journal of Applied Microbiology* **107(2)**, 616-624.
- Moschonas, G., Bolton, D., Sheridan, J. und McDowell, D. (2010). The effect of storage temperature and inoculum level on the time of onset of 'blown pack' spoilage. *Journal of Applied Microbiology* **108(2)**, 532-539.
- Navaneethan, U., Venkatesh, P. und Shen, B. (2010). *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: Understanding the evolving relationship. *World Journal of Gastroenterology* **16(39)**, 4892-4904.
- Norrung, B., Andersen, J. und Buncic, S. (2009). Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. In *Safety of meat and processed meat*, Toldra, F., 1. Auflage, Springer Verlag, 3-29.
- Obanor, F., Morton, J., Geesink, G. und Bickerstaffe, R. (2005). Effect of processing on turkey meat quality and proteolysis. *Poultry Science* **84(7)**, 1123-1128.
- Olofsson, T., Ahrne, S. und Molin, G. (2007). Composition of the bacterial population of refrigerated beef, identified with direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *International Journal of Food Microbiology* **118(3)**, 233-240.
- Prechter, S., Betz, M., Cerny, G., Wegener, G. und Windeisen, E. (2002). Hygienische Aspekte von Schneidebrettern aus Holz bzw. Kunststoff. *European Journal of Wood and Wood Products* **60(4)**, 239-248.
- Probst, J., Leiber, F. und Heckendorf, F. (2009). Lammfleischqualität von extensiv gehaltenen und seltenen Schweizer Schafrassen (Engadinerschaf, Schwarznasenschaf, Spiegelschaf) im Vergleich zum Weißen Alpenschaf. 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau 2009, 11.-13. Februar 2009, Zürich, Schweiz.
- Rainey, F., Hollen, B. und Small, A. (2009). Genus I *Clostridium* Prazmowski 1880, 23<sup>AL</sup>. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Band 3 The Firmicutes, De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K.-H., Whitman, W., 2. Auflage, Springer Verlag, 738-827.
- Ray, B. und Bhunia, A. (2008). *Fundamental food microbiology*, 4. Auflage, CRC Press Verlag.

- Reid, C., Small, A., Avery, S. und Buncic, S. (2001). Presence of food-borne pathogens on cattle hides. *Food Control* **13(6-7)**, 411-415.
- Reuter, G. (2003). Mikrobiologie des Fleisches. In Mikrobiologie der Lebensmittel – Fleisch – Fisch – Feinkost, Weber, H., 1. Auflage, Behr's Verlag, 1-112.
- RKI (2011). Robert Koch-Institut, Infektionsepidemiologische Jahrbücher, URL: [http://www.rki.de/cln\\_162/nn\\_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbueche/r/jahrbuecher\\_\\_node.html?\\_\\_nnn=true](http://www.rki.de/cln_162/nn_196882/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbueche/r/jahrbuecher__node.html?__nnn=true) (Zugriffsdatum: 25. Januar 2011).
- Ross, H. (1965). *Clostridium putrefaciens*: a neglected anaerobe. *Journal of Applied Microbiology* **28(1)**, 49-51.
- Rudi, K., Nogva, H., Moen, B., Nissen, H., Bredholt, S., Moretro, T., Naterstad, K. und Holck, A. (2002). Development and application of new nuclear acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *International Journal of Food Microbiology* **78(1-2)**, 171-181.
- Russell, N., Harrison, P., Johnston, I., Jaenicke, R., Zuber, M., Franks, F. und Wynn-Williams, D. (1990). Cold adaptation of microorganisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Biological Sciences* **326(1237)**, 595-611.
- Schaumann, R. und Rodloff, A. (2009). *Clostridium* spp. In Mikrobiologische Diagnostik, Neumeister, B., Geiss, H., Braun, R. und Kimmig, P., 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, 539-550.
- Schijven, J. (2003). Bacteriophages and *Clostridium* spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. *Water Research* **37(9)**, 2186-2194.
- Schliesser, T. (1981). Grundlagen der Desinfektion. In Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft, Schliesser, T. und Strauch, D., 1. Auflage, Enke Verlag, 1-69.
- Schuchmann, H. P. und Schuchmann, H. (2008). Fleisch und Fleischprodukte. In Lebensmittelverfahrenstechnik: Rohstoffe, Prozesse, Produkte, Schuchmann, H. und Schuchmann, H.P., 2. Auflage, Wiley Verlag, 39-48.
- Setlow, P. und Johnson, E. (2007). Spores and their significance. In Food microbiology: fundamentals and frontiers, Doyle, M. und Beuchat, L., 3. Auflage, ASM Press Verlag, 35-67.
- Shcherbakova, V., Chuvilskaya, N., Rivkina, E., Pecheritsyna, S., Laurinavichius, K., Suzina, N., Osipov, G., Lysenko, A., Gilichinsky, D. und Akimenko, V. (2005). Novel psychrophilic anaerobic spore-forming bacterium from the overcooled water brine in permafrost: description *Clostridium algoriphilum* sp. nov. *Extremophiles* **9(3)**, 239-246.

- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S. und Hayashi, H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99(2)**, 996-1001.
- Smith, L. (1975). Common mesophilic anaerobes, including *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*, in 21 soil specimens. *Applied and Environmental Microbiology* **29(5)**, 590-594.
- Songer, J. (2010). *Clostridia* as agents of zoonotic disease. *Veterinary Microbiology* **140**, 399-404.
- Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppenstedt, R., 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* **53(4)**, 1019-1029.
- Statistisches Bundesamt (2011). GENESIS-Online Datenbank, URL: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online> (Zugriffsdatum: Januar/Februar 2011).
- Statistisches Bundesamt (2012). GENESIS-Online Datenbank, URL: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online> (Zugriffsdatum: Januar 2012).
- Sundriyal, A., Roberts, A., Ling, R., McGlashan, J., Shone, C. und Acharya, K. (2010). Expression, purification and cell cytotoxicity of actin-modifying binary toxin from *Clostridium difficile*. *Protein Expression and Purification* **74(1)**, 42-48.
- USDA (2011). United States Department of Agriculture, Livestock and Meat Trade Data, URL: <http://www.ers.usda.gov/Data/MeatTrade/download.htm> (Zugriffsdatum: 13. Januar 2011).
- Whelehan, O., Hudson, W. und Roberts, T. A. (1986). Microbiology of beef carcasses before and after slaughterline automation. *Journal of Hygiene* **96(2)**, 205-216.
- WHO (2011). Weltgesundheitsorganisation, Informationen für die Medien, URL: <http://www.euro.who.int/de/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2009/05/influenza-ah1n1-in-the-who-european-region,-no-time-for-complacency-working-together-to-prepare-for-a-pandemic> (Zugriffsdatum: 30. Januar 2011).
- Windhorst, H.-W. (2004). Regional differenzierte Strukturen. *Fleischwirtschaft* **84(12)**, 11-17.

- Windhorst, H.-W. (2005). Strukturen des globalen Handels - Teil 2. *Fleischwirtschaft* **85(11)**, 14-22.
- Windhorst, H.-W. (2006a). Dynamik bestimmt das Jahrzehnt - Teil 1. *Fleischwirtschaft* **86(6)**, 14-17.
- Windhorst, H.-W. (2006b). Dynamik bestimmt das Jahrzehnt - Teil 2. *Fleischwirtschaft* **86(7)**, 12-18.
- Windhorst, H.-W. (2008a). Regionale Konzentration setzt sich fort. *Fleischwirtschaft* **88(2)**, 16-22.
- Windhorst, H.-W. (2008b). Asien - das neue Zentrum. *Fleischwirtschaft* **88(3)**, 15-22.
- Windhorst, H.-W. (2009). Dynamik weist große Unterschiede auf. *Fleischwirtschaft* **89(3)**, 24-32.
- Windhorst, H.-W. (2010a). Rindfleisch nur noch an dritter Stelle. *Fleischwirtschaft* **90(1)**, 13-17.
- Windhorst, H.-W. (2010b). Dynamische Veränderungen. *Fleischwirtschaft* **90(4)**, 88-97.
- Yang, X., Balamurugan, S. und Gill, C. (2009a). Substrate utilization by *Clostridium estertheticum* cultivated in meat juice medium. *International Journal of Food Microbiology* **128(3)**, 501-505.
- Yang, X., Gill, C. und Balamurugan, S. (2009b). Effects of temperature and pH on the growth of bacteria isolated from blown packs of vacuum-packaged beef. *Journal of Food Protection* **72(11)**, 2380-2385.
- Yang, X., Gill, C. und Balamurugan, S. (2010). Products of glucose and lactate fermentation, and utilization of amino acids by *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* and *estertheticum* growing in meat juice medium. *Journal of Food Protection* **73(7)**, 1348-1352.
- Yeh, F., Dong, M., Yao, J., Tepp, W., Lin, G., Johnson, E. und Chapman, E. (2010). SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathogens* **6(11)**, 1-12.
- Yilmaz, A., Helps, C., Kaya, G. und Krat, E. (2009). Investigation on the presence of spoilage bacteria *Clostridium estertheticum* in vacuum-packed beef by PCR. *Veteriner Fakultesi Dergisi* **35(1)**, 1-6.
- Ziegler, E. (2009). Untersuchungen zum Nachweis und zum Vorkommen von *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch, Veterinärmedizinische Dissertation, Tierärztliche Fakultät, LMU München.

**Gesetze, Verordnungen, Normen und amtliche Methoden:**

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980). Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L 06.00-16: Mikrobiologische Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen – Vorbereitung der Proben. Beuth Verlag.

DIN 10516 (2001). Deutsches Institut für Normung e. V., Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion. Beuth Verlag.

DIN EN 13697 (2001). Deutsches Institut für Normung e. V., Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfungsverfahren ohne mechanische Behandlung und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2). Beuth Verlag.

Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG)

i. d. Fassung vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045)

zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S. 1622)

Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001)

i. d. Fassung vom 28. November 2011 (BGBl. I S. 2370)

zuletzt geändert durch Artikel 2 Absatz 19 des Gesetzes vom 22. Dezember 2011 (BGBl. I S. 3044)

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 (ABl. L 31, S. 1-24)

---

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene (ABl. L 139, S. 1-54)

Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs (ABl. L 139, S. 55-205)

Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs (ABl. L 139, S. 206-320)

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (ABl. L 338, S. 1-26)

## 9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas, das Interesse an der Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, unter der damaligen Leitung von Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis durchgeführt.

Herrn J. Kabisch danke ich ganz herzlich für die stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung der Arbeit, für die jederzeit gewährte moralische und konstruktive Unterstützung und seine unermüdliche Geduld bei der Korrektur der Entwürfe.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. R. Pichner danke ich für die wertvolle Beratung und Unterstützung, Frau E. Gardill für die hervorragende und engagierte Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitstechniken, Frau L. Weber für die sorgfältige und zügige Hilfe bei der Sequenzierung sowie bei der Durchführung der Desinfektionsmitteltests und Herrn J. Dresel für die gewissenhafte und rasche Unterstützung bei der Untersuchung der Fleischproben.

Herrn H. Hechelmann gilt ein spezieller Dank für die Einbringung seiner Erfahrung und dafür, dass er persönliche Kontakte für diese Arbeit zur Verfügung stellte.

Dem kooperierenden, fleischverarbeitenden Betrieb und den beteiligten Schlachthöfen danke ich für die Unterstützung, sowohl finanziell als auch durch die Bereitstellung von Fleischproben.

Bei der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux, Bern, Schweiz, bedanke ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit und die Überlassung von Fleischproben.

---

Nicht zuletzt gilt mein Dank Frau Dr. R. Bonke und Frau Dr. N. Drees vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der Ludwig-Maximilians-Universität München für die kritische Durchsicht und das Korrekturlesen der Arbeit.