

Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstherzeugnissen

Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage

FKZ: 04OE003/1F

Projektnehmer:

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
Arbeitsgruppe Analytik
E.C.-Baumannstraße 20, 95326 Kulmbach
Tel.: +49 9221 803-1
Fax: +49 9221 803-244
E-Mail: poststelle@mri.bund.de
Internet: <http://www.mri.bund.de>

Autoren:

Kabisch, Jan; Scheuer, Rainer; Rödel, Wolfgang; Gareis, Manfred

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

Forschungsprojekt 04OE003/F

„Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen“

„Im Rahmen der Richtlinie zur Durchführung des Programms des BMELV zur Förderung von Forschungs- und Entwicklungsvorhaben sowie von Maßnahmen zum Technologie- und Wissenstransfer im ökologischen Landbau“

Zuwendungsempfänger/Ausführende Stelle:

Max Rubner-Institut

Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

E.C.-Baumannstraße 20, D-95326 Kulmbach

Auftraggeber: Geschäftsstelle Bundesprogramm

Ökologischer Landbau (BLÖ)

Ferdinand-Lassalle-Str. 1-5

53175 Bonn

Laufzeit: 01.03.2006 - 30.04.2008

Abschlußbericht

Berichtszeitraum März 2006 – April 2008

Bearbeiter:

Jan Kabisch, Dr. R. Scheuer, Prof. W. Rödel,

Dir. und Prof. Dr. Dr. M. Gareis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Nährmedien	5
2.2	Material für die Herstellung von Rohwürsten	7
2.3	Chemikalien	8
2.4	Geräte	9
2.5	Mikroorganismen	10
2.6	Stammhaltung	10
2.7	Kultivierung von Stämmen der Gattung <i>Escherichia</i>, <i>Listeria</i> und <i>Salmonella</i>	11
2.7.1	Inkubationsansätze für die <i>in vitro</i> Versuche	11
2.7.1.1	Datenerhebung	11
2.7.2	Inkubationsansätze für die <i>in vivo</i> Versuche	11
2.7.3	Inkubationsansätze für die Elektronenmikroskopie	12
2.8	Messung der Wasseraktivität (a_w-Wert)	12
2.9	Messung des Säuregrades (pH-Wert)	12
2.10	Nitritbestimmung	12
2.11	Redoxpotentialmessung	13
2.12	Rohwurstherstellung	13
2.12.1	Herstellung einer feinerzkleinerten streichfähigen Rohwurst	13
2.12.1.1	Grundrezeptur	13
2.12.1.2	Zusatzstoffe	14
2.12.1.3	Technologie der Herstellung	14
2.12.1.4	Reife- und Lagerungsbedingungen	15
2.12.1.5	Chargenkodierung	17

2.12.2	Herstellung einer schnellgereiften groben schnittfesten Rohwurst	17
2.12.2.1	Grundrezeptur	18
2.12.2.2	Zusatzstoffe	18
2.12.2.3	Technologie der Herstellung	18
2.12.2.4	Reife- und Lagerungsbedingungen	19
2.12.2.5	Chargenkodierung	21
2.12.3	Herstellung einer langgereiften groben schnittfesten Rohwurst	22
2.12.3.1	Grundrezeptur	22
2.12.3.2	Zusatzstoffe	22
2.12.3.3	Technologie der Herstellung	23
2.12.3.4	Reife- und Lagerungsbedingungen	23
2.12.3.5	Chargenkodierung	25
2.12.4	Herstellung einer schimmelpilzgereiften schnittfesten Rohwurst	25
2.12.4.1	Grundrezeptur	25
2.12.4.2	Zusatzstoffe	26
2.12.4.3	Technologie der Herstellung	26
2.12.4.4	Reife- und Lagerungsbedingungen	26
2.12.4.5	Chargenkodierung	29
2.13	Mikrobiologische Untersuchungen der Rohwürste	29
2.13.1	Kultureller Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.13.2	Kultureller Nachweis von <i>Escherichia coli</i> [EHEC/STEC]	30
2.13.3	Kultureller Nachweis von <i>Salmonella</i> spp.	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Ergebnisse der <i>in-vitro</i> Untersuchungen	32
3.1.1	Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von <i>Listeria monocytogenes</i>	34
3.1.1.1	Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	34

3.1.1.2	Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C, verschiedenen pH- und a _w -Werten	38
3.1.1.3	Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit	40
3.1.2	Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von <i>Escherichia coli</i>	43
3.1.2.1	Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	43
3.1.2.2	Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	46
3.1.2.3	Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohen Anfangskeimzahlen bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	48
3.1.2.4	Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit	50
3.1.3	Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von <i>Salmonella</i> spp.	52
3.1.3.1	Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	52
3.1.3.2	Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	54
3.1.3.3	Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohen Anfangskeimzahlen bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	56
3.1.3.4	Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit	57
3.2	Ergebnisse der Challengeversuche	59
3.2.1	Schnellgereifte, streichfähige Rohwurst	59
3.2.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	59
3.2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	63
3.2.1.3	<i>Salmonella</i> spp.	66
3.2.2	Schnellgereifte, schnittfeste Rohwurst	73
3.2.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	73

3.2.2.2	<i>Escherichia coli</i>	75
3.2.2.3	<i>Salmonella</i> spp.	77
3.2.3	Langgereifte, schnittfeste Rohwurst	82
3.2.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	82
3.2.3.2	<i>Escherichia coli</i>	84
3.2.3.3	<i>Salmonella</i> spp.	86
3.2.4	Schimmelpilzgereifte Rohwurst	92
3.2.4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	93
3.2.4.2	<i>Escherichia coli</i>	95
3.2.4.3	<i>Salmonella</i> spp.	97
4.	Diskussion	103
4.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	103
4.2	<i>Escherichia coli</i>	110
4.3	<i>Salmonella</i> spp.	114
5.	Zusammenfassung	118
6.	Empfehlung	125
7.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den erreichten Zielen	127
7.1	Geplante Ziele	127
7.2	Erreichte Ziele	128
7.3	Vergleich der geplanten und der erreichten Ziele, weitergehende Fragestellungen	129
8.	Literaturverzeichnis	131
9.	Veröffentlichungen	140
9.1	Vorträge	140
9.2	Veröffentlichungen	140

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
Aqua dest.	Aqua destillata
a_w	Wasseraktivität
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
KbE	Kolonien bildende Einheiten
l	Länge
mg/g	Milli-/gramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)

1. Einleitung

Rohwurstzeugnisse stabilisieren sich ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess. Ablauf und Bedingungen dieses Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien entscheiden dabei letztlich über die Sicherheit des Endproduktes. Das Rohmaterial (Schweine- oder Rindfleisch) für die Herstellung von Rohwurstzeugnissen kann mit verschiedenen Krankheitserregern belastet sein. Schweine sind beispielsweise ein Reservoir für *Yersinia enterocolitica* (Bowman et al., 2007; Nesbakken et al., 2003), während Wiederkäuer vor allem als Quelle für enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) (Albihn et al., 2003; Chapman et al., 1997; Rasmussen et al., 1993) und auch *Listeria monocytogenes* (Farber et al., 1989; Gobat and Jemmi, 1990) gelten. Weiterhin können Salmonellen (Fontain et al., 2007; Much et al., 2007), *Clostridium perfringens* (Kamber et al., 2007; Singh et al., 2005) und *Staphylococcus aureus* (Balaban and Rasooly, 2000; Wieneke et al., 1993) als Kontaminanten auf Fleisch vorkommen.

Zur Haltbarmachung und Wachstumshemmung von solchen unerwünschten Keimen wird Rohwürsten Nitrit oder Nitrat zugesetzt. Nitrit und Nitrat (Nitrit-Reservoir) sind Lebensmittelzusatzstoffe, die seit der Antike zum Pökeln von Fleischerzeugnissen verwendet werden und sowohl positive als auch negative Eigenschaften haben. Positive Effekte sind Umrötung (Wirth, 1991), Aromabildung (Fischer et al., 2005), Konservierung (Albert et al., 2003; Hechelmann et al., 1974) und Oxidationsschutz (Arneth, 2001; Rödel et al., 1992).

Jedoch ist Nitrit nach der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung nur zur Konservierung zugelassen (ZZuV, 1998). Bei der Produktion von Rohwurstzeugnissen wird dem Rohwurstbrät in der Regel Nitrit in Form von Nitritpökelsalz zugegeben, das meist zu etwa 99,5% aus Kochsalz und 0,4 bis 0,5% aus Natriumnitrit besteht. Im Fleischerzeugnis wird Nitrit zum reaktiven Stickoxid (NO) umgesetzt (Wirth, 1991) dieses verbindet sich mit Häm- und Myoglobin zum relativ stabilen „Pökelfarot“. Nach KLETTNER und TROEGER (2000) werden dabei 30-50 mg/kg Nitrit als minimal notwendige Menge zur Ausbildung einer ausreichenden Pökelfarbe bei allen Fleischerzeugnissen gesehen.

Das Pökelaroma entsteht ähnlich der Pökelfarbe aus einer Reaktion von NO mit verschiedenen Fleischbestandteilen, wobei 20-40 mg/kg zur Ausbildung des typischen Pökelaromas in Fleischerzeugnissen ausreichen (Klettner and Troeger, 2000). Nitrit wirkt weiterhin durch die Reaktion mit dem Myoglobin des Fleisches zum Stickoxidmyoglobin antioxidativ. Nitrit verhindert somit zum einen die Anlagerung des Sauerstoffs an das Myoglobin und damit dessen katalytische Aktivität bei der Fettoxidation und zum anderen durch die Hemmung von Oxidasen im Fleisch einen oxidativen Fettabbau (Rödel et al., 1992). Qualitätsminderungen wie zum Beispiel im Geschmack (Ranzigkeit) werden somit verzögert oder vermieden (Lücke, 1999).

Durch die Zugabe von 80 bis 150 mg/kg Natriumnitrit (Klettner and Troeger, 2000) soll eine Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen erreicht werden. Darüber bestehen allerdings widersprüchliche Meinungen (Birzele et al., 2005; Lücke, 2003a). So warnt LÜCKE (2003a) vor einer Überbewertung der mikrobioziden Wirkung von Nitrit. LÜCKE (2003a) führt dazu an, dass es keinen

epidemiologisch feststellbaren Zusammenhang zwischen der Verwendung von Nitrit und einem Botulismusrisiko gibt und dass gerade auch in Rohwurstwaren die antimikrobielle Wirkung von Nitrit fraglich oder nicht relevant sei.

Die Zugabe von Nitrit kann aber auch unerwünschte Folgen haben. So reagiert Nitrit in eiweißhaltigen Lebensmitteln zu Nitrosaminen (Rywotycki, 1997; Rywotycki, 2007) und ist in höheren Dosen toxisch (Bruningfann and Kaneene, 1993; Standefer et al., 1979). Bereits 1934 wurde in Deutschland ein Salzgemisch mit 0,5-0,6% Nitrit als alleiniges Pökelmittel (Pökelsalz) vorgeschrieben (RGLB, 1934), nachdem es durch Fehlanwendungen zum gehäuften Auftreten der Blausucht vor allem bei Kleinkindern kam.

Die Gesamtmenge an Nitrit, die täglich den Magen erreicht, beträgt 4.2–5.6 mg, wovon ca. 3% auf Pökelfleischerzeugnisse fallen sollen. Nach Berechnungen von WILD (2003) entsteht die Hauptmenge als Folge der endogenen NO-Produktion (Wild, 2003). Somit tragen diese, wenn auch nicht in dem oft angenommenen Ausmaß, zur Nitritbelastung des Menschen bei (Schätzung für Deutschland nach Lücke, 2003b). Die Frage, ob durch den Konsum nitritgepökelter Fleischerzeugnisse Krebs beim Menschen entsteht, wird zur Zeit kontrovers diskutiert (rz-consult, 2000; Wild, 2003). Nitrosamine wie z.B. N-Nitroso-dimethylamin, sind kanzerogen (Liteplo and Meek, 2001; Ray et al., 2005). Die Nitrit-Nitrosamin-Hypothese besagt, dass bereits im Produkt und auch im Magen in Gegenwart von Nitrit und sekundären Aminen des Fleisches Nitrosamine entstehen (Honikel, 2008). Damit würde ein erhöhtes Risiko bestehen, durch den Verzehr von gepökelten Rohwurstprodukten an Magenkrebs zu erkranken. Entsprechende epidemiologische Untersuchungen liegen zwar vor, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen (Gonzalez et al., 1994; van Loon et al., 1998).

Neben den gesundheitlichen Aspekten ist generell zu beachten, dass chemische Zusatzstoffe vom Verbraucher weniger akzeptiert werden. Einige Verbände im Bereich des ökologischen Landbaus (z.B. Bioland, Demeter, Ökosiegel, Gää) haben sich daher gegen die Verwendung von Nitrit ausgesprochen. Doch auch für die Betriebe, die nicht strikt ökologisch ausgerichtet sind, stellt sich das Problem, einerseits den Verbraucherinteressen (keine oder verringerte Zusatzstoffmengen) nachzukommen und andererseits den Forderungen nach längerer Haltbarkeit gerecht zu werden (Farag et al., 1989). Zutaten auf pflanzlicher Basis (z.B. Gewürze, Gemüseextrakte), die einen relativ hohen Nitrat-Gehalt (Nitrit-Reservoir) aufweisen, werden hier z.T. als vom Verbraucher eher akzeptierte Alternativen angesehen. Wurstwaren, die mit Gewürz- und Gemüseextrakten umgerötet sind, können als „Konservierungsstoff frei“ deklariert werden. Die Sicherheit solcher Produkte kann jedoch zurzeit nicht ausreichend bewertet werden (Fischer et al., 2005), da entsprechende wissenschaftliche Studien fehlen.

Die konventionelle Herstellung von Fleischerzeugnissen mit Pökelsalz ist in der Anlage 5, Teil C, Liste 1 der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung von 1998, oder in Anhang III Teil C der EU-Richtlinie 95/2 geregelt. In der Änderung dieser Richtlinie (Richtlinie 2006/52/EG) wird der Zusatz von Natriumnitrit in Fleischerzeugnissen auf 150 mg/kg begrenzt. Damit folgte die Europäische Union der Empfehlung der EFSA, die eine Regelung von Nitrit über die Zusatzmenge und nicht über den Höchstgehalt an

Rückständen im Produkt empfiehlt. Nach Meinung der EFSA würde eine solche Regelung einen möglichen Missbrauch von Nitrit als Zusatzstoff unterbinden und den Einsatz einwandfreier Rohware (EFSA, 2003) erzwingen. Für ökologische Produkte trat zum 01.12.2007 die EU-Verordnung 780/06 zur Änderung des Anhangs VI der Verordnung 2092/91 in Kraft. In dieser wird ein Richtwert für den Zusatz von 80 mg/kg Natriumnitrit vorgeschlagen, sollte es keine technologische Alternative geben.

Die Verwendung von Nitrit als Konservierungsstoff für Rohwurstzeugnisse aus ökologischer Produktion ist daher zu überprüfen.

Für eine wissenschaftliche Überprüfung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Nitrit in Rohwurstzeugnissen müssen sämtliche Aspekte und Faktoren, die einen wechselseitigen Einfluss auf pathogene Keime haben, in die Untersuchungen einbezogen werden. Diese Faktoren konzentrieren sich im Wesentlichen auf die jeweilige Keimart, das Vorhandensein von apathogenen Konkurrenzkeimen und Starterkulturen, die Reifetemperatur, den Säuregrad und den Wasseraktivitätswert des Produktes sowie den Einfluss von Zusatzstoffen. Da diese Faktoren nicht isoliert betrachtet werden können, muss der Ansatz einer Überprüfung multifaktoriell sein, d.h., es müssen die sich gegenseitig unterschiedlich stark beeinflussenden Faktoren auf das Wachstum und Überleben pathogener Keime gleichermaßen berücksichtigt werden.

Zu diesem Zweck sollten in dem Projekt unter Einbeziehung der oben genannten Faktoren Untersuchungen mit den wichtigsten Lebensmittelinfektionserregern *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, enterohämorrhagische/shigatoxinbildende *Escherichia coli* (EHEC/STEC) durchgeführt werden.

In der ersten Phase des Projektes sollte die Kinetik des Wachstums/ Absterbens dieser hygienisch relevanten Keime in flüssigen Kulturmedien unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen und der Faktoren Keimzahlhöhe, Temperatur, Säuregrad, Wasseraktivität untersucht werden. Die Auswirkungen der variablen Faktoren auf das Wachstumsverhalten wurden auf der Basis von Potentialmessungen und paralleler mikrobiologischer Diagnostik dokumentiert. Die aus dieser Phase ermittelten quantitativen und qualitativen Ergebnisse bildeten die Grundlage entsprechende Challengeuntersuchungen im zweiten Versuchsabschnitt.

In der zweiten Phase wurden Rohwurstprodukte mit den Lebensmittelinfektionserregern artifiziell belastet (Challengetests) um das Verhalten der Keime unter dem Einfluss variabler Faktoren (Natriumnitritkonzentration, Inokulumhöhe, Starter- oder Schutzkulturen, Wasseraktivität und Säuregrad) unter praxisüblichen Reifungsverfahren in entsprechenden Klimakammern zu überprüfen. Diese Untersuchungen sind erforderlich, da bei der Rohwurstreifung dynamische Prozesse ablaufen, die in Kulturmedien nicht simuliert werden können. Dynamische Prozesse sind z.B. die Senkung des pH- und a_w -Wertes und Steuerung der Luftströmungsgeschwindigkeit in der Klimakammer und die Temperaturkonditionen. Diese variablen externen und internen Faktoren veranlassen die Mikroorganismen zu einer ständigen Anpassung an die äußeren Milieuverhältnisse. In die Challengetests wurden kurzgereifte streichfähige und schnittfeste Produkte, langgereifte und schimmelgereifte Rohwurstzeugnisse einbezogen. In den Versuchen wurden zwei Reifeprogramme getestet, ein

Standardverfahren und ein Verfahren, das durch einen kurzzeitigen Temperaturanstieg eine metabolische Erschöpfung von pathogenen Mikroorganismen hervorrufen kann.

Das Ziel dieses Forschungsprojektes ist die Überprüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Natriumnitrit auf die wichtigsten pathogenen Lebensmittelinfektionserreger in Rohwurstzeugnissen.

Die gewonnenen Daten sollen zeigen, ob der Zusatz von Nitrit zur Herstellung eines mikrobiologischen stabilen Produktes ausreichend ist oder ob er gegebenenfalls reduziert werden kann.

Weiterhin werden auch die Erzeuger ökologischer Rohwurstprodukte profitieren, da bis jetzt für die Produktion von Nitrit-freien Erzeugnissen nur Erfahrungswerte nicht jedoch wissenschaftlich fundierte Daten vorliegen.

Die Ergebnisse dieses Vorhabens sollen dazu beitragen, Empfehlungen abzuleiten, ob und unter welchen Bedingungen eine Herstellung von hygienisch einwandfreien Rohwurstprodukten auch ohne den Zusatzstoff Nitrit möglich sein könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Nährmedien

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden die folgenden Fest- und Flüssigmedien (siehe Tab. 1 und Tab. 2) verwendet.

Tab. 1: Verwendete Festmedien

Agar	Hersteller
Fluorocult [®] -E.coli-O157:H7-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Columbia-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Schafsblut defibriniert steril	ACILA, Mörfelden-Walldorf (D)
Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar nach SAKAZAKI; DHL-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Lactobacillus-Agar nach DE MAN et al.; MRS-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Palcam-Listeria-Selektiv-Agar nach VAN NETTEN et al.	Merck, Darmstadt (D)
Palcam-Listeria-Selektiv-Supplement nach van Netten et al.	Merck, Darmstadt (D)
Oxoid-Chromogen-Listeria-Agar (OCLA [®])	Oxoid, Wesel (D)
Listeria-Chromogen-Selektiv-Supplement	Oxoid, Wesel (D)
Sorbitol-MacConkey-Agar; SMAC-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Standard-I-Nähragar	Merck, Darmstadt (D)
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar; XLD-Agar	Bio-Rad, München (D)

Tab. 2: Verwendete Flüssigmedien

Bouillon	Hersteller
Caso-Bouillon (TSB)	Merck, Darmstadt (D)
EC-Bouillon	ACILA, Mörfelden-Walldorf (D)
Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon	Merck, Darmstadt (D)
Fraser-Listeria-Supplement	Merck, Darmstadt (D)
Pepton-Wasser (gepuffert)	Merck, Darmstadt (D)
Salmonella-Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vasiliadis (RVS-Bouillon)	Merck, Darmstadt (D)
Standard I Bouillon	Merck, Darmstadt (D)

Alle Nährmedien wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verarbeitet.

2.2 Material für die Herstellung von Rohwürsten

Für die Herstellungen von feinzerkleinerten und groben schnittfesten Rohwürsten wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Materialien verwendet.

Tab. 3: Materialien, die für die Herstellung der Rohwurstherzeugnisse benötigt wurden

Material	Hersteller
Glucose-monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
D-(+)-Glucono-1,5-lacton; GdL	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe (D)
Kaliumsorbat	PROLABO, Darmstadt (D)
Nalo [®] Cellulosehydrat-Därme (ø 45 mm, L 20 cm)	Kalle GmbH, Wiesbaden (D)
Naturin R2 Kollagenfaserdärme (ø 60 mm, L 40 cm)	Naturin GmbH, Weinheim (D)
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt (D)
Natrium-L-(+)-ascorbat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumnitrit; NaNO ₂	Riedel-de Haen, Seelze (D)
Pfeffer, weiß, gemahlen	Raps, Kulmbach (D)
Rindfleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil; R2	Färber, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, fettfrei und ohne sichtbare Sehnen; S1	Färber, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil; S2	Färber, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, kerniger Rückenspeck; S 8	Färber, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, mittelfette Wammen ohne Schwarten und Drüsen; S10	Färber, Kulmbach (D)
Starterkulturen BITEC LS-1, Milchsäurebakterien	Gewürzmüller, Korntal-Münchingen (D)
Starterkulturen M-EK 4-Bactoferm [®] , Edelschimmel	Chr. Hansen, Nienburg (D)

2.3 Chemikalien

Alle Versuche wurden mit handelsüblichen Chemikalien höchster Reinheit durchgeführt. Spezielle Chemikalien sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 4).

Tab. 4: Reinheitsgrad und Herkunft der verwendeten Chemikalien

Substanz	Reinheitsgrad	Herkunft
Bromkresolpurpur	k.A.	Merck
Kaliumchlorid	99,5 %	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei)	p.a.	Merck
L-(+)-Rhamnose-monohydrat	puriss.	Merck
Magnesiumchlorid-hexahydrat	99 %	Merck
Milchsäure	99,3 %	Merck
Natriumchlorid; NaCl	99,8 %	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	99 %	Merck
Natriumhydroxid, NaOH	98 %	Sigma-Aldrich
Natriumnitrit, NaNO ₂	99 %	Riedel-de Haen
Novobiocin	90 %	Sigma-Aldrich
Standard-Pufferlösung pH 4	k.A.	Merck
Standard-Pufferlösung pH 7	k.A.	Merck
Universalpepton M66	k.A.	Merck
D-(+)-Xylose	99 %	Riedel-de Haen

k.A.: keine Angaben
 p.a.: zur Analyse
 puriss.: reinst

2.4 Geräte

Tab. 5: Liste der verwendeten Geräte, Software und Testkits

Gerät	Hersteller
a _w -Kryometer AWK-20 [®]	Nagy Messsysteme, Gäufelden (D)
Akrobit [®] Software	AMR, Holzkirchen (D)
Anemometer TA 3000	Airflow Lufttechnik GmbH, Rheinbach (D)
Aspiration-Psychrometer nach Aßmann	BFEL, Kulmbach (D)
Clip-Maschine Poly-Clip [®] System Typ SCH 7210	Niedecker GmbH, Frankfurt/ Main (D)
Datenlogger [®] ALMEMO 2590-9 V5 und V6	AMR, Holzkirchen (D)
Datenlogger [®] ALMEMO 2890-9	AMR, Holzkirchen (D)
Dispenser Dose 803	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Einstabmesselektrode Typ SA Pt 6140	Schott, Mainz (D)
Fleischwolf FW82	Bizerba, Balingen (D)
Fleischkutter MTK 20/1 (Fassungsvermögen 10l)	E. Müller & Söhne, Saarbrücken (D)
Klimakammern	Karl Weiss, Giessen (D)
Merckoquant [®] Nitrit-Teststäbchen	Merck, Darmstadt (D)
Multi Trip Temperature Logger	Tech Innovators LTD, Auckland (NZ)
pH-Meter pH 526	WTW, Weilheim (D)
pH-Elektrode SenTix [®]	WTW, Weilheim (D)
Pipettierhilfe pipetus [®] Akku	Hirschmann, Eberstadt (D)
Rasterelektronenmikroskop S 3000N	Hitachi, Tokio (J)
Stomacher 400	Colworth, London (GB)
Spezialrechenstab für Luftfeuchte	Karl Weiss, Giessen (D)
Temperatur-Feucht-Transmitter FH A646-1	AMR, Holzkirchen (D)
Wurstfüller (6 l)	Firma Dick, (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)

2.5 Mikroorganismen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Stämmen handelt es sich um Organismen der Gattungen *Listeria*, *Escherichia* und *Salmonella* aus der Stammsammlung des Max Rubner-Institutes in Kulmbach. Zur Testung des Verhaltens von hygienisch relevanten pathogenen Mikroorganismen gegenüber verschiedenen Konzentrationen von Natriumnitrit wurden die folgenden Arten ausgewählt (Tab. 6).

Tab. 6: Artname, Stammnummer und Herkunft der verwendeten Organismen

Art/Serotyp	Stammnummer	Herkunft
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	SLCC 6139 Li 127	Liquor / Mensch (D) Prof. Wundt (Mannheim)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	NTCC 10527 Li 2	Liquor / Mensch (D) E. Weise (BgVV-Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4d	Li 135	Produktionsumfeld der Rohwurstherstellung (BFEL)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	E 118	Faeces / Rind (D) Prof. Bülte (Gießen)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 35150 E 134	Kot/ Mensch (USA) K. Katsaras (BFEL)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 43896 E 135	roher Hamburger (USA) K.Katsaras (BFEL)
<i>Escherichia coli</i> O26: H11	E 165	Stuhl / Kalb BFEL
<i>Salmonella</i> Typhimurium	S 469	Bratwurst / Schwein (D) R. Pichner BFEL
<i>Salmonella</i> Enteritidis	S 489	Bratwurst / Schwein (D) R. Pichner BFEL
<i>Salmonella</i> Derby Serotyp B	S 589	Fleischprobe / Schwein (D) H. Hechelmann (BFEL)
<i>Salmonella</i> Goldcoast Serotyp C	S 600	mech. entsehtes Fleisch (D) H. Hechelmann (BFEL)
<i>Salmonella</i> Infantis	S 609	Fleischoberfläche / Schwein (D) H. Hechelmann (BFEL)

SLCC: Seeligers *Listeria* Culture Collection (Prof. Seeliger, Würzburg)

NTCC: National Collection of Type Cultures

ATCC: American Type Culture Collection

Li, E und S: Stammnummern der BFEL Kulmbach

2.6 Stammhaltung

Die verwendeten Mikroorganismen (vgl.2.5) wurden auf Standard-I-Nähragar kultiviert und alle zwei Wochen neu überimpft, um mit frischen Kulturen arbeiten zu können. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 24 Stunden wurden die Platten bei 10 °C gelagert. Zum Ausschluss einer Fremdinfection wurden in regelmäßigen Abständen Vereinzelausstriche und mikroskopische Präparate der verwendeten Stämme hergestellt.

2.7 Kultivierung von Stämmen der Gattungen *Escherichia*, *Listeria* und *Salmonella*

Einer 24 Stunden alten Nähragarkultur (vgl. 2.6) wurde eine Impföse Zellmaterial des jeweiligen Stammes entnommen, in ein Reagenzglas mit 9 ml Standard-I-Nährbouillon (pH 7,2) überführt und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

2.7.1 Inkubationsansätze für die *in vitro* Versuche

Vor dem Beginn der *in vitro* Untersuchungen wurde sowohl der pH-Wert der Nährbouillon mit Hilfe einer 40 % igen NaOH-Lösung oder einer 90 % igen Milchsäure-Lösung auf 7, 6 oder 5, als auch der Wasseraktivitätswert (a_w), im Bereich von 0,99 bis 0,94 mit NaCl, eingestellt.

Nach der Kultivierung (vgl. 2.7) wurden je 1 ml der Bakteriensuspension (ca. 1×10^9 KbE/ml) entnommen und in einem 50-ml-Standkolben, welcher mit 27 ml 0,85 % iger Kochsalzlösung gefüllt war, zu einem Bakterienpool der jeweiligen Gattung vereinigt. Anschließend wurde 1 ml aus dem Kölbchen entnommen und in ein Reagenzglas, das mit 9 ml steriler 0,85 % iger Kochsalzlösung beschickt war, überführt. Es folgten weitere Verdünnungen, bis im Reagenzglas eine Bakteriensuspension von 1×10^4 KbE/ml erwartet werden konnte. Nach dem letzten Verdünnungsschritt wurden aus der 1×10^4 -Verdünnung 4,3 ml Bakteriensuspension entnommen und in einen sterilen 100-ml-Standkolben, welcher mit 50 ml Nährbouillon gefüllt war, gegeben. Natriumnitrit wurde anschließend in den Konzentrationen 0 mg/l 100 mg/l [1,45 mM], 150 mg/l [2,17 mM] und 200 mg/l [2,9 mM] zu den verschiedenen Ansätzen zugesetzt. Aus diesen wurden nun jeweils 4 ml entnommen und in sterile Reagenzgläser pipettiert, welche danach in eine klimatisierte Messbox eingebracht wurden. Die Versuche erfolgten bei konstant eingestellten Temperaturen von 25 °C und 17 °C.

2.7.1.1 Datenerhebung

Zur quantitativen Erfassung der Ausgangskeimzahl sowie der Zahl der lebensfähigen Keime nach einer Inkubation mit und ohne Natriumnitrit (vgl. 2.7.1) wurde das Spatelverfahren eingesetzt. Bei hohen Keimdichten musste die Bakteriensuspension verdünnt werden. Die Verdünnungsreihen wurden in dekadischen Stufen in 0,85 % iger Kochsalzlösung vorgenommen. Mit je 100 µl der entsprechend verdünnten Suspension wurden pro ausplattierter Verdünnungsstufe zwei Nähragarplatten beimpft. Die Agarplatten wurden für 24 Stunden bei 30 °C aerob bebrütet. Zur Auszählung wurden die Verdünnungsplatten ausgewählt, bei denen die Zahl der Keime zwischen 20 und 200 lagen. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden. Aus dem Medianwert der beiden parallelen Messreihen wurde die Keimzahl gebildet und zur weiteren Auswertung in eine Tabellenkalkulation eingefügt. Der pH-Wert und die Nitritkonzentration wurden durch eine Doppelmessung zu Beginn des Versuches und am 1., 2., 3., 4. und 7. Tag gemessen.

2.7.2 Inkubationsansätze für die *in vivo* Versuche

Zur Herstellung des Beimpfungspools (Inokulum) wurden Mikroorganismen eingesetzt, die bei der Produktion der Rohwurst ein besonderes Gefahrenpotential darstellen (siehe Tab.6). Die Isolate

stammten aus klinischem Untersuchungsmaterial, Rohwürsten und aus dem Produktionsumfeld der Rohwurstherstellung. Die Höhe der eingesetzten Keimmengen lag bei 5×10^3 KbE/g Brät. Für die einzelnen Versuchsreihen wurden je 1 ml der Bakteriensuspension (ca. 1×10^9 KbE/ml) vgl. 2.7 entnommen und in einem sterilen Reagenzglas zu einem Bakterienpool der jeweiligen Gattung vereinigt. Mittels einer dezimalen Verdünnungsstufe wurde eine Keimdichte von 1×10^7 KbE/ml hergestellt. Anschließend wurden aus dieser 0,5 ml entnommen und erneut in ein Reagenzglas mit 9 ml 0,85 % iger Kochsalzlösung überführt. Die Beimpfung des Wurstbrätes erfolgte danach mit 1,6 ml dieser Ausgangssuspension pro Kilogramm, wobei Natriumnitrit in den Konzentrationen 0 mg/kg, 100 mg/kg [1,45 mM], 150 mg/kg [2,17 mM] und 200 mg/kg [2,9 mM] zu den verschiedenen Chargen zugesetzt wurde.

2.7.3 Inkubationsansätze für die Elektronenmikroskopie

Der Einfluss von Natriumnitrit auf die Bakterienzellen von *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. wurde im Rahmen der Untersuchungen zudem elektronenmikroskopisch analysiert werden. Dazu wurden die Zellen, wie unter Punkt 2.7 beschrieben, vorkultiviert und dann in einen 300-ml Standkolben mit 100 ml Nährbouillon überführt. Natriumnitrit wurde in einer Endkonzentration von 100 mg/l [1,45 mM] und 200 mg/l [2,9 mM] den Medien zugesetzt. Dem Kontrollansatz wurde kein Nitrit zugesetzt. Nach einer 24- oder 48- stündigen Inkubation bei 25 °C und 180 rpm, wurden fünfmal 1 ml Suspension unter sterilen Bedingungen entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mittels Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 Minuten wurde das Nährmedium entfernt, das Zellpellet in 200 µl 0,85 % iger Kochsalzlösung aufgelöst und die 5 Zentrifugationsansätze vereinigt. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Proben im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des MRI Kulmbach präpariert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt.

2.8 Messung der Wasseraktivität (a_w -Wert)

Die Wasseraktivitätswerte wurden mit einem a_w -Kryometer über eine Doppelmessung ermittelt (RÖDEL et al. 1989).

2.9 Messung des Säuregrades (pH-Wert)

Die pH-Wertmessung der Proben wurde alle 24 Stunden elektrometrisch mit einem pH-Meter durchgeführt. Die pH-Elektrode wurde einmal wöchentlich mit Standard-Pufferlösungen mit pH 4 und pH 7 bei Raumtemperatur kalibriert.

2.10 Nitritbestimmung

Um die Konzentration des Zusatzstoffes Natriumnitrit im Nährmedium/Wurstbrät im Verlauf des Untersuchungszeitraumes zu verfolgen, wurde der Nitritgehalt semi-quantitativ mit Teststäbchen bestimmt. Die Teststäbchen deckten einen Bereich von 2-80 mg/l ab, für höher konzentrierte Proben wurde eine 1:10 (Verdünnung mit 0,85 % iger Kochsalzlösung) verwendet.

2.11 Redoxpotentialmessung

Die Untersuchungen zur kontinuierlichen Messung der Redoxpotentiale wurden mit Einstabmesselektroden durchgeführt, die Messwerte mit einer Datenerfassungsanlage alle 15 Minuten gespeichert und zur weiteren Auswertung an einen Computer übertragen. Diese Datensätze wurden anschließend durch eine geeignete Software graphisch weiterverarbeitet. Alle Redoxpotentialwerte wurden zu Beginn der Messung rechnerisch auf Null zurückgesetzt, um einen besseren Vergleich der Messreihen zu gewährleisten. Die Redoxpotentialkurven sind daher als relative Redoxpotentialwerte dargestellt. Eine eingehende Beschreibung der Methodik zur Redoxpotentialmessung wurde von RÖDEL und SCHEUER (1998) publiziert.

Die Redoxelektroden steckten im Verlaufe der *In Vitro*-Untersuchungen in passgenauen Reagenzgläsern. Jedes dieser Röhrchen war mit 4 ml der entsprechenden Nährbouillon befüllt (vgl. 2.7.1). Mit diesem Messsystem konnten 8 Proben gleichzeitig gemessen werden. Bei unseren Versuchen wurden zwei Messsysteme mit insgesamt 16 Elektroden eingesetzt. Die Experimente wurden in zwei Messboxen mit einer konstant eingestellten Temperatur durchgeführt und waren als Zweifachmessungen angelegt. Parallel zur Erfassung der mikrobiellen Stoffwechselaktivität wurden, wie unter Punkt 2.7.1.1 beschrieben, Keimzahlbestimmungen durchgeführt, um eine genauere Aussage über das Verhalten der Mikroorganismen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen treffen zu können.

Um auch in den verschiedenen Rohwurstprodukten eine Aussage über den Verlauf der mikrobiellen Aktivität treffen zu können, wurden die Redoxpotentialelektroden direkt in das Produkt eingeführt. Da im Verlauf der Reifung das Produkt an Gewicht und Größe verlor, mussten die Redoxelektroden im Produkt fixiert werden.

2.12 Rohwurstherstellung

Zur Untersuchung des Einflusses von Natriumnitrit auf das Verhalten von *Escherichia coli* [EHEC/STEC], *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp., während der Reifung und Lagerung in verschiedenen Rohwurstprodukten wurden Challengeversuche durchgeführt. Überprüft wurden neben der Wirkung des Zusatzstoffes Nitrit auch verschiedene Reifebedingungen. Das Brät wurde mit einer Keimdichte von 3,4 – 4,0 log₁₀ KbE pro Gramm beimpft. Hierfür wurde ein Keimpool verwendet (vgl. Punkt 2.7.2).

2.12.1 Herstellung einer feinzerkleinerten streichfähigen Rohwurst

Für die Überprüfung des Verhaltens der eingesetzten Keime in feinzerkleinerten Rohwurstprodukten (Typ Teewurst) wurden insgesamt 4 Untersuchungsreihen mit 4 unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt.

2.12.1.1 Grundrezeptur

Bei allen Ansätzen wurde für die Vorchargen die aus Tab. 7 ersichtliche Grundrezeptur verwendet. Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 550 Gramm Schweinefleisch und 450 Gramm Fett (Wammen)

verwendet. Die Starterkultur bestand aus Kulturen von *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* ssp. *utilis* und *Kocuria varians*. Es handelte sich dabei um ein gefriergetrocknetes Konzentrat mit Dextrose (85 % +/- 5 %) und 5 % Magermilchpulver.

Tab. 7: Für alle Versuchsansätze verwendete Grundrezeptur zur Herstellung von Rohwurst

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Glucose	3 g (0,3 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

2.12.1.2 Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumchlorid und Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Bei den Versuchsansätzen geprüfte Zusatzstoffe

Zusatzstoff	Menge	Versuchsansatz
Natriumchlorid	25 g/kg (2,42 %)	A Ia; A IIa; B Ia; B IIa; C Ia; C IIa; D Ia; D IIa
	30 g/kg (2,89 %)	A Ib; A IIb; B Ib; B IIb; C Ib; C IIb; D Ib; D IIb
Natriumnitrit	0 mg/kg	A Ia; A Ib; A IIa; A IIb
	100 mg/kg	B Ia; B Ib; B IIa; B IIb
	150 mg/kg	C Ia; C Ib; C IIa; C IIb
	200 mg/kg	D Ia; D Ib; D IIa; D IIb

2.12.1.3 Technologie der Herstellung

Das Zuschneiden und Wolfen (Körnung: 3 mm) der Rohmaterialien erfolgte am Tag vor der Herstellung der Teewürste. Die Ausgangsmaterialien wurden bis zum nächsten Tag bei 4 °C gelagert. Das Fettgewebe wurde vor der Zugabe zum Magerfleisch bis zu einer schaumig-klebrigen Konsistenz gekuttert, das Inokulum (siehe Punkt 2.7.2) und die Zutaten dem Rohmaterial zugegeben und das so

erhaltene Brät bis zur feinsten Körnung ca. 60 Runden gekuttert. Die unbeimpften Kontrollchargen wurden im Versuchsablauf zuerst hergestellt.

Das Brät wurde anschließend mit einer Wurstfüllmaschine in Cellulosehydrat-Därme zu je 200 g abgefüllt.

2.12.1.4 Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von einer Stunde wurden die hergestellten Teewürste für ca. 5 Sekunden in eine 20 % ige Kaliumascorbat-Lösung getaucht, um einen Oberflächenbewuchs während der Reife- und Lagerungsphase zu unterbinden. Insgesamt wurden zwei Reifeprogramme (1 u. 2) gefahren (siehe Tab. 9). Dabei sollte unter anderem der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf 25 °C nach dem sechsten Reifetag auf das Verhalten der eingesetzten Keime untersucht werden (Leistner, 1992; Leistner, 2000). Die Teewürste wurden anschließend bei 17 °C für 28 Tage gelagert.

Die relative Luftfeuchte wurde bei allen Versuchen auf 92 % und die Luftgeschwindigkeit auf einen festen Wert von 0,01 m/s eingestellt. Jedoch konnten in der befüllten Reifekammer an verschiedenen Messpunkten in der Klimakammer Geschwindigkeiten zwischen 0,01 – 0,05 m/s gemessen werden.

Tab. 9: Übersicht der geprüften Reife- und Lagerungsbedingungen

Tag	Reifeprogramm 1	Reifeprogramm 2
0-3	24 °C	24 °C
4-6	22 °C	22 °C
7-10	18 °C	25 °C
Tag	Lagerung	
11-28	17 °C	17 °C

Die in den Klimakammern für die jeweiligen Reifeprogramme eingestellten Werte, für die Temperatur und die relative Feuchte wurden an Hand von Datenloggern protokolliert und mit Hilfe eines Aspiration-Psychrometers überprüft.

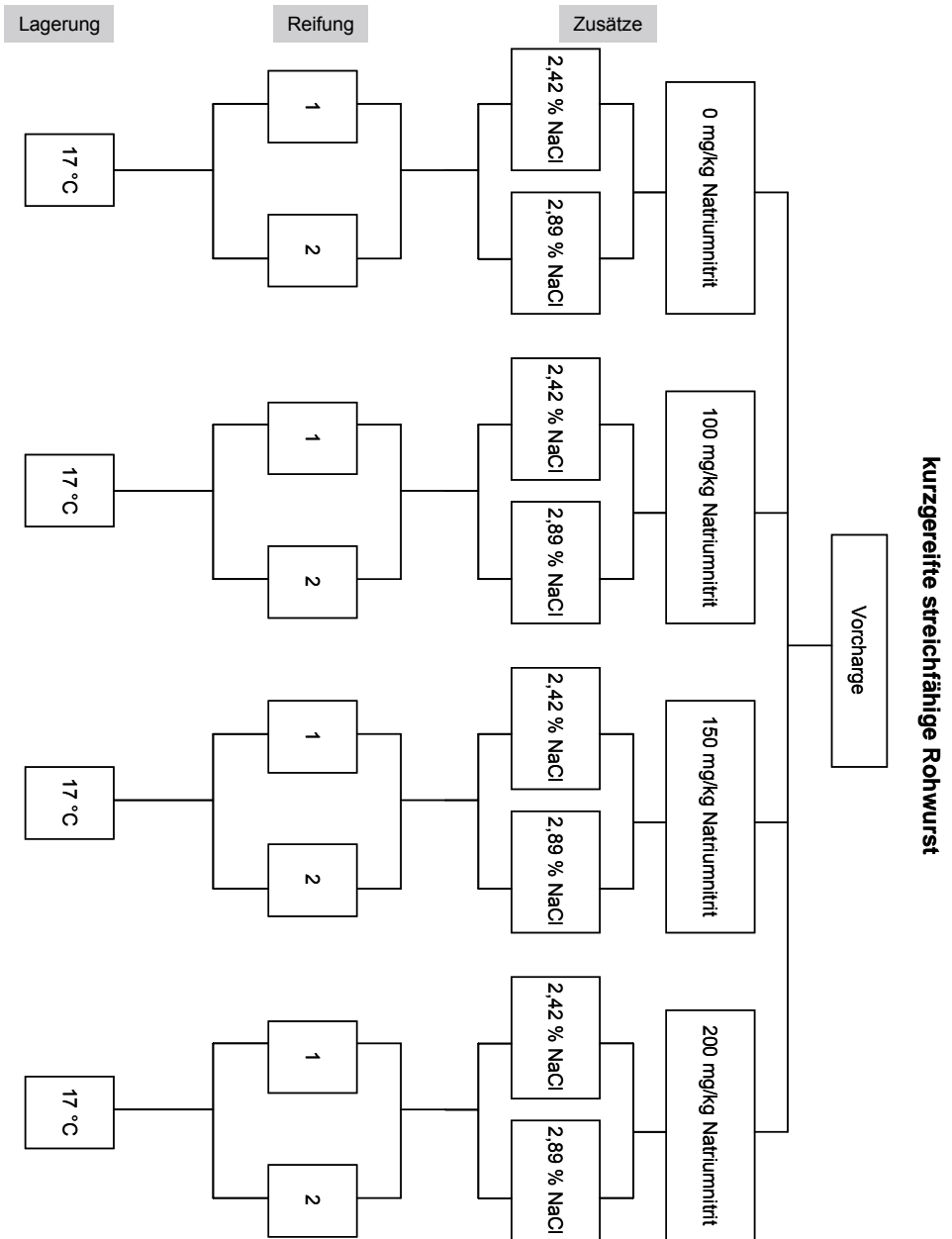


Abb. 1: Schematische Übersicht der Versuchsansätze zum Verhalten der verwendeten Keime in feinzerkleinerter, streichfähiger Rohwurst

2.12.1.5 Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen und die dazugehörigen Rezepturen sowie Reife- und Lagerungsbedingungen sind in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Übersicht aller hergestellten Chargen und der Chargenkodierung

Chargencode	NaCl	Natriumnitrit	Reifeprogramm
A Ia	2,42 %	0 mg/kg	1
A IIa	2,42 %	0 mg/kg	2
A Ib	2,89 %	0 mg/kg	1
A IIb	2,89 %	0 mg/kg	2
B Ia	2,42 %	100 mg/kg	1
B IIa	2,42 %	100 mg/kg	2
B Ib	2,89 %	100 mg/kg	1
B IIb	2,89 %	100 mg/kg	2
C Ia	2,42 %	150 mg/kg	1
C IIa	2,42 %	150 mg/kg	2
C Ib	2,89 %	150 mg/kg	1
C IIb	2,89 %	150 mg/kg	2
D Ia	2,42 %	200 mg/kg	1
D IIa	2,42 %	200 mg/kg	2
D Ib	2,89 %	200 mg/kg	1
D IIb	2,89 %	200 mg/kg	2

2.12.2 Herstellung einer schnellgereiften groben schnittfesten Rohwurst

Für die Überprüfung des Verhaltens der eingesetzten Bakterien der Gattungen *Escherichia coli* (EHEC), *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. in schnellgereiften schnittfesten Rohwurstprodukten, wurden 4 Untersuchungsreihen mit 2 unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt.

2.12.2.1 Grundrezeptur

Bei allen Ansätzen wurde die für die Vorchargen aus Tab. 11 ersichtliche Grundrezeptur verwendet. Dabei wurden pro Kilogramm Rohmaterial 330 Gramm Schweinefleisch, 330 Gramm Rindfleisch und 300 Gramm Rückenspeck verwendet. Die Starterkultur bestand aus Kulturen von *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* ssp. *utilis* und *Kocuria varians*. Es handelte sich dabei um ein gefriergetrocknetes Konzentrat mit Dextrose (85 % +/- 5 %) und 5 % Magermilchpulver.

Tab. 11: Für alle Versuchsansätze verwendete Grundrezeptur für die Herstellung von Rohwurst

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Natriumchlorid	28 g (2,81 %)
GDL	5 g (0,5 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

2.12.2.2 Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Bei den Versuchsansätzen geprüfte Zusatzstoffe

Zusatzstoff	Menge	Versuchsansatz
Natriumnitrit	0 mg/kg	A Ia; A Ib
	100 mg/kg	B Ia; B Ib
	150 mg/kg	C Ia; C Ib
	200 mg/kg	D Ia; D Ib

2.12.2.3 Technologie der Herstellung

Die Rohmaterialien wurden eine Woche vor der Herstellung des Produktes zugeschnitten und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die tiefgefrorenen Teilstücke wurden in einem Kutter, unter gleichzeitiger Zugabe der Gewürze und Starterkulturen, auf eine Körnung von ca. 10 mm zerkleinert. Zu dem in Chargen aufgeteilten Brät erfolgte die Zugabe der Inocula (siehe 2.7.2) und der Zusatzstoffe während der Zerkleinerungsphase im Kutter.

Das Brät wurde anschließend mit einer Wurstfüllmaschine in Naturin Kollagenfaserdärme mit einem Kaliber von 60 mm und einer Länge von 40 cm gefüllt.

2.12.2.4 Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste (siehe 2.12.2.3) für ca. 5 Sekunden in eine 20 % ige Kaliumascorbat-Lösung getaucht, um einen Oberflächenbewuchs während der Reife- und Lagerungsphase zu unterbinden. Die Reifung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern. Insgesamt wurden zwei Reifeprogramme (1 u. 2) gefahren (siehe Tab. 13). Hierbei sollte erneut der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf 25 °C nach dem dritten Reifetag auf das Verhalten der eingesetzten Keime untersucht werden. Die schnellgereiften Rohwürste wurden dann bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes bei 17 °C gelagert.

Tab. 13: Übersicht der geprüften Reife- und Lagerungsbedingungen

Tag	Reifeprogramm 1	Reifeprogramm 2	rel. Luftfeuchtigkeit	Luftgeschwindigkeit
0-1	24 °C	24 °C	93-94 %	0,4-0,5 m/s
1-2	22 °C	22 °C	92 %	0,4-0,5 m/s
2-3	20 °C	20 °C	90 %	0,4-0,5 m/s
4-6	19 °C	25 °C	88 %	0,3-0,4 m/s
Tag	Lagerung			
7-10	17 °C	17 °C	85 %	0,2-0,3 m/s
11-28	17 °C	17 °C	85 %	0,05-0,1 m/s

Die in den Klimakammern für die jeweiligen Reifeprogramme eingestellten Werte für die Temperatur, die Luftgeschwindigkeit und die relative Feuchte wurde mit Datenloggern protokolliert und mit Hilfe von einem Aspiration-Psychrometer und einem Anemometer täglich überprüft.

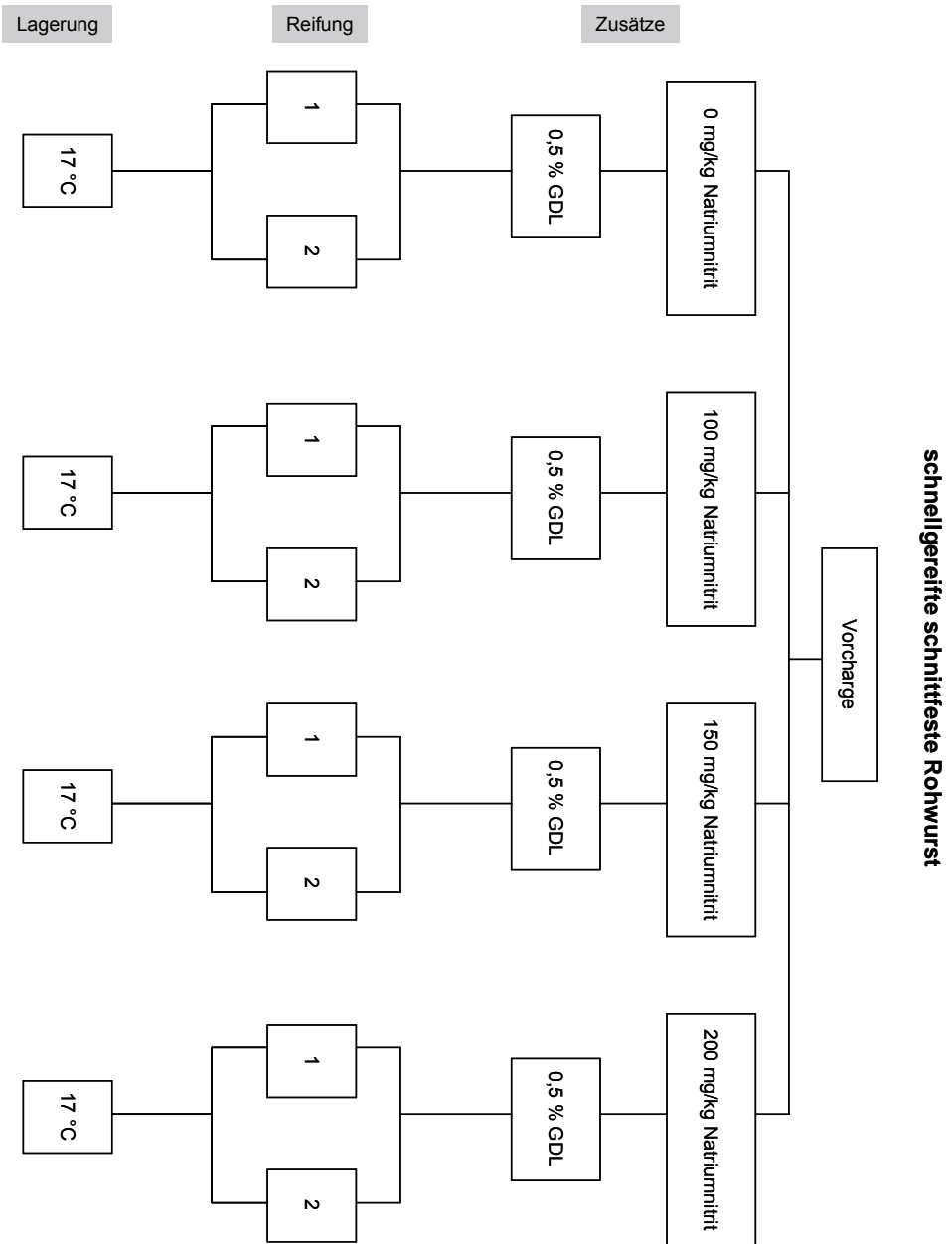


Abb. 2: Schematische Übersicht der Versuchsansätze zum Verhalten der verwendeten Keime in einer schnellgereiften Rohwurst

2.12.2.5 Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen und die dazugehörigen Rezepturen sowie Reife- und Lagerungsbedingungen sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Übersicht aller hergestellten Chargen und der Chargenkodierung

Chargenkodierung	NaCl	GDL	Natriumnitrit	Reifeprogramm
A la	2,8 %	0,5 %	0 mg/kg	1
A lb	2,8 %	0,5 %	0 mg/kg	2
B la	2,8 %	0,5 %	100 mg/kg	1
B lb	2,8 %	0,5 %	100 mg/kg	2
C la	2,8 %	0,5 %	150 mg/kg	1
C lb	2,8 %	0,5 %	150 mg/kg	2
D la	2,8 %	0,5 %	200 mg/kg	1
D lb	2,8 %	0,5 %	200 mg/kg	2

2.12.3 Herstellung einer langgereiften groben schnittfesten Rohwurst

Für die Überprüfung des Verhaltens der eingesetzten Keime (siehe 2.5) in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst wurden 4 Untersuchungsreihen mit 2 unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt.

2.12.3.1 Grundrezeptur

Bei allen Ansätzen wurde für die gleiche Grundrezeptur für die Vorchargen (siehe Tab. 15) verwendet. Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 330 Gramm Schweinefleisch, 330 Gramm Rindfleisch und 300 Gramm Rückenspeck verwendet. Die Zugabe der Starterkultur BITEC LS-1 erfolgte während des Zerkleinerungsvorgangs im Kutter.

Tab. 15: Für alle Versuchsansätze verwendete Grundrezeptur für die Herstellung von Rohwurst

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Glucose	2 g (0,2 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

2.12.3.2 Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumchlorid und Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Bei den Versuchsansätzen geprüfte Zusatzstoffe

Zusatzstoff	Menge	Versuchsansatz
Natriumchlorid	28 g/kg (2,82 %)	A Ia; B Ia; C Ia; D Ia
	34 g/kg (3,4 %)	A Ib; B Ib; C Ib; D Ib
Natriumnitrit	0 mg/kg	A Ia; A Ib
	100 mg/kg	B Ia; B Ib
	150 mg/kg	C Ia; C Ib
	200 mg/kg	D Ia; D Ib

2.12.3.3 Technologie der Herstellung

Die Herstellung der langgereiften schnittfesten Rohwurst erfolgte analog der Produktion für eine schnellgereifte mit GDL produzierte Rohwurst (siehe 2.12.2.3).

2.12.3.4 Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste (siehe 2.12.2.3) für ca. 5 Sekunden in eine 20 % ige Kaliumascorbat-Lösung getaucht, um einen Oberflächenbewuchs während der Reife- und Lagerungsphase zu unterbinden. Die Reifung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern. Im Gegensatz zu den GDL-gereiften Rohwürsten wurde bei diesen Versuchen nur ein Reifeprogramm (siehe Tab. 17), das einem herkömmlichen industriellen Fermentationsprogramm entsprach, verwendet.

Tab. 17: Übersicht der geprüften Reife- und Lagerungsbedingungen

Tag	Reifeprogramm 1	relative Feuchte	Luftgeschwindigkeit
0-1	24 °C	94 %	0,4 - 0,5 m/s
1-2	22 °C	92 %	0,4 - 0,5 m/s
2-3	20 °C	90 %	0,4 - 0,5 m/s
4-6	19 °C	88 %	0,3 - 0,4 m/s
Tag	Lagerung		
7-10	17 °C	85 %	0,2 -0,3 m/s
11-28	17 °C	85 %	0,01 - 0,05 m/s
29-84	17 °C	82 %	0,01 - 0,05 m/s

Die in den Reifekammern eingestellten Werte für die Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit wurden analog wie 2.12.2.4 dokumentiert und überprüft.

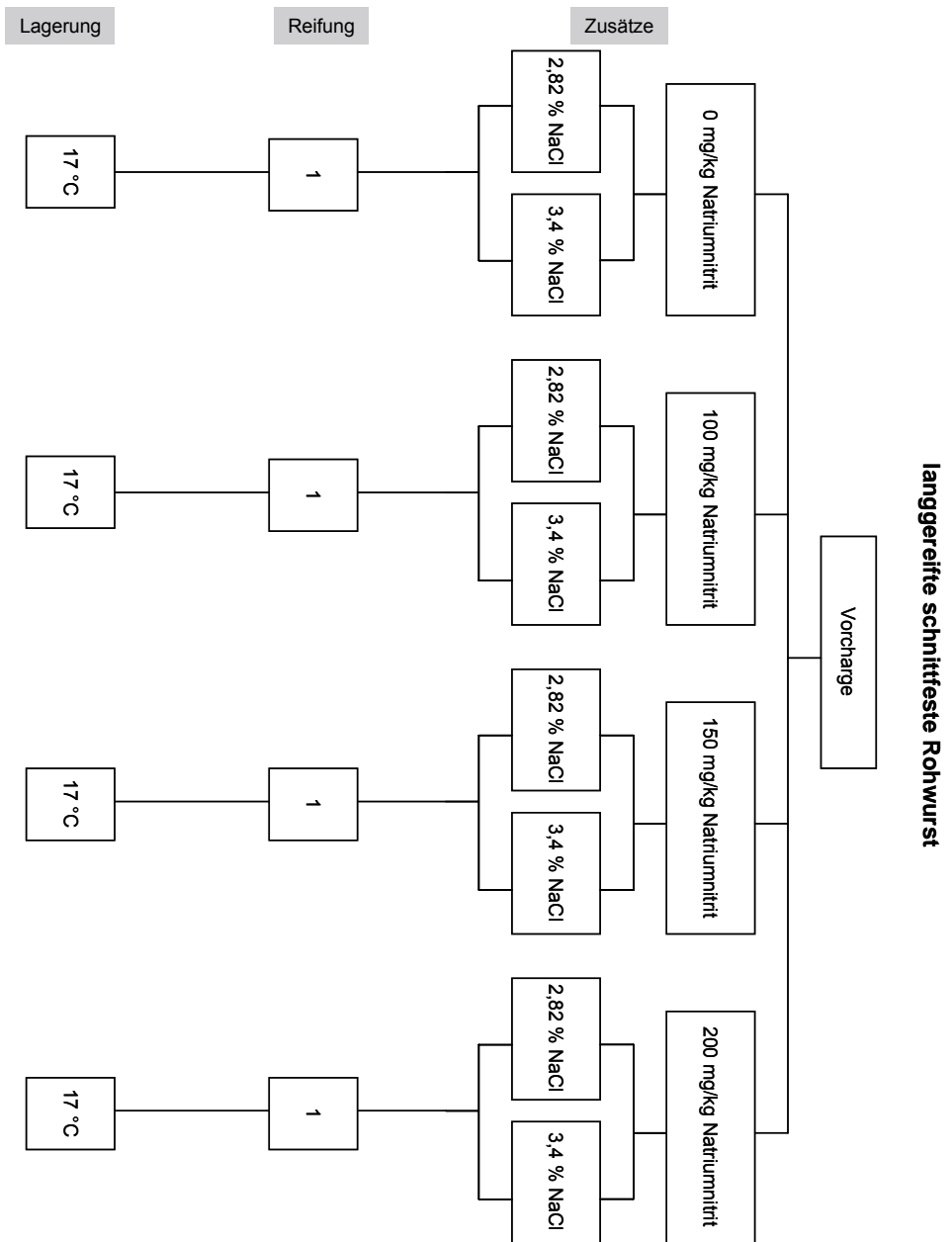


Abb. 3: Schematische Übersicht der Versuchsansätze zum Verhalten der verwendeten Keime in langgereifter Rohwurst

2.12.3.5 Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen und die dazugehörigen Rezepturen sowie Reife- und Lagerungsbedingungen sind in Tab. 18 zusammengefasst.

Tab. 18: Übersicht aller hergestellten Chargen und der Chargenkodierung

Chargenkodierung	NaCl	Natriumnitrit	Reifeprogramm
A Ia	2,82 %	0 mg/kg	1
A IB	3,4 %	0 mg/kg	1
B Ia	2,82 %	100 mg/kg	1
B Ib	3,4 %	100 mg/kg	1
C Ia	2,82 %	150 mg/kg	1
C Ib	3,4 %	150 mg/kg	1
D Ia	2,82 %	200 mg/kg	1
D Ib	3,4 %	200 mg/kg	1

2.12.4 Herstellung einer schimmelpilzgereiften schnittfesten Rohwurst

Für die Überprüfung des Verhaltens der eingesetzten Keime (siehe 2.5) in einer schimmelpilzgereiften schnittfesten Rohwurst wurden 4 Untersuchungsreihen mit 2 unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt.

2.12.4.1 Grundrezeptur

Bei allen Ansätzen wurde die gleiche Grundrezeptur für die Vorchargen verwendet (siehe Tab. 19). Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 330 Gramm Schweinefleisch, 330 Gramm Rindfleisch und 300 Gramm Rückenspeck verwendet. Die Zugabe der Starterkultur BITEC LS-1 erfolgte während des Zerkleinerungsvorgangs im Kutter.

Tab. 19: Für alle Versuchsansätze verwendete Grundrezeptur

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Glucose	2 g (0,2 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

2.12.4.2 Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumchlorid und Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 20)

Tab. 20: Bei den Versuchsansätzen verwendete Zusatzstoffe

Zusatzstoff	Menge	Versuchsansatz
Natriumchlorid	28 g/kg (2,82 %)	A Ia; B Ia; C Ia; D Ia
	34 g/kg (3,4 %)	A Ib; B Ib; C Ib; D Ib
Natriumnitrit	0 mg/kg	A Ia; A Ib
	100 mg/kg	B Ia; B Ib
	150 mg/kg	C Ia; C Ib
	200 mg/kg	D Ia; D Ib

2.12.4.3 Technologie der Herstellung

Die Rohmaterialien wurden eine Woche vor der Herstellung des Produktes zugeschnitten und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die tiefgefrorenen Teilstücke wurden in einem Kutter unter gleichzeitiger Zugabe der Gewürze und Starterkulturen (BITEC-LS 1) auf eine Körnung von ca. 10 mm zerkleinert. Zu dem in Chargen aufgeteilten Brät erfolgte die Zugabe der Inocula (siehe 2.7.2) und der Zusatzstoffe während der Zerkleinerungsphase im Kutter.

Das Brät wurde anschließend mit einer Wurstfüllmaschine in Naturin Kollagenfaserdärme, mit einem Kaliber von 60 mm und einer Länge von 40 cm gefüllt.

2.12.4.4 Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste für ca. 5 Sekunden in eine Edelschimmelpilz-Lösung (MEK-4) getaucht, um einen gleichmäßigen Oberflächenbewuchs mit *Penicillium nalgiovense* während der Reife- und Lagerungsphase zu erreichen. Die Edelschimmelkultur bestand aus einem gefriergetrockneten Konzentrat mit Dextrose (85 % +/- 5 %) und 5 % Magermilchpulver.

Die Reifung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern unter industriellen Bedingungen (siehe Tab. 21).

Tab. 21: Übersicht der geprüften Reife- und Lagerungsbedingungen

Tag	Reifeprogramm 1	relative Feuchte	Luftgeschwindigkeit
0-3	20 °C	92 %	0 - 0,01 m/s
3-7	18 °C	88 %	0,05 - 0,1 m/s
7-14	15 °C	85 %	0,1 - 0,2 m/s
14-21	15 °C	80 %	0,1 - 0,2 m/s
21-35	15 °C	75 %	0,1 - 0,2 m/s
35-42	15 °C	72 %	0,1 - 0,2 m/s
Tag	Lagerung		
42-84	15 °C	75 %	0,01 - 0,05 m/s

Die in den Reifekammern eingestellten Werte für die Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit wurden analog wie Punkt 2.12.2.4 dokumentiert und überprüft.

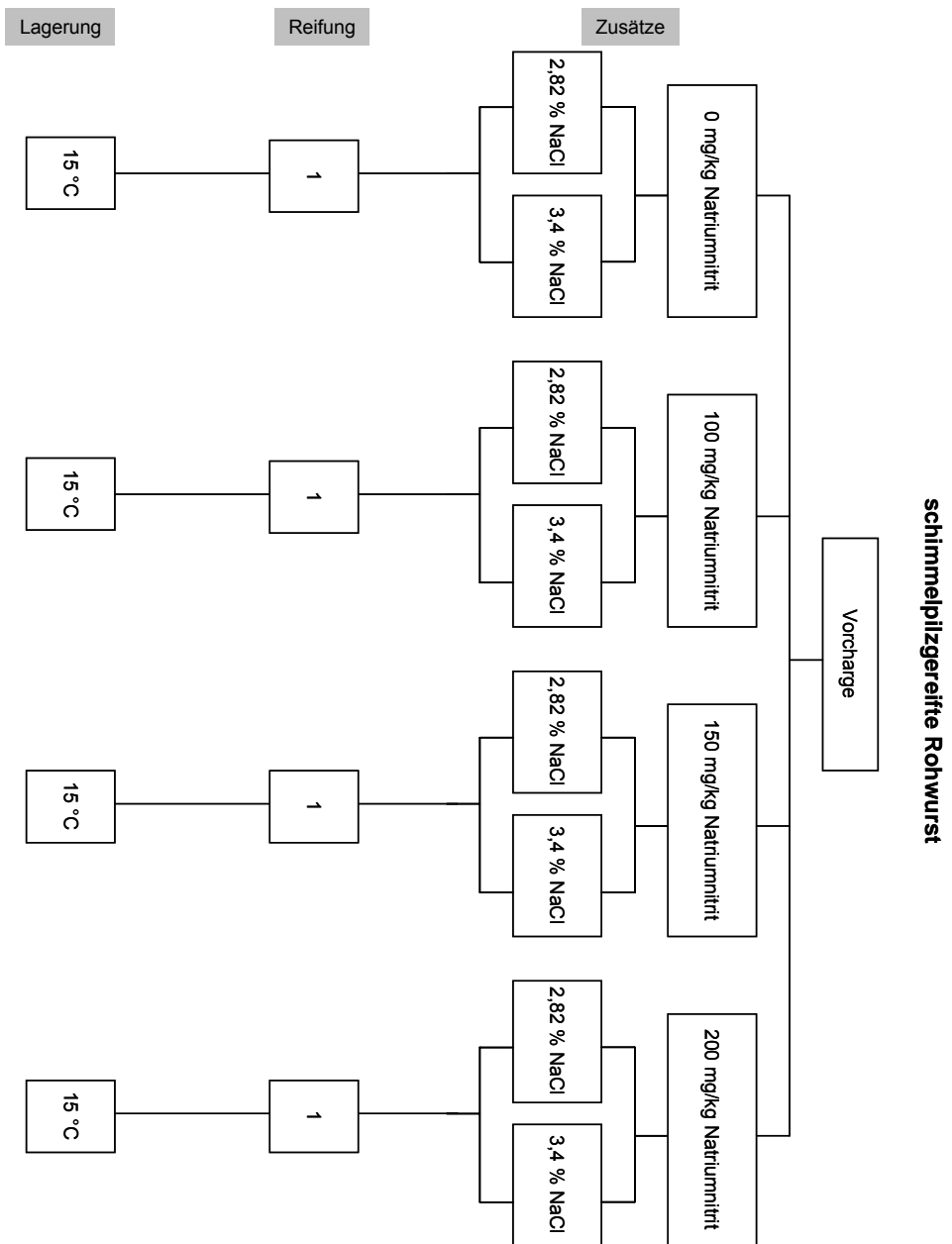


Abb. 4: Schematische Übersicht der Versuchsansätze zum Verhalten der verwendeten Keime in schimmelplizgereifter Rohwurst

2.12.4.5 Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen und die dazugehörigen Rezepturen sowie Reife- und Lagerungsbedingungen sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Übersicht aller hergestellten Chargen und der Chargenkodierung

Chargenkodierung	NaCl	Natriumnitrit	Reifeprogramm
A Ia	2,82 %	0 mg/kg	1
A IB	3,4 %	0 mg/kg	1
B Ia	2,82 %	100 mg/kg	1
B Ib	3,4 %	100 mg/kg	1
C Ia	2,82 %	150 mg/kg	1
C Ib	3,4 %	150 mg/kg	1
D Ia	2,82 %	200 mg/kg	1
D Ib	3,4 %	200 mg/kg	1

2.13 Mikrobiologische Untersuchungen der Rohwürste

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Keimzahlverlauf der eingepfropften Stämme (vgl. 2.5) der Milchsäurebakterienflora, der Enterobacteriaceen sowie der aeroben mesophilen Mikroorganismen bestimmt. Das Rohmaterial wurde vor der Keimzugabe auf das Vorhandensein von *Escherichia coli* [EHEC/STEC], *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. untersucht.

2.13.1 Kultureller Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Die Rohwürste wurden mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten, anschließend wurde unter sterilen Bedingungen 10 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 90 ml 0,85% iger Kochsalzlösung für zwei Minuten im Stomacher homogenisiert.

Die Keimzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* erfolgte zum einem mit dem PALCAM-Medium und parallel dazu zum Vergleich mit Chromogen-Listeria-Agar. Das Nachweisprinzip dieses Mediums beruht auf der Spaltung des Farbstoffs Chromogen-X-Glycosid durch die β -Glycosidase und der Hydrolyse des im Agar enthaltenen Lecithins durch eine Phospholipase (Lecithinase). Kolonien von *Listeria monocytogenes* erscheinen somit auf dem Agar türkis und sind von einem hellen Hof umgeben.

Zur Keimzählung wurden jeweils dezimale Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-7} angelegt. Alle Nachweismedien wurden mit 0,1 ml pro Platte im Spatelverfahren beschickt. Je 0,1 ml Suspension der Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} wurden sowohl auf dem PALCAM- als auch auf dem Chromogen-Listeria-Agar pipettiert und ausgespatelt. Die Agarplatten wurden anschließend für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Eine Beimpfung des Standard I- und MRS-Agars erfolgte mit je 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-5} und 10^{-6} . Ab dem zweiten Reifetag wurde die Verdünnungsstufen 10^{-7} ausplattiert. Diese Medien wurden aerob bei 30 °C für 48 Stunden inkubiert. Sowohl vom PALCAM- als auch vom Chromogen-Listeria-Agar wurden die charakteristischen Kolonien ausgezählt.

Je Untersuchungstag wurden jeweils vier verdächtige Kolonien der niedrigst auszählbaren Verdünnungsstufe auf Standard I-Agar subkultiviert und zur Kontrolle bestätigt. Hierzu wurden die HENRY'sche Beleuchtung und der CAMP-Test durchgeführt sowie das Hämolyseverhalten und die Rhamnose und Xyloseverwertung überprüft. Die Berechnung der *Listeria monocytogenes* Keimdichte sowie der Zahl aerober Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimflora erfolgte wie unter Punkt 8 der Methode L 06.00 § 64 LFGB beschrieben.

2.13.2 Kultureller Nachweis von Escherichia coli [EHEC/STEC]

Die zu untersuchenden Rohwürste wurden mit einem sterilen Skalpell senkrecht in der Mitte aufgeschnitten. Jeweils 25 g Proben wurde unter sterilen Bedingungen sowohl aus der Wurstmitte als auch aus dem Randbereich entnommen und in einen Stomacherbeutel mit Seitenfilter überführt. Nach Zugabe von 225 ml 0,85 % -iger Kochsalzlösung (1:10 Verdünnung) wurde die Probe zwei Minuten homogenisiert. Die Keimzahlbestimmung von *Escherichia coli* [EHEC/STEC] erfolgte mit dem DHL-Medium (Desoxycholate Hydrogen Sulfide Lactose Agar) und parallel dazu zum Vergleich mit Sorbitol MacConkey Agar (SMAC).

Zur Keimzählung der beimpften Chargen wurden 1 ml Homogenat entnommen und in einer dezimalen Verdünnungsreihe angelegt. Nach dem Anlegen der Verdünnungsreihe wurden jeweils 0,1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-2} und 10^{-3} auf dem SMAC- und DHL-Nährboden ausplattiert. Je 0,1 ml wurden in der Verdünnungsstufe 10^{-6} und 10^{-7} auf dem Standard I- und MRS-Agar angelegt. Die Bebrütung des Sorbitol MacConkey Agar und des DHL Agar erfolgte für 48 Stunden bei 30 °C. Das Zählen der Kolonien wurde wie unter Punkt 8 L 06.00 § 64 LFGB beschrieben durchgeführt. Im Vergleich zu natürlich kontaminierten Proben erfolgte die Nachweismethode bei den verwendeten künstlich beimpften Proben ohne einen Anreicherungsschritt so lange keine Keimzahlen ≤ 10 erreicht wurden.

Dann wurde das Probenmaterial in 225 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) aufgenommen und für 18 Stunden geschüttelt, um vorgeschädigte STEC wieder zu beleben. 1,0 ml der bebrüteten Kultur wurden in 4 ml sterile TSB mit 10 mg Novobiocin /l pipettiert und 16 Stunden in einem sterilen Reagenzglaschen bei 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde diesen 1 ml Homogenat entnommen und in einer dezimalen Verdünnungsreihe angelegt. Ausplattiert auf SMAC wurden die Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} . In regelmäßigen Abständen wurden zur Bestätigung des Ergebnisses verdächtige Kolonien von den SMAC- und DHL-Nährböden abgenommen und auf einem

chromogen Medium (Fluorocult) für 24 Stunden bei 30 °C ausgestrichen. Durch den Gehalt einer fluorogenen Substanz wird der Nachweis der β -D-Glucuronidase (positiv bei *E. coli*) möglich.

2.13.3 Kultureller Nachweis von *Salmonella* spp.

Der kulturelle Nachweis von *Salmonella* spp. (siehe Punkt 2.5) geschah analog zu Punkt 2.13.2. Jedoch wurden als geeignete Nachweismedien der XLD-Agar und autoklavierter DHL-Agar eingesetzt. Dabei zeigten typische, auf XLD-Agar gewachsene, Salmonellen-Kolonien ein schwarzes Koloniezentrum und eine leicht rötlich gefärbte transparente Zone durch den Umschlag des Indikators. Im Gegensatz dazu konnte auf dem autoklavierten DHL-Nährboden für *Salmonella* spp. nur schwarze Kolonien nachgewiesen werden. Eine selektive Anreicherung erfolgte erst nachdem die Keimzahl der Proben auf kleiner 10 abgesunken war. Dazu wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertes Peptonwasser überführt, zerkleinert und für 18 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von der Voranreicherung wurden anschließend 0,1 ml zu 10 ml RVS-Bouillon pipettiert. Die beimpfte RVS-Bouillon wurde für 24 h unter ständigem Schütteln (180 rpm) bei 41 °C inkubiert. Aus der RVS-Bouillon erfolgte ein Verdünnungsausstrich mit einer Impföse auf dem XLD- und DHL-Agar. Da in den Ausgangsmaterialien keine Salmonellen nachgewiesen werden konnten, wurde auf eine serologische Bestätigung verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen

Im Rahmen des ersten Arbeitsblocks sollte untersucht werden, ob die verwendeten pathogenen Mikroorganismen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (EHEC/STEC) und *Salmonella* spp. unter verschiedenen Milieubedingungen mit bzw. ohne Zusatz von Natriumnitrit ein unterschiedliches Keimwachstumsverhalten zeigen.

Dazu wurden die Versuche zunächst im Nährmedium (*in vitro*) bei Temperaturen von 25 °C und 17 °C durchgeführt, die auch in der industriellen Fermentation von Rohwürsten häufig verwendet werden (Farber et al. 1993; Trüssel et al. 1989; Työppönen et al. 2003). In Hinblick auf das später zu untersuchende Produkt Rohwurst wurden multifaktorielle Aspekte (Zusatz von Natriumnitrit, pH-, a_w -Wert und Keimzahlhöhe) mit einbezogen, so dass die Wachstumskinetik der Mikroorganismen unter realitätsnahen Bedingungen verfolgt werden konnte. Parallel zur Erfassung der Keimzahl wurde die mikrobielle Aktivität über das Redoxpotential bestimmt. Die kontinuierliche Aufzeichnung der Redoxpotentialverläufe ermöglicht, alle Geschehnisse aufzuzeichnen, die das umgebende Milieu der Elektrode beeinflussen. Infolge einer Vermehrung der Mikroorganismen verändert sich ständig die Zusammensetzung des Milieus in Abhängigkeit zur Menge und Art der gebildeten Stoffwechselprodukte (Rödel und Scheuer, 2003). Eine Vermehrung der Organismen ist durch einen Abfall der relativen Redoxpotentiale gekennzeichnet. Der Zeitraum bis zum exponentiellen Abfall der Messkurve, die „elektronische lag-Phase“, ist ein präzise bestimmbarer Maßstab für die Wirksamkeit einer Hürde (siehe Abb.1).

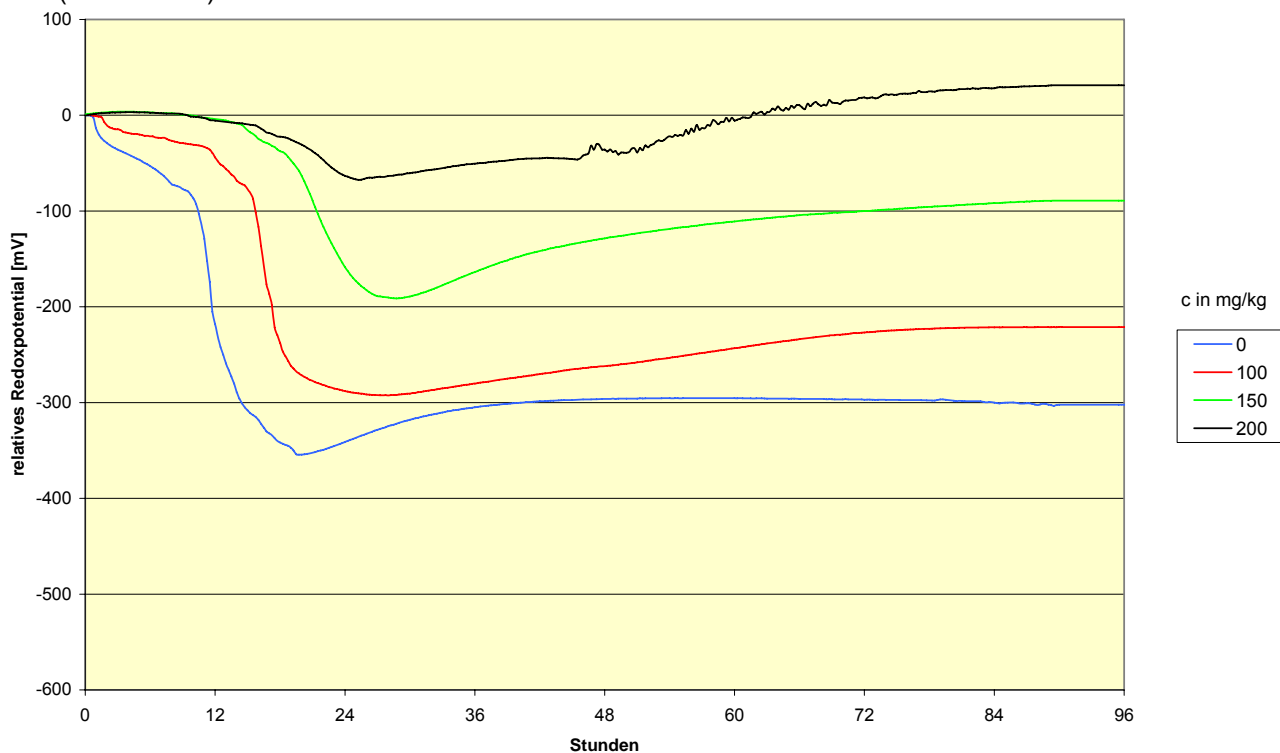


Abb.1: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Zusatzstoffes Natriumnitrit (0, 100 und 200 mg/l) auf die Länge der „elektronischen Lag-Phase“ bei *Listeria innocua* bei pH6, 25 °C in Peptonwasser

Werden die Bakterien in ihrer Vermehrung durch Zusatzstoffe z.B. Natriumnitrit oder andere Faktoren negativ beeinflusst, ist ebenfalls eine Verlängerung der „elektronischen Lag-Phase“ mit zunehmender Hemmung zu beobachten. Neben der rein quantitativen Erfassung der Keimzahlen erlaubte die Beobachtung der Redoxpotentialverläufe eine genauere Interpretation der Wirkmechanismen bestimmter Hürden.

Die Ergebnisse der im Arbeitsblock 1 ausgeführten Experimente bildeten die Grundlage für alle weiteren Versuche mit dem Produkt „fermentierte Rohwurst“ (Arbeitsblock 2).

3.1.1 Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes*

3.1.1.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,98 hatte Natriumnitrit nur in einer Konzentration von 200 mg/l einen geringfügig hemmenden Einfluss auf die Zellen von *Listeria monocytogenes* (siehe, Abb.2).

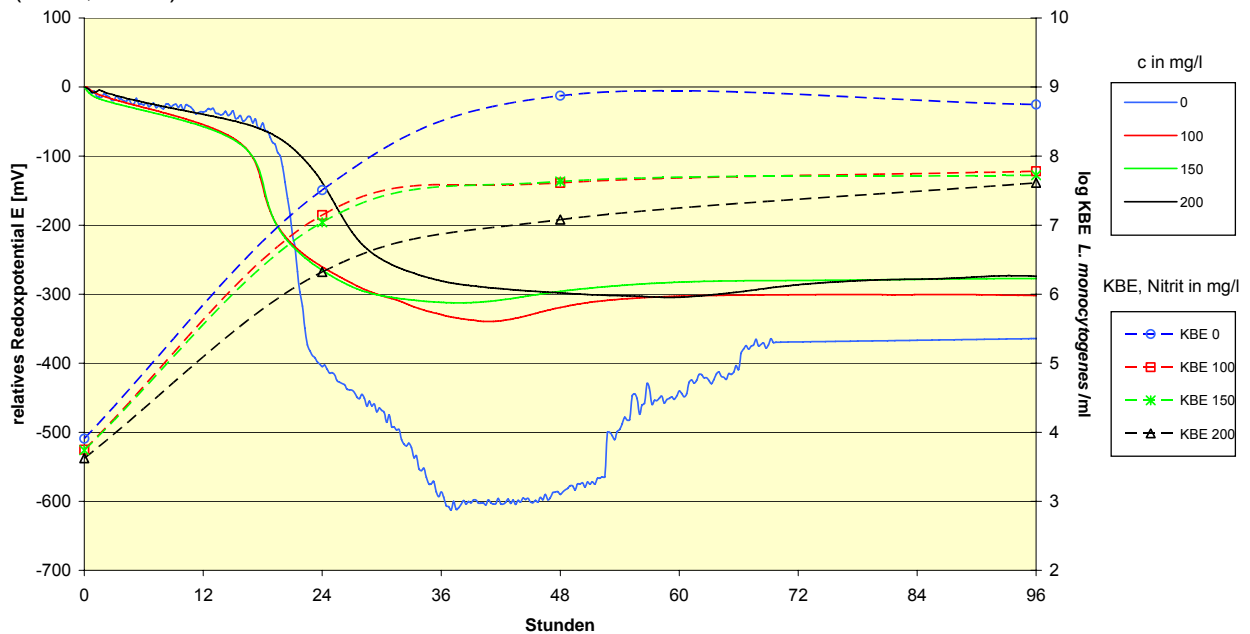


Abb.2: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektivbouillon bei 25 °C, pH7 und a_w : 0,98

Ab einem a_w -Wert von 0,97 konnte ein beschleunigtes Wachstum der Mikroorganismen im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden, so dass die Anfangskeimzahlen von ca. $5,0 \times 10^3$ KBE/ml innerhalb von 24 Stunden auf ca. $5,0 \times 10^7$ KBE/ml zunahm (siehe, Abb. 3).

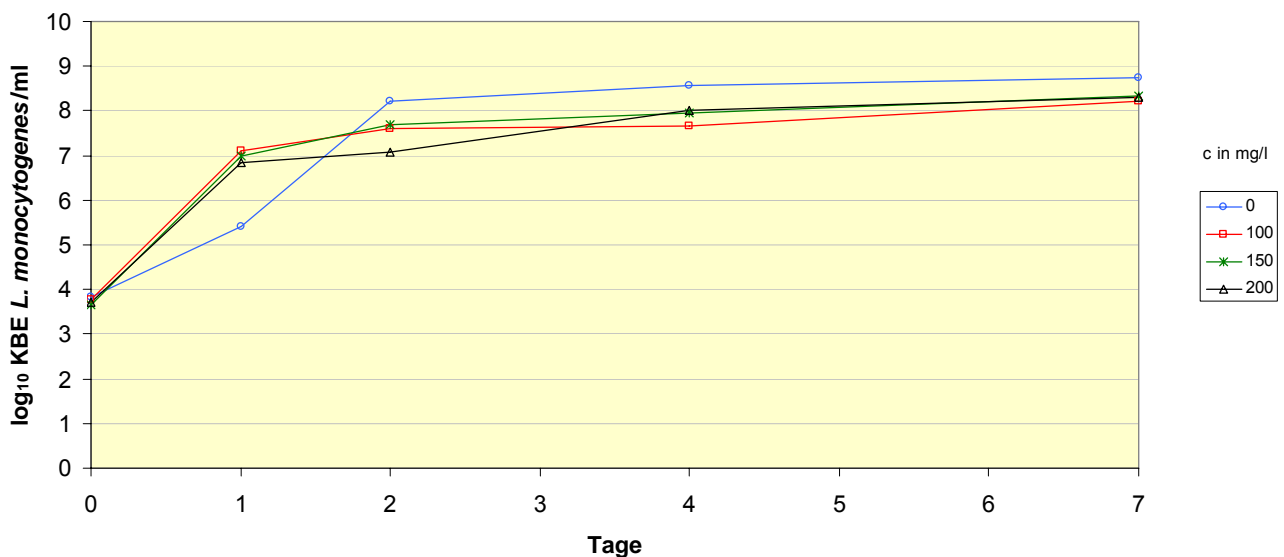


Abb.3: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,97

Obwohl die Negativkontrolle die Endkeimzahlen der Ansätze mit Nitrit um ca. eine Zehnerpotenz übertraf, zeigte sich aber innerhalb der ersten 24 Stunden ein stimulierender Effekt des Zusatzstoffes auf das Wachstum der Zellen von *Listeria monocytogenes*. Über den gesamten Untersuchungszeitraum von 7 Tagen blieben die Keimzahlen konstant auf einem hohen Niveau von $5,0 \times 10^7$ KBE/ml.

Bei einer Erniedrigung des Wasseraktivitätswertes auf 0,94 verstärkte sich der positive Effekt des Nitrits im Vergleich zur Negativkontrolle noch deutlicher, so dass die Kulturen mit Nitrit eine höhere Endkeimzahl erreichten als die Kontrollen (siehe, Abb. 4).

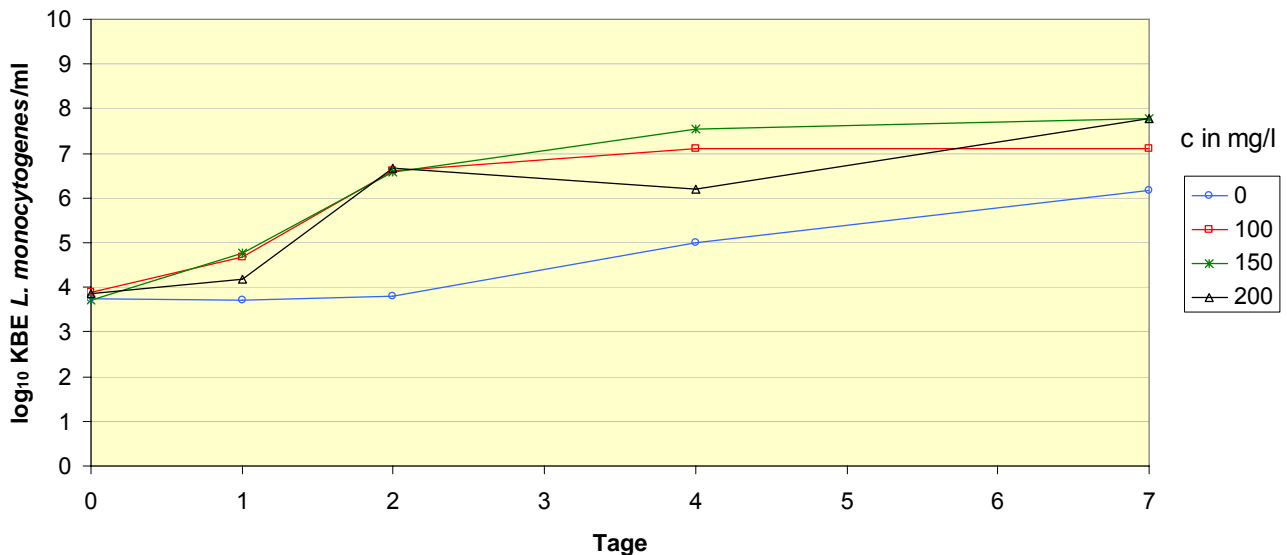


Abb.4: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,94

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung wurden durch die Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt. Diese fielen innerhalb der ersten 24 Stunden steil ab und zeigten, unabhängig von der eingesetzten Nitritmenge, einen fast identischen Verlauf bis zu einem Redoxpotentialwert von -300 mV (Relativwert). Anschließend gingen die Redoxpotentialkurven, die den Ansätzen mit unterschiedlichen Nitritkonzentrationen entsprachen, in einen waagerechten Verlauf über. Der niedrigste Messwert von ca. -600 mV (Relativwert) wurde nur von der Negativkontrolle ohne Natriumnitrit erreicht (siehe Abb. 2).

Bei einem pH-Wert von 6 zeigte sich, dass die Mikroorganismen bei Wasseraktivitätswerten von 0,98 und 0,97 durch Natriumnitrit in ihrem Wachstum gefördert oder nicht beeinflusst wurden. Ab einem a_w -Wert von 0,955 konnte jedoch in den Ansätzen mit 150 mg/l und 200 mg/l Natriumnitrit im Gegensatz zur Negativkontrolle ein verzögertes Wachstum beobachtet werden (siehe Abb. 5).

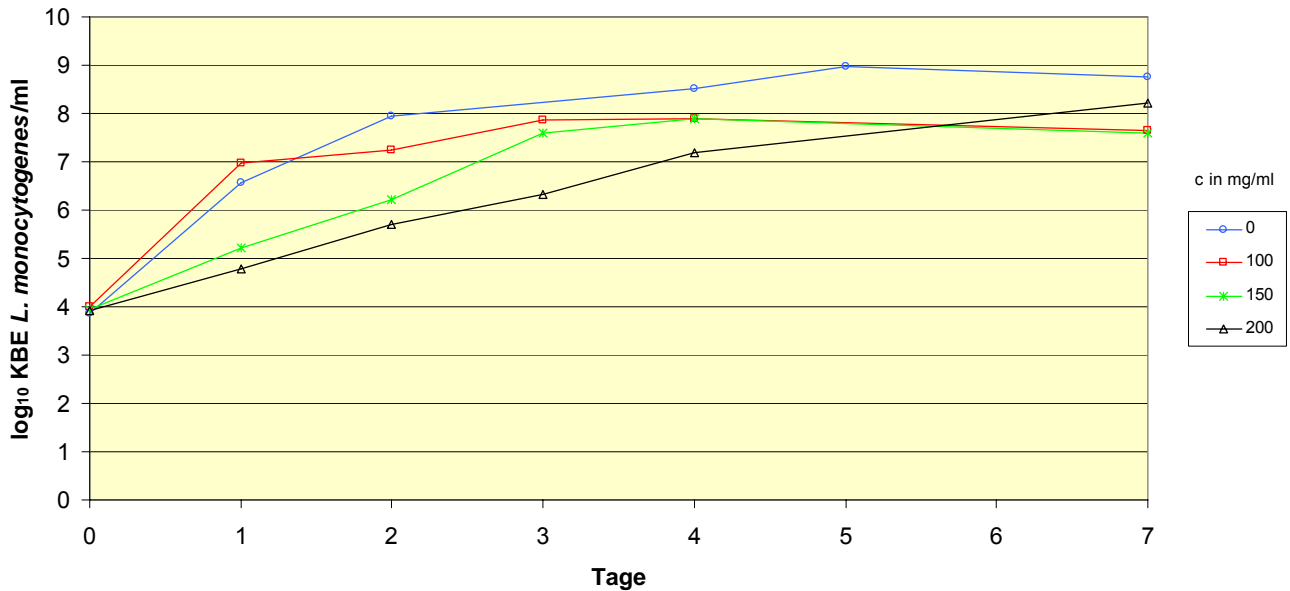


Abb.5: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,955

Mit einem weiter abnehmenden a_w -Wert kam es zu einer zusätzlichen Verlängerung der lag-Phase der Bakterienzellen. *Listeria monocytogenes* erreichte jedoch auch unter diesen Bedingungen im Medium nach 3-4 Tagen eine vergleichbare Keimzahl wie bei den Experimenten, die mit einem pH-Wert von 7 durchgeführt wurden. Wurde Natriumnitrit in Konzentrationen von 100 mg/l zugesetzt, ergab sich eine Wachstumskinetik, die sehr eng mit der der Negativkontrolle korrelierte. Die ermittelten Endkeimzahlen waren jedoch um ca. eine halbe Zehnerpotenz in Richtung der Negativkontrolle verschoben.

Bei einem pH-Wert von 5 war kein Wachstum mehr feststellbar (siehe Abb. 6). Stattdessen konnten bakteriostatische (a_w -Wert 0,98) oder bakterizide Zustände in den Ansätzen beobachtet werden.

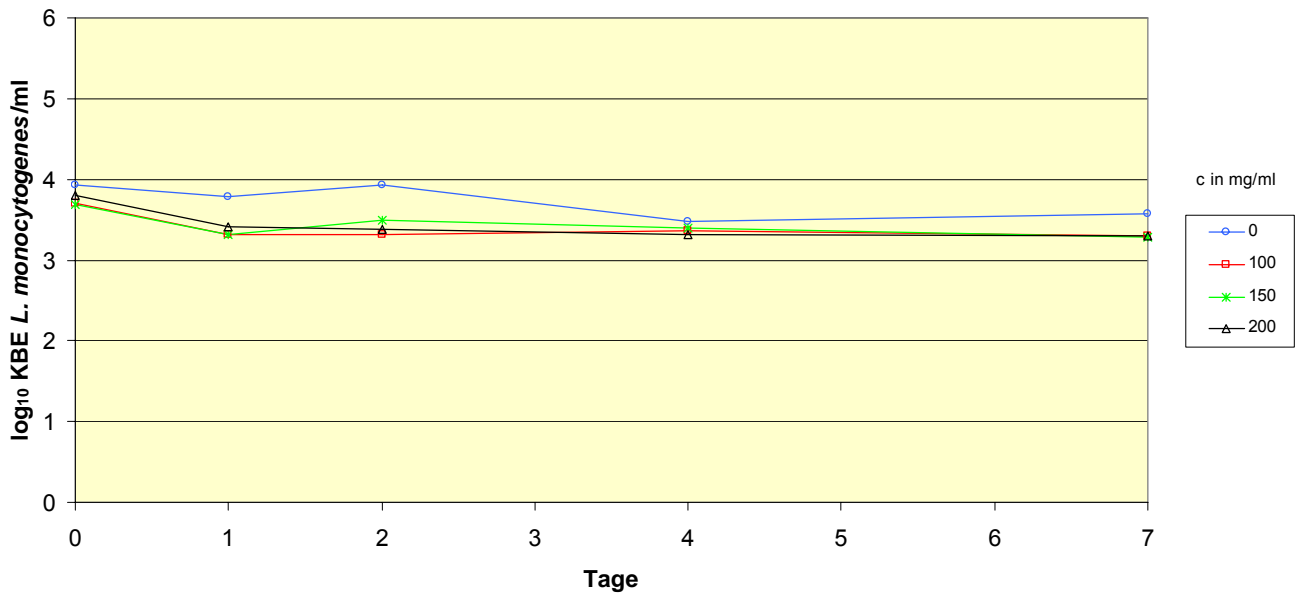


Abb.6: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,98

Wurde der a_w -Wert schrittweise weiter erniedrigt, so starben die Mikroorganismen in den Ansätzen mit Nitrit ab. Dabei wurde eine Zunahme der bakteriziden Wirkung des Nitrits mit steigender Konzentration festgestellt (siehe Abb. 7).

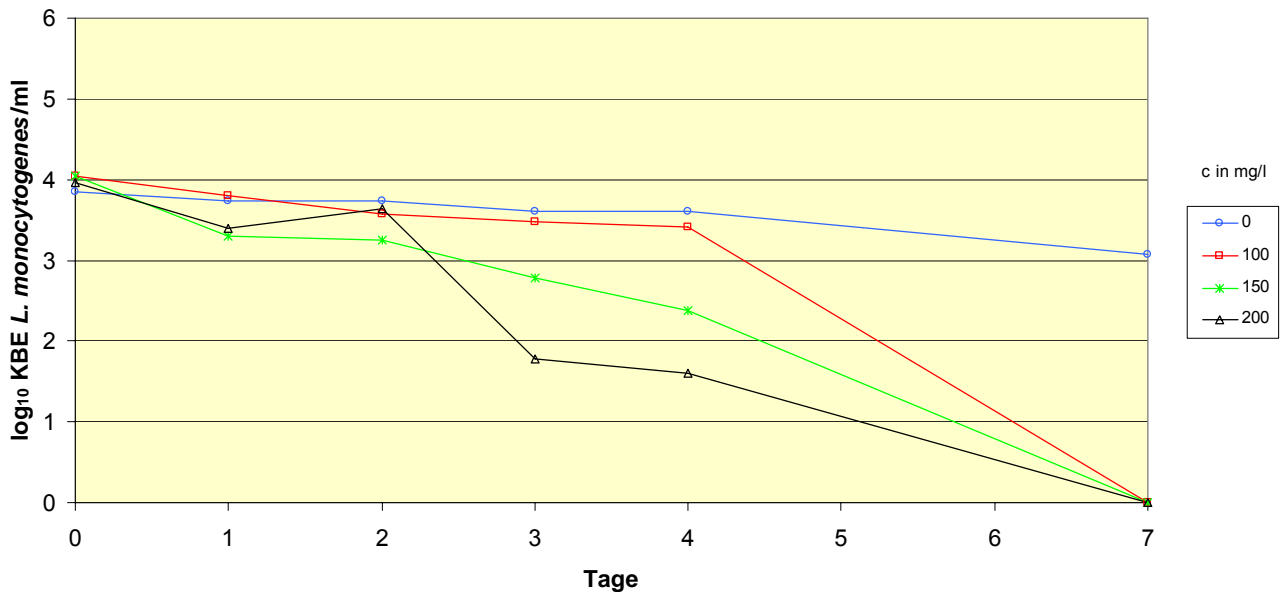


Abb.7: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,94

Die Keimzahlen der Negativkontrollen blieben bei allen Versuchen stabil bei ihren Anfangswerten von 5×10^3 KBE/ml. Durch die Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale (Rödel und Scheuer 2003 a/b) konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, da über den gesamten Untersuchungszeitraum in keinem der Ansätze eine Abnahme des Redoxwertes und damit eine Zunahme der mikrobiellen Aktivität festgestellt werden konnte.

3.1.1.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C, verschiedenen pH- und a_w -Werten

Natriumnitrit hatte bei einem pH-Wert von 7 keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum der Organismen. Wie auch schon die Untersuchungen bei 25 °C und pH 7 gezeigt haben, fällt auch hier auf, dass die Ansätze mit Nitrit ab einem a_w -Wert von 0,97 ein deutlich besseres Wachstum aufwiesen, als die Negativkontrollen ohne Zusatzstoff (vgl. 3.1.1). Dieses Ergebnis wurde über die Messung der Redoxpotentiale bestätigt, trat jedoch hier bei einer Konzentration von 100 mg/l etwas abgeschwächer auf als bei 150 mg/l und 200 mg/l (siehe Abb.8).

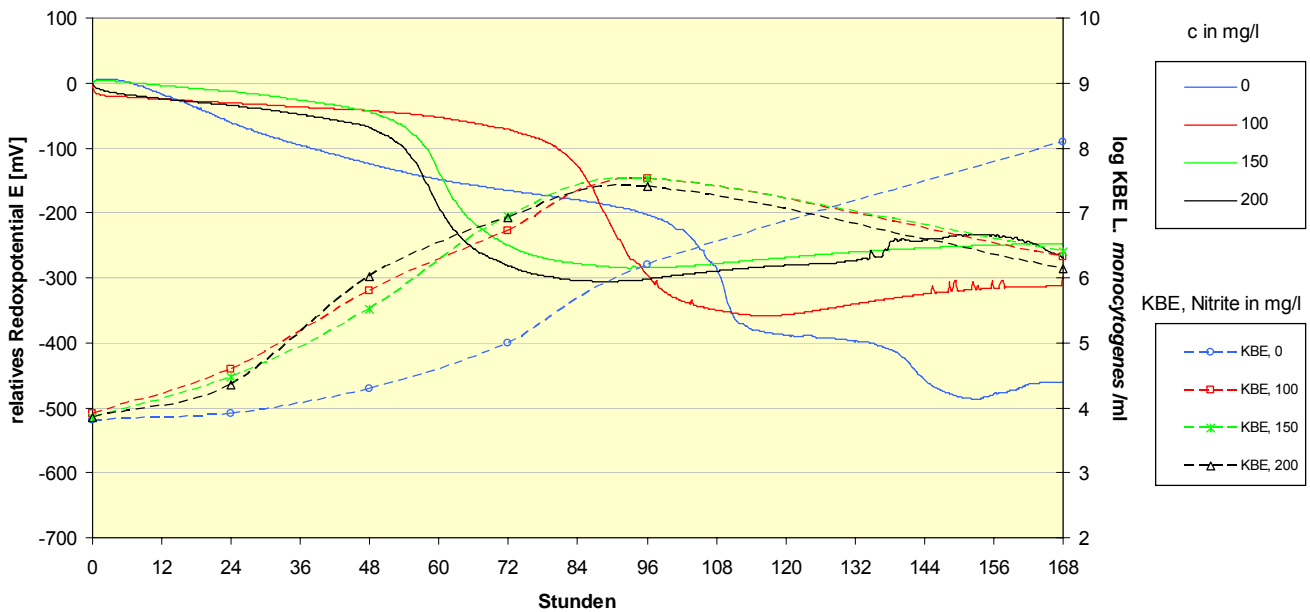


Abb.8: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektivbouillon bei 17 °C, pH7 und a_w : 0,955

Dieser Wachstumsvorteil kehrte sich bei einer Erniedrigung des pH-Wertes von 7 auf 6 um (siehe Abb. 9). Je höher nun die zugesetzte Konzentration an Natriumnitrit war, desto länger wird die lag-Phase von *Listeria monocytogenes*. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden auch deutlich geringere Endkeimzahlen erreicht.

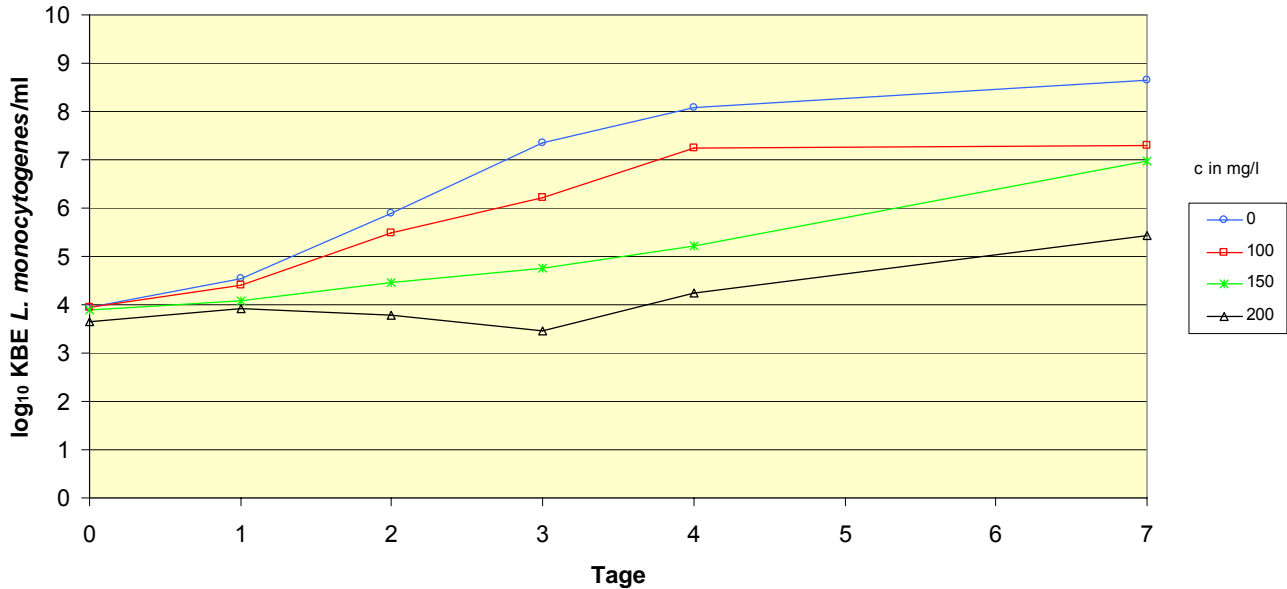


Abb.9: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w: 0,98

Wurde der a_w-Wert, in Kombination mit einem pH von 6, auf 0,955 weiter abgesenkt, trat in den Ansätzen mit 150 mg/l und 200 mg/l Natriumnitrit ein bakteriostatischer Zustand ein (siehe, Abb. 10).

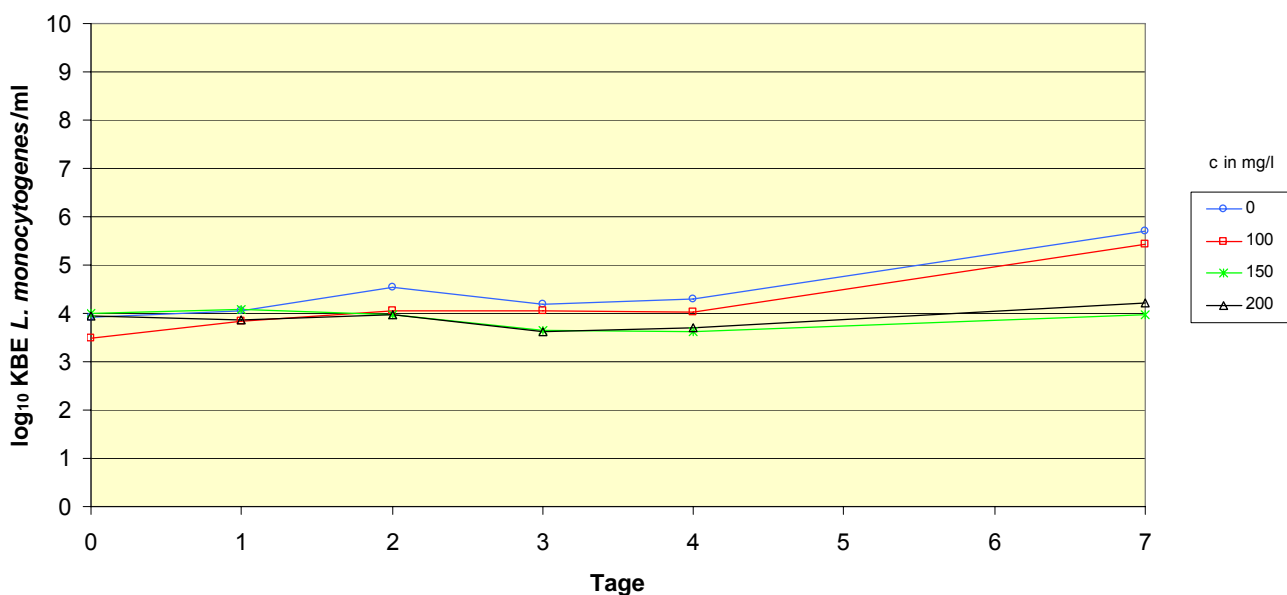


Abb.10: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w: 0,955

Bei einer weiteren Erniedrigung des a_w -Wertes auf 0,94 war kein Wachstum mehr zu beobachten. Die Mikroorganismen verharrten in einem Zustand der Bakteriostase. Folglich blieb die Keimzahl auf dem Niveau der Anfangskeimzahl von ca. 5×10^3 KBE/ml.

Bei Absenkung des pH-Wertes von 6 auf 5 sank die Anfangskeimzahl um eine Zehnerpotenz und blieb dann über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant auf diesem Niveau. Im Vergleich zu den Experimenten bei 25 °C kann festgestellt werden, dass es zu keinem Absterben der Mikroorganismen unter den genannten Bedingungen kam (siehe Abb. 11).

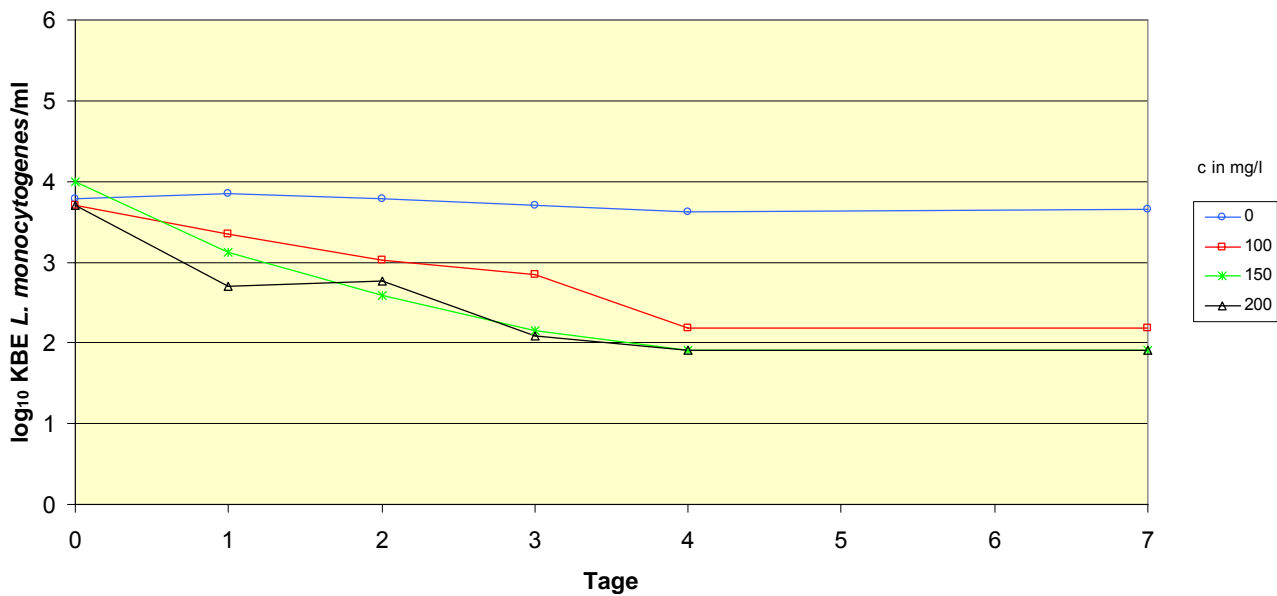


Abb.11: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,94

3.1.1.3 Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24- stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit

Ein Einfluss von Natriumnitrit auf die Zellen von *Listeria monocytogenes* wurde im Hinblick auf eine Veränderung der Zelloberfläche auch mikroskopisch untersucht. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops konnte zwischen den mit und ohne Natriumnitrit inkubierten Zellen bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,98 ein deutlich sichtbarer Unterschied in den Aufnahmen festgestellt werden.

Natriumnitrit führte unter den genannten Bedingungen zu deutlichen Veränderungen in der bakteriellen Zellwand (siehe Abb. 12).

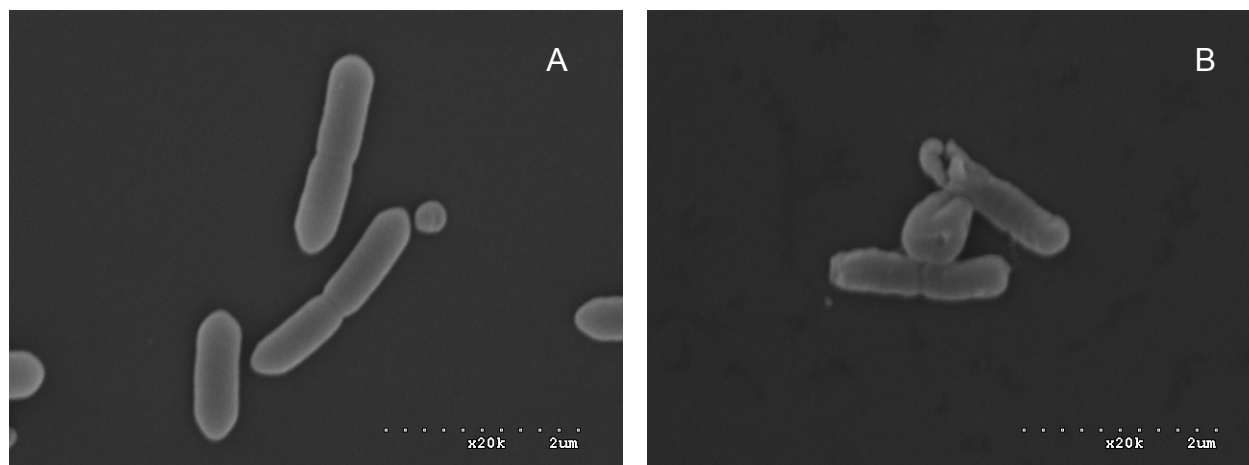


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes* nach einer 24-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon (pH: 7 und a_w : 0,98, Temp.: 25 °C, Inokulum: 3×10^6 KBE/ml) ohne Natriumnitrit (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B)

Um die bei einem pH-Wert von 7 unter 3.1.1 gemachten Beobachtungen besser interpretieren zu können, wurden auch von Zellen aus diesem Versuch elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. Dadurch sollte geklärt werden, ob aufgrund der Morphologie der Zellen eine Aussage möglich ist, warum mit Nitrit inkubierte Zellen bei a_w -Werten unterhalb von 0,98 ein besseres Anfangswachstum, als die Zellen der Negativkontrolle zeigten. Mit der Rasterelektronenmikroskopie konnte zwischen den mit und ohne Nitrit inkubierten Zellen kein optischer Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 13).

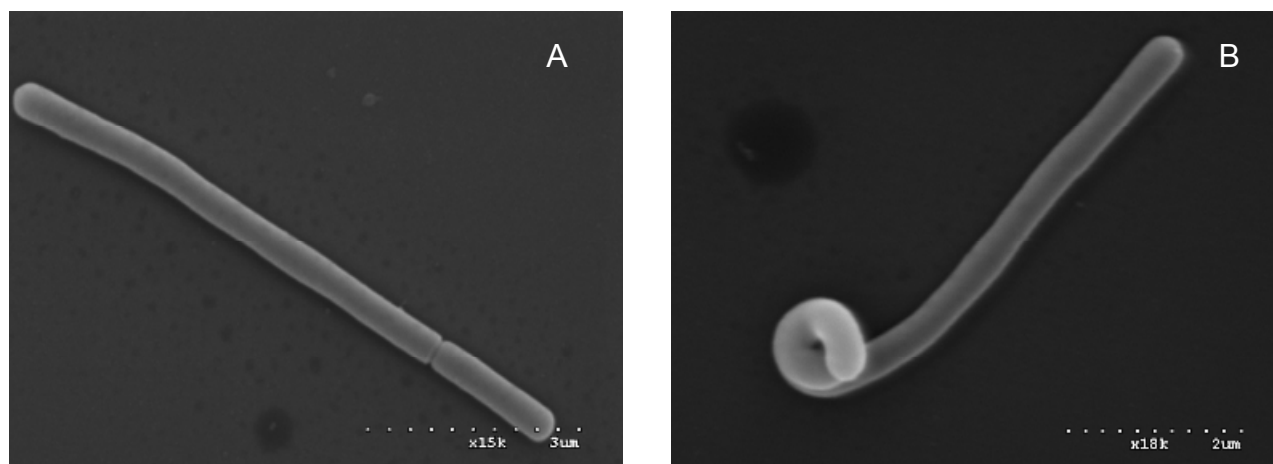


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes* nach einer 48-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon (pH: 7 und a_w : 0,955, Temp.: 25 °C, Inokulum: 5×10^6 KBE/ml) ohne Natriumnitrit (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B)

Jedoch fiel im Vergleich zur Abbildung 12 auf, dass die mit Nitrit inkubierten Zellen keine Schäden in der Zelloberfläche aufwiesen. Es konnte jedoch eine deutliche Veränderung der Form der Stäbchen beobachtet werden. Waren diese bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,98 doch eher kompakt, wiesen sie bei einer reduzierten Wasseraktivität eine schmalere und länglichere Form auf.

Bei einer Absenkung des pH-Wertes von 7 auf 5 konnte eine deutliche Abnahme der Länge der inkubierten Listerienzellen beobachtet werden (siehe Abb. 14).

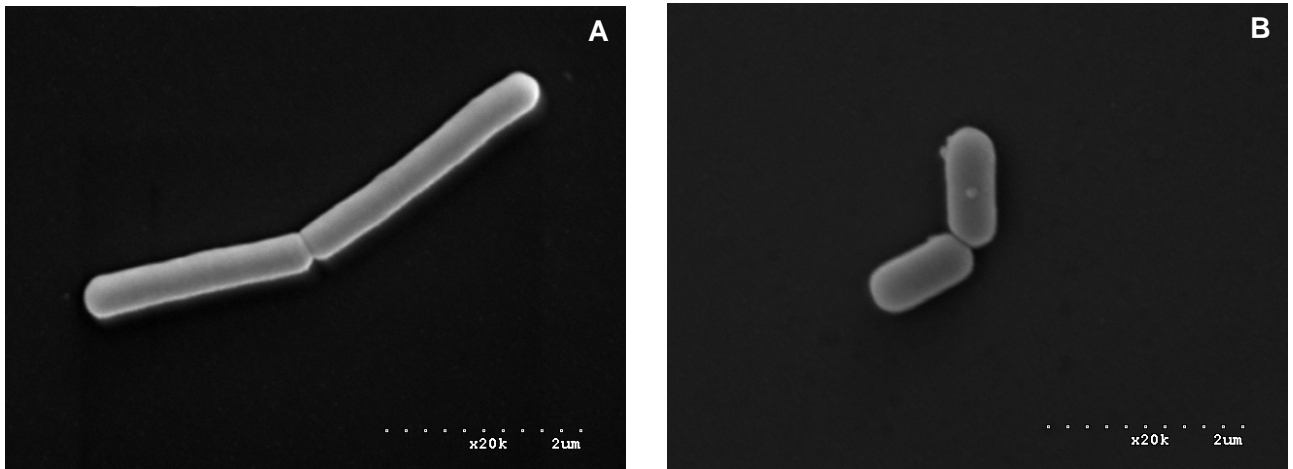


Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes* nach einer 48-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillion (a_w : 0,955, Temp.: 25 °C, Inokulum 3×10^6 und 200 mg/l Natriumnitrit) bei einem pH-Wert von 7 (A) und 5 (B)

3.1.2 Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von *Escherichia coli*

Da *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. im Vergleich zu *Listeria monocytogenes* gegen eine Absenkung des Wasseraktivitätswertes empfindlicher sind (Madigan et al. 2001; Krämer 2002), wurden für diese Untersuchungen höhere a_w -Werte gewählt.

3.1.2.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Natriumnitrit hatte bei einem pH-Wert von 7 und a_w -Werten von 0,99 bis 0,975 keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen. Mit abnehmendem a_w -Wert konnte lediglich eine Verlängerung der lag-Phase um ca. 24 Stunden festgestellt werden, jedoch wurden in allen Ansätzen nach 7 Tagen Keimzahlen von ca. 5×10^8 KBE/ml erreicht (siehe Abb. 15).

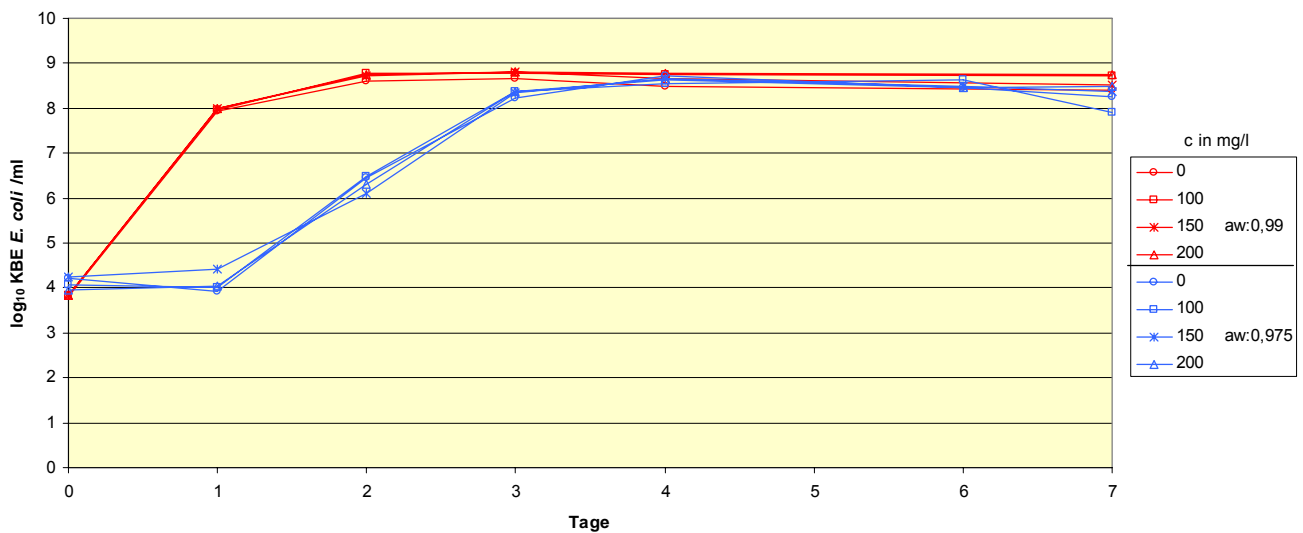


Abb.15: Vergleich des Einflusses der Wasseraktivität (a_w : 0,99 und a_w : 0,975) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

Die Ergebnisse, die durch Ermittlung der Keimzahl erzielt wurden, konnten durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden fielen die Redoxkurven steil ab und zeigten unabhängig von der eingesetzten Nitritmenge einen fast identischen Verlauf bis zu einem Redoxpotentialwert von -600 mV (Relativwert). Dies war ein Hinweis für eine starke mikrobielle Aktivität.

Wurde der Wasseraktivitätswert auf 0,965 abgesenkt, konnten bereits nach 24 Stunden in den Ansätzen mit 200 mg/l Nitrit keine Kolonien nachgewiesen werden. In den Versuchen mit 0, 100 und 150 mg/l Natriumnitrit konnten die Mikroorganismen mit den verwendeten Methoden zwischen dem 1. und 4. Untersuchungstag nicht mehr erfasst werden.

Erst zwischen dem 4. und 7. Untersuchungstag kam es zu einer sprunghaften Vermehrung der Organismen auf Keimzahlen von 3×10^8 KBE/ml (siehe Abb. 16). Damit lag die erreichte Keimdichte, im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen mit a_w -Werten von 0,99 bis 0,975, auf einem ähnlich hohen Niveau.

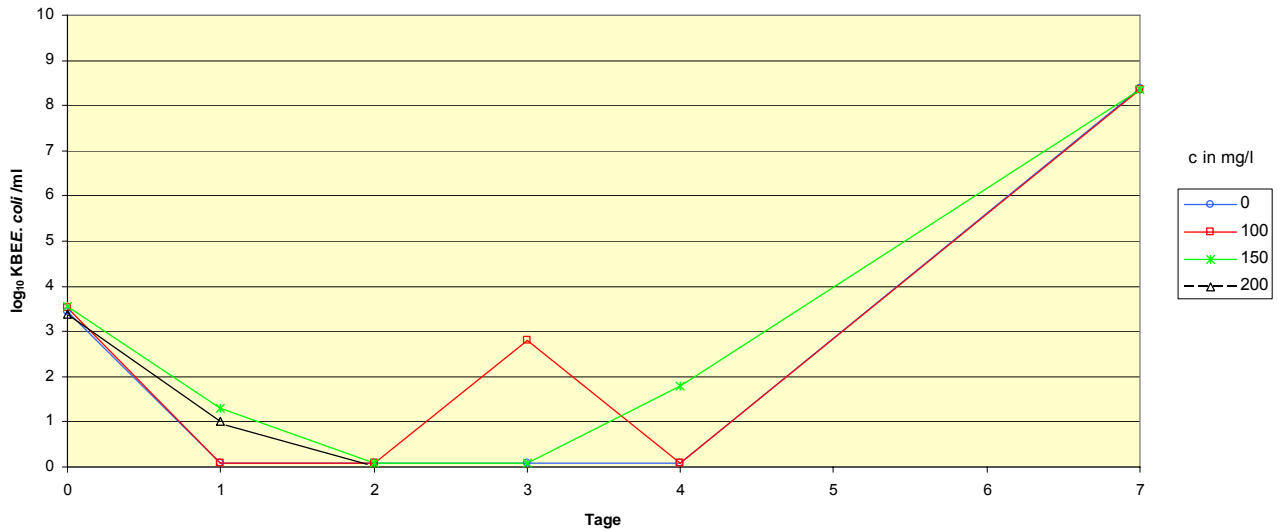


Abb.16: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 7, a_w : 0,965

Wurde der pH-Wert von 7 auf 6 abgesenkt, konnte bei allen untersuchten a_w -Werten eine Hemmung der Mikroorganismen mit Natriumnitrit im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden. Dieses Resultat konnte durch die Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden (siehe Abb. 17).

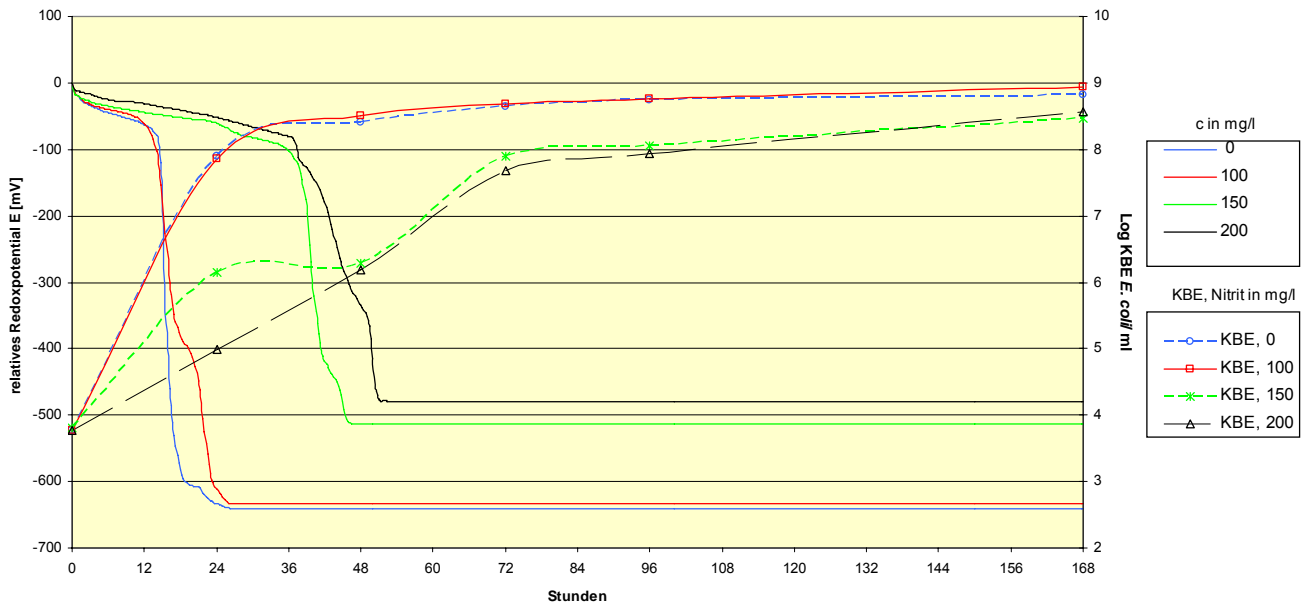


Abb.17: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* bei 25 °C in E.C.-Bouillon bei pH 6 und a_w : 0,99

Bei einer Senkung des a_w -Wertes auf 0,965 waren bereits nach 24 Stunden in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg/l Natriumnitrit keine Mikroorganismen im Vergleich zur Negativkontrolle mehr nachweisbar. Die Kulturen der Negativkontrolle bewegten sich bis zum vierten Versuchstag auf einem konstanten Niveau von 5×10^3 KBE/ml. Anschließend konnten auch diese Kulturen nicht mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch die Messung der Redoxpotentiale gestützt.

Bei einer weiteren Absenkung des pH-Wertes auf 5 trat in keinem der Ansätze ein Wachstum auf. Stattdessen war mit abnehmendem Wasseraktivitätswert eine Zunahme der Toxizität des Natriumnitrits zu beobachten (siehe Abb. 18).

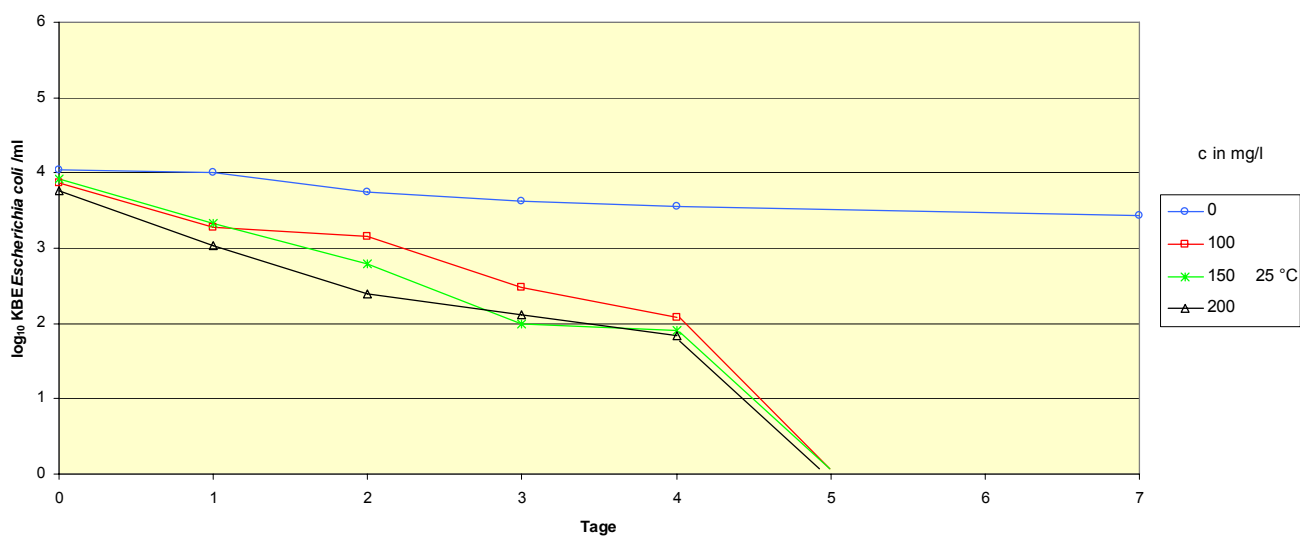


Abb.18: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 5, a_w : 0,965

3.1.2.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Genau wie bei den vorherigen Untersuchungen (vgl. 3.2.1) war kein Einfluss des Natriumnitrits bei einem pH-Wert von 7 und Wasseraktivitätswerten von 0,99 bis 0,975 feststellbar. Jedoch war bei einem a_w -Wert von 0,965 im Gegensatz zu den Versuchen, die bei 25 °C durchgeführt wurden, kein Absterben der Mikroorganismen bei 200 mg/l Nitrit, zu beobachten. Zwar sank die Keimzahl innerhalb der ersten 24 Stunden, vor allem für die Organismen, die mit 150 und 200 mg/l Natriumnitrit inkubiert wurden, um zwei Zehnerpotenzen, aber bereits nach 48 Stunden erreichten diese Kulturen mit der Negativkontrolle vergleichbare Keimzahlen (siehe Abb. 19).

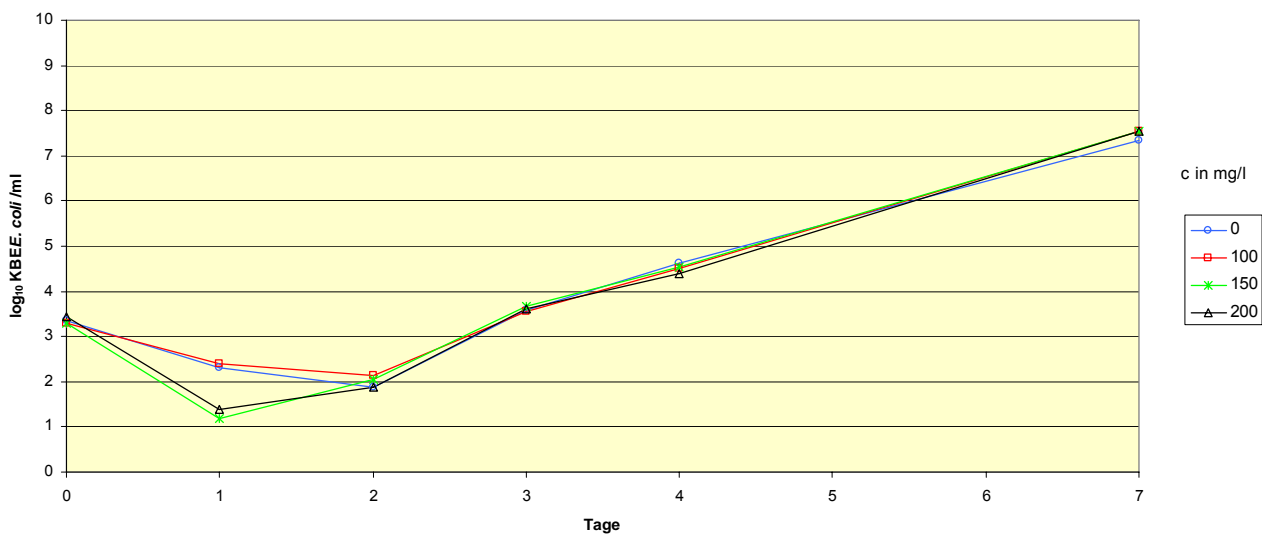


Abb.19: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,965

Die Ergebnisse der Keimzählung konnten durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden.

Bei einem pH-Wert von 6 zeigte der Zusatzstoff Natriumnitrit einen deutlichen Einfluss. Der hemmende Effekt des Nitrits trat hier sehr viel ausgeprägter auf als dies bei 25 °C (vgl. 3.2.1) der Fall war. Im Vergleich zur Negativkontrolle verlängerte sich zum einen die lag-Phase der Bakterien im Schnitt um 72 Stunden und zum anderen wurden deutlich niedrigere Keimzahlen erreicht (siehe Abb. 20).

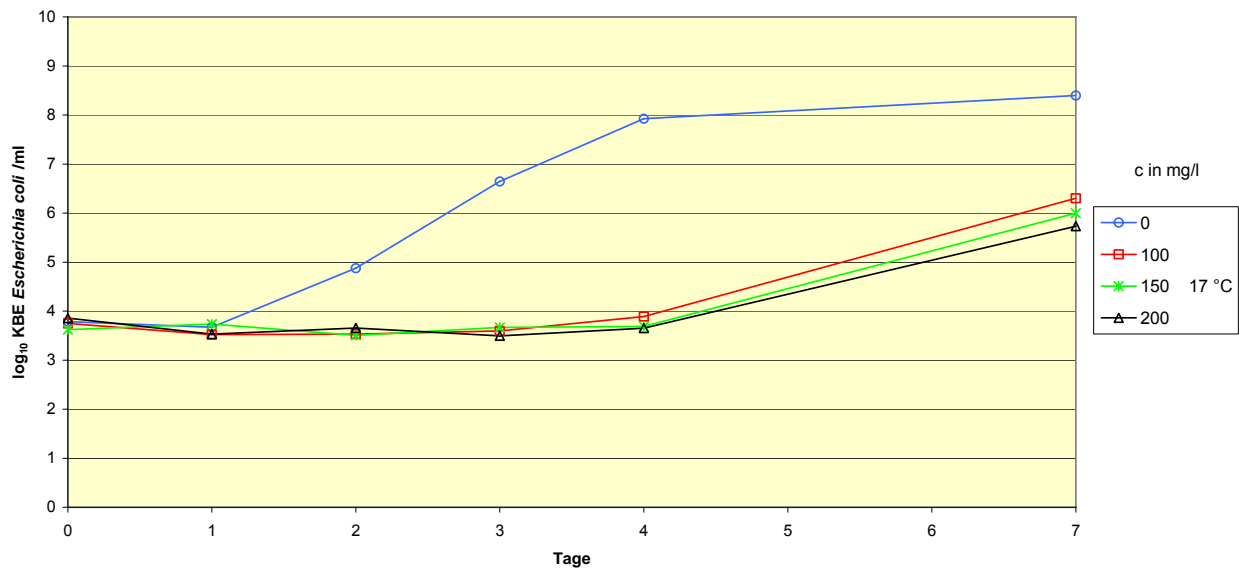


Abb.20: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w: 0,975

Dass die Temperatur bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 einen starken Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen besitzt, zeigten auch schon die vorangegangenen Untersuchungen (vgl. 3.2.1). Während bei Versuchen mit 25 °C nach 6 Tagen keine Organismen mehr nachgewiesen werden konnten, stiegen die Keimzahlen im Verlaufe der Untersuchungen bei 17 °C nach ca. 72 Stunden an und erreichten, je nach zugesetzter Menge an Nitrit, Keimzahlen von 1 x 10⁶ KbE/ml bei einer Konzentration von 100 mg/l oder 1 x 10⁴ KbE/ml bei 200 mg/l (siehe Abb. 21).

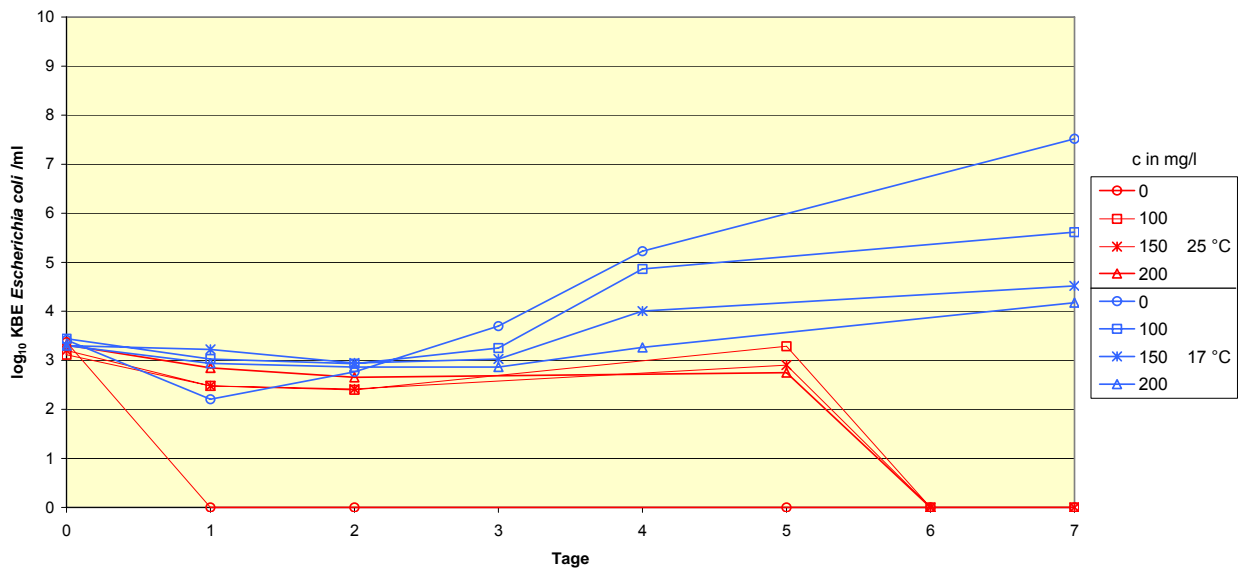


Abb.21: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 6, a_w: 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

Die Beobachtungen wurden durch die Messung der mikrobiellen Aktivität mit der Redoxpotentialmessung bestätigt.

Bei pH-Wert 5, war kein Wachstum der Organismen zu beobachten. Stattdessen traten in den Versuchen bakteriostatische oder bakterizide Zustände ein. Bei a_w -Werten von 0,98 und 0,975 war bei allen verwendeten Nitritkonzentrationen ein Überleben der Kulturen von *Escherichia coli* möglich (Bakteriostase). Kam es zu einer weiteren Absenkung des a_w -Wertes auf 0,965 konnten die Mikroorganismen, in Reihenfolge der zunehmenden Toxizität der zugesetzten Nitritmengen, nicht mehr nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Daten bei 17 °C mit denen bei 25 °C, fällt auf, dass die Organismen, die bei 25 °C inkubiert wurden, zu einem deutlich früheren Zeitpunkt nicht mehr im Medium nachzuweisen waren (siehe Abb. 22).

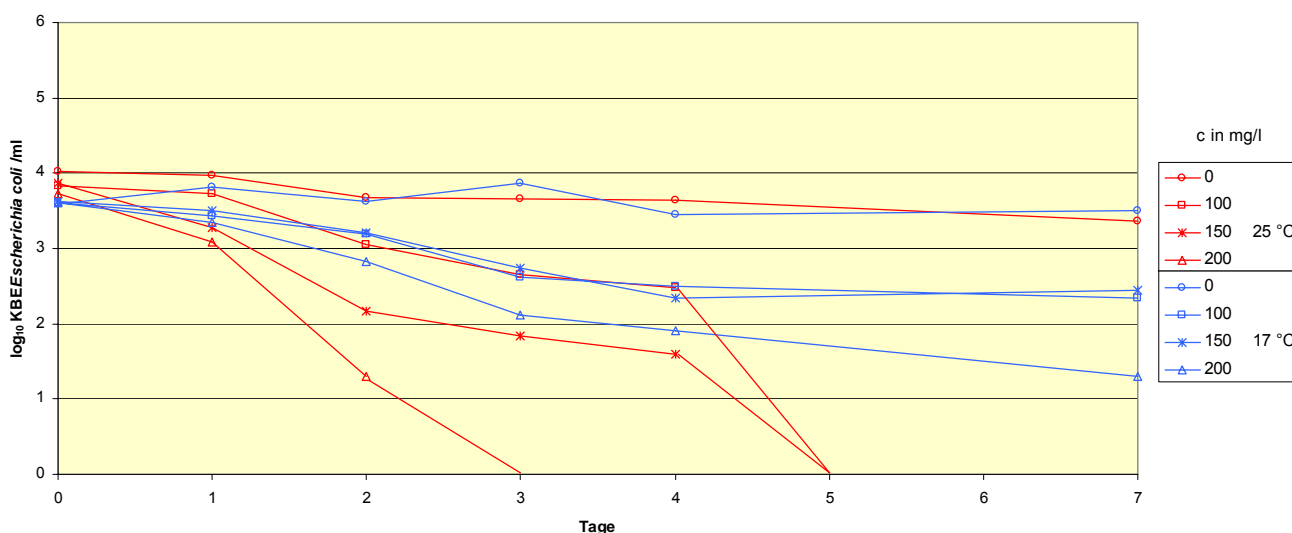


Abb.22: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 5, a_w : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

3.1.2.3 Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohen Anfangskeimzahlen bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Sowohl bei 25 °C als auch bei 17 °C zeigte sich, dass Natriumnitrit bei einem pH-Wert von 7 und hohen a_w -Werten keinen Einfluss auf das Wachstum von *Escherichia coli* hatte. Erst bei einer Absenkung des Wasseraktivitätswertes auf 0,965 traten Unterschiede bei den verwendeten Temperaturen auf. Während die Mikroorganismen, welche bei 17 °C inkubiert wurden, innerhalb der ersten 48 Stunden auf dem Anfangsniveau von 7×10^6 KBE/ml verharrten, konnte bei 25 °C eine Abnahme der Keimzahl um zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden. Der Effekt trat jedoch nur zeitlich begrenzt auf. Nach 72 Stunden setzte ein Wachstum der Bakterien ein und vergleichbare Zellzahlen wie bei dem Versuch mit 17 °C wurden erreicht. Diese Beobachtung war aber nicht auf die Wirkung von Natriumnitrit zurückzuführen, da die Negativkontrolle ein ähnliches Verhalten wie die Ansätze mit 100, 150 und 200 mg/l zeigte. Bei einem pH-Wert von 6, war nur bei 17 °C und hohen Wasseraktivitätswerten eine Hemmung der Zellen durch Natriumnitrit feststellbar. Im Vergleich zur

Negativkontrolle verlängerte sich die lag-Phase der Mikroorganismen, welche mit 150 und 200 mg/l Natriumnitrit inkubiert wurden, um 72 Stunden. Durch eine weitere Absenkung des a_w -Wertes auf 0,965 konnte mit zunehmender Nitritkonzentration eine steigende Toxizität des Natriumnitrits beobachtet werden. Dieser Effekt trat erst nach 48 Stunden auf und war bei einer Temperatur von 25 °C ausgeprägter als bei 17 °C (siehe Abb. 23).

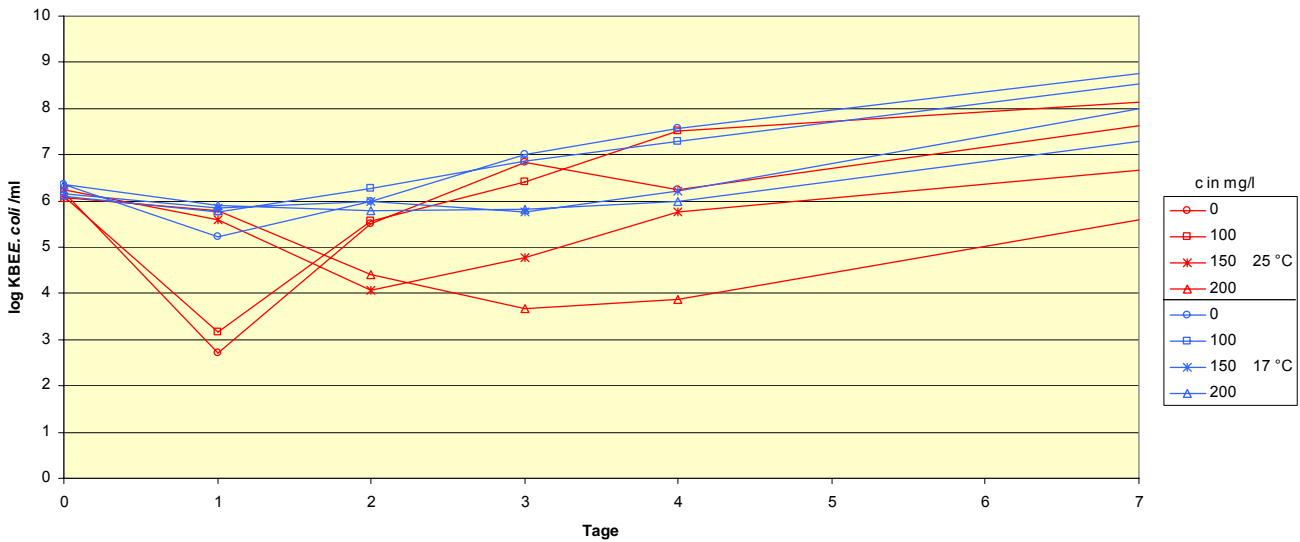


Abb.23: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 6, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

Innerhalb der ersten 48 Stunden zeigte sich bei 25 °C und abgeschwächt bei 17 °C ein anderes temperaturabhängiges Verhalten. Während die Keimzahlen der Kulturen, welche mit 0 mg/l und 100 mg/l Nitrit inkubiert wurden, um drei Zehnerpotenzen abnahmen, sank die Keimdichte der mit 150 mg/l und 200 mg/l inkubierten Mikroorganismen in den ersten 24 Stunden um eine halbe Zehnerpotenz. Innerhalb der nächsten 24 Stunden trat dann genau das Gegenteil ein. In der Negativkontrolle und in dem Ansatz mit 100 mg/l Nitrit begannen die Kulturen von *E. coli* zu wachsen, während für die Versuche mit hohen Nitritkonzentrationen eine Abnahme der Keimdichte um zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden konnte.

3.1.2.4 Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24- stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit

Ein Einfluss von Natriumnitrit auf die Zellen von *Escherichia coli* wurde im Hinblick auf eine Veränderung der Zelloberfläche analog zu 3.1.1.3 auch mikroskopisch untersucht. Zwischen den mit und ohne Natriumnitrit inkubierten Zellen konnte bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,99 kein sichtbarer Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 24). Dieses Resultat bestätigt somit die Ergebnisse der in *in vitro* Experimente, dass eine Hemmung des bakteriellen Wachstums durch Nitrit bei einem pH-Wert von 7 nicht beobachtet werden konnte.

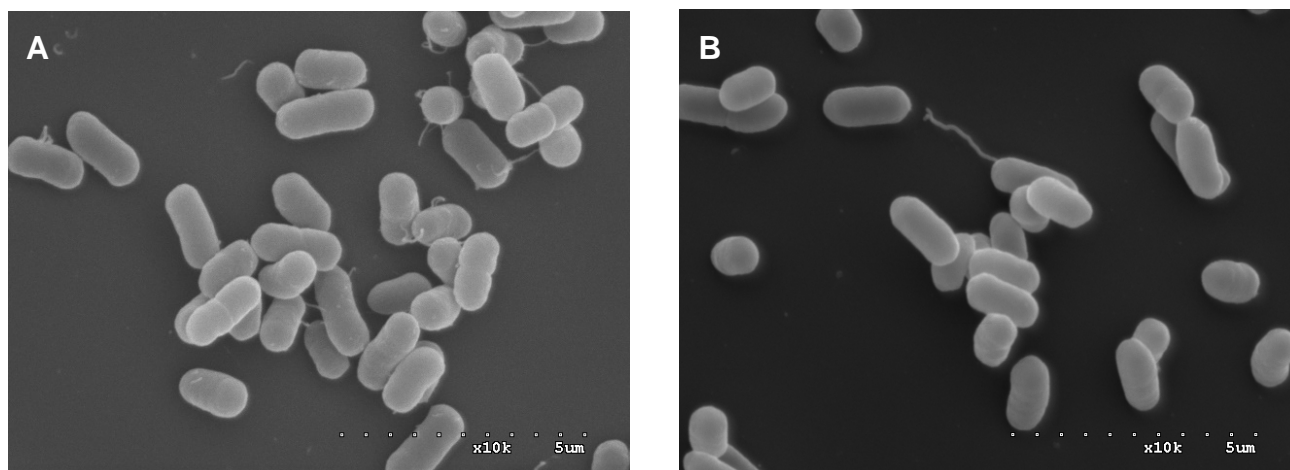


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,99, Temp.: 25 °C, Inokulum $3,7 \times 10^6$ KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B) bei einem pH-Wert von 7

Um das Verhalten von *Escherichia coli* in Anwesenheit des Zusatzstoffes Nitrit besser interpretieren zu können, wurden weitere elektromikroskopische Aufnahmen angefertigt. In diesen zeigte sich, dass Nitrit bis zu einem pH-Wert von 5 die Oberfläche der Zellen nicht schädigt.

Jedoch konnte mit abnehmendem a_w -Wert bei den pH-Werten 7 und 6, sowohl bei den Ansätzen mit als auch bei denen ohne Natriumnitrit, eine verstärkte Bildung von Fimbrien und die damit verbundene Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden (siehe Abb. 25).

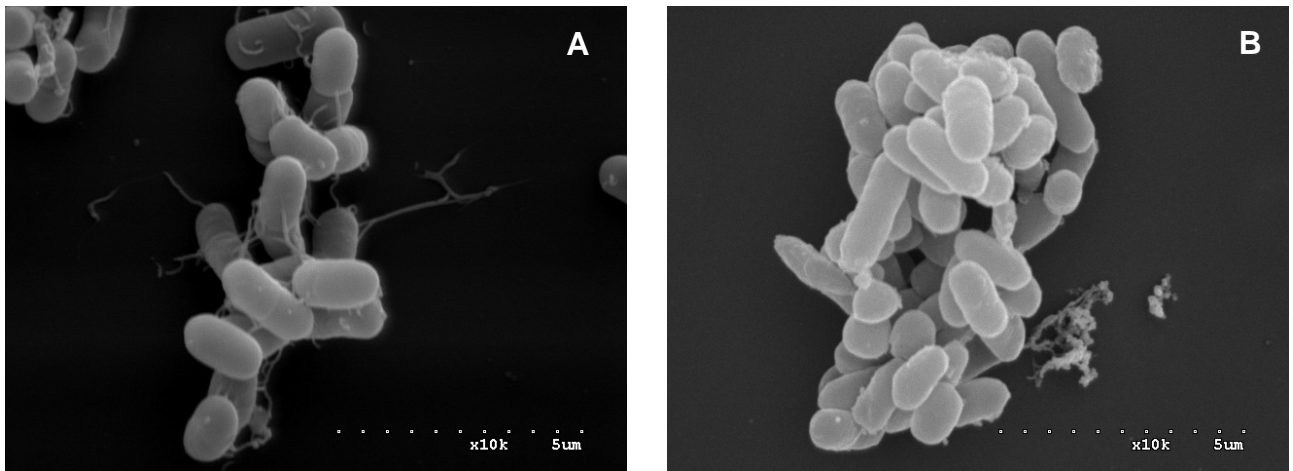


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : **0,975**, Temp.: **25 °C**, Inokulum $3,7 \times 10^6$ KbE/ml) **ohne** (A) und mit **200 mg/l Natriumnitrit** (B) bei einem **pH-Wert von 6**

Durch die Bildung von Zellaggregaten wurde schneller eine hohe Zelldichte erreicht, wodurch die Bakterien verschiedene Vorteile gegenüber einzelnen Zellen hatten. So bietet die Gruppe Schutz vor mechanischen, physikalischen und/oder chemischen Stress, ermöglichte die Spezialisierung einzelner Zellen und erhöhte damit die Fähigkeit der Mikroorganismen auch unter extremen Milieubedingungen zu überleben. Wurde der pH-Wert auf 5 gesenkt, konnte zum einen eine deutliche Veränderung der Form der Stäbchen (siehe Abb. 26) beobachtet werden und zum anderen blieb die Aggregation der Zellen aus.

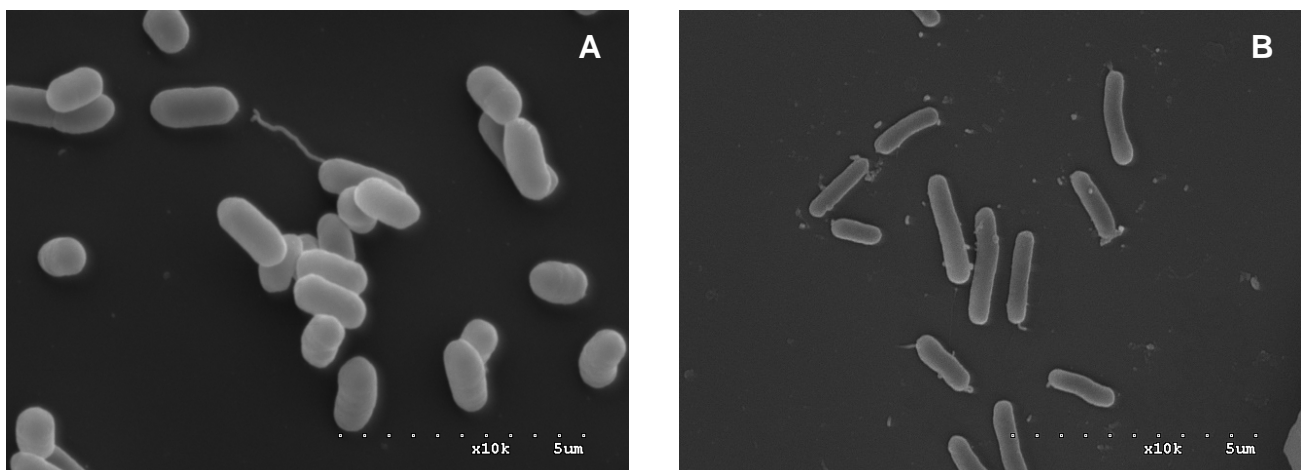


Abb. 26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : **0,975**, Temp.: **25 °C**, Inokulum $3,4 \times 10^6$ KbE/ml, **200 mg/ml Natriumnitrit**) bei **pH 7**(A) und bei einem **pH-Wert von 5** (B)

In den Ansätzen konnten lediglich einzelne Zellen nachgewiesen werden. In dieser Form waren die Mikroorganismen viel stärker den verschiedenen Umweltfaktoren wie pH-Wert, a_w -Wert und Nitritkonzentration ausgesetzt. Ein rasches Absterben von *Escherichia coli* war somit wahrscheinlicher

und konnte in den *in vitro* Versuchen bei einem pH-Wert von 5 auch in dieser Form dokumentiert werden (vgl. 3.1.2).

3.1.3 Multifaktorielle Untersuchungen zum Einfluss von Natriumnitrit auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp.

3.1.3.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Natriumnitrit hatte bei einem pH-Wert von 7 und a_w -Werten bis 0,965 keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen. Mit abnehmendem a_w -Wert konnte lediglich eine Verlängerung der lag-Phase um ca. 24 Stunden festgestellt werden, jedoch wurden in allen Ansätzen nach 7 Tagen Keimzahlen von ca. 1×10^8 KBE/ml erreicht (siehe, Abb. 27).

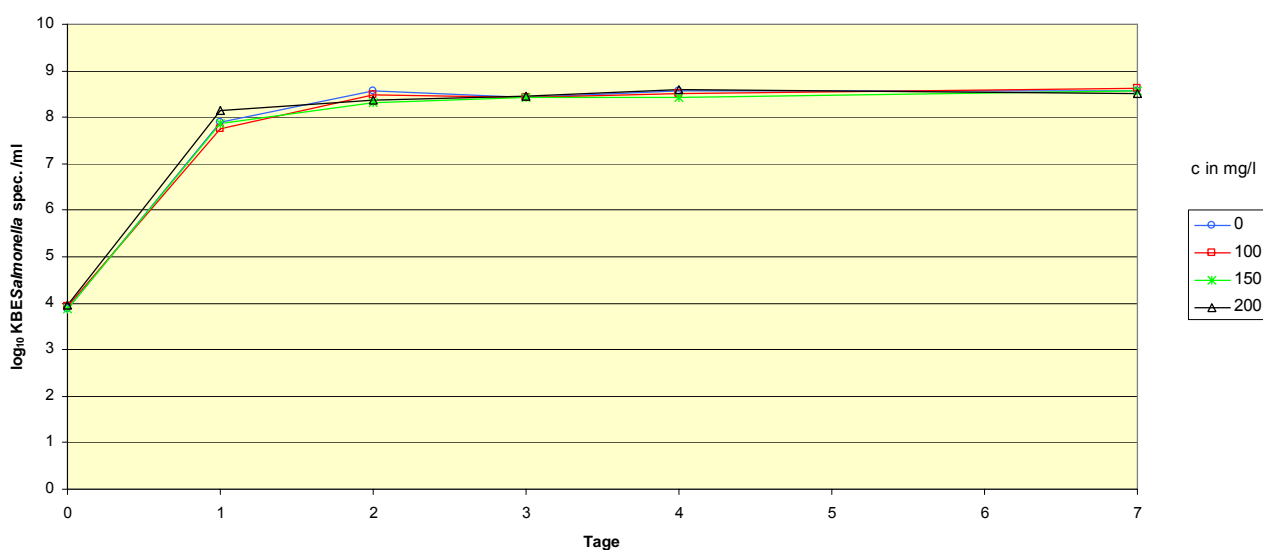


Abb.27: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,97

Die Ergebnisse, die durch Ermittlung der Keimzahl erzielt wurden, konnten durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden fielen die Redoxkurven steil ab und zeigten unabhängig von der eingesetzten Nitritmenge einen fast identischen Verlauf bis zu einem Redoxpotentialwert von -300 bis -500 mV (Relativwerte). Nur die Negativkontrolle erreichte bei allen getesteten a_w -Werten ein niedrigeres relatives Redoxpotential von -600 mV. Dies lässt auf einen leicht beeinträchtigten Stoffwechsel der Salmonellen in Anwesenheit von Nitrit schließen.

Im Gegensatz zu den Listerien und den enterohämorrhagischen *E.coli* konnte während des Versuchszeitraumes ein Anstieg des pH-Wertes auf 8 festgestellt werden. Diese Zunahme war bei einem a_w -Wert von 0,965 nicht ganz so stark ausgeprägt, so dass hier pH-Werte von 7,3 -7,4 gemessen werden konnten. Salmonellen sekretieren damit im Gegensatz zu den untersuchten Listerien und *E. coli*'s keine sauren, sondern alkalische Stoffwechselprodukte. Diese Beobachtung wird vor allem bei niedrigeren pH-Werten eine größere Bedeutung haben. Da der üblicherweise in diesem pH-Wertbereich auftretende verstärkte Nitritzerfall durch den pH-Wert Anstieg infolge des mikrobiellen Stoffwechsels vermindert wird. Damit wird durch das Ausscheiden von mikrobiellen

Stoffwechselprodukten, indirekt die Überlebenschance der Organismen in Anwesenheit des Zusatzstoffes gesteigert.

Wurde der pH-Wert von 7 auf 6 abgesenkt, konnte bis zu einem a_w -Wert von 0,975 kein antimikrobieller Einfluss beobachtet werden. Erst bei einem tieferen Wasseraktivitätswert konnte innerhalb der ersten 48 Stunden eine Hemmung der mit Nitrit inkubierten Salmonellen beobachtet werden (siehe Abb. 28).

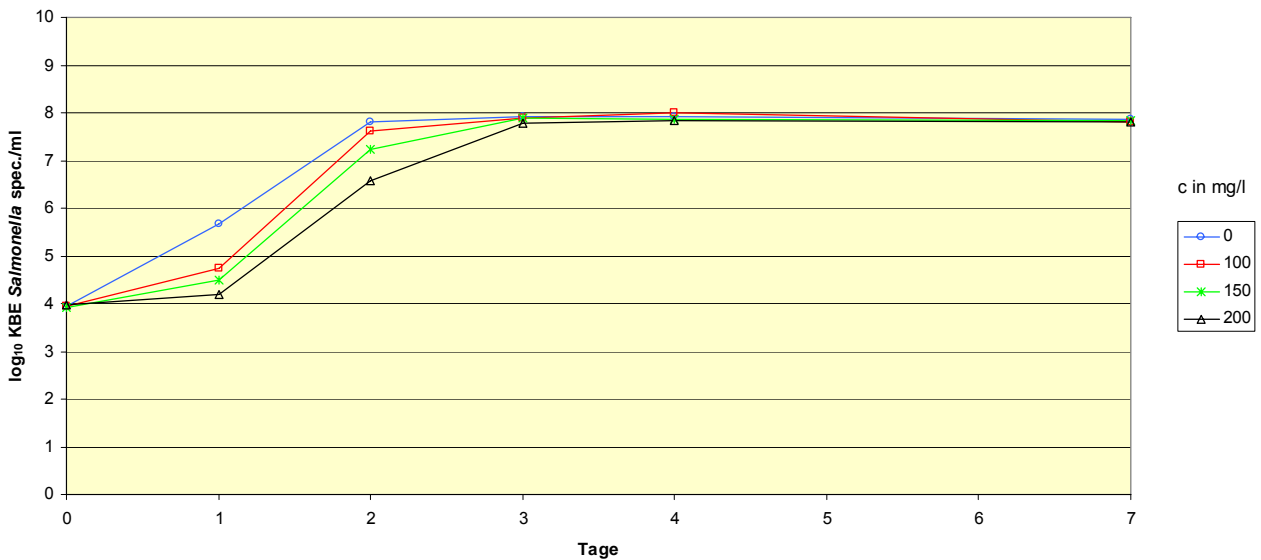


Abb.28: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,965

Diese Resultate konnten durch die Messung der mikrobiellen Aktivität bestätigt werden. Bei einem pH-Wert von 5 konnte in keinem der Ansätze mit Natriumnitrit ein Wachstum festgestellt werden. Stattdessen konnte mit abnehmender Wasseraktivität eine Zunahme der Toxizität des Nitrits, in Reihenfolge der zugegebenen Konzentration beobachtet werden (siehe Abb. 29).

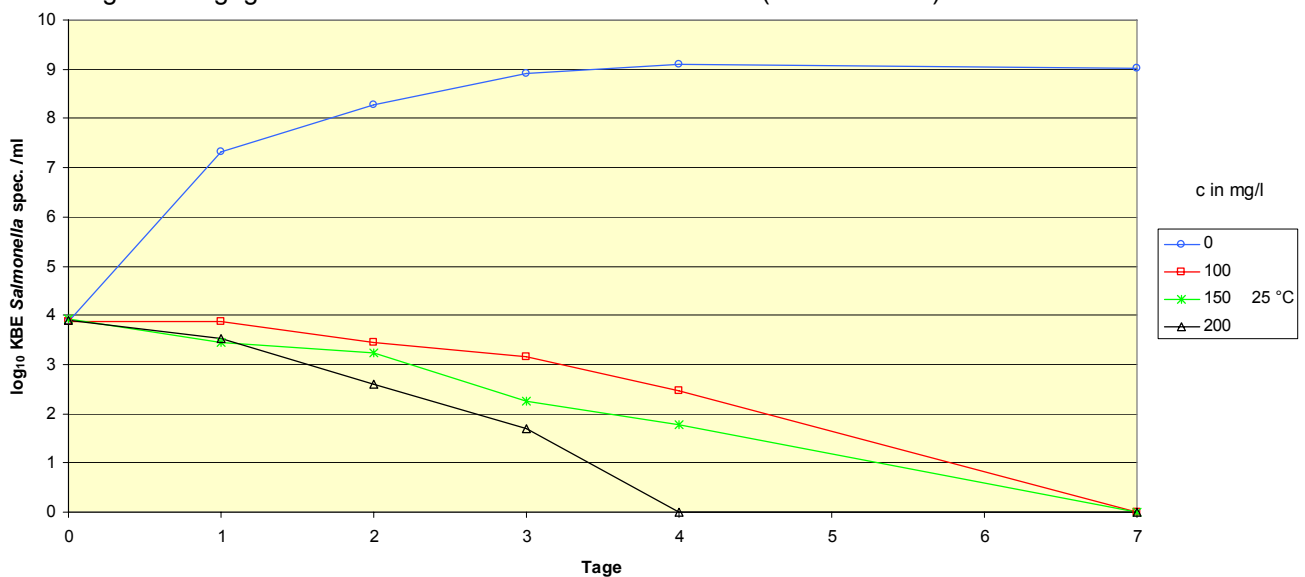


Abb.29: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,99

In keinem der Ansätze war ein Überleben der Salmonellen bis zum Ende des Versuchszeitraumes möglich. Jedoch konnte im Gegensatz zu *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* ein Wachstum der Negativkontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 29). Dieses Ergebnis ist auf die Anhebung des pH-Wertes im Inkubationsgefäß in Folge des unbeeinträchtigten Stoffwechsels der Mikroorganismen zurückzuführen.

3.1.3.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w-Werten

Genau wie bei den vorherigen Untersuchungen (vgl. 3.1.3.1) war kein Einfluss des Natriumnitrits, bei einem pH-Wert von 7 feststellbar.

Bei einem pH-Wert von 6 zeigte der Zusatz von Natriumnitrit einen deutlichen Einfluss. Im Vergleich zur Negativkontrolle verlängerte sich zum einen die „elektronische lag-Phase“ der Bakterien im Schnitt um 72 Stunden und zum anderen wurden deutlich niedrigere Keimzahlen gemessen. Ab Wasseraktivitätswerten von unter 0,975 wurden im Medium bakterio-statische Bedingungen erreicht (siehe Abb. 30). Ein Wachstum der Salmonellen war nicht mehr festzustellen. Jedoch konnten die Organismen im Gegensatz zu *E. coli* bei gleicher Temperatur bis zum Versuchsende in der Bouillon nachgewiesen werden.

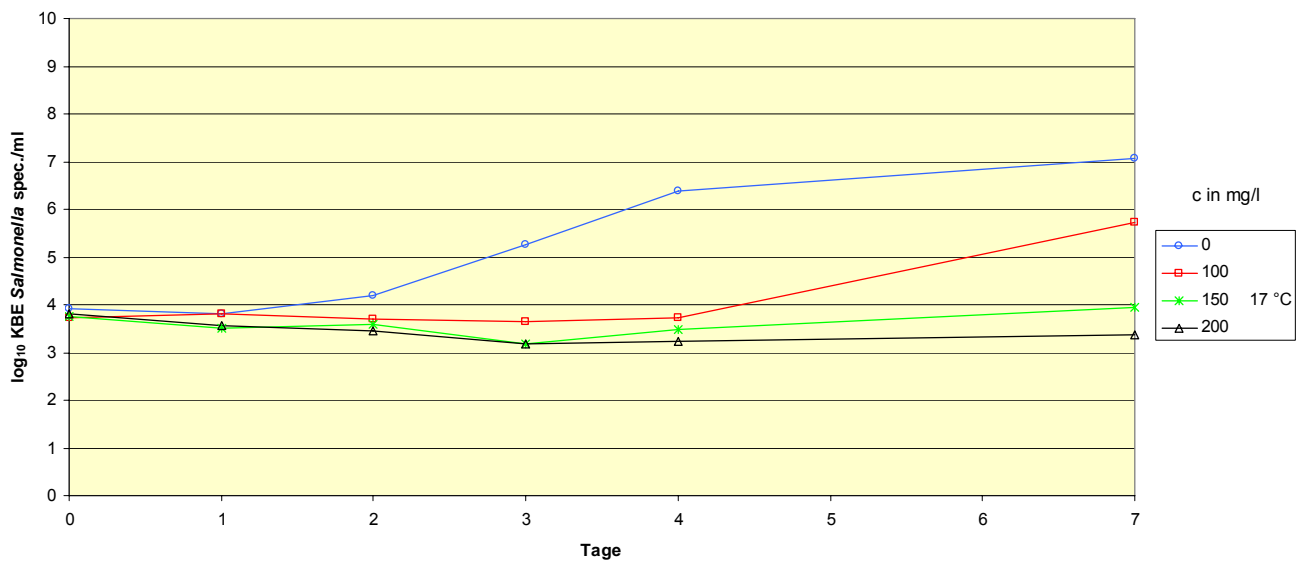


Abb.30: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 6 und a_w: 0,965

Wurde der pH-Wert auf 5 erniedrigt, war kein Wachstum der mit Nitrit inkubierten Organismen zu beobachten. Stattdessen traten in Reihenfolge der zunehmenden Toxizität der zugesetzten Nitritmengen bakteriostatische oder bakterizide Zustände ein (siehe Abb. 31). In den Inkubationsansätzen ohne Nitrit konnte erneut (vgl. 3.1.3.1) ein Anstieg des pH-Wertes und in Folge dieser Zunahme, eine Vermehrung der Salmonellen registriert werden.

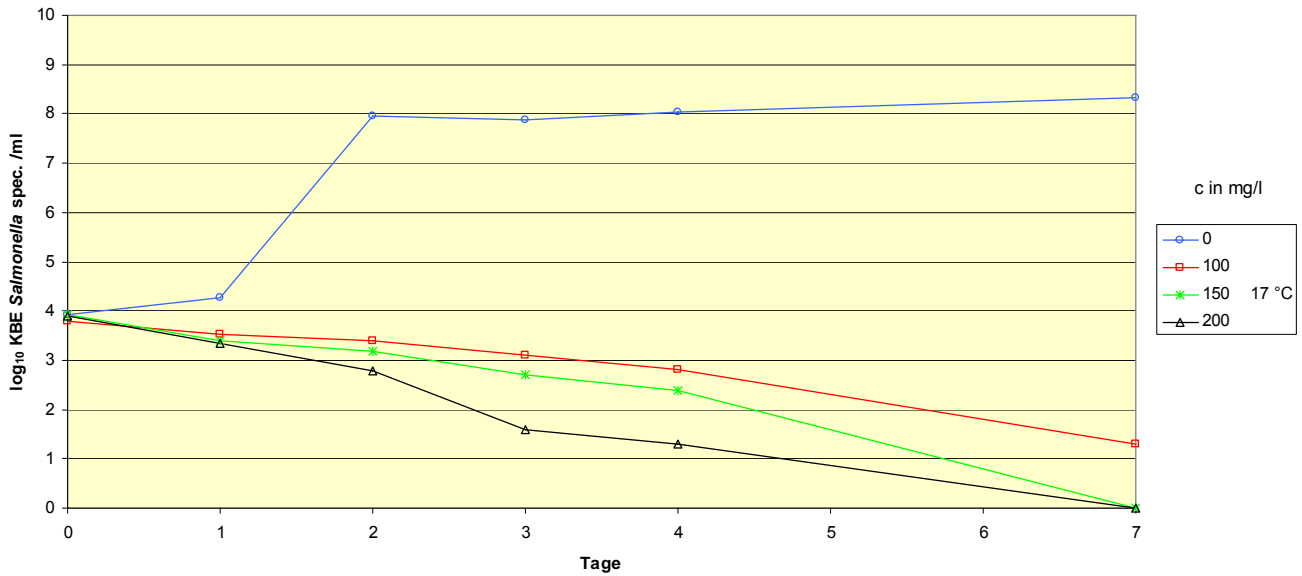


Abb.31: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,99

Die Ergebnisse der Keimzählung konnten bei allen getesteten pH-Werten durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden.

Bei einer weiteren Absenkung des a_w -Wertes starben zuerst die Mikroorganismen ab, die bei einer höheren Temperatur inkubiert wurden waren. Dieser Effekt wurde auch schon bei den zuvor untersuchten Organismen beobachtet (vgl. 3.1.2.2).

3.1.3.3 Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohen Anfangskeimzahlen bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_w-Werten

Sowohl bei 25 °C als auch bei 17 °C zeigte sich, dass Natriumnitrit bei einem pH-Wert von 7, unabhängig vom getesteten a_w-Wert, keinen Einfluss auf das Wachstum von *Salmonella* spp. hatte. Erst bei einer Absenkung des pH-Wertes auf 6 in Kombination mit einem erniedrigten a_w-Wert traten Unterschiede bei den verwendeten Temperaturen auf. Mikroorganismen, die bei 25 °C inkubiert wurden, zeigten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich zur Negativkontrolle. Dagegen konnte bei einer Temperatur von 17 °C eine Hemmung des mikrobiellen Wachstums beobachtet werden. Dieser Effekt war zeitlich begrenzt, da nach ca. 72 Stunden mit der Negativkontrolle vergleichbare Zellzahlen erreicht wurden.

Bei einem pH-Wert von 5 war sowohl bei hohen, als auch bei niedrigen Wasseraktivitätswerten eine starke Hemmung der Salmonellen durch den Zusatzstoff Natriumnitrit feststellbar. Im Vergleich zur Negativkontrolle stellten sich mit zunehmender Nitritkonzentration bakteriostatische und bakterizide Keimzahlverläufe ein. Diese Beobachtung war bei einer Temperatur von 25 °C ausgeprägter als bei 17 °C (siehe, Abb. 32) und ähnelte den erzielten Ergebnissen von *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* (vgl. 3.1.2.3).

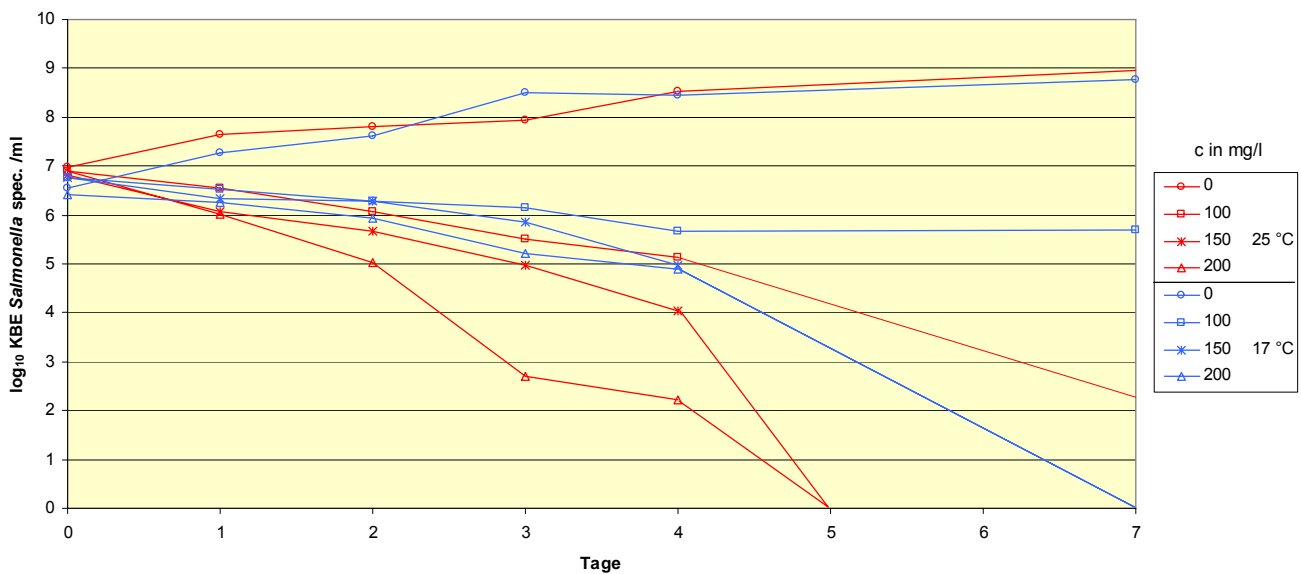


Abb.32: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei pH 5, a_w: 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

3.1.3.4 Elektronenoptischer Vergleich zwischen Bakterienzellen nach 24- stündiger Inkubation mit und ohne Natriumnitrit

Ein Einfluss von Natriumnitrit auf die Zellen von *Salmonella* spp. wurde im Hinblick auf eine Veränderung der Zelloberfläche analog zu 3.1.1.3 und 3.1.2.4 auch mikroskopisch untersucht. Zwischen den mit und ohne Natriumnitrit inkubierten Zellen konnte bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,99 kein sichtbarer Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 33). Dieses Resultat bestätigt somit die Ergebnisse der in *in vitro* Experimente, dass eine Hemmung des bakteriellen Wachstums durch Nitrit bei einem pH-Wert von 7 nicht beobachtet werden konnte.

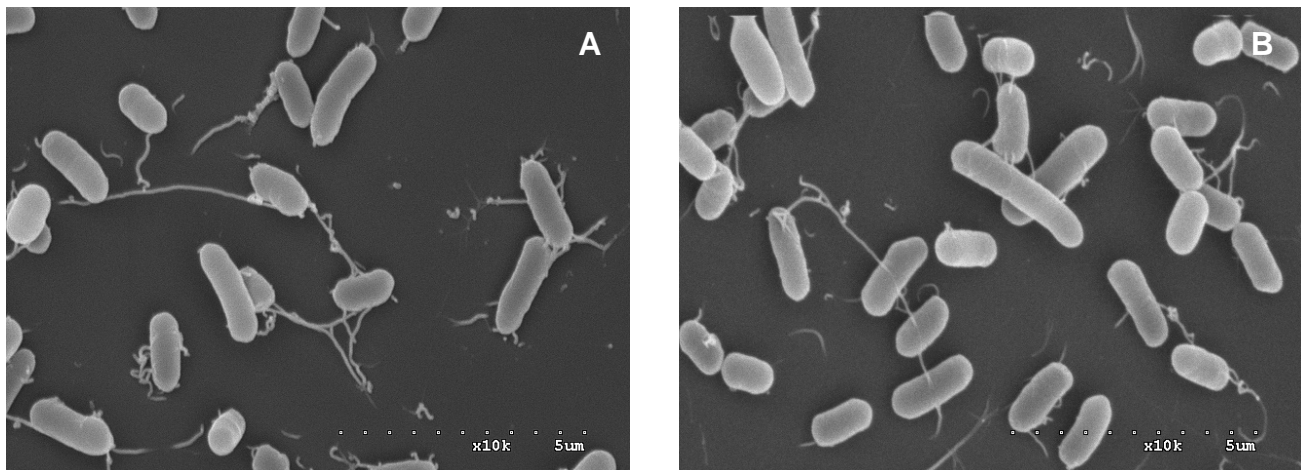


Abb. 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,99, Temp.: 25 °C, Inokulum $3,9 \times 10^6$ KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B) bei einem pH-Wert von 7

Um das Verhalten von *Salmonella* spp. in Anwesenheit des Zusatzstoffes Nitrit besser interpretieren zu können, wurden weitere elektromikroskopische Aufnahmen angefertigt. Es zeigte sich, dass Natriumnitrit bis zu einem pH-Wert von 5 keine elektronenmikroskopisch sichtbaren Zellschäden verursachte. Jedoch konnte mit abnehmendem a_w -Wert bei den pH-Werten 6 und 5, sowohl bei den Ansätzen mit als auch bei denen ohne Natriumnitrit, eine deutliche Veränderung der Zellform festgestellt werden.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zellen von *Salmonella* spp. unter diesen Bedingungen keine Geißeln bzw. Fimbrien mehr aufwiesen. (vgl. Abb. 33 und 34).

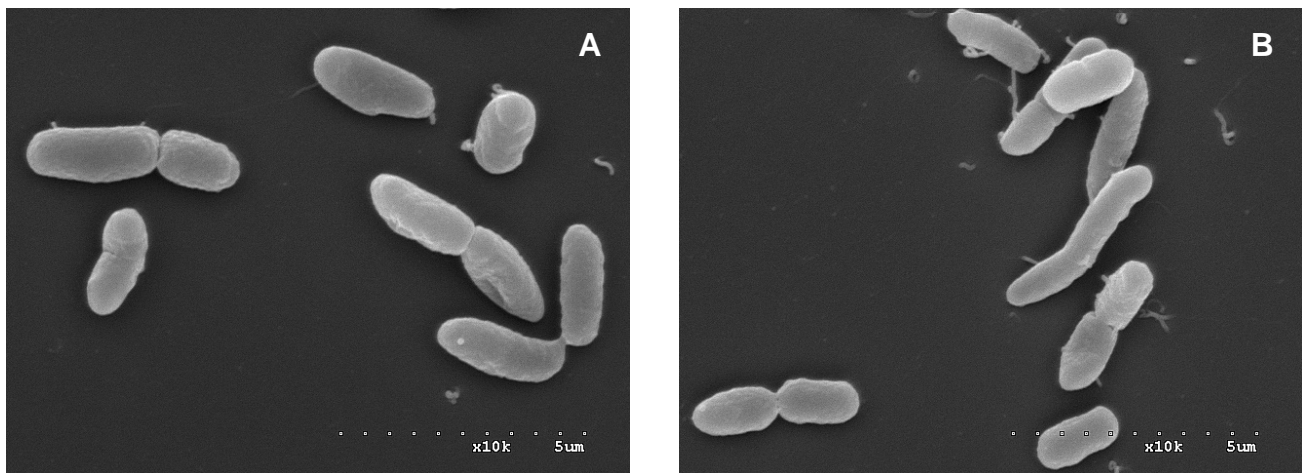


Abb. 34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum $3,5 \times 10^6$ KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B) bei einem pH-Wert von 6

Im Vergleich zu den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Escherichia coli* bei einem pH-Wert von 6 fällt auf, dass sich Salmonellen unter diesen Bedingungen nicht zu Zellaggregaten zusammen lagern. Dies ist ein möglicher Hinweis, warum *Salmonella* spp. unter sonst identischen Bedingungen empfindlicher in den *in vivo* Versuchen reagierte als *Escherichia coli* (vgl. 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

In den Ansätzen bei einem pH-Wert von 5 konnten lediglich einzelne, stark verkleinerte Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 35).

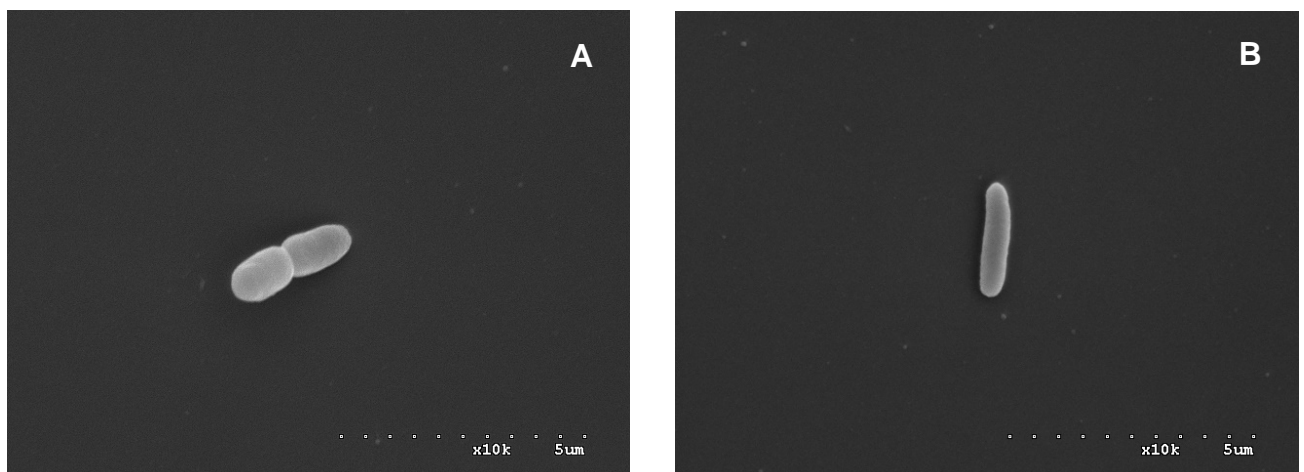


Abb. 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum $4,6 \times 10^6$ KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg/ml Natriumnitrit (B) bei einem pH-Wert von 5

In dieser Form sind die Mikroorganismen viel stärker den verschiedenen Umweltfaktoren wie pH-Wert, a_w -Wert und Nitritkonzentration ausgesetzt. Ein rasches Absterben von *Salmonella* spp. war somit wahrscheinlicher und konnte in den *in vitro* Versuchen bei einem pH-Wert von 5 auch in dieser Form dokumentiert werden (vgl. 3.1.3.1 und 3.1.3.2).

3.2 Ergebnisse der Challengeversuche

3.2.1 Schnellgereifte, streichfähige Rohwurst

Streichfähige Rohwürste sind sortenabhängig gereifte, umgerötete, jedoch nur gering abgetrocknete, nicht zur längeren Lagerung bestimmte Fleischerzeugnisse. Aus zerkleinertem Fettgewebe freigesetztes Fett umhüllt die Fleischteilchen und bewirkt die Streichfähigkeit. In Abhängigkeit vom Zerkleinerungsgrad der Fleisch- und Fettpartikel unterscheidet man zwischen fein- und grobzerkleinerter Ware. Die streichfähige Rohwurst ist reich an Eiweiß und verfügbarem Wasser und stellt mit ihrer feinen Körnung den idealen Nährboden für Keime aller Art zur Verfügung. Auf Grund der geringen Bandbreite der zur Verfügung stehenden Hürden, ist sie das sensibelste Produkt unter den streichfähigen Rohwürsten.

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei Reifeprogramme getestet. Zum einen ein Standardreifeprogramm A und zum anderen ein Reifeprogramm B, welches durch eine Temperaturerhöhung zwischen dem vierten und sechsten Tag eine metabolische Erschöpfung (Leistner, 1992) der Keime hervorrufen sollte. Des Weiteren wurde bei allen Chargen zum einen durch die Zugabe zweier verschiedener Kochsalzkonzentrationen (2,42 % und 2,89 %) der Einfluss des Ausgangswasseraktivitätswerts und zum anderen die Wirkung des Zusatzstoffes Natriumnitrit (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Verhalten der pathogenen Keime untersucht.

3.2.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde in einer Keimdichte von $3,8 - 3,9 \log_{10}$ KbE pro g ($6,3 - 7,9 \times 10^3$ KbE/g) dem Brät zugegeben (siehe Abb.36).

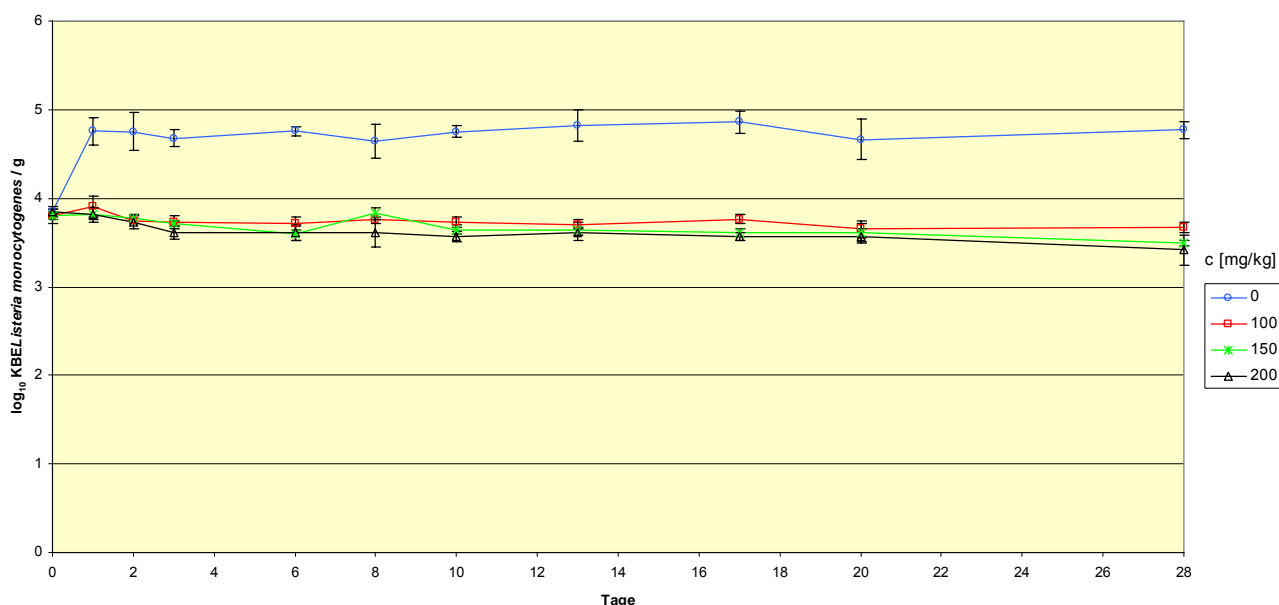


Abb.36: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Listeria monocytogenes* in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,42 % NaCl)

Der pH-Wert nahm in Folge des Wachstums der Starterkulturen innerhalb der ersten 48 Stunden auf 5,2 – 5,3 ab. Dabei ließ sich eine leichte Verzögerung der Ansäuerung des Produktes mit zunehmender Nitritkonzentration im Brät erkennen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Reifeprogramm A

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

In den Chargen, welche ohne den Zusatzstoff Natriumnitrit, hergestellt wurden, konnte innerhalb der ersten 48 Stunden eine starke Zunahme der Keimdichte von *Listeria monocytogenes* im Brät auf $4,8 \log_{10}$ KBE/g ($6,3 \times 10^4$ KBE/g) beobachtet werden (siehe Abb. 36). Auf diesem Niveau blieb die Keimzahl konstant bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes von 28 Tagen. Im Gegensatz dazu konnte in den Ansätzen denen Nitrit zugegeben wurde, kein Wachstum der pathogenen Mikroorganismen festgestellt werden. *Listeria monocytogenes* konnte bis zum Tag 28 in etwa derselben Konzentration wie am Tag der Herstellung nachgewiesen werden. Eine Reduzierung der Keimdichte war in diesem Reifeprogramm und der hier verwendeten Salzkonzentration nicht möglich (siehe Abb.36).

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Wurde der Anfangswasseraktivitätswert durch die Steigerung der Kochsalzkonzentration erniedrigt, so konnte im Vergleich zu einem 2,42 %-tigen Zusatz von Natriumchlorid eine Verlangsamung der Vermehrung von *Listeria monocytogenes* in den Ansätzen ohne Nitrit festgestellt werden (vgl. Abb. 36 und 37).

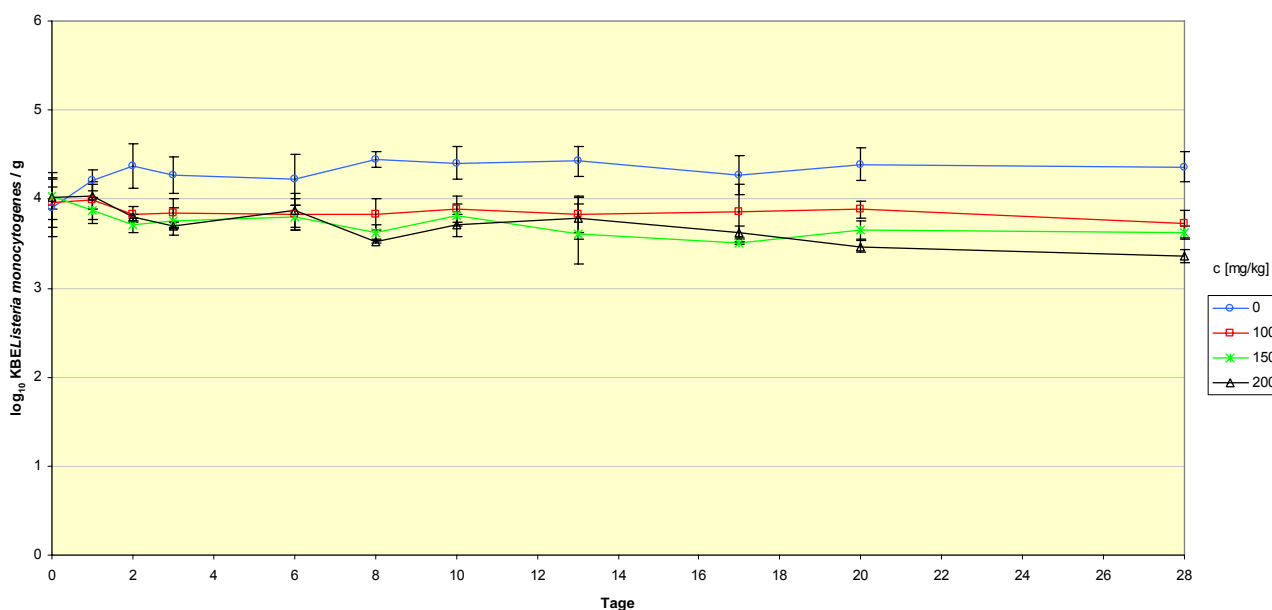


Abb.37: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Listeria monocytogenes* in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,89 % NaCl)

Auch wurden nach 72 Stunden geringere Keimzahldichten von $4,3 \log_{10}$ KbE/g (2×10^4 KbE/g) im Brät beobachtet. Auf diesem Niveau blieb die Keimzahl bis zum letzten Untersuchungstag. In den Chargen mit Nitrit war keine Vermehrung der pathogenen Mikroorganismen möglich. Die in das Brät zum Beginn der Versuche eingepfimte Keimdichte blieb bis zum Tag 28 konstant (siehe Abb. 37). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Natriumnitritkonzentrationen 100, 150 und 200 mg/kg konnte sowohl bei den Versuchen mit einer Kochsalzkonzentration von 2,42 % als auch bei denen mit 2,89 % nicht festgestellt werden.

Reifeprogramm B

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

In den Chargen ohne Nitrit konnte wie bei Reifeprogramm A eine Vermehrung der Listerien um eine Zehnerpotenz in den ersten 24 Stunden festgestellt werden (siehe Abb. 38). Auf diesem Niveau blieb die Keimdichte bis zum letzten Untersuchungstag, ohne dass eine Abnahme zu beobachten war. Die Erhöhung der Temperatur auf 25 °C zwischen dem Tag 4 und 6 führte nicht zum gewünschten Erfolg. Der Keimzahlverlauf von *Listeria monocytogenes* entsprach hier dem des Reifeprogramms A (vgl. Abb. 36 und Abb. 38). Durch den Zusatz von Natriumnitrit konnte ein Wachstum der pathogenen Keime unterbunden werden. Die Keimzahl sank während des Untersuchungszeitraumes leicht aber kontinuierlich (siehe Abb. 38) von $3,8 \log_{10}$ KbE/g auf $3 \log_{10}$ KbE/g ($1,0 \times 10^3$ KbE/g). Im Vergleich zu einem industriellen Reifeprogramm konnte eine Reduzierung der Keimdichte um eine halbe Zehnerpotenz erreicht werden. Jedoch sollten diese Ergebnisse nicht überbewertet werden, da sie im Bereich von Messungenauigkeiten liegen. Zwischen den zugesetzten Nitritkonzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede, hinsichtlich einer effektiveren Keimhemmung, beobachtet werden.

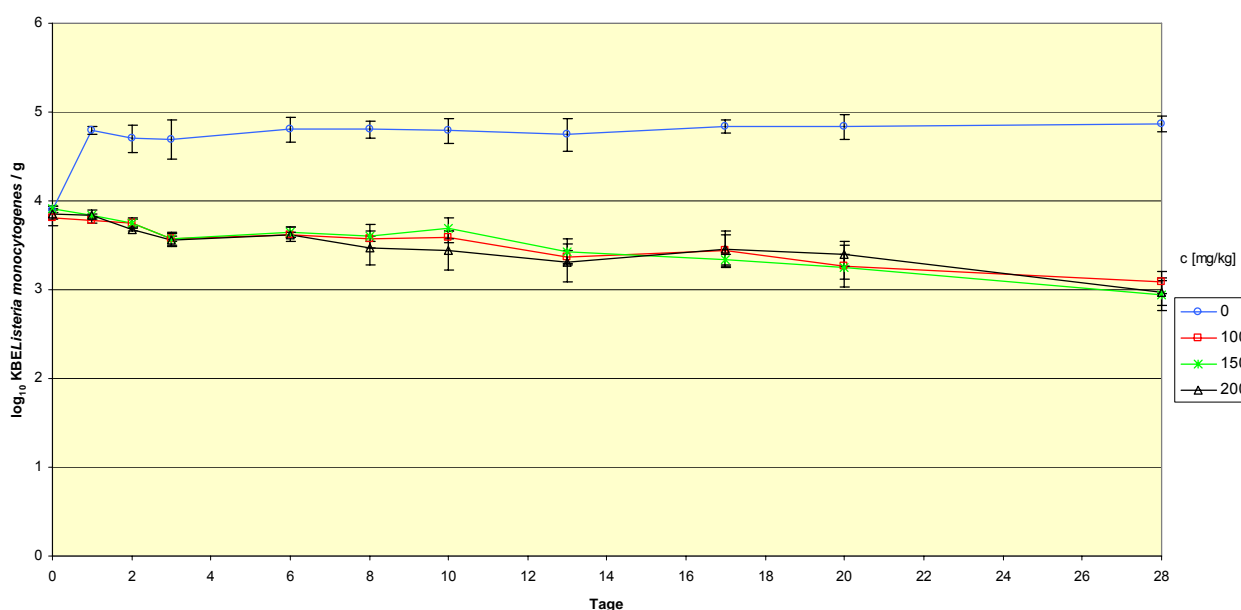


Abb.38: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Listeria monocytogenes* in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,42 % NaCl)

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Eine Vermehrung der *Listeria monocytogenes* Stämme konnte nur in den Chargen ohne Natriumnitrit festgestellt werden. Durch den erhöhten Zusatz von 2,89 % Kochsalz stieg die Keimzahl im Vergleich zur Zugabe von 2,42 % NaCl langsamer und erreichte nur Keimzahlen von 4,5 log₁₀ KbE/g (3,2 x 10⁴ KbE/g) Brät (siehe Abb. 39). Eine Abnahme der Keimdichte konnte innerhalb des 28-tägigen Untersuchungszeitraumes nicht beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Chargen ohne Nitrit wurde in den Ansätzen mit Nitrit kein Wachstum der pathogenen Mikroorganismen festgestellt. Die Keimdichte blieb nahe zu konstant und nahm erst zum Ende des Versuches leicht ab (siehe Abb. 39). Ein Unterschied zu einem industriellen Reifeprogramm war nicht zu beobachten.

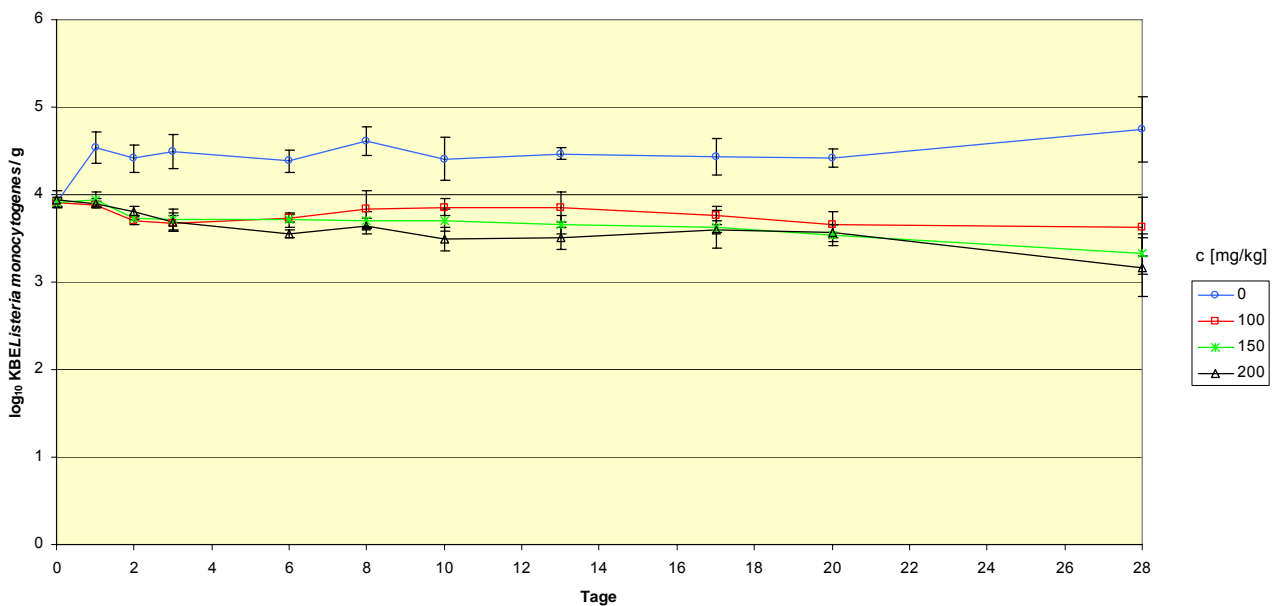


Abb.39: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Listeria monocytogenes* in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,89 % NaCl)

3.2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde dem Brät in einer Keimdichte von $3,5 - 4,1 \log_{10}$ KbE pro g ($3,2 - 12,6 \times 10^3$ KbE/g) dem Brät zugegeben (siehe Abb. 40). Der pH-Wert nahm in Folge des Wachstums der Starterkulturen innerhalb der ersten 48 Stunden von 5,8 auf 5,2 – 5,4 ab. Dabei ließ sich eine leichte Verzögerung der Ansäuerung des Produktes mit zunehmender Nitritkonzentration im Brät erkennen. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Reifeprogramm A

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

In keiner der Chargen konnte eine Zunahme der Keimdichte im Verlauf einer 28-tägigen Untersuchung festgestellt werden. Die Keimdichte von *Escherichia coli* sank innerhalb der ersten 72 Stunden leicht auf Werte um $3,3 - 3,5 \log_{10}$ KbE/g ($2,0 - 3,2 \times 10^3$ KbE/g). Anschließend blieb sie bis zum Ende der Untersuchungen konstant auf diesem hohen Niveau (siehe Abb. 40). Ein Unterschied zwischen den Chargen mit oder ohne Nitrit war nicht zu erkennen, auch konnten keine charakteristischen Besonderheiten hinsichtlich der zugesetzten Nitritmenge festgestellt werden.

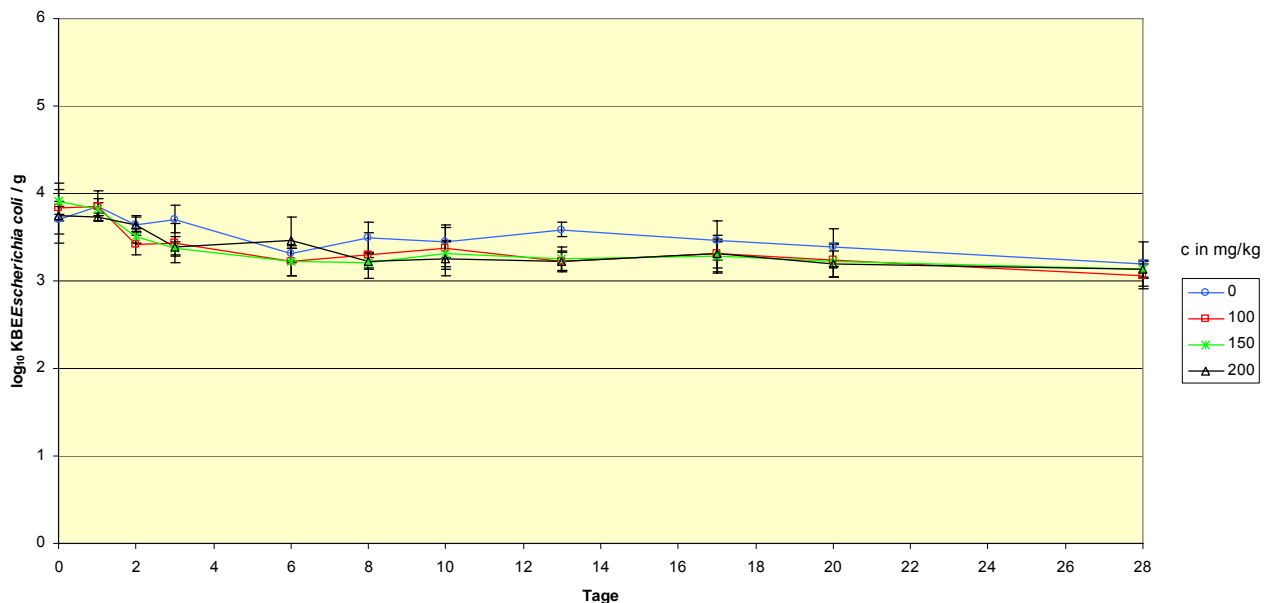


Abb.40: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,42 % NaCl)

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Im Verlauf der 28-tägigen Untersuchung wurde in keiner Charge eine Vermehrung der Organismen beobachtet (siehe Abb. 41). Stattdessen sank die Keimzahl zunächst leicht auf Werte um $3,5 \log_{10}$ KBE/g, um dann bis zum Tag 20 auf diesem Niveau zu überdauern. Erst in der letzten Untersuchungswoche konnte dann erneut eine Abnahme der Zellzahl im Brät registriert werden (siehe Abb. 41). Die Keimdichte nahm im gesamten Versuchszeitraum um eine Zehnerpotenz ab. Im Vergleich zu einer Kochsalzkonzentration von 2,42 % lässt sich erkennen, dass die Keimzahl, wenn auch nicht deutlicher, bei einer höheren Salzkonzentration am Ende der Untersuchung niedriger ist (ca. $2,8 \log_{10}$ KBE/g). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen zugesetzten Nitritkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 41).

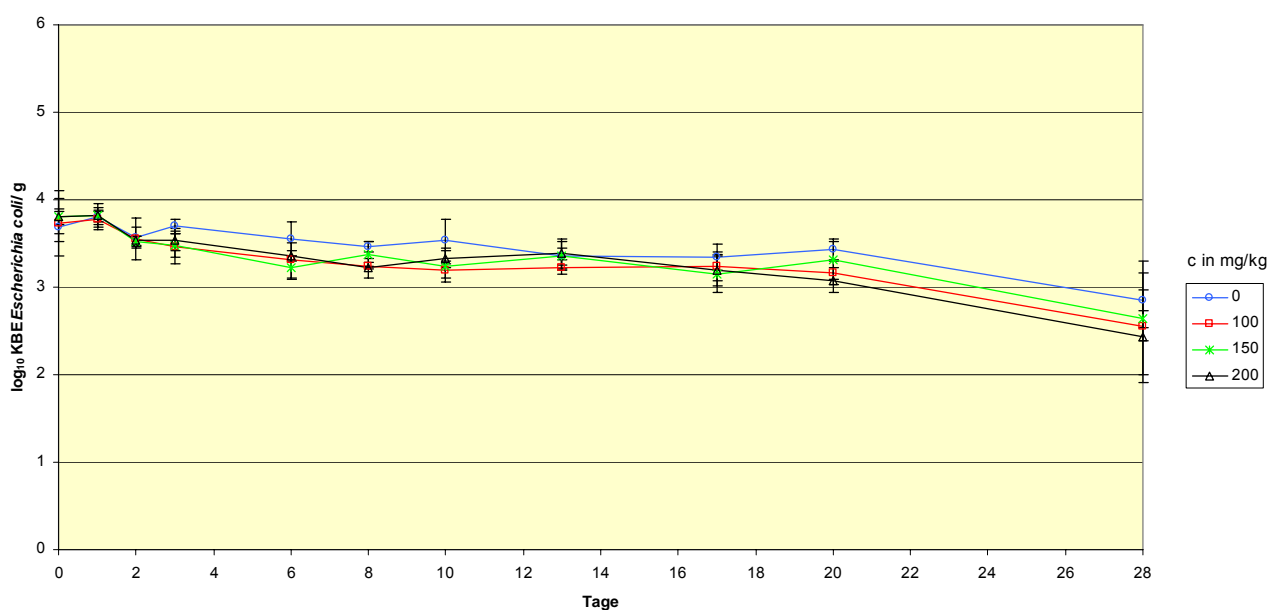


Abb.41: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,89 % NaCl)

Reifeprogramm B

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

Eine Vermehrung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* konnte analog dem Reifeprogramm A nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 40 und 42). Die Keimdichte nahm in Folge der Temperaturerhöhung zwischen dem 4- und 6-ten Reifetag deutlich stärker ab als im gleichen Zeitraum mit einem herkömmlichen Reifeprogramm. So konnte bereits nach dem achten Tag eine Reduktion um eine Zehnerpotenz im Produkt nachgewiesen werden (siehe Abb. 42). Anschließend gingen die Keime wie auch schon beim Reifeprogramm A beobachtet in eine stationäre Phase über und blieben bis zum 17-ten Versuchstag konstant auf diesem Niveau (siehe Abb. 42). Danach sank die Keimzahl noch einmal deutlich um erneut eine Zehnerpotenz, so dass am Ende der Untersuchung Keimdichten von

1,6 - 2,1 log₁₀ KBE/g (40 - 125 KBE/g) im Produkt erfasst wurden. Im Vergleich zu einem industriellen Reifeprogramm verbesserte sich die Reduktion der Keime um ca. eine Zehnerpotenz. Ein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Nitritkonzentrationen wurde nicht festgestellt (siehe Abb. 42).

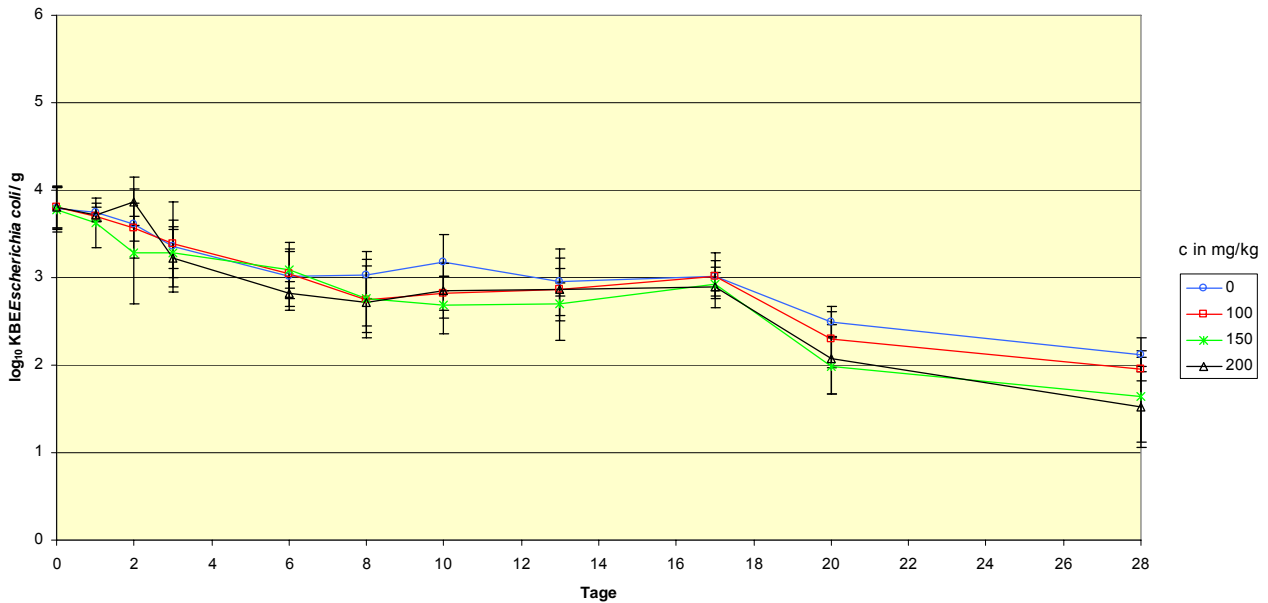


Abb.42: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,42 % NaCl)

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Mit zunehmender Kochsalzkonzentration im Ausgangsbrät konnte eine gleichmäßige und konstante Abnahme der Keimdichte im Produkt festgestellt werden (siehe Abb. 43).

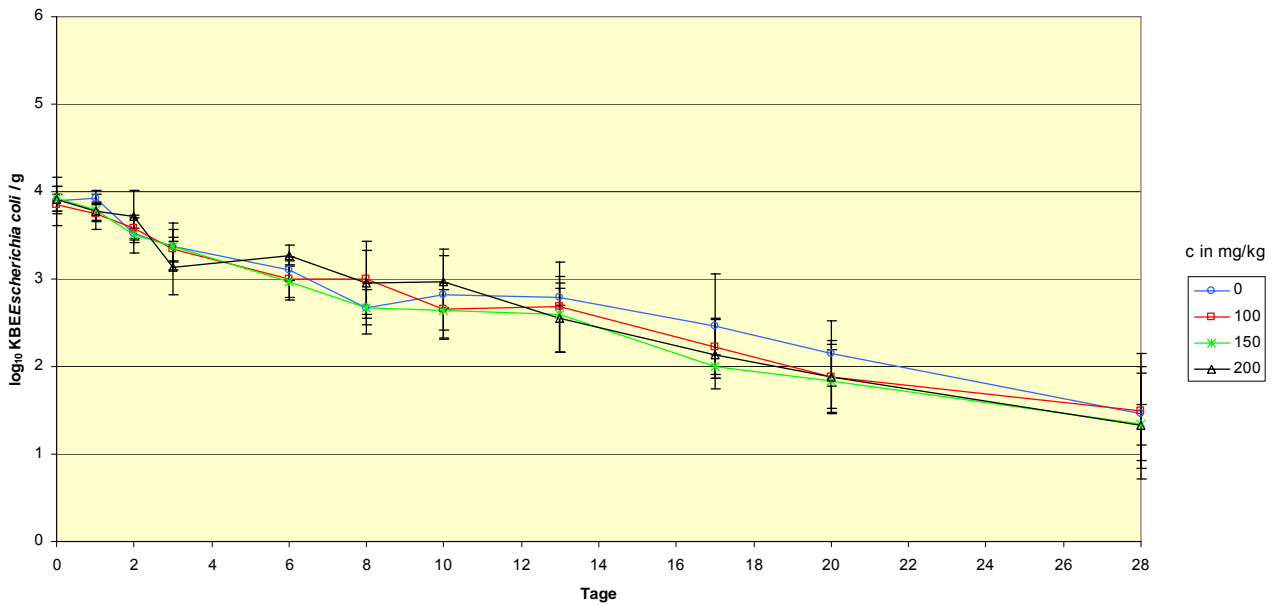


Abb.43: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,89 % NaCl)

Ein Übergang in eine stationäre Phase und somit ein Anpassen an die Umweltbedingungen konnte nicht beobachtet werden. Auch konnte kein Unterschied zwischen den Chargen mit oder ohne Nitrit, hinsichtlich einer Wachstumshemmung auf die Organismen, festgestellt werden (vgl. Reifeprogramm A). Am Ende des Untersuchungszeitraumes wurden im Median Keimdichten von 1,4 – 1,6 log₁₀ KbE/g (25 - 40 KbE/g) nachgewiesen (siehe Abb. 43).

3.2.1.3 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. wurde in einer Keimdichte von 3,5 – 3,9 log₁₀ KbE pro g (3,2 – 7,9 x 10³ KbE/g) dem Brät zugegeben (siehe Abb. 44 und 45). Der pH-Wert nahm in Folge des Wachstums der zugesetzten Milchsäurebakterien innerhalb der ersten 24 Stunden auf Werte um 5,3 ab. Somit war eine ordnungsgemäße Reifung und Herstellung des Produktes gewährleistet.

Reifeprogramm A

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

In den Chargen ohne Natriumnitrit konnte innerhalb der ersten 72 Stunden eine sehr schnelle Zunahme der Keimdichte beobachtet werden (siehe Abb. 44). So stieg die Keimzahl um zwei Zehnerpotenzen auf 5,5 log₁₀ KbE/g (3,2 x 10⁵ KbE/g) an. Auf diesem Niveau bewegte sich die Anzahl der Salmonellen bis zum Untersuchungstag 28 (siehe Abb. 4). Eine Abnahme der Keimzahl war nicht festzustellen. Im Gegensatz dazu konnte in den Chargen, welche mit Nitrit hergestellt wurden, keine Vermehrung der pathogenen Bakterien beobachtet werden. Die Keimzahl sank bis zum Ende der Untersuchungen kontinuierlich (siehe Abb. 44) auf Werte von 1,7 bis 1,9 log₁₀ KbE/g (50 - 79 KbE/g) ab. Ein charakteristischer Unterschied hinsichtlich der Hemmung des Bakterienwachstums zwischen den einzelnen Natriumnitritkonzentration 100, 150 und 200 mg/kg war nicht zu erkennen (siehe Abb. 44).

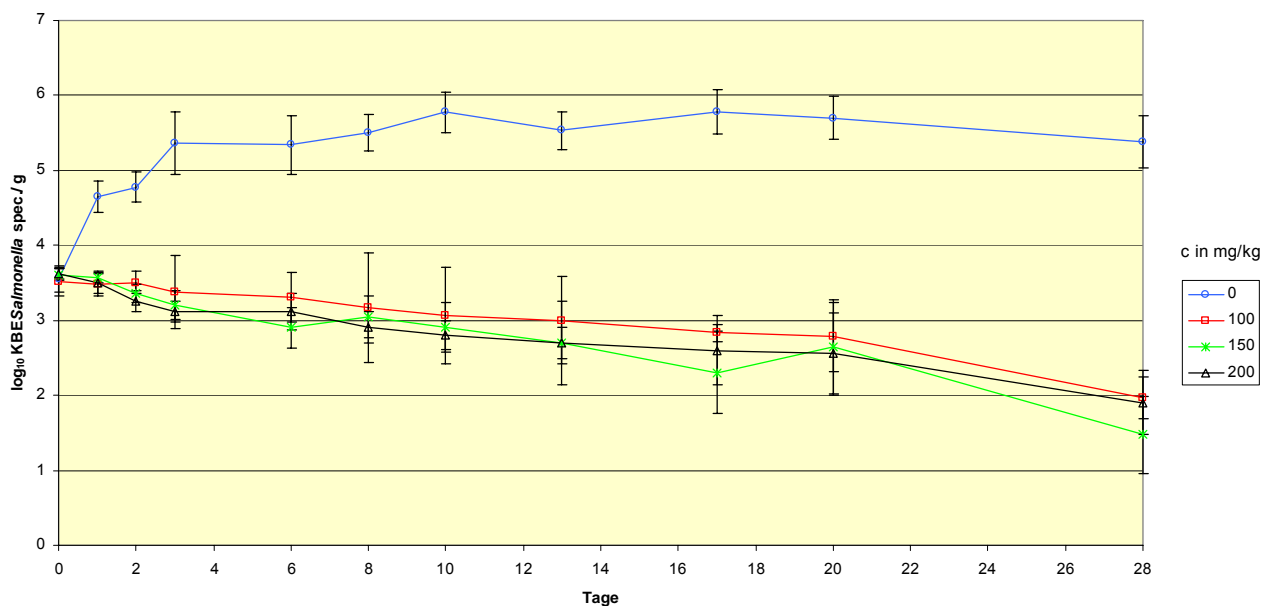


Abb.44: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella* spp. in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,42 % NaCl)

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Auch durch eine höhere Kochsalzkonzentration von 2,89 % konnte eine Vermehrung der zugesetzten Salmonellen in den Chargen ohne Nitrit nicht verhindert werden (vgl. Abb. 44 und Abb. 45). Zwar war der Anstieg der Keimzahl in Folge des niedrigeren a_w -Wertes leicht verzögert (siehe Abb. 44 und Abb. 45), dennoch wurden vergleichbare Keimzahlen wie bei den Versuchen mit 2,42 % Kochsalz nachgewiesen (siehe Abb. 44). Nach dem Erreichen einer Keimdichte von $5,5 \log_{10}$ KbE/g ($3,2 \times 10^5$ KbE/g) ab dem 6. Versuchstag, sank die Zahl von *Salmonella* spp. bis zum Tag 28 nur leicht auf Werte um $4,8 \log_{10}$ KbE/g ($6,3 \times 10^4$ KbE/g) ab. In den Chargen mit Nitrit konnte während des ganzen Versuchszeitraumes keine Vermehrung der Keime von *Salmonella* spp. beobachtet werden (siehe Abb. 45). Die Keimzahl sank kontinuierlich, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen den zugesetzten Nitritmengen festgestellt wurden. Am Tag 28 lag der Median der Keimdichte zwischen 2,0 und $2,4 \log_{10}$ KbE/g ($1,0 - 2,5 \times 10^2$ KbE/g).

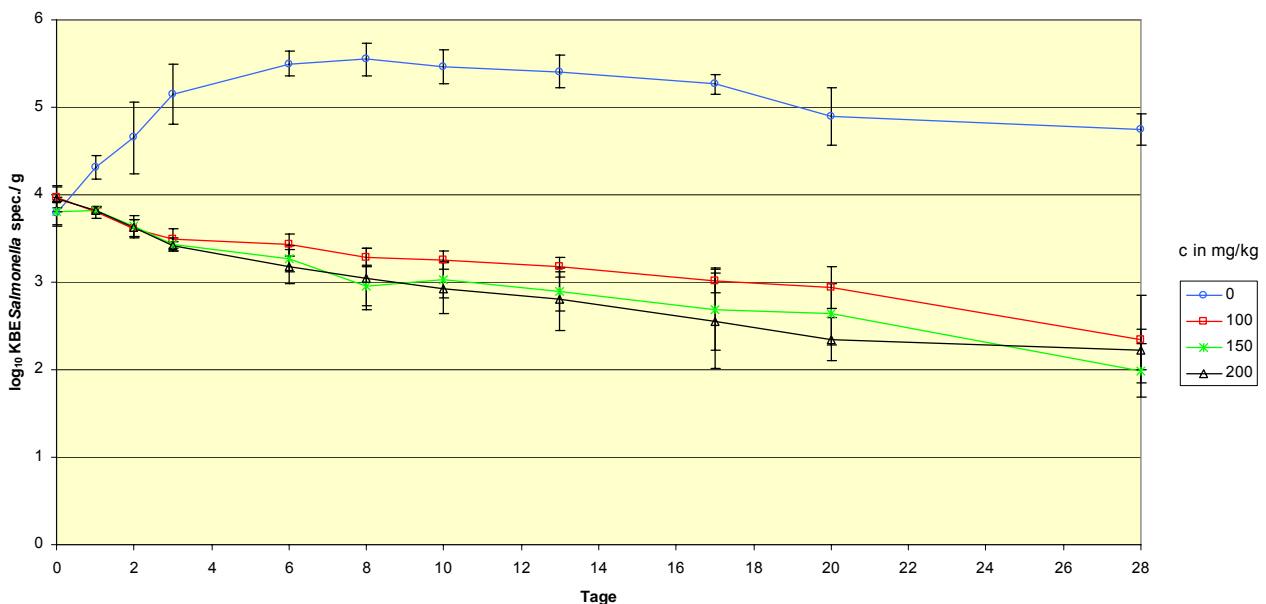


Abb.45: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella* spp. in einer Teewurst. (Reifeprogramm A und 2,89 % NaCl)

Eine vollständige Reduktion der Keime von *Salmonella* spp. war mit dem Standardreifeprogramm nicht möglich. Zwar wurde in den Chargen mit Nitrit eine Verminderung der Keimdichte von einer Zehnerpotenz erreicht, dennoch lagen die Werte über den gesetzlichen Bestimmungen, welche eine Abwesenheit von *Salmonella* spp. in 25 g des zu untersuchenden Produktes verlangen.

Reifeprogramm B

Kochsalzkonzentration: 2,42 %

Analog zum Reifeprogramm A konnte in den Ansätzen ohne Nitrit eine Vermehrung der Organismen innerhalb der ersten 2 bis 3 Tage festgestellt werden (siehe Abb. 46). Die Keimzahl erreichte Werte von $5,8 \log_{10}$ KbE/g ($6,3 \times 10^5$ KbE/g). Auf diesem hohen Niveau blieb die Keimdichte konstant bis zum Untersuchungstag 20. Erst in der letzten Woche konnte bis zum Tag 28 eine Abnahme auf $5 \log_{10}$ KbE/g ($1,0 \times 10^5$ KbE/g) beobachtet werden. Ein Einfluss der Temperaturerhöhung zwischen dem Tag 4 und 6 war in diesem Fall nicht zu erkennen. In den Chargen mit Nitrit konnte im Vergleich dazu keine Vermehrung der Salmonellen beobachtet werden (siehe Abb. 46). Die Keimzahl sank kontinuierlich auf unter 10 KbE/g, so dass am Tag 28 ein Nachweis der Organismen nur noch nach Anreicherung möglich war. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zugesetzten Nitritkonzentrationen, hinsichtlich einer effektiveren Wachstumshemmung war nicht festzustellen.

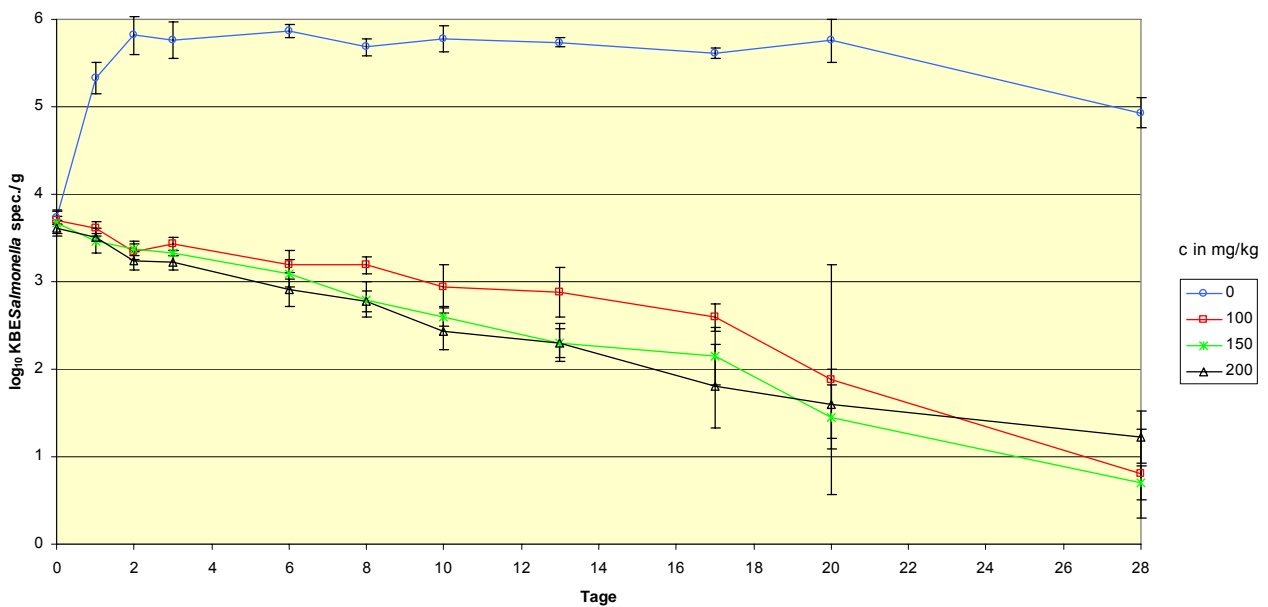


Abb.46: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella spp.* in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,42 % NaCl)

Kochsalzkonzentration: 2,89 %

Auch durch den Zusatz von 2,89 % Kochsalz konnte in den Chargen ohne Natriumnitrit eine starke Vermehrung der Organismen nicht verhindert werden. Die Keimzahl stieg innerhalb der ersten 3 Tage auf $5,5 \log_{10}$ KbE/g ($3,2 \times 10^5$ KbE/g) an und sank anschließend im Verlauf der Untersuchung gleichmäßig auf $4,5 \log_{10}$ KbE/g ($3,2 \times 10^4$ KbE/g) ab (siehe Abb. 47). Bei den Chargen mit Nitrit konnte analog zum Reifeprogramm A keine Vermehrung der pathogenen Mikroorganismen festgestellt werden. Besonders deutlich sank die Keimdichte noch einmal nach dem Untersuchungstag 6, also unmittelbar im Anschluss an den Temperaturerhöhungsschritt (siehe Abb. 47). Im weiteren Verlauf nahm die Keimzahl bis zum Tag 20 auf Werte unter 10 KbE/g ab. Ein Nachweis von *Salmonella* spp. war am letzten Untersuchungstag nur noch nach einer Anreicherung möglich. Vor allem in den ersten 6 Tagen konnte eine leicht bessere Wachstumshemmung in den Chargen mit 200 mg/kg Natriumnitrit festgestellt werden. Jedoch erreichten alle Chargen mit Nitrit am Ende der Untersuchung vergleichbare Keimzahlen.

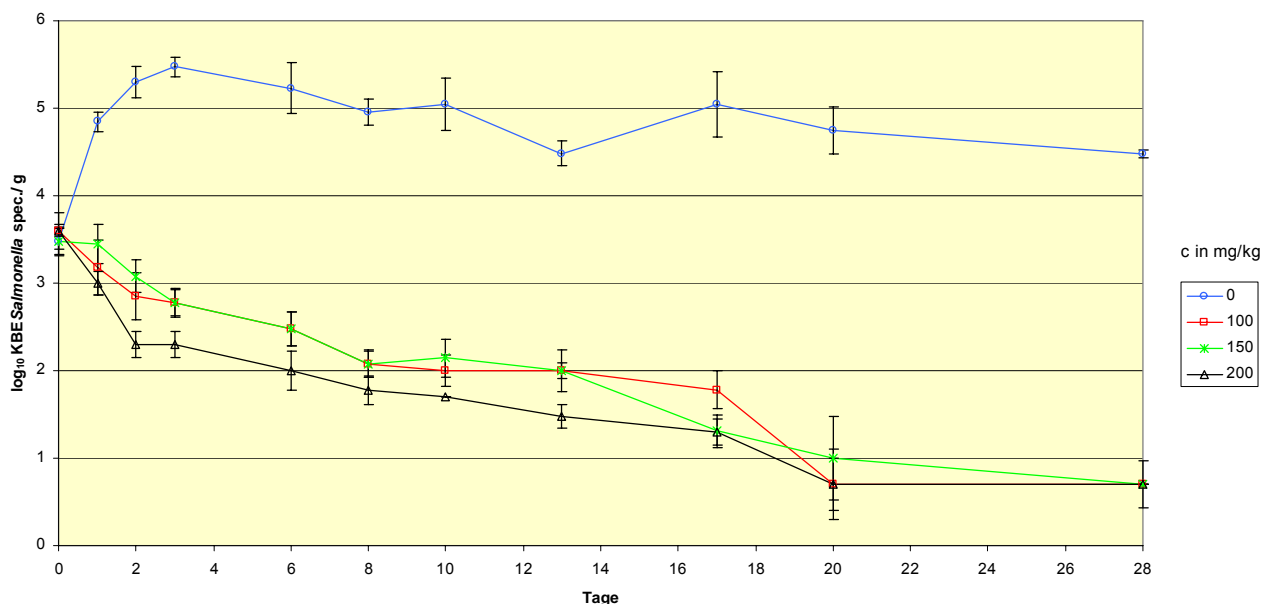


Abb.47: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella* spp. in einer Teewurst. (Reifeprogramm B und 2,89 % NaCl)

Die schnellgereifte streichfähige Rohwurst ist ein sensibles Produkt, welches ohne den Zusatz von Natriumnitrit vor allem in den kritischen ersten 48 Stunden eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. zuließ. Eine vollständige Eliminierung der pathogenen Keime gelang weder mit einem erniedrigten Anfangswasseraktivitätswert noch mit einem optimierten Reifeprogramm. Dennoch ließ sich zeigen, dass mit Hilfe eines Temperaturerhöhungsschrittes nach dem Tag 4 eine z.T. deutlich bessere Keimzahlreduzierung möglich war, als mit einem Standardreifeprogramm (vgl. 3.2.1.2 und 3.2.1.3).

Verlauf des a_W -Wertes

Der a_W -Wert betrug am Tag 0 beim Zusatz einer Kochsalzkonzentration von 2,42 % 0,968 (siehe Abb. 48).

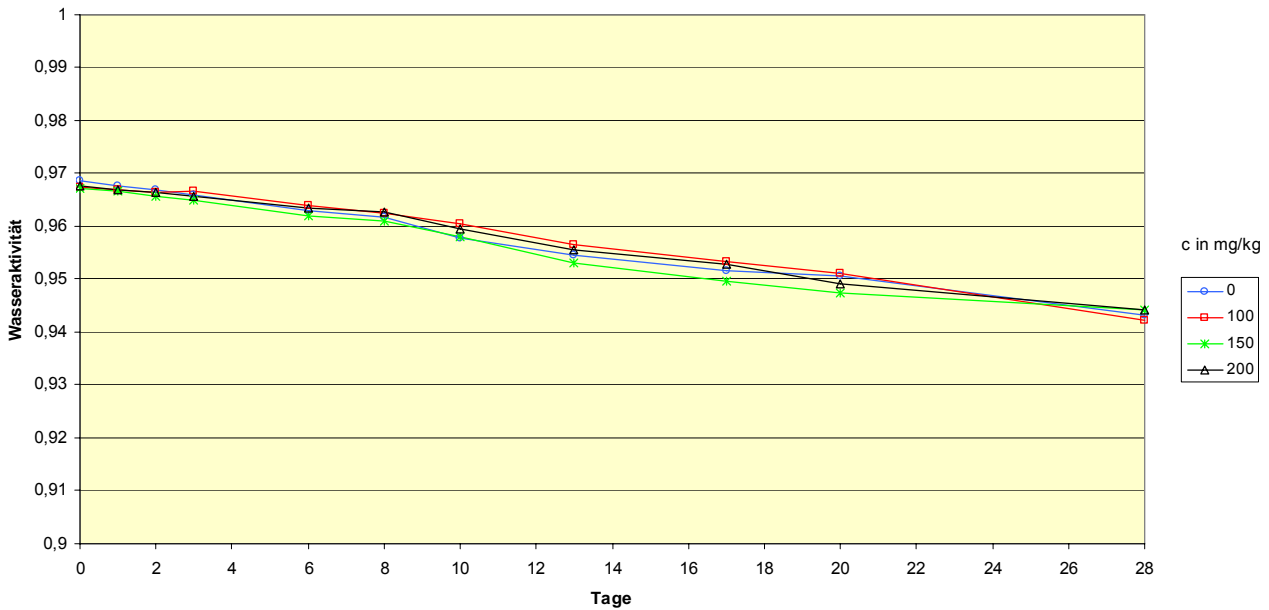


Abb. 48: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 28-tägigen Inkubation einer Teewurst mit **2,42 % NaCl** und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Reifeprogramm **B** und beimpft mit *Salmonella* spp.)

Wurde die Kochsalzkonzentration im Ausgangsbrät auf 2,89 % erhöht, so konnte ein Anfangswasseraktivitätswert von 0,962 gemessen werden (siehe Abb.49). Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen vergleichbar, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne Nitrit festgestellt werden. Die Veränderung des a_W -Wertes (a_W) von Tag 0 bis 28 betrug maximal 0,017 Einheiten.

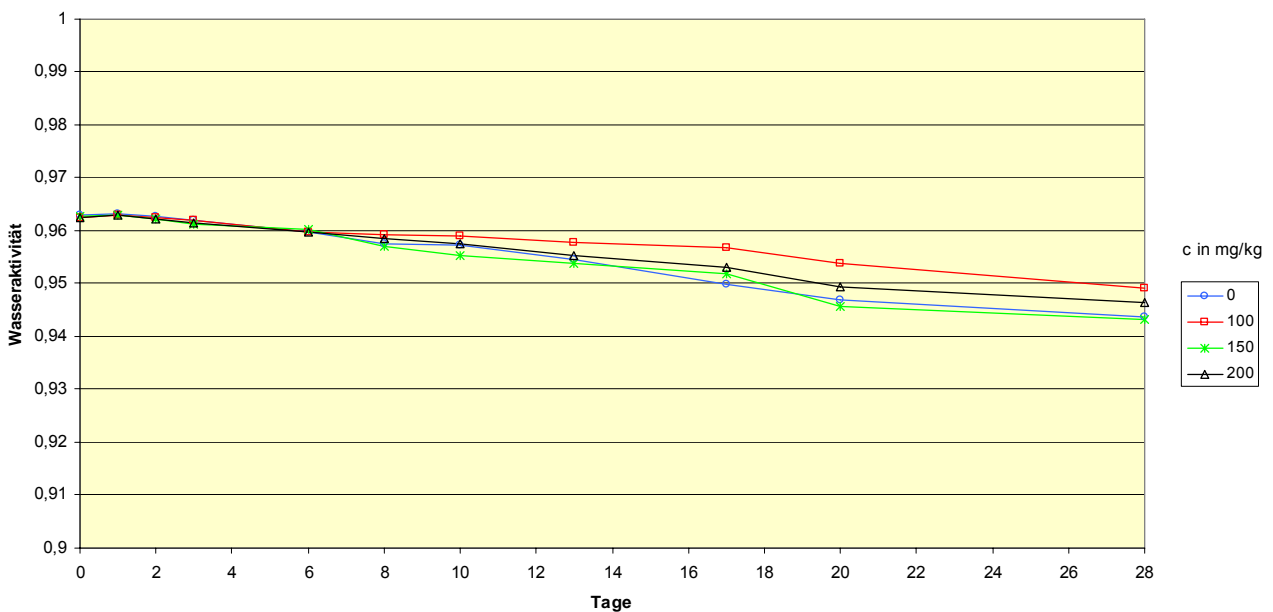


Abb. 49: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 28-tägigen Inkubation einer Teewurst mit **2,89 % NaCl** und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Reifeprogramm **A** und beimpft mit *Salmonella* spp.)

Die Temperaturerhöhung auf 25 °C bedingte eine vergleichsweise stärkere Abnahme des Wasseraktivitätswertes, wobei die Reduktion immer kleiner als 0,0004 Einheiten im Vergleich zum Standardreifeprogramm war. Wie der Vergleich zur unbeimpften Charge zeigte, blieb der a_w -Wert am Anfang und im Verlauf der Reifung durch den eingeimpften Keimpool unbeeinflusst. Dies bestätigte sich bei allen Versuchsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 48 dargestellt.

Verlauf des pH-Wertes und der Milchsäurebakterienzahl

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,8 und 5,9 und fiel bei allen Chargen auf Werte um 5,3 bis 5,4 (Abb. 50). Wie die Abbildung 51 zeigt, konnte gleichzeitig eine Vermehrung der nachweisbaren Milchsäurebakterien beobachtet werden. Nach 24 bis 48 Stunden betrug der Anstieg etwa zwei Zehnerpotenzen. Innerhalb dieses Zeitraumes war auch die pH-Wertabnahme am größten. Wie der Vergleich der beimpften zur unbeimpften Charge zeigte, wurde der Verlauf des pH-Wertes durch den eingeimpften Bakterienpool nicht beeinflusst. Dies bestätigte sich auch in allen weiteren Untersuchungsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 50 dargestellt.

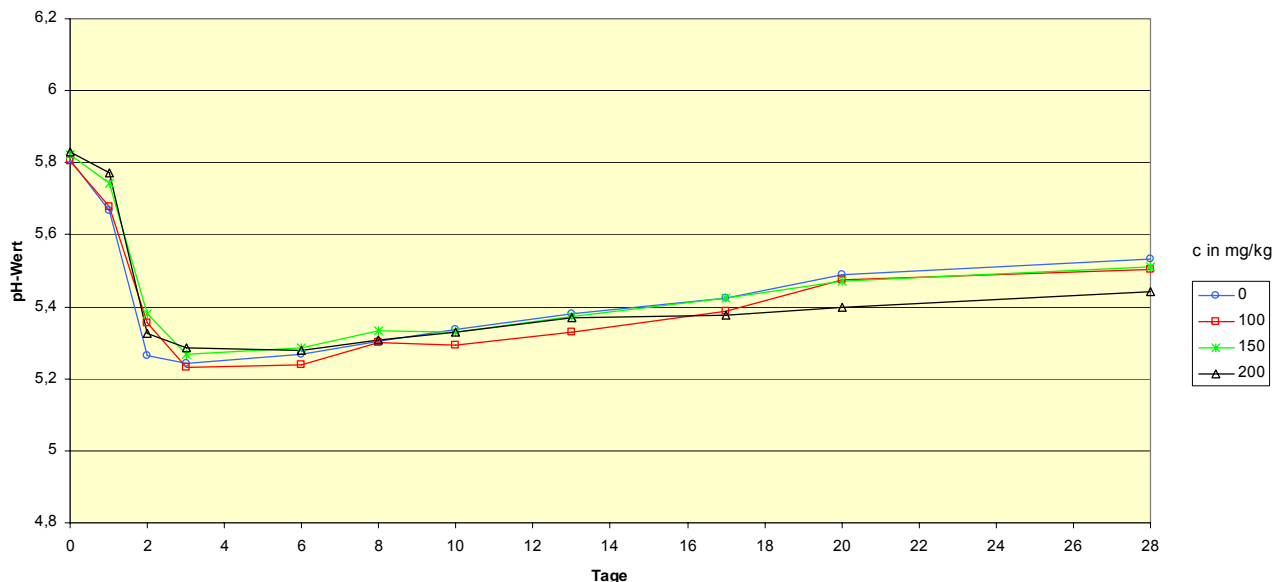


Abb.50: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf den pH-Wertverlauf in einer Teewurst mit 2,42 % NaCl (Beimpft mit *Salmonella* spp. $5 \cdot 10^3$ KBE/g).

Die Milchsäurebakterien sorgten durch die Verwertung der zugegebenen Glucose für den pH-Wertabfall und trugen somit dazu bei, dass der pH-Wert bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nicht über einen Wert von 5,5 – 5,6 stieg.

Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien in den Ansätzen nicht unter 8,0 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 51).

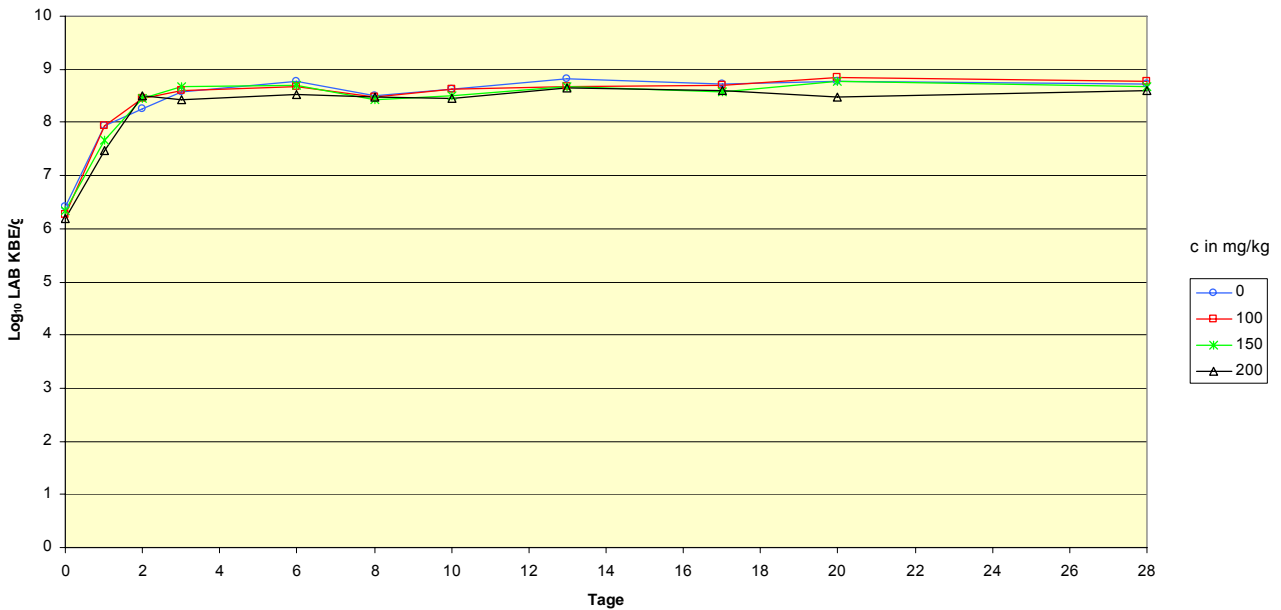


Abb. 51: Verlauf der Milchsäurebakterienzahl (LAB) KbE/g in einer Teewurst hergestellt mit 2,42 % NaCl und beimpft mit *Salmonella* spp. (Reifeprogramm A)

Verlauf der Zahl der aeroben mesophilen Keime

Die Keimzahl auf Standard I-Agar war bei allen Versuchschargen nach 24 Stunden mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl auf dem MRS-Agar vergleichbar. Die Absolutwerte waren auf Grund miterfasster *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen etwas höher. In Abbildung 52 ist dies beispielhaft dargestellt.

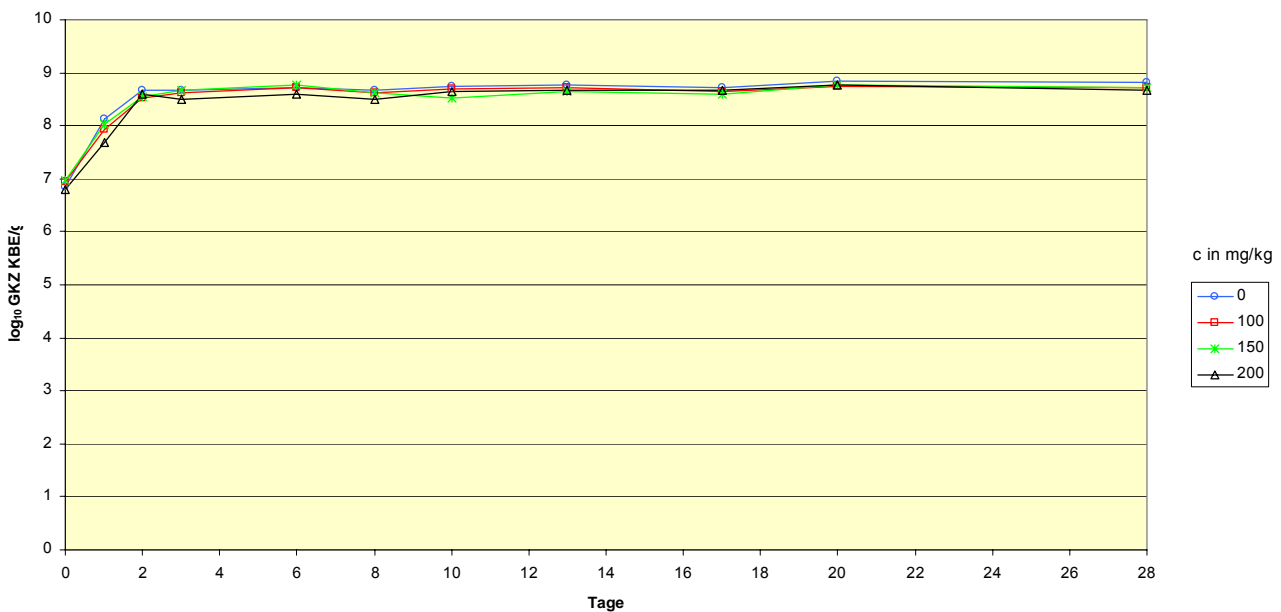


Abb. 51: Verlauf der Gesamtkeimzahl KbE/g in einer Teewurst hergestellt mit 2,42 % NaCl und beimpft mit *Salmonella* spp. (Reifeprogramm A)

3.2.2 Schnellgereifte, schnittfeste Rohwurst

Der Zusatzstoff Glucono-delta-Lacton (GdL) ist ein Schnellreifungsmittel, das in Deutschland oft verwendet wird. GdL ist ein zyklischer Ester, der sich in Wasser rasch in Gluconsäure umwandelt und zu einer erwünschten pH-Wert Senkung, einer schnellen Gelbildung und zu einer beschleunigten Umrötung im Produkt führt. GdL verkürzt zum einen die Reifezeit auf ein Drittel und reduziert den Gewichtsverlust auf rund fünfzehn Prozent (üblich sind 30 bis 50 Prozent) und andererseits entstehen durch die kürzere Reifezeit weniger aromatische Proteinabbauprodukte. Die Haltbarkeit GdL-gereifter Produkte ist jedoch verkürzt, und die Farbe sowie das Aroma sind weniger intensiv. Die anfangs niedrigen Gewichtsverluste, die schnell erreichte Schnittfestigkeit und somit Verkaufsfähigkeit und die risikoarme Herstellung sind vorteilhaft, jedoch sind Geschmack, Farbe und auch Haltbarkeit dieser Würste begrenzt. Bei längerer Lagerung treten zudem ein beißig-saurer Geschmack und hohe Gewichtsverluste auf.

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei Reifeprogramme getestet. Zum einen ein Standardreifeprogramm A und zum anderen ein Reifeprogramm B, welches durch eine Temperaturerhöhung eine metabolische Erschöpfung (Leistner, 1992) und somit ein vorzeitiges Absterben der Keime hervorrufen sollte. Bei allen Chargen sollte zum einen der Einfluss des Zusatzstoffes Natriumnitrit und zum anderen der Einfluss der zwei Reifeprogramme auf das Verhalten der verwendeten Keime untersucht werden.

3.2.2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde in einer Keimmenge von $3,8 \log_{10}$ KbE pro g ($6,3 \times 10^3$ KbE/g) dem Brät zugegeben (siehe Abb. 52). Durch das zugesetzte Glucono-delta-Lacton nahm der pH-Wert in der Rohwurst sehr schnell ab, so dass nach 48 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,1 - 5,2 gemessen werden konnten.

Reifeprogramm A

In Folge der sehr schnellen pH-Wertabsenkung konnte in keiner der Chargen eine Vermehrung der Listerien beobachtet werden (siehe Abb. 52). Bis zum Versuchstag 6 nahm die Zellzahl leicht auf $3,0 \log_{10}$ KbE/g ($1,0 \times 10^3$ KbE/g) ab. Anschließend blieb die Keimdichte bis zum 20. Tag auf diesem hohen Niveau konstant (siehe Abb. 52). Zwischen dem Tag 20 und 28 konnte in Folge der zunehmenden Abtrocknung des Produktes eine weitere Reduktion der Keimzahl beobachtet werden. Nach einer 4-wöchigen Reifungs- oder Nachreifungszeit konnten in den Produkten Keimmengen von $1,7 - 2,0 \log_{10}$ KbE/g (50-100 KbE/g) festgestellt werden. Im Verlauf der Untersuchung sank die Keimzahl somit um zwei Zehnerpotenzen, dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne Nitrit festgestellt werden (siehe Abb. 52). Auch spielte die zugegebene Nitritmenge hinsichtlich einer effektiveren Keiminaktivierung keine Rolle.

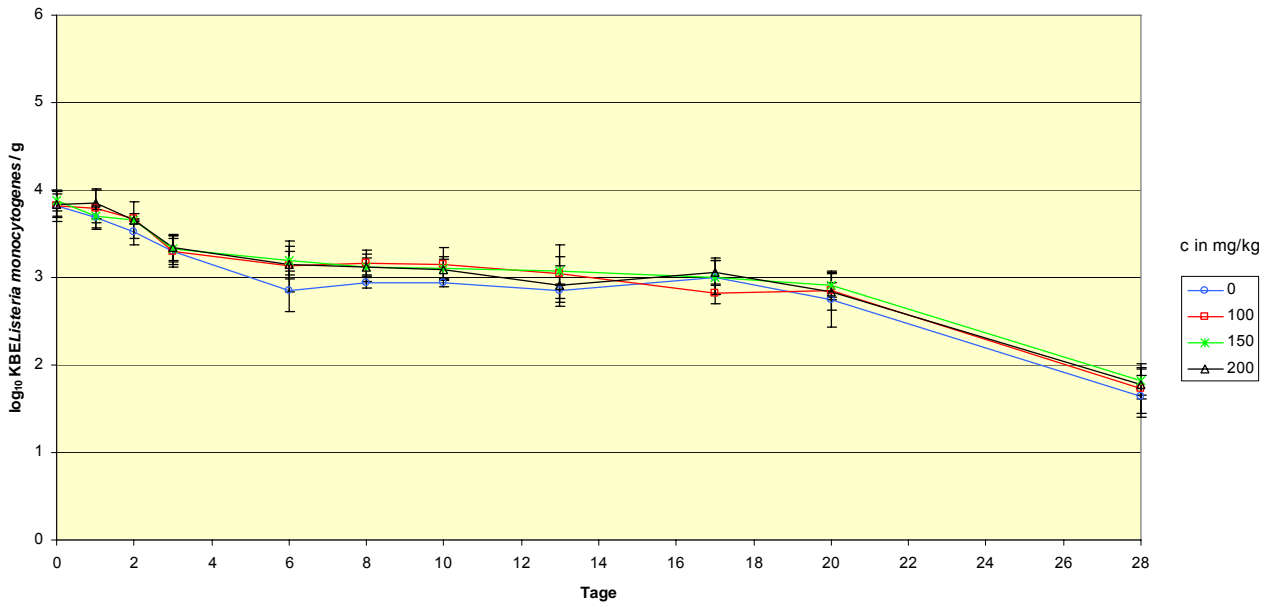


Abb. 52: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer schnellgereiften Salami (Reifeprogramm A und 2,81 % NaCl)

Reifeprogramm B

Im Vergleich zum Reifeprogramm A konnte während oder nach der Temperaturerhöhung auf 25 °C keine deutlichere Keimzahlabnahme beobachtet werden (siehe Abb. 53). Stattdessen zeigte sich ein Keimzahlverlauf, der mit dem des Standardreifeprogrammes fast identisch war (vgl. Abb. 52 und Abb. 53). Auch in diesem Fall konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Chargen mit oder ohne Natriumnitrit festgestellt werden. Die verschiedenen Natriumnitritkonzentrationen (100, 150 und 200 mg/g) die dem Brät zugegeben wurden, zeigten keinen erhöhten antimikrobiellen Effekt.

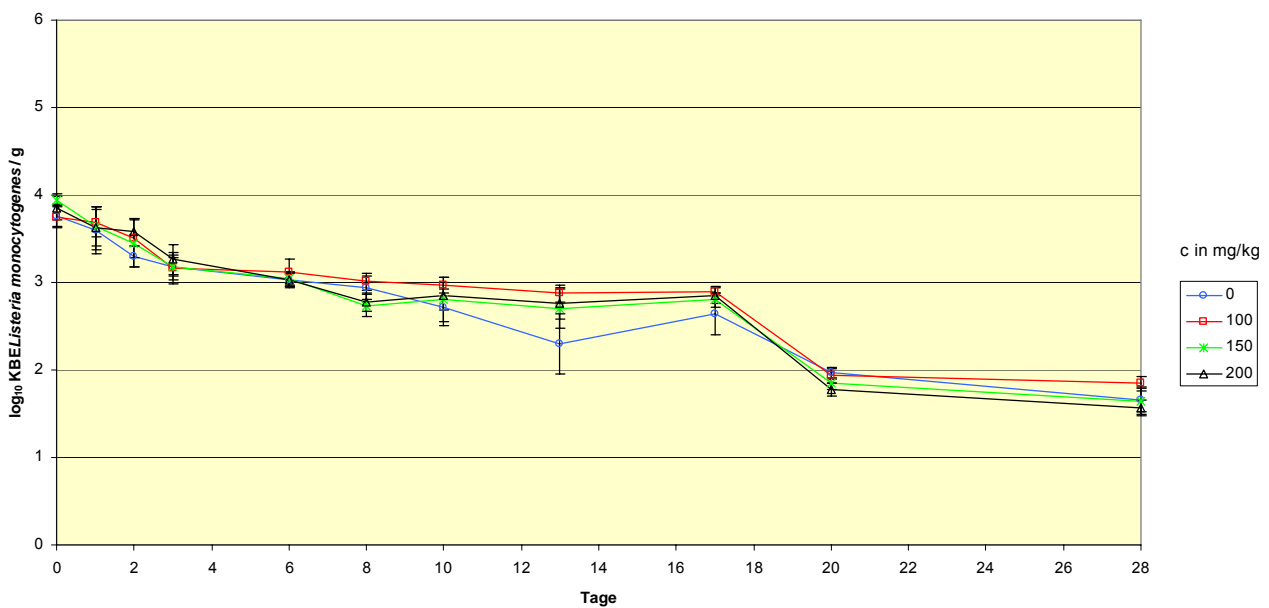


Abb. 53: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer schnellgereiften Salami (Reifeprogramm B und 2,81 % NaCl)

3.2.2.2 *Escherichia coli*

Das Brät wurde mit einer *Escherichia coli* Keimmenge von ca. $3,8 \log_{10}$ KbE pro g ($6,3 \times 10^3$ KbE/g) Brät beimpft. Durch das zugesetzte GdL nahm der pH-Wert der Rohwurst sehr schnell ab, so dass nach 48 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,2 gemessen wurden.

Reifeprogramm A

Ein Anstieg der Keimzahlen konnte infolge der raschen Erniedrigung des Säuregrades nicht festgestellt werden, stattdessen nahm die Keimdichte auf $2,0 - 2,7 \log_{10}$ KbE/g kontinuierlich bis zu Untersuchungstag 6 ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Chargen, die mit oder ohne Natriumnitrit inkubiert wurden, konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 54). Zwischen dem Tag 6 und 13 blieb die Zellzahl von *E.coli* in der schnellgereiften Rohwurst konstant (siehe Abb. 54). Durch die weiter voran schreitende Abtrocknung des Produktes auf Wasseraktivitätswerte unter 0,95 nahm die Keimdichte weiter ab. Erst ab dem 17. Untersuchungstag zeigten sich Unterschiede in Bezug auf die Keimdichte von *Escherichia coli* zwischen den Chargen ohne und mit Natriumnitrit (siehe Abb. 54). Während in den Nitritchargen niedrigere Keimdichten von ca. $1,0 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen werden konnten, lagen diese für die ohne Nitrit hergestellten Rohwürste bei $1,5 - 1,7 \log_{10}$ KbE/g. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht direkt auf die Wirkung von Nitrit zurückgeführt werden, da der Zusatzstoff mit unseren Methoden ab dem dritten Untersuchungstag nicht mehr nachweisbar war. Zwischen den Chargen mit unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen von 100 bis 200 mg/g konnte hinsichtlich der Keimzahl keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Am Tag 28 konnten in den Chargen mit Natriumnitrit sowohl nach Anreicherung als auch nach molekularbiologischer Diagnostik keine Keime mehr nachgewiesen werden. In den Ansätzen ohne Nitrit war dies nach Anreicherung möglich (siehe Abb. 54).

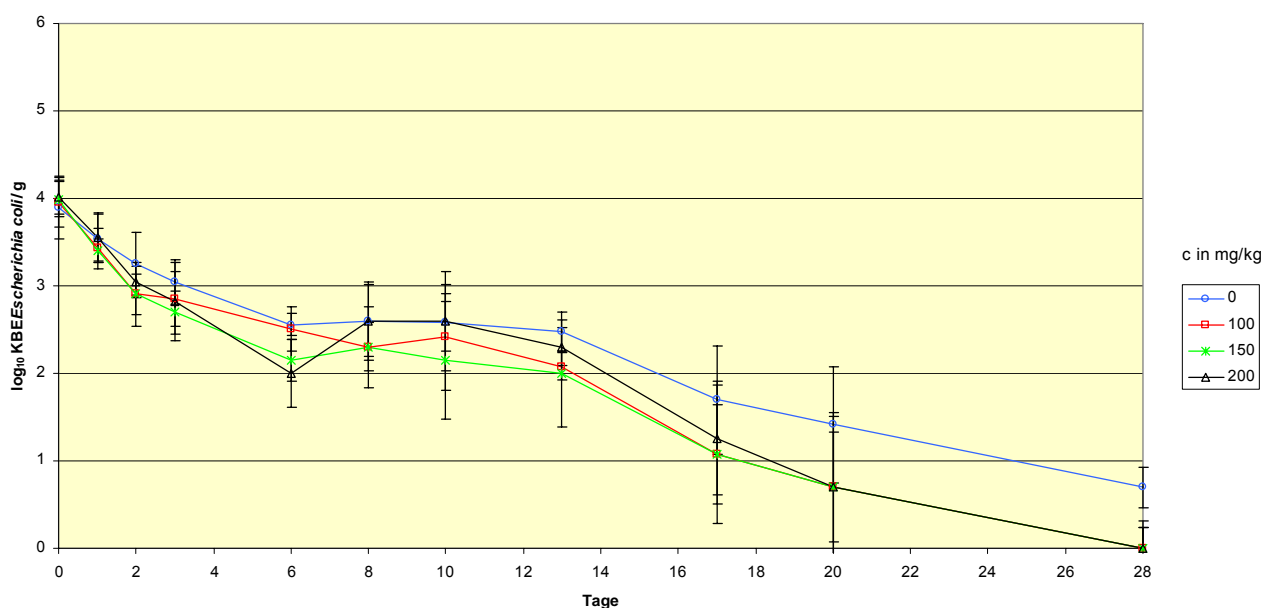


Abb. 54: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer schnellgereiften Salami (Reifeprogramm A und 2,81 % NaCl)

Reifeprogramm B

Eine Vermehrung von *Escherichia coli* konnte auch bei diesem Reifeprogramm nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zum Reifeprogramm A wurde durch eine Temperaturerhöhung auf 25 °C zwischen dem vierten und sechsten Tag eine deutlichere Abnahme der Keimzahl im Produkt erreicht (vgl. Abb. 57 und 58). So konnten in den Ansätzen mit Nitrit nach dem sechsten Untersuchungstag Keimdichten von 1,0 - 1,8 log₁₀ KbE/g (10 – 63 KbE/g) nachgewiesen werden (siehe Abb. 55). Ab dem achten Tag war ein Nachweis von *Escherichia coli* in diesen Proben nur noch nach Anreicherung möglich. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen zugesetzten Natriumnitritkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden.

Bei den Chargen, denen kein Natriumnitrit zugesetzt wurde, konnte zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung eine höhere Keimzahl im Vergleich zu denen mit Nitrit ermittelt werden (siehe Abb. 55). Dieser Unterschied war jedoch auf Grund der Spannungsbreite der Ergebnisse nicht signifikant und sollte daher nicht überbewertet werden. Erst ab Tag 17 konnten die Bakterien nur noch mittels Voranreicherung nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum Reifeprogramm A lässt sich feststellen, dass in Folge der Temperaturerhöhung zwischen dem Reifetag 4 und 6 eine deutliche Keimreduzierung im Produkt erreicht werden konnte (vgl. Abb. 54 und 55). Bereits nach dem sechsten oder achten Versuchstag war ein Nachweis von *Escherichia coli* in den Rohwürsten mit Nitrit nur noch nach Voranreicherung möglich. Im Vergleich dazu konnten die pathogenen Bakterien, welche ein Standardreifeprogramm durchlaufen hatten, bis zum 17. Tag ohne Voranreicherung nachgewiesen werden.

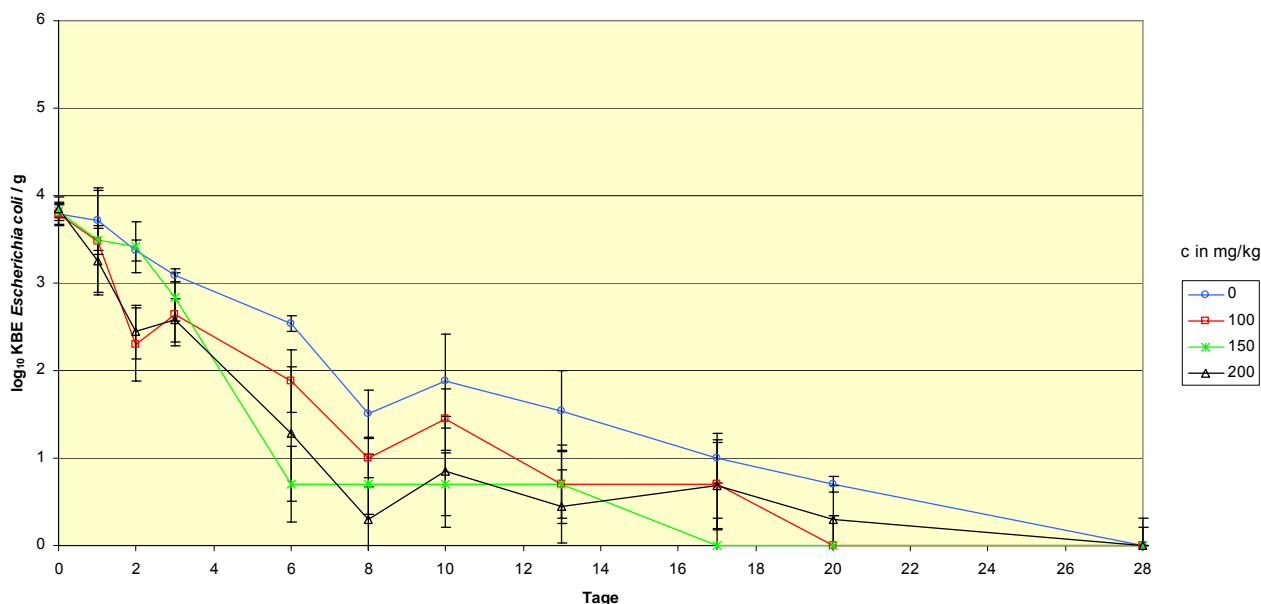


Abb. 55: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer schnellgereiften Salami (Reifeprogramm B und 2,81 % NaCl)

Weiterhin ließ sich feststellen, dass eine Vermehrung der eingepflichten Keime bei keinem der Versuchsansätze statt fand. Auch in den nitritfreien schnellgereiften Rohwürsten war kein Wachstum der Bakterien von *Escherichia coli* zu beobachten. Jedoch waren am Ende des Versuchszeitraumes geringe Keimzahlen nachweisbar.

3.2.2.3 *Salmonella* spp.

Das Brät wurde mit einer *Salmonella* spp. Keimmenge von 3,0 - 3,6 log₁₀ KbE pro g (1,0 - 3,9 x 10³ KbE/g) Brät beimpft. Durch das zugesetzte GdL nahm der pH-Wert der schnellgereiften schnittfesten Rohwurst sehr schnell ab, so dass nach 24 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,1 gemessen werden konnten.

Reifeprogramm A

In keiner der Versuchschargen konnte während des Untersuchungszeitraumes eine Vermehrung der Zellen von *Salmonella* spp. beobachtet werden (siehe Abb. 56). Jedoch ließ sich ein hemmender Einfluss des Zusatzstoffes Natriumnitrit auf die Keime feststellen. So bewirkte Nitrit innerhalb der ersten 72 Stunden eine Reduzierung der Ausgangskeimzahl um 2 Zehnerpotenzen (siehe Abb. 56), während im gleichen Zeitraum bei den Organismen die ohne Nitrit inkubiert wurden nur eine Reduktion von 1 Zehnerpotenz ermittelt werden konnte. Ab dem sechsten Versuchstag mussten die Proben mit Natriumnitrit zum Nachweis der Organismen vorangereichert werden und ab dem 13. Untersuchungstag war kein Nachweis mehr möglich. Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Nitritkonzentrationen konnte nicht festgestellt werden. In den Proben ohne Nitrit konnten die Zellen von *Salmonella* spp. vereinzelt noch bis zum 17. Tag nach Anreicherung nachgewiesen werden. Erst ab dem Tag 20 war diese Rohwurst Salmonellen frei (siehe Abb. 56).

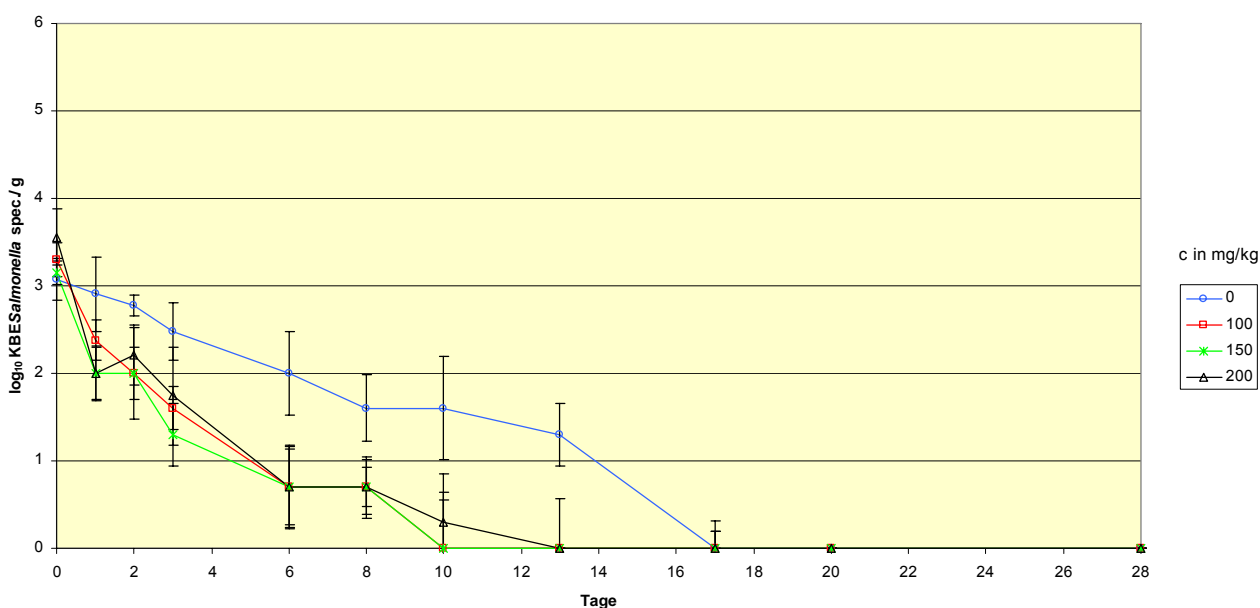


Abb. 56: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer schnellgereiften Salami (Reifeprogramm A und 2,81 % NaCl)

Reifeprogramm B

Während des Untersuchungszeitraumes war eine Vermehrung der Zellen von *Salmonella* spp. in keiner der Chargen möglich (siehe Abb. 57). Eine keimhemmende Wirkung des Nitrits konnte beobachtet werden, jedoch wurden erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen getesteten Nitritmengen festgestellt. Innerhalb der ersten 72 Stunden wurde die Ausgangskeimzahl analog zum Reifeprogramm um zwei Zehnerpotenzen reduziert (siehe Abb. 56 und 57). Im Gegensatz zum Reifeprogramm A konnte durch eine Temperaturerhöhung auf 25 °C zwischen dem vierten und sechsten Tag eine deutlichere Abnahme der Keimdichte erreicht werden. So wurden ab dem achten Versuchstag nur noch vereinzelt Bakterien der Gattung *Salmonella* nach einer Anreicherung nachgewiesen (siehe Abb. 56), während dies beim Reifeprogramm A erst nach dem 10. oder 13. Untersuchungstag der Fall war (siehe Abb. 56). In den Chargen, welche ohne Natriumnitrit hergestellt wurden, konnten die Salmonellen bis zum 13. Tag mittels Anreicherung detektiert werden. Im Vergleich zum Standardreifeprogramm A bedeutete dies, dass die Keime durch die Temperaturerhöhung im Schnitt drei Tage früher nicht mehr im Produkt nachzuweisen waren, als dies bei einem Standardreifeprogramm der Fall war (vgl. Abb. 56 und 57).

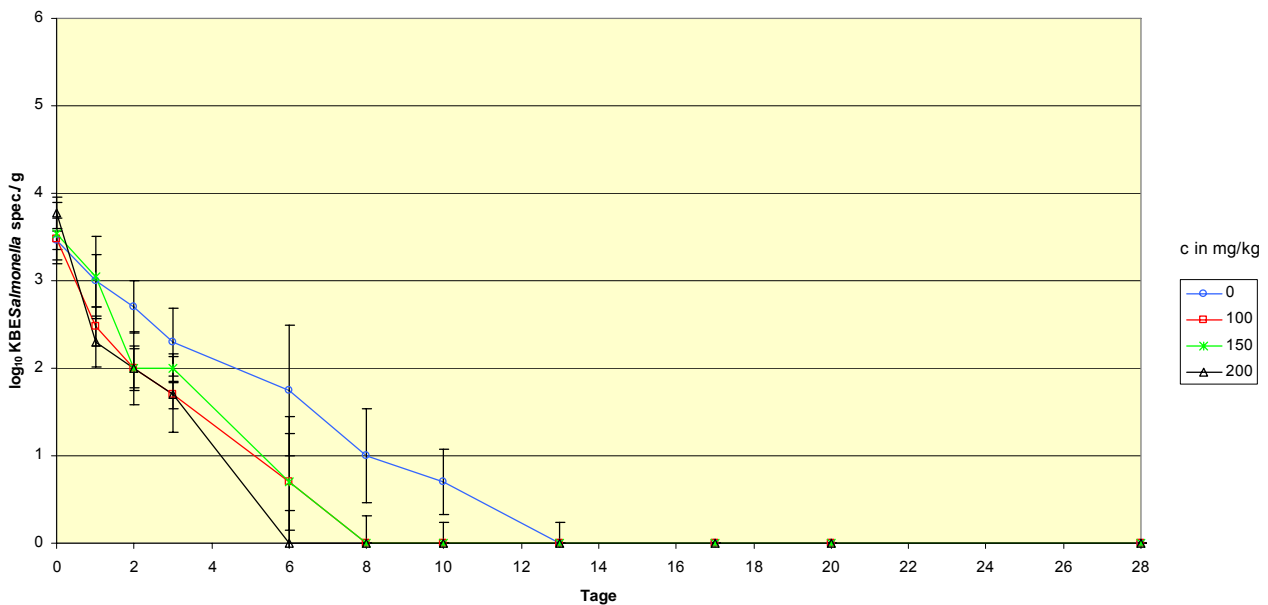


Abb. 57: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer **schnellgereiften Salami (Reifeprogramm B und 2,81 % NaCl)**

Insgesamt gesehen ist die schnellgereifte schnittfeste Rohwurst ein sehr sicheres Produkt, denn die durch die Gluconsäure induzierte pH-Wertabsenkung verhinderte sehr effektiv eine Vermehrung der pathogenen Bakterien vor allem in den kritischen ersten 24 Stunden (vgl. 3.2.1.). *Salmonella* spp. und *Escherichia coli* erwiesen sich hier als sehr anfällig gegenüber einer pH- und a_w -Wertabsenkung und konnten mit dem Reifeprogramm B schnell abgetötet werden.

Verlauf des a_w -Wertes

Der a_w -Wert betrug kurz nach der Beimpfung 0,964 (2,81% NaCl). Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen vergleichbar, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne Nitrit festgestellt werden (siehe Abb. 58). Die Veränderung des a_w -Wertes von Tag 0 bis 28 betrug maximal 0,08 Einheiten. Die Temperaturerhöhung auf 25 °C bedingte eine vergleichsweise minimal stärkere Abnahme des Wasseraktivitätswertes, wobei die Reduktion immer kleiner als 0,0002 Einheiten war. Wie der Vergleich zur unbeimpften Charge zeigte, blieb der a_w -Wert am Anfang und im Verlauf der Reifung durch den eingeimpften Keimpool unbeeinflusst. Dies bestätigte sich bei allen Versuchsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 58 dargestellt.

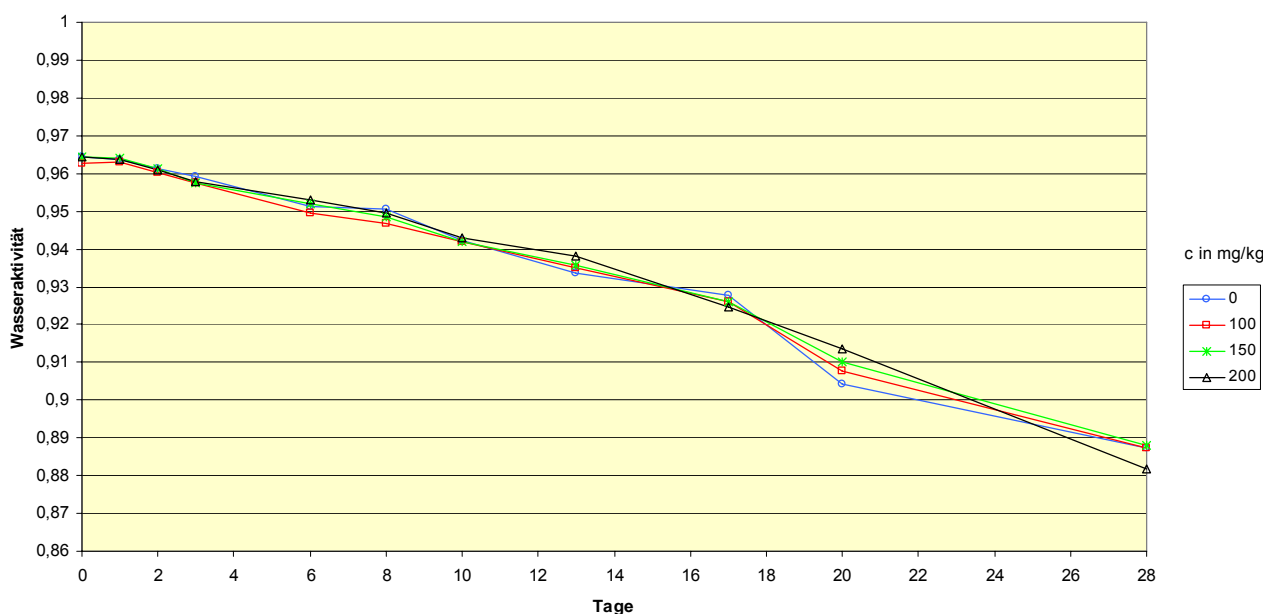


Abb.58: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 28-tägigen Inkubation einer schnellgereiften Salami hergestellt mit **2,81 % NaCl** und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (**0, 100, 150 und 200 mg/kg**). (Reifeprogramm B und beimpft mit *Salmonella* spp.)

Verlauf des pH-Wertes und der Milchsäurebakterienzahl

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,8 und 5,9 und fiel bei allen Chargen auf Werte um 4,9 bis 5,1 (Abb. 59). Wie die Abbildung 60 zeigt, konnte gleichzeitig eine Vermehrung der nachweisbaren Milchsäurebakterien beobachtet werden. Nach 24 bis 48 Stunden betrug der Anstieg etwa zwei Zehnerpotenzen. Innerhalb dieses Zeitraumes war auch die pH-Wertabnahme am größten. Die hier beobachtete sehr schnelle pH-Werterniedrigung ist jedoch nicht nur auf den Zusatz der Starterkulturen zurückzuführen sondern auf die vor allem auf die Zugabe von GdL. Die Milchsäurebakterien unterstützten die pH-Wert senkende Wirkung des Glucono-delta-lactons und bewirkten mit ihrer kontinuierlichen Produktion von Milchsäure, dass der pH-Wert bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes nicht über einen Wert von 5,1 stieg. Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien nicht unter 8,0 log₁₀ KbE/g. Wie der Vergleich der beimpften zur unbeimpften Charge zeigte, wurde der Verlauf des pH-Wertes durch den eingeimpften Bakterienpool nicht beeinflusst. Dies bestätigte sich auch in allen weiteren Untersuchungsreihen und ist hier

beeinflusst. Dies bestätigte sich auch in allen weiteren Untersuchungsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 59 dargestellt.

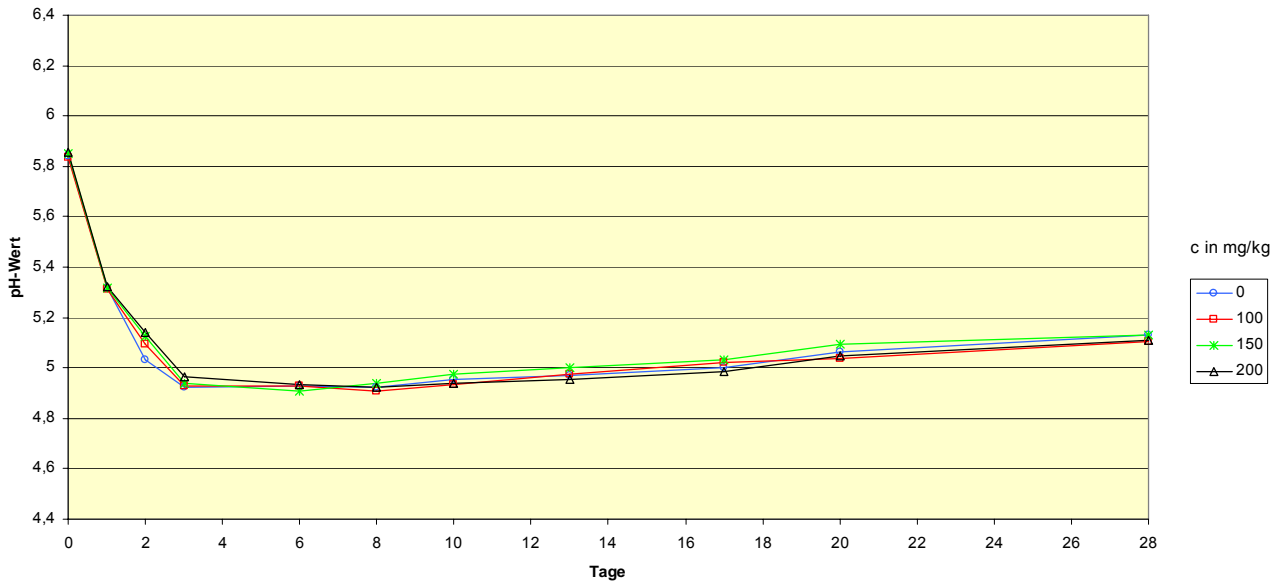


Abb. 59: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf den pH-Wertverlauf in einer schnellgereiften Salami mit **2,81 % NaCl (Reifeprogramm B** und beimpft mit **Salmonella spp. $5 \cdot 10^3$ KBE/g**).

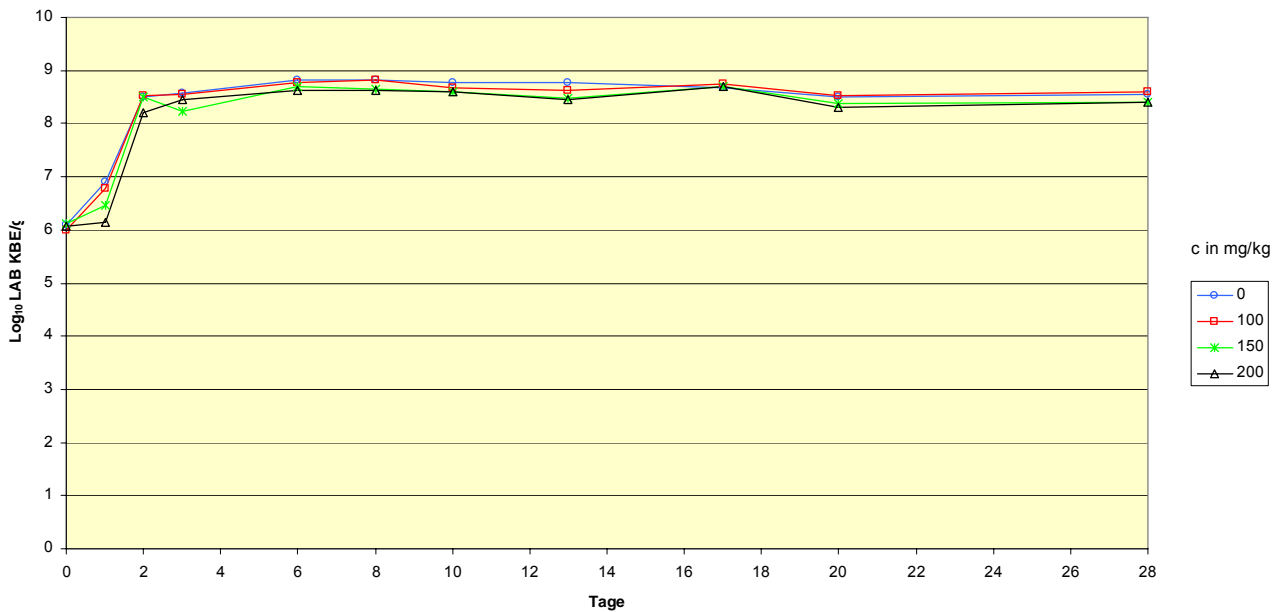


Abb.60: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf den Verlauf der **Milchsäurebakterienzahl (LAB) KBE/g** in einer **schnellgereiften Salami** mit **2,8 % NaCl. (Reifeprogramm B** und beimpft mit **Salmonella spp.**)

Verlauf der Zahl der aeroben mesophilen Keime

Die Keimzahl auf Standard-I-Agar war bei allen Versuchschargen nach 24 Stunden mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl auf dem MRS-Agar vergleichbar. Die Absolutwerte waren auf Grund miterfasster *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen etwas höher. In Abbildung 61 ist dies beispielhaft dargestellt.

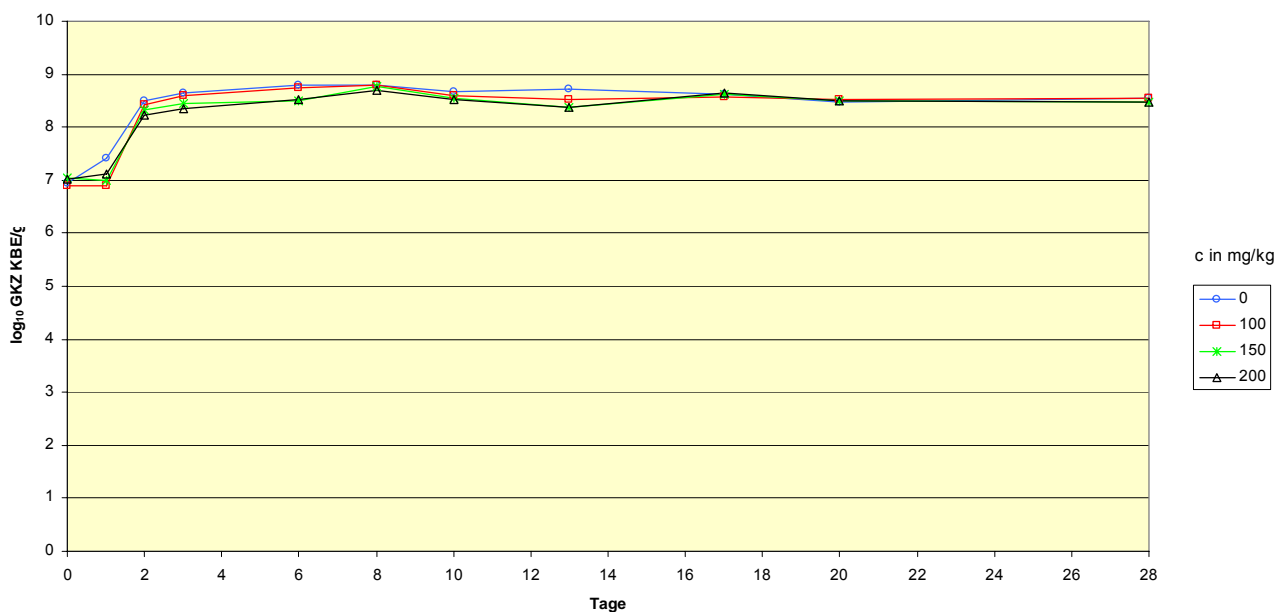


Abb.61: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf den Verlauf der **Gesamtkeimzahl** (GKZ) KbE/g in einer **schnellgereiften Salami** mit **2,8 % NaCl**. (Reifeprogramm **B** und beimpft mit *Salmonella* spp.)

3.2.3 Langgereifte, schnittfeste Rohwurst

Der Vorteil der langgereiften Rohwurst gegenüber einer kurzgereiften ist ihre lange Haltbarkeit und der Verzicht auf den chemisch-synthetischen Zusatzstoff Glucono-delta-Lacton. Durch die verlängerte Reifezeit entsteht mehr attraktiver Eigengeschmack – analog zu Wein und Käse. Gemäß RAPELLI (2004) benötigt eine Qualitätssalami pro Millimeter Kaliber einen Tag Reifezeit bei moderater Temperatur. Ein genügend hoher Trocknungsgrad ist entsprechend der Erfahrung der Hauptfaktor für die Haltbarkeit. Die Wasseraktivität muss für alle Rohwürste auf unter a_w : 0,93 oder noch tiefer gesenkt werden. Aber auch weitere Faktoren bestimmen die Haltbarkeit der langgereiften Rohwurst. Der pH-Wert sollte während der Reifung mindestens pH 5,3 erreichen und bis zum Ende nicht über 5,7 steigen.

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei verschiedene Salzkonzentrationen getestet. Zum einen eine Salzkonzentration von 2,82 % und zum anderen eine von 3,4 %, welche leicht unterhalb oder oberhalb der von der Industrie verwendeten Salzkonzentration von 3,0 % liegt, getestet. Ziel war es, den Einfluss der Anfangswasseraktivität auf das Verhalten von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (EHEC) und *Salmonella* spp. zu untersuchen.

3.2.3.1 *Listeria monocytogenes*

Das Brät wurde vor dem Füllen mit einer Keimmenge von $3,8 \log_{10}$ KbE/g ($6,3 \times 10^3$ KbE/g) beimpft (siehe Abb. 62). Der pH-Wert der Rohwurst nahm in Folge der Vermehrung der Starterkultur schnell ab, so dass nach 48 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,4 - 5,5 gemessen werden konnten.

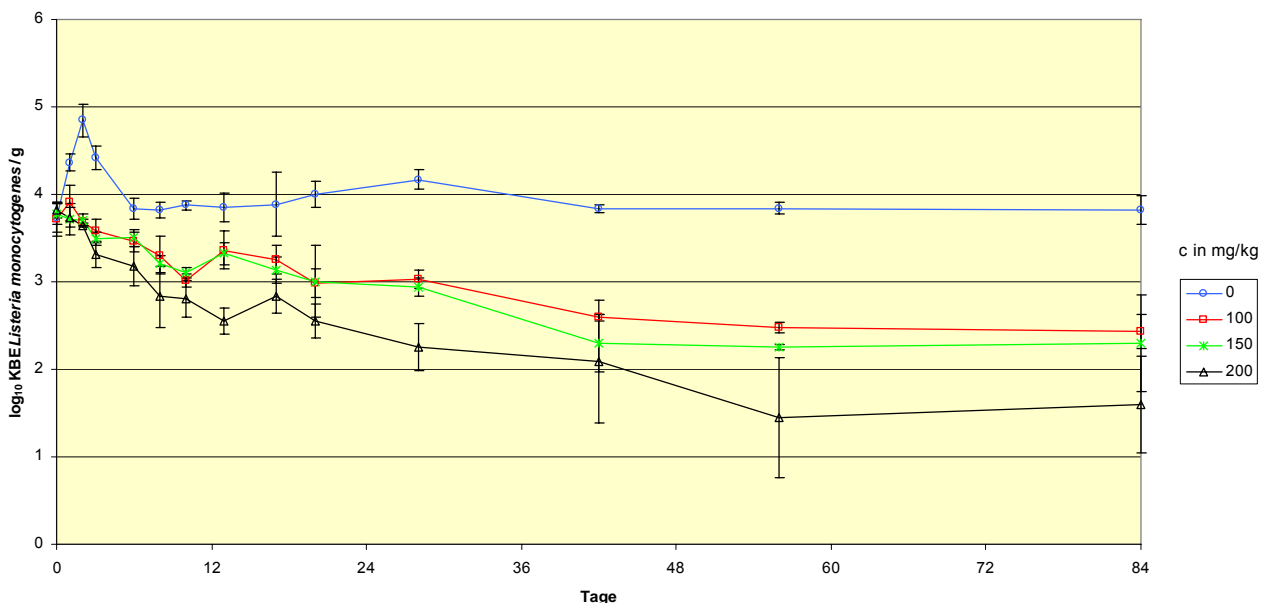


Abb.62: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer langgereiften Salami mit 2,82 % NaCl

Kochsalzkonzentration: 2,82 %

In den Chargen ohne Natriumnitrit konnte in den ersten 48 Stunden eine rasche Zunahme der Keimdichte auf $4,8 \log_{10}$ KbE/g ($6,3 \times 10^4$ KbE/g) beobachtet werden. Mit zunehmendem Reifeverlauf sank die Keimzahl zurück auf das Ausgangsniveau (siehe Abb. 62) und blieb auf diesem Level bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes.

Im Vergleich dazu konnte in den Ansätzen mit Nitrit keine Vermehrung der zugesetzten Organismen beobachtet werden. Die Konzentration von *Listeria monocytogenes* nahm in den folgenden Reifetagen leicht ab, erst nach dem Untersuchungstag 42 konnte eine Reduktion der Keime um eine Zehnerpotenz festgestellt werden (siehe Abb. 62). Bis zu diesem Tag waren auch keine deutlichen Unterschiede zwischen den eingesetzten Natriumnitritkonzentrationen sichtbar.

Erst nach dem Tag 42 sank die Keimzahl der Listerien in den Ansätzen mit 200 mg/kg Natriumnitrit signifikant stärker (auf $1,8 \log_{10}$ KbE/g) als in den Chargen mit 100 oder 150 mg/kg ($2,5 - 2,6 \log_{10}$ KbE/g). Sie war damit im Schnitt 1 Zehnerpotenz niedriger (siehe Abb. 62). Diese Beobachtung kann jedoch nicht auf die direkte Wirkung des Zusatzstoffes zurückgeführt werden, da Nitrit ab dem sechsten Untersuchungstag nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

Ein Wachstum von *Listeria monocytogenes* trat nur in den Chargen ohne Natriumnitrit auf. So wurden Keimzahlen von $5,0 \log_{10}$ KbE/g (1×10^5 KbE/g) im Produkt nach 48 Stunden nachgewiesen (siehe Abb. 63). Anschließend sank die Keimdichte leicht und erreichte am sechsten Untersuchungstag eine Keimhöhe von $4,6 - 4,7 \log_{10}$ KbE/g ($4 - 5,0 \times 10^4$ KbE/g). Auf diesem Niveau blieb die Keimzahl bis zum Tag 56. Erst am Ende des Untersuchungszeitraumes sank die Bakterienzellzahl unter $4,0 \log_{10}$ KbE/g auf $3,8 - 3,9 \log_{10}$ KbE/g ($6,3 - 7,9 \times 10^3$ KbE/g).

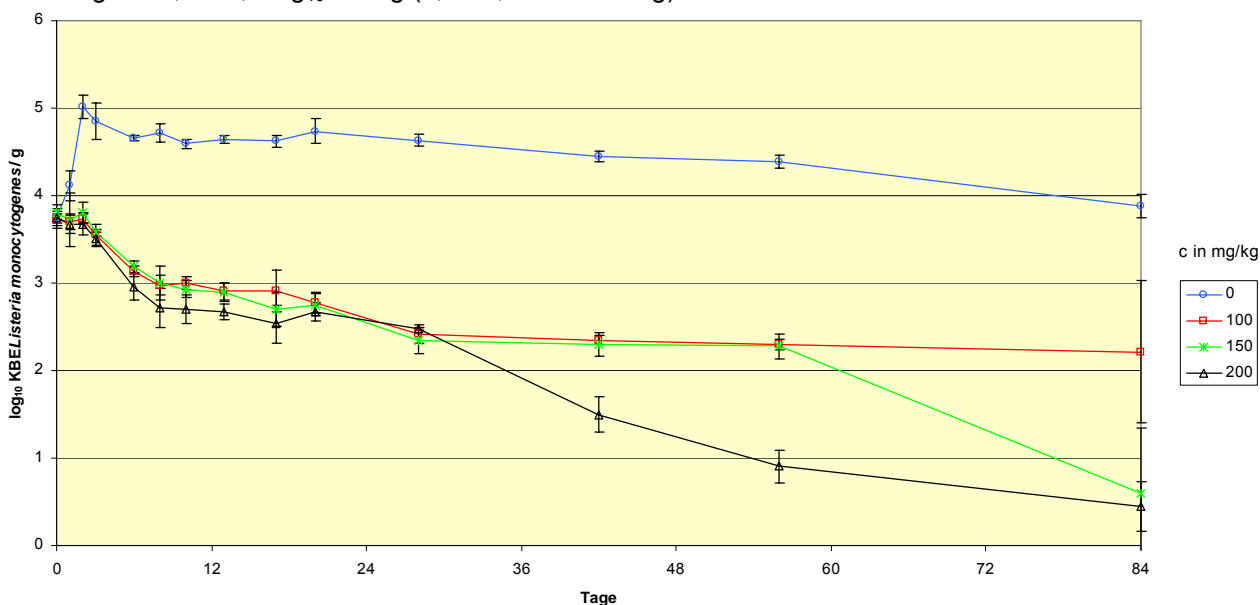


Abb.63: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer langgereiften Salami mit 3,4 % NaCl

Eine vollständige Eliminierung der Stämme von *Listeria monocytogenes* in einer langgereiften Rohwurst, welche unter streng ökologischen Gesichtspunkten hergestellt wurde, war nicht möglich (siehe Abb. 66). Auch war hier die nachweisbare Keimzahl im Produkt zum Zeitpunkt der Abgabe an den Verbraucher deutlich höher, als dies im rechtlichen Rahmen (100 KbE/g) erlaubt ist (Verordnung (EG) 2073/2005).

In den Chargen, die mit Natriumnitrit hergestellt wurden, konnte keine Vermehrung der zugesetzten Listerien beobachtet werden (siehe Abb. 63). Stattdessen sank die Keimzahl bis zum Tag 28 um eine Zehnerpotenz, ohne dass zwischen den unterschiedlichen Nitritkonzentrationen signifikante Unterschiede hinsichtlich einer effektiveren Wachstumshemmung festgestellt werden konnten (siehe Abb. 63). Erst ab dem Untersuchungstag 42 traten charakteristische Unterschiede zwischen den eingesetzten Nitritmengen auf (siehe Abb. 63). *Listeria monocytogenes* konnte in den Ansätzen mit 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit am Ende des Herstellungsprozesses nach 84 Tagen nur noch nach Anreicherung nachgewiesen werden. Damit lagen die Keimzahlen hier deutlich unter den gesetzlich geforderten Werten von $2 \log_{10}$ KbE/g Brät (100 KbE/g).

In den Chargen welche mit 100 mg/kg Natriumnitrit hergestellt wurden lagen die Keimzahlen im Median leicht über der gesetzlich geforderten Grenze. Jedoch können die Ergebnisse bei den unterschiedlichen Natriumnitritmengen von 100, 150 und 200 m/kg nicht auf die direkte Wirkung des Zusatzstoffes zurückgeführt werden, da dieser bereits ab dem sechsten Untersuchungstag nicht mehr nachzuweisen war.

3.2.3.2 *Escherichia coli*

Das Brät wurde mit einer *Escherichia coli* Keimmenge von 3,8-4,2 \log_{10} KbE pro g (6,3 - 15,9 $\times 10^3$ KbE/g) Brät beimpft (siehe Abb. 64). Der pH-Wert der Rohwurst nahm in Folge der Vermehrung der Starterkultur schnell ab, so dass nach 48 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,3-5,4 gemessen werden konnten.

Kochsalzkonzentration: 2,82 %

Eine Vermehrung der pathogenen *Escherichia coli* Kulturen konnte in keiner Charge über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen werden (siehe Abb. 64). Innerhalb der ersten 6 Tage nahm die Keimdichte im Produkt um eine Zehnerpotenz ab. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte hinsichtlich einer effektiveren Keimhemmung sowohl zwischen den unterschiedlichen Nitritkonzentrationen als auch bei dem Ansatz ohne Zusatzstoff kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 64). Zwischen dem 6. und 13. Untersuchungstag blieben die Keime auf einem konstant hohen Niveau von 2,7-3,1 \log_{10} KbE/g (5,0 – 12,5 $\times 10^2$ KbE/g). Eine deutliche Keimzahlabnahme konnte erst ab dem 17. Tag für die Chargen, welche mit dem Zusatzstoff Nitrit hergestellt wurden, beobachtet werden. Bei dem Versuchsansatz ohne Nitrit trat diese Reduktion der Bakterien erst ab dem Untersuchungstag 20 auf.

Diese Beobachtung kann jedoch nicht direkt auf den hemmenden Einfluss des Nitrits zurückgeführt werden, da Natriumnitrit ab dem sechsten Untersuchungstag nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Eine völlige Abwesenheit der Keime konnte für die Chargen mit Nitrit ab 42. und für die Chargen ohne Nitrit ab dem 56. Tag nachgewiesen werden (siehe Abb. 64).

In der langgereiften schnittfesten Rohwurst mit dem Zusatz von 2,82 % Kochsalz, die unter ökologischen Aspekte ohne den Zusatz von Nitrit hergestellt wurde, konnten die Keime von *Escherichia coli* (EHEC) im Schnitt 14 Tage länger nachgewiesen werden.

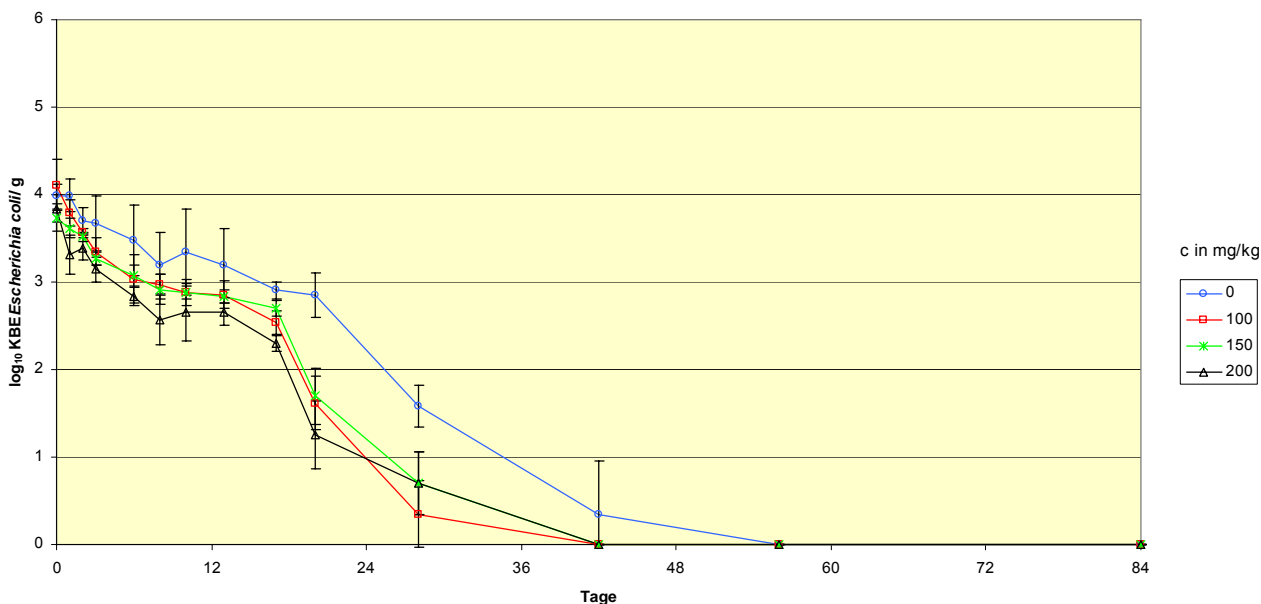


Abb.64: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer langgereiften Salami mit 2,82 % NaCl

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

Wurde der Zusatz des Kochsalzes auf 3,4 % erhöht, so sank die Ausgangskeimzahl von *Escherichia coli* innerhalb der ersten 17 Tage um fast drei Zehnerpotenzen (siehe Abb. 65). Am Untersuchungstag 28 konnten Kolonien von *Escherichia coli* (EHEC) nur noch mittels Anreicherung im Produkt nachgewiesen werden. Zwischen den Chargen mit oder ohne Nitrit konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Der durch den Zusatz von 3,4 % Kochsalz erniedrigte Anfangswasseraktivitätswert von unter 0,96 bewirkte in einer langgereifte Rohwurst, dass die eingepfimte Keimzahl sehr schnell abnahm. Im Vergleich zu einer Rohwurst die ohne Nitrit mit 2,8 % Kochsalz produziert wurde, konnte eine völlige Abwesenheit der pathogenen Keime 4 Wochen früher erreicht werden (vgl. Abb. 64 und 65).

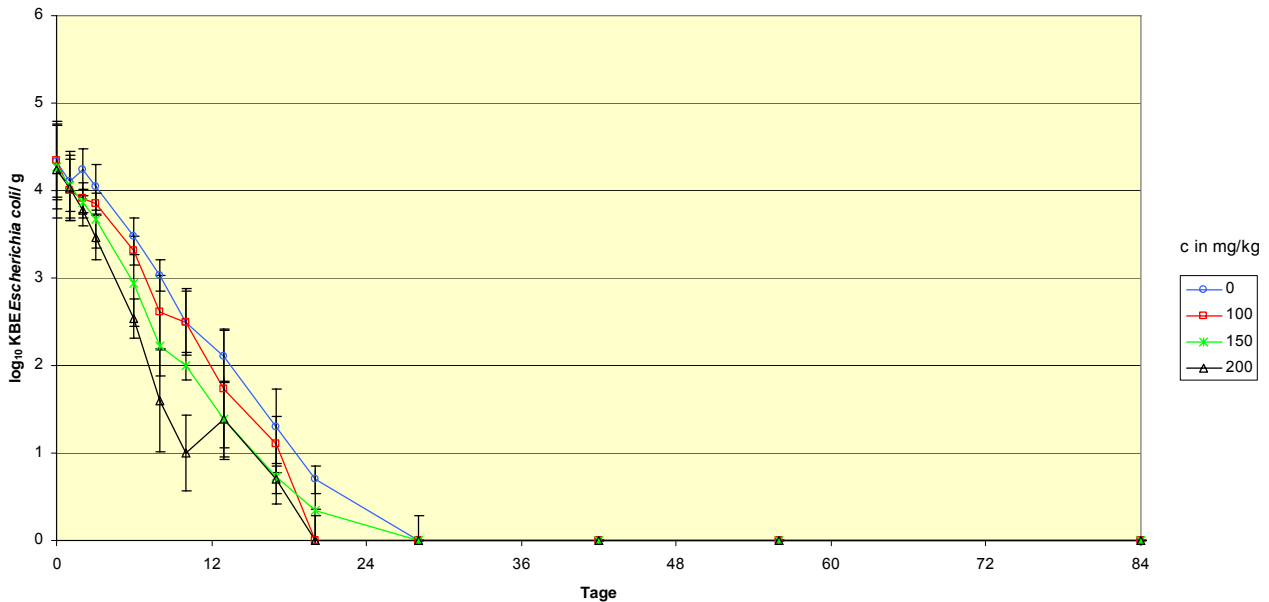


Abb.65: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer langgereiften Salami mit 3,4 % NaCl

3.2.3.3 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. wurde in einer Keimmenge von 3,5 log₁₀ KbE pro g (3,2 x 10³ KbE/g) dem Brät zugegeben. Der pH-Wert der Rohwurst nahm in Folge der Vermehrung der Starterkultur schnell ab, so dass nach 48 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,3 - 5,4 gemessen werden konnten.

Kochsalzkonzentration: 2,82 %

Natriumnitrit hatte einen deutlichen Einfluss auf das Verhalten der Salmonellen, so konnte in der Charge ohne Nitrit eine deutliche Zunahme der Zellzahl innerhalb der ersten 72 Stunden beobachtet werden. In den Ansätzen wurden Zellzahlen von 4,8-4,9 log₁₀ KbE/g (6,31 x 10⁴ – 7,94 x 10⁴ KbE/g) erreicht (siehe Abb. 66). Auf diesem Niveau blieb die Keimzahl bis zum 10. Untersuchungstag um anschließend infolge der zunehmenden Abtrocknung kontinuierlich zu sinken (siehe Abb. 66).

Nach 56 Tagen wurden in den Ansätzen ohne Natriumnitrit keine Salmonellen mehr nachgewiesen. In den Chargen mit Nitrit konnte über den gesamten Versuchszeitraum keine Vermehrung festgestellt werden. In den ersten 72 Stunden nahm die Zelldichte um eine Zehnerpotenz ab, nach 10 Tagen konnten die Keime nur noch nach Anreicherung und nach 20 Tagen nicht mehr in den Ansätzen mit Nitrit nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den eingesetzten Natriumnitritkonzentrationen (100, 150 und 200 mg/kg) war nicht zu beobachten (siehe Abb. 66).

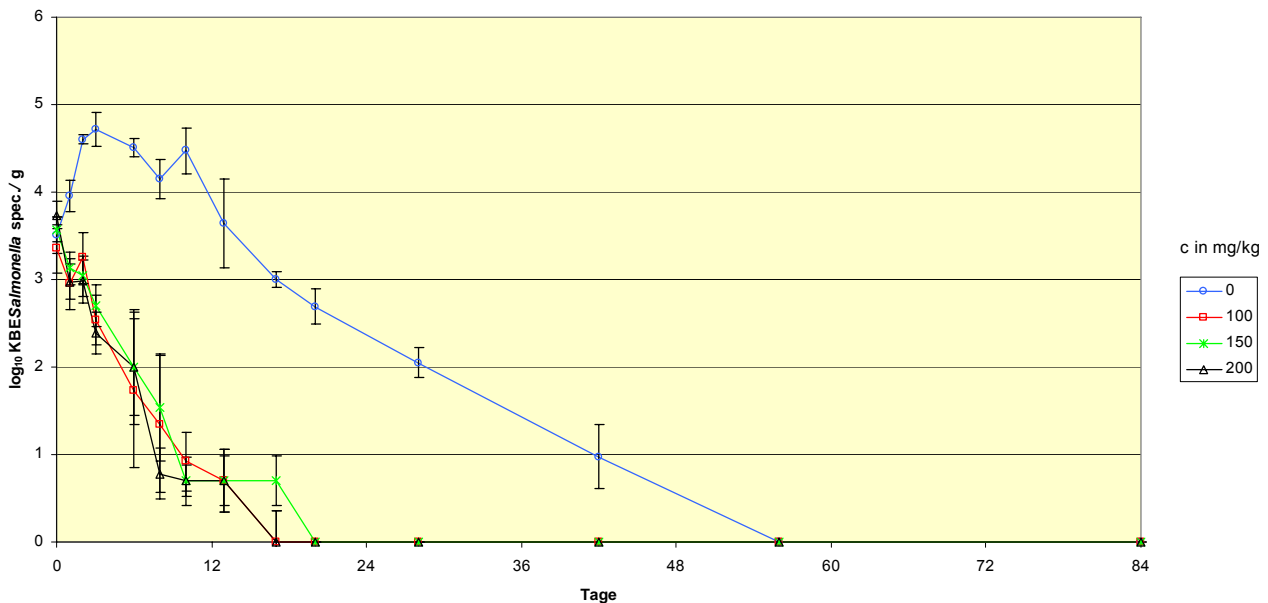


Abb.66: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer langgereiften Salami mit 2,82 % NaCl

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

In den Ansätzen ohne Natriumnitrit konnte, wie auch schon zuvor für eine Kochsalzkonzentration von 2,82 %, eine starke Vermehrung der Keime von *Salmonella* spp. beobachtet werden (siehe Abb. 67). Jedoch fiel diese mit 4,2-4,3 log₁₀ KbE/g Brät etwas geringer aus. Grund dafür könnte der erniedrigte Wasseraktivitätswert sein. Diese Beobachtung konnte schon bei Versuchen mit *Listeria monocytogenes* gezeigt werden. Bis zum 8-ten Reifetag sank die Keimdichte nur minimal.

Mit beginnender Trocknung des Produktes und dem weiterhin niedrigen pH-Wert begann die Keimzahl nach dem achten Untersuchungstag deutlich zu sinken. Im Vergleich zu einer Kochsalzkonzentration von 2,82 % konnten bereits 14 Tage früher, also am Versuchstag 42 keine Bakterien der Gattung *Salmonella* mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 67). Eine erniedrigte Ausgangswasseraktivität trug also zu einer schnelleren Abtötung in einem Produkt ohne Nitrit bei, auch wenn sie ein anfängliches Wachstum der Bakterien nicht unterdrücken konnte.

In den Chargen mit Nitrit konnte über den gesamten Versuchszeitraum, analog wie beim Ansatz mit 2,82 % Kochsalz, keine Vermehrung festgestellt werden. In den ersten 72 Stunden nahm die Zelldichte um eine Zehnerpotenz ab, nach 8 Tagen konnten die Keime nur noch nach Anreicherung und nach 20 Tagen nicht mehr in den Ansätzen mit Nitrit nachgewiesen werden (siehe Abb. 67). Im Vergleich zu der Charge in der 2,82 % Kochsalz eingesetzt wurde, konnte keine schnellere Abtötung der Salmonellen erreicht werden (vgl. Abb. 66 und 67). Zwischen den eingesetzten Nitritkonzentrationen gab es keine charakteristischen Unterschiede.

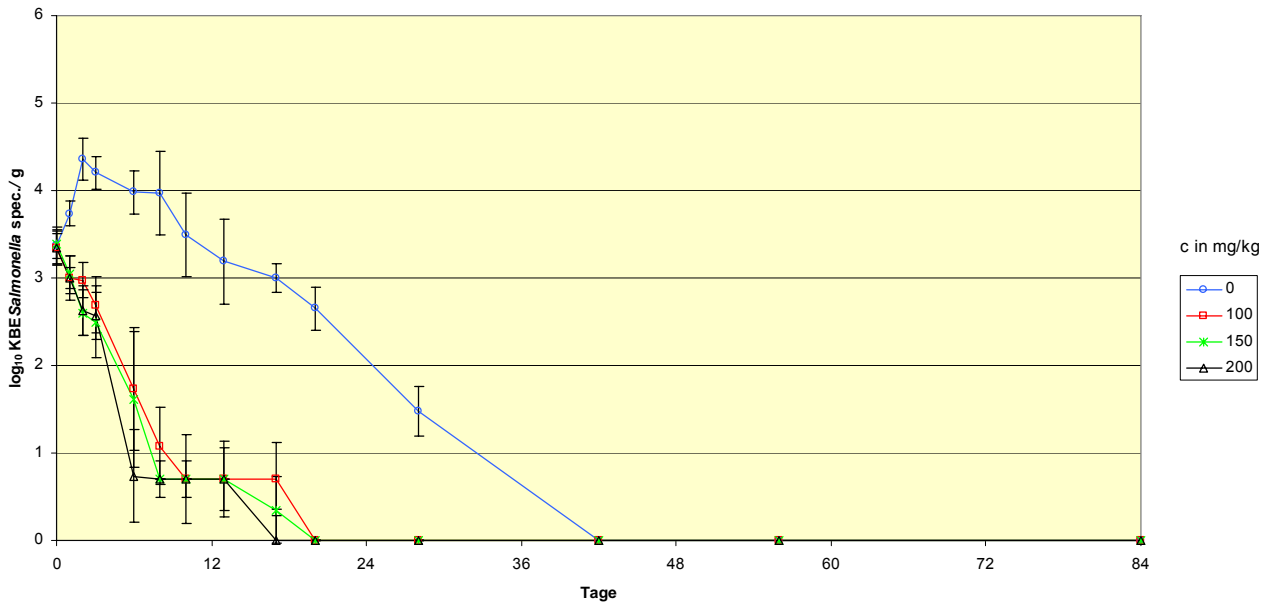


Abb.67: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer langgereiften Salami mit 3,4 % NaCl

Ohne den Zusatz von Natriumnitrit kann in einer langgereiften Rohwurst eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* und von *Salmonella* spp. in den kritischen ersten Reifungstagen nicht verhindert werden. Erst mit der einsetzenden Erniedrigung des a_w -Wertes (Abtrocknung) und des pH-Wertes als Folge des Wachstums der Starterkulturen kam das Wachstum der beiden pathogenen Vertreter zum Stillstand. Mit zunehmender Abtrocknung sank auch der Keimgehalt im Produkt, so dass die Salmonellen und enterohämorrhagische *Escherichia coli* effektiv im Zeitraum der Herstellung abgetötet werden konnten. *Listeria monocytogenes* konnte in keiner der Versuche abgetötet werden.

Verlauf des a_w -Wertes

Der a_w -Wert betrug am Tag 0 beim Zusatz einer Kochsalzkonzentration von 2,82 % 0,965 (siehe Abb. 68).

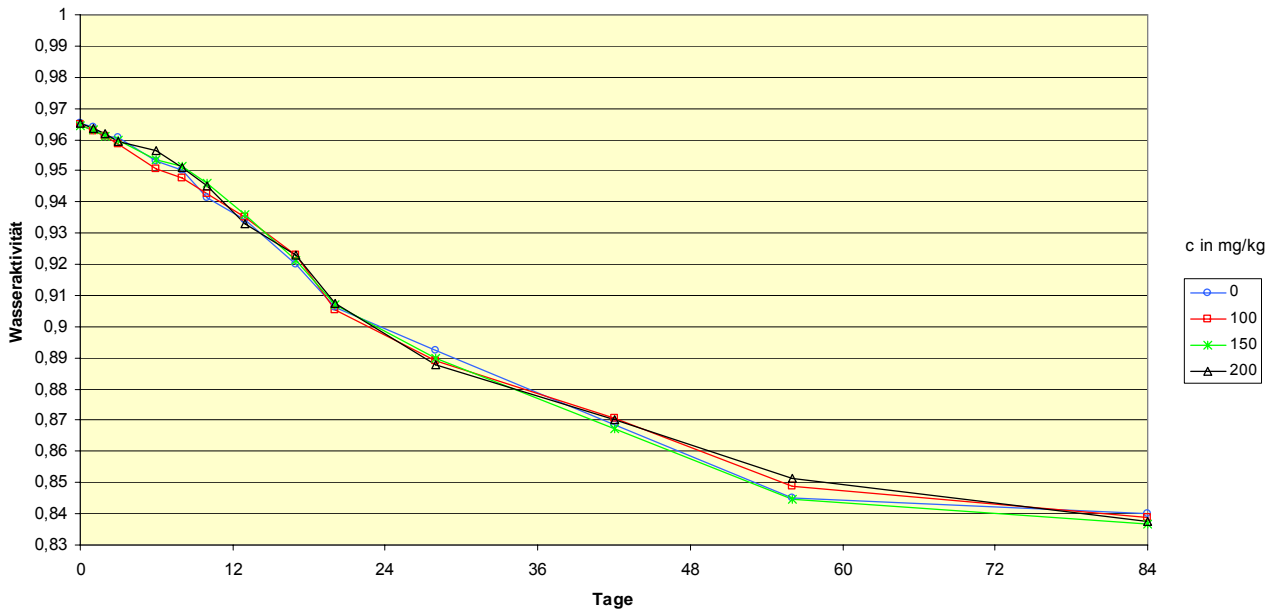


Abb. 68: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 84-tägigen Inkubation einer langgereiften Rohwurst mit **2,82 % NaCl** und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Beimpft mit *Escherichia coli*)

Wurde die Kochsalzkonzentration im Ausgangsbrät auf 3,4 % erhöht, so konnte ein Anfangswasseraktivitätswert von 0,958 gemessen werden (siehe Abb.69). Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen vergleichbar, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne Nitrit festgestellt werden.

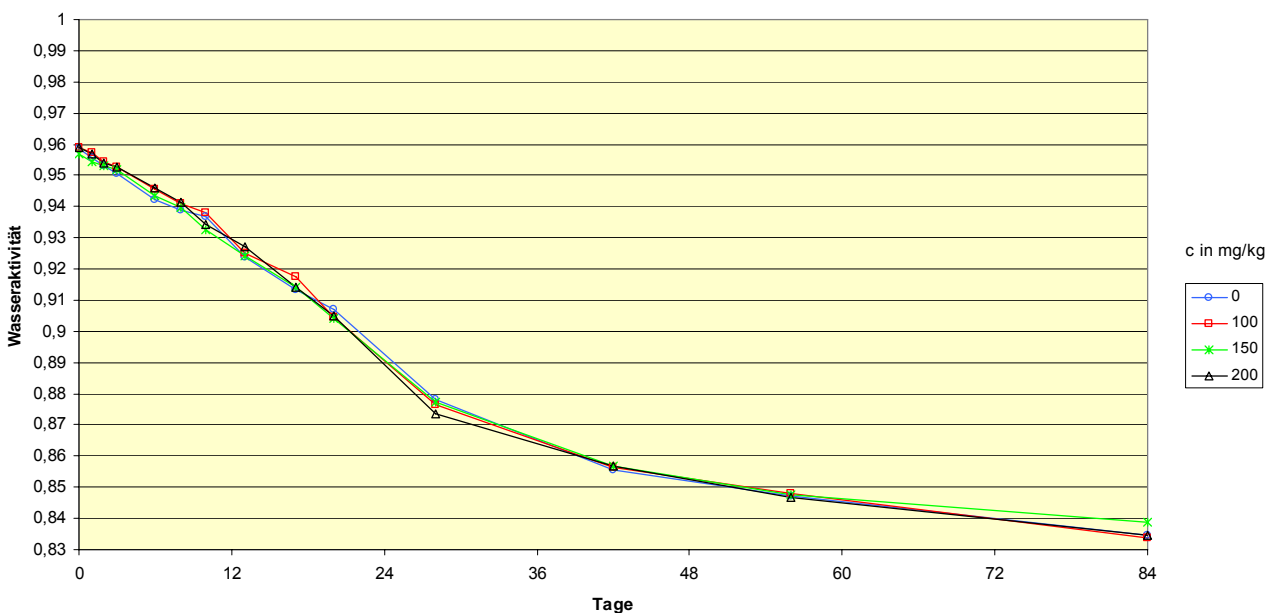


Abb. 69: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 84-tägigen Inkubation einer langgereiften Rohwurst mit **3,4 % NaCl** und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Beimpft mit *Escherichia coli*)

Die Veränderung des a_w -Wertes (a_w) von Tag 0 bis 84 betrug maximal 0,13 Einheiten. Wie der Vergleich zur unbeimpften Charge zeigte, blieb der a_w -Wert am Anfang und im Verlauf der Reifung durch den eingeimpften Keimpool unbeeinflusst. Dies bestätigte sich bei allen Versuchsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 69 dargestellt.

Verlauf des pH-Wertes und der Milchsäurebakterienzahl

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,8 und 5,9 und fiel bei allen Chargen auf Werte um 5,1 bis 5,3 (Abb. 70) ab.

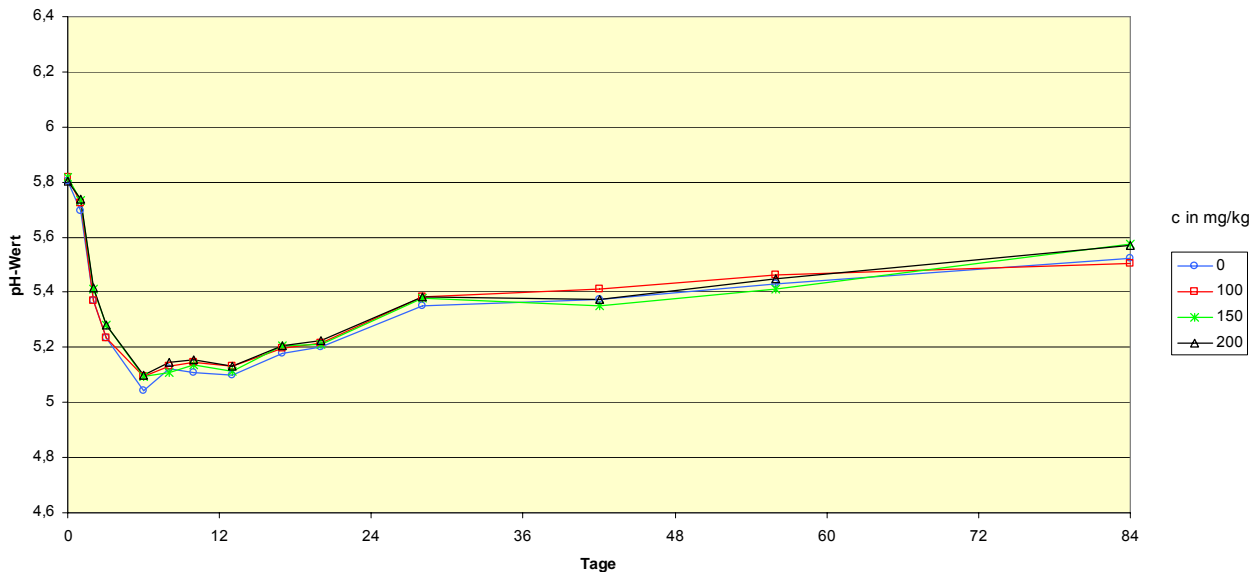


Abb. 70: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf den pH-Wertverlauf in einer langgereiften Salami mit 3,4 % NaCl (Beimpft mit *Salmonella spp.*).

Wie die Abbildung 71 zeigt, konnte gleichzeitig eine Vermehrung der nachweisbaren Milchsäurebakterien beobachtet werden. Nach 24 bis 48 Stunden betrug der Anstieg etwa zwei Zehnerpotenzen. Innerhalb dieses Zeitraumes war auch die pH-Wertabnahme am größten. Bei den Chargen mit höherer Kochsalzmenge (3,4 %) waren die pH-Wertabsenkung sowie die Zunahme der Milchsäurebakterienzahl leicht verzögert.

Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien nicht unter $8,0 \log_{10}$ KbE/g. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg auch der pH-Wert in der Rohwurst durch den mikrobiellen und/oder biochemischen Säure- oder Fleischiweißabbau auf pH-Werte von 5,5.

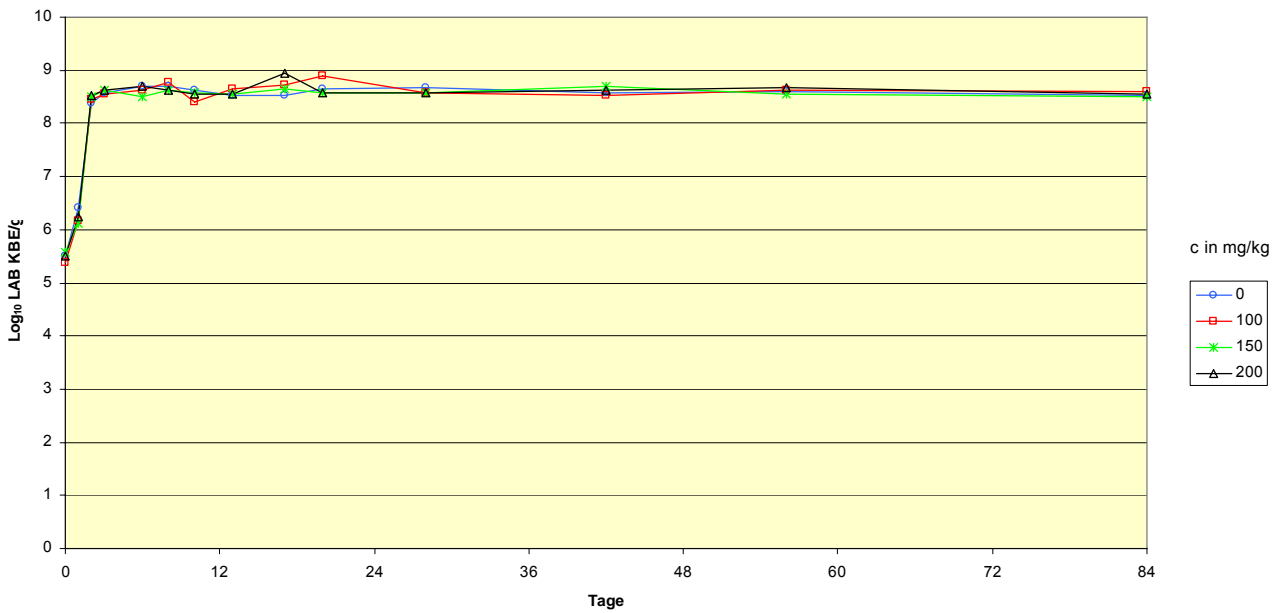


Abb. 71: Verlauf der Milchsäurebakterienzahl (LAB) KBE/g in einer langgereiften Rohwurst hergestellt mit 3,4 % NaCl und beimpft mit *Salmonella spp.*

Wie der Vergleich der beimpften zur unbeimpften Charge zeigte, wurde der Verlauf des pH-Wertes durch den eingepflichten Bakterienpool nicht beeinflusst. Dies bestätigte sich auch in allen weiteren Untersuchungsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 70 dargestellt.

Verlauf der Zahl der aeroben mesophilen Keime

Die Keimzahl auf Standard I-Agar war bei allen Versuchschargen nach 24 Stunden mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl auf dem MRS-Agar vergleichbar. Die Absolutwerte waren auf Grund miterfasster *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen etwas höher. In Abbildung 72 ist dies beispielhaft dargestellt.

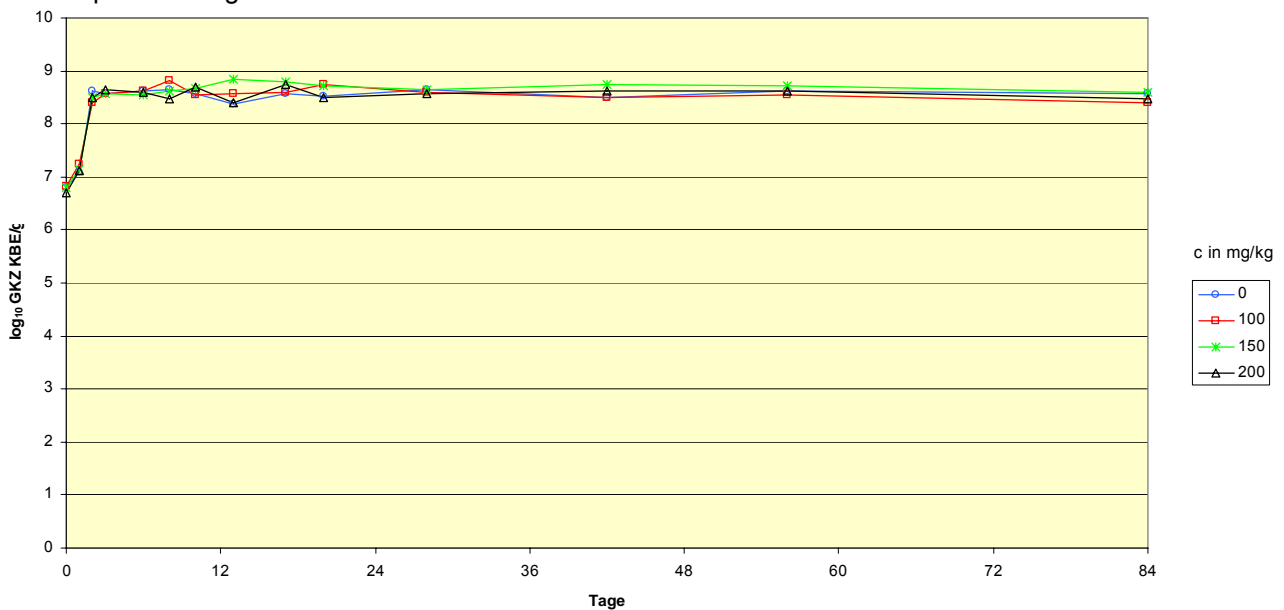


Abb. 72: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) KBE/g in einer langgereiften Rohwurst hergestellt mit 3,4 % NaCl und beimpft mit *Salmonella spec*

3.2.4 Schimmelpilzgereifte Rohwurst

Zur Herstellung von bestimmten Rohwurstsorten (Salami ungarischer und italienischer Art) wird die Wurst direkt nach dem Füllen in ein Tauchbad mit Sporen eines nicht toxinogenen *Penicillium* Stammes getaucht. Bei der Reifung entwickelt sich auf der Wurstoberfläche ein weißes Schimmelpilzmycel. Die chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Vorgänge bei der Reifung sind denen bei der Fleischpökellung sehr ähnlich (Umrötung, Säuerung und Aromabildung). Die Vorteile einer schimmelpilzgereiften Rohwurst sind vielfältig, so werden Geruch, Geschmack sowie die Konservierung des Produktes positiv beeinflusst. Durch das schnelle Wachstum des Edelschimmels wird das Wachstum von unerwünschten Bakterien und Schimmelpilzen auf der Oberfläche gemindert und der Schimmelbelag schützt vor einer ungünstigen Licht- und Sauerstoffeinwirkung, so dass ein Ranzigwerden verzögert wird. Jedoch besteht durch das schnelle Wachstum des Schimmelbelages und mit dem damit verbundenen Anstieg des pH-Wertes vor allem im Randbereich die Gefahr einer verminderten Abtötung der pathogenen Keime.

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei verschiedene Salzkonzentrationen getestet. Zum einen eine Salzkonzentration von 2,82 % und zum anderen eine von 3,4 %. Ziel war es, den Einfluss der Anfangswasseraktivität auf das Verhalten von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (EHEC) und *Salmonella* spp. zu untersuchen. Des Weiteren sollte bei allen Chargen der Einfluss des Zusatzstoffes Natriumnitrit auf die verwendeten Keime und der Einfluss des wieder ansteigenden pH-Wertes, in Folge des Oberflächenbewuchses, untersucht werden.

3.2.4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes wurde dem Brät in einer Keimdichte von $3,8 - 3,9 \log_{10}$ KbE pro g ($6,3 - 7,9 \times 10^3$ KbE/g) zugegeben. Zunächst nahm der pH-Wert in der Rohwurst durch die Vermehrung der Starterkulturen auf Werte um 5,2 ab. Mit dem Beginn des Wachstums der Edelschimmelpilzkulturen auf der Wurstoberfläche nahm der pH-Wert ab dem zehnten Reifetag wieder zu und erreichte zum Ende des Untersuchungszeitraumes Werte von 6,3 (siehe Abb.73).

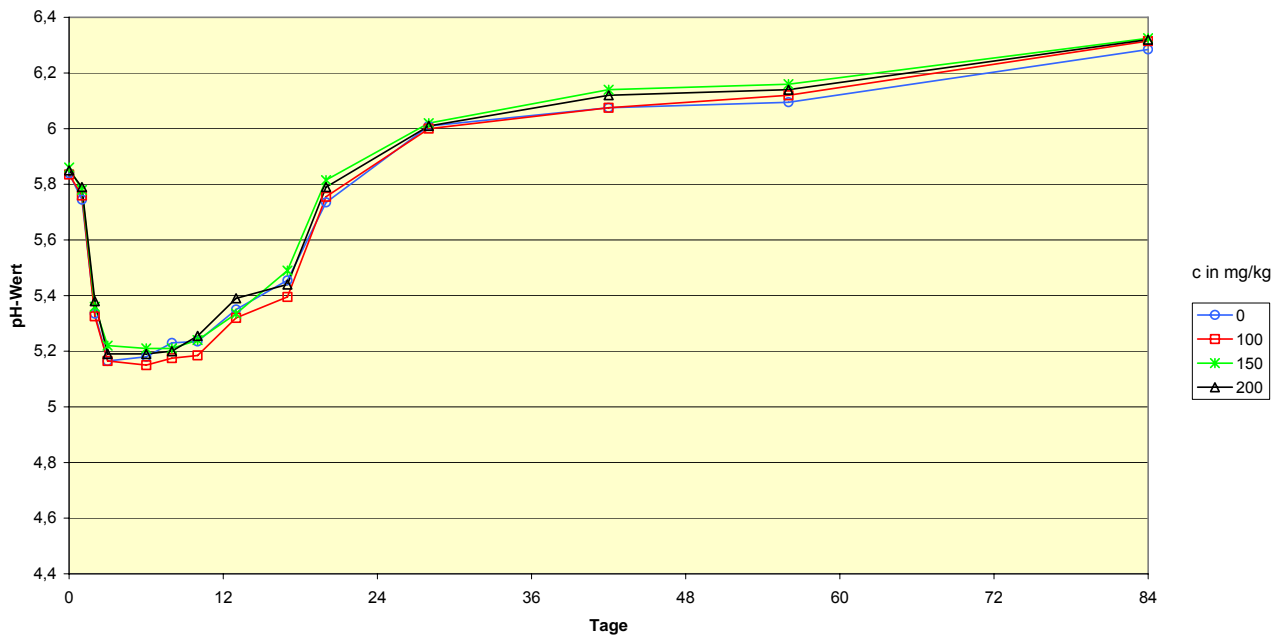


Abb.73: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0,100, 150 und 200 mg/k) auf den pH-Wertverlauf in einer **schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 2,8 % NaCl** (Beimpft mit *Listeria monocytogenes*)

Kochsalzkonzentration: 2,8 %

In den Chargen ohne Natriumnitrit konnte in den ersten 48 Stunden eine rasche Zunahme der Keimdichte auf $4,5 \log_{10}$ KbE/g ($3,2 \times 10^4$ KbE/g) beobachtet werden. Mit zunehmendem Reifeverlauf sank die Keimzahl bis zum 42. Tag leicht auf $4 \log_{10}$ KbE/g (1×10^4 KbE/g) und blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf diesem Niveau (siehe Abb. 74). Eine weitere Reduktion der Keimdichte wurde nicht beobachtet.

Im Vergleich dazu konnte in den Ansätzen mit Nitrit keine Vermehrung der zugesetzten Organismen beobachtet werden. Die Konzentration von *Listeria monocytogenes* nahm bis zum Untersuchungstag 42 leicht ab. Die Reduktion entsprach der Größenordnung von einer Zehnerpotenz. Anschließend blieb die Keimdichte bis zum Tag 84 auf diesem Niveau. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen zugesetzten Nitritmengen konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 74).

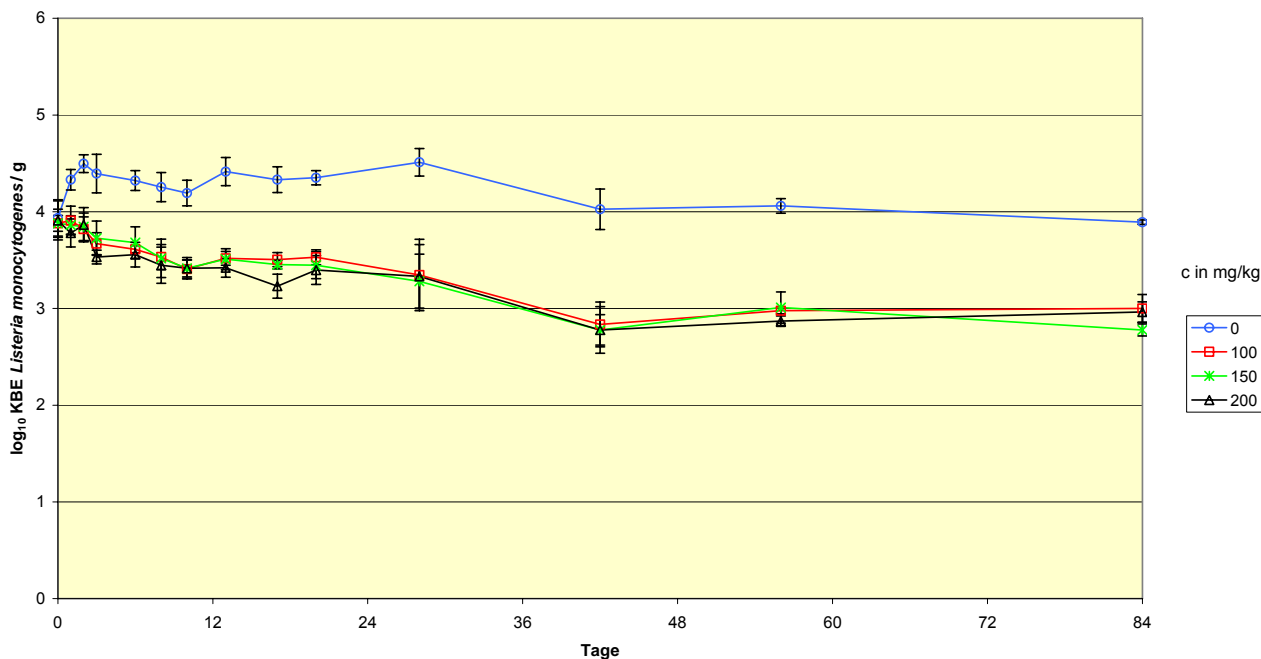


Abb.74: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 2,8 % NaCl

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

Ein Wachstum von *Listeria monocytogenes* trat nur in den Chargen ohne Natriumnitrit auf. Im Mittel wurden in diesen Produkten Keimdichten von $4,7 \log_{10}$ KbE/g (5×10^4 KbE/g) nach 48 Stunden nachgewiesen (siehe Abb. 75). Anschließend sank die Keimdichte leicht und erreichte am sechsten Untersuchungstag eine Keimhöhe von $4,3 - 4,5 \log_{10}$ KbE/g ($2 - 3,2 \times 10^4$ KbE/g). Auf diesem Niveau blieb die Keimzahl bis zum Tag 56. Erst am Ende des Untersuchungszeitraumes sank die Bakterienzellzahl auf $4,0 \log_{10}$ KbE/g (1×10^4 KbE/g) Produkt.

Eine vollständige Eliminierung der Stämme von *Listeria monocytogenes* in der Charge die ohne Nitrit hergestellt wurde, war nicht möglich (siehe Abb. 75). Im Vergleich zu einer langgereiften Rohwurst war auch hier die nachweisbare Keimzahl im Produkt zum Zeitpunkt der Abgabe an den Verbraucher deutlich höher, als dies im rechtlichen Rahmen (100 KbE/g) erlaubt ist (VO (EG) 2073/2005).

In der Charge, die mit Natriumnitrit hergestellt wurden, konnte keine Vermehrung der zugesetzten Listerien beobachtet werden (siehe Abb. 75). Stattdessen sank die Keimzahl bis zum Tag 28 um eine Zehnerpotenz, ohne dass zwischen den unterschiedlichen Nitritkonzentrationen signifikante

Unterschiede hinsichtlich einer effektiveren Wachstumshemmung festgestellt werden konnten (siehe Abb. 75).

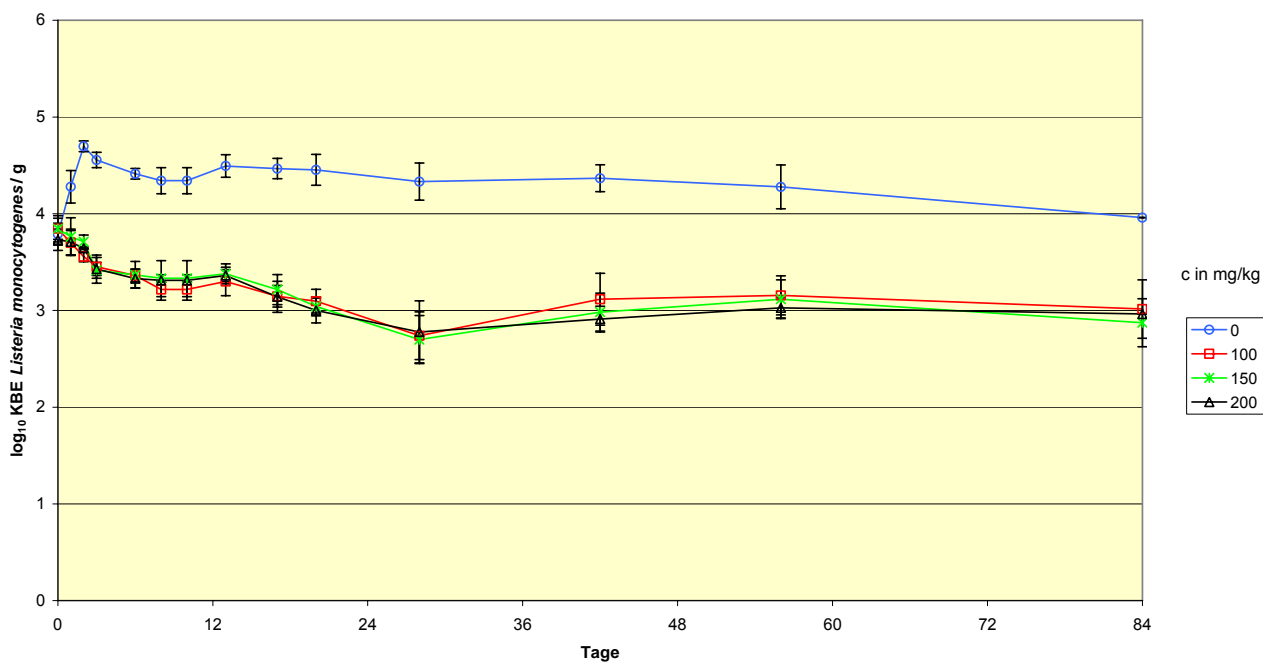


Abb.75: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Listeria monocytogenes* in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 3,4 % NaCl

Anschließend stieg die Konzentration der pathogenen Bakterien erneut ganz leicht an und erreichte im Mittel eine Keimdichte von $3 \log_{10}$ KbE/g (1×10^3 KbE/g) im Brät (siehe Abb. 75). Bis zum Ende des Versuchszeitraumes konnte in den Nitritchargen keine weitere Zu- oder Abnahme der Keimzahl im Produkt festgestellt werden. Die Keimdichte betrug am Tag 84 1000 KbE/g und war somit um eine Zehnerpotenz höher als gesetzlich erlaubt.

3.2.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde in einer Keimmenge von $3,7 - 4,2 \log_{10}$ KbE pro g ($5,0 - 16 \times 10^3$ KbE/g) dem Brät zugegeben. Der pH-Wert der Rohwurst nahm in Folge der Vermehrung der Starterkultur ab. Nach 72 Stunden konnten bei allen Chargen pH-Werte von 5,2 gemessen werden. Mit weiter voranschreitender Reifung stieg der pH-Wert in Folge des Oberflächenbewuchses mit *Penicillium nalgiovense* ab dem achten Tag wieder an und erreichte am Tag 84 pH-Werte um 6,2.

Kochsalzkonzentration: 2,8 %

Ein Wachstum der ins Brät eingepfunden enterohämorrhagischen *Escherichia coli* konnte weder in den Chargen mit oder ohne Natriumnitrit festgestellt werden (siehe Abb. 76). Die Keimdichte sank in den ersten 6 Tagen bei allen Ansätzen um eine Zehnerpotenz auf $3,1 - 3,3 \log_{10}$ KbE/g ($1,3 - 2,0 \times 10^3$ KbE/g). Mit weiter fallendem a_w -Wert nahm die Keimzahl im Produkt deutlich ab, so dass nach 28 Tagen eine Keimdichte von $1,6 - 2,0 \log_{10}$ KbE/g und nach 42 Tagen auch nach Anreicherung

keine *Escherichia coli* Kolonien im Produkt mehr nachgewiesen werden konnten. Ein Unterschied zwischen den Chargen mit oder ohne Nitrit konnte nicht beobachtet werden. Auch zwischen den eingesetzten Nitritkonzentrationen gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich einer effektiveren Keimhemmung (siehe Abb. 76).

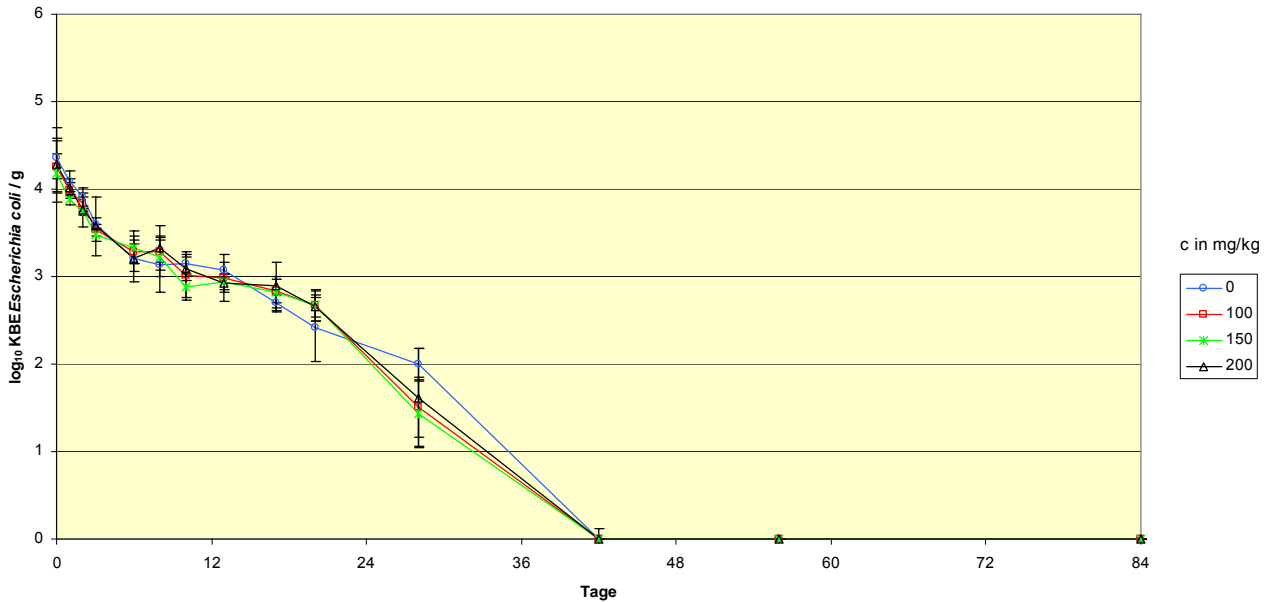


Abb.76: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer **schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 2,82 % NaCl**

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

Wie bei den Chargen mit 2,82 % Kochsalz konnte auch bei diesem Versuch keine Vermehrung von *Escherichia coli* in den unterschiedlichen Ansätzen festgestellt werden (siehe Abb. 77). Die Keimdichte nahm wie im zuvor beschriebenen Versuch in den ersten 6 Tagen um eine Zehnerpotenz auf 2,7 - 2,9 log₁₀ KbE/g (5,0 – 7,9 x 10² KbE/g) ab.

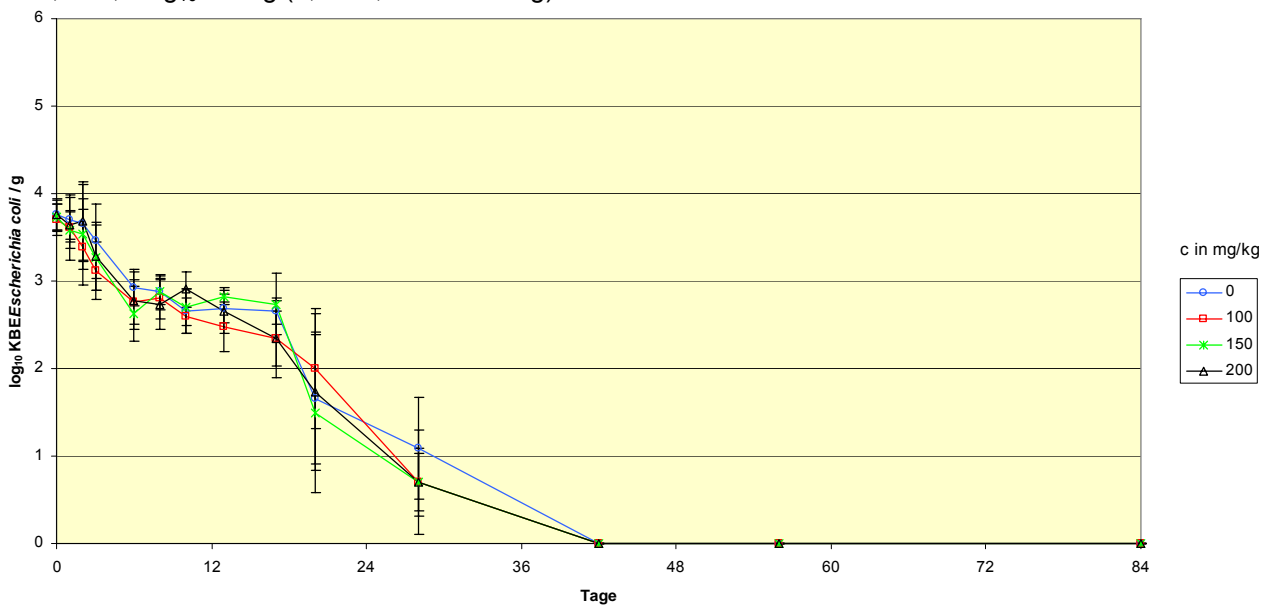


Abb.77: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Escherichia coli* in einer **schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 3,4 % NaCl**

Bereits nach dem Tage 28 wurden in den Ansätzen mit Nitrit Keimzahlen im Median von unter 10 KbE/g und in den Chargen ohne den Zusatzstoff Natriumnitrit Keimdichten von 1,0 - 1,2 \log_{10} KbE/g (10 – 16 KbE/g) erreicht. Jedoch waren die Unterschiede, sowohl zwischen den einzelnen Nitritkonzentration als auch zwischen den Chargen mit oder ohne Nitrit, nicht signifikant (siehe Abb. 77).

Die Keime nahmen in den beiden Versuchsansätzen gleichmäßig ab und konnten ab dem Tag 42 nicht mehr im Produkt nachgewiesen werden (vgl. Abb. 76 und Abb. 77). Ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Nitritkonzentrationen wurde nicht beobachtet.

Wie schon bei den kurzgereiften und langgereiften Rohwurstprodukten wurde keine Vermehrung von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* weder in den Ansätzen mit noch ohne Nitrit beobachtet (vgl. 3.2.1.2 und 3.2.3.2).

3.2.4.3 *Salmonella* spp.

Das Brät wurde vor dem Füllen mit einer Keimmenge von 3,5 \log_{10} KbE/g ($3,2 \times 10^3$ KbE/g) beimpft (siehe Abb. 78). Der pH-Wert der Rohwurst nahm in Folge der Vermehrung der Starterkultur ab, so dass nach 72 Stunden bei allen Chargen pH-Werte von 5,2 - 5,3 gemessen werden konnten. In Folge des Wachstums der Edelschimmelpilzkulturen begann der pH-Wert zwischen dem achten und zehnten Untersuchungstag wieder zu steigen.

Kochsalzkonzentration: 2,82 %

In den Chargen ohne Natriumnitrit konnte in den ersten 72 Stunden eine deutliche Vermehrung der Salmonellen im Brät auf 4,4 \log_{10} KbE/g ($2,5 \times 10^4$ KbE/g) beobachtet werden (siehe Abb. 78). Dieses Ergebnis wurde schon bei einer langgereiften Rohwurst ohne Edelschimmel festgestellt (vgl. 3.2.3.3).

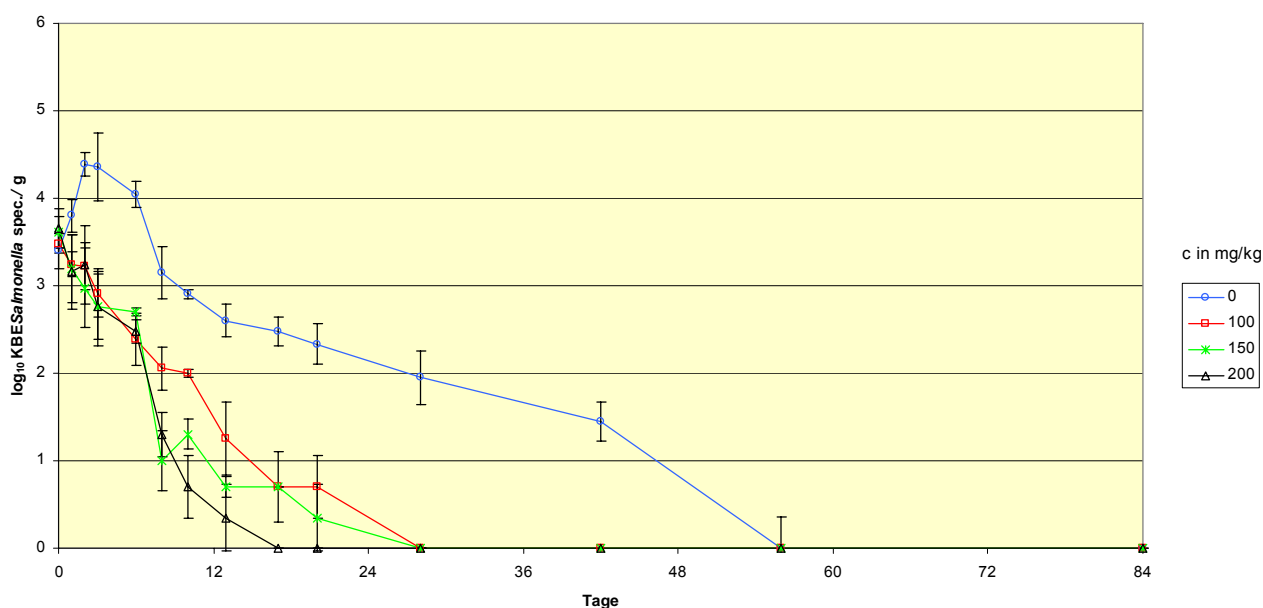


Abb.78: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 2,82 % NaCl

Im weiteren Verlauf der Reifung nahm die Keimdichte in Folge der zunehmenden Abtrocknung und der Anwesenheit der Starterkulturen relativ schnell auf $2 \log_{10}$ KbE (100 KbE/g) nach 28 Tagen ab. Jedoch ließen sich vereinzelt noch Salmonellen bis zum Tag 56 mit Hilfe einer Anreicherung nachweisen, erst ab dem Tag 84 war das ohne Nitrit hergestellte Produkt frei von *Salmonella* spp.. In den Nitritchargen war während des gesamten Versuchszeitraumes keine Vermehrung der pathogenen Mikroorganismen festzustellen (siehe Abb. 78). Die Keimdichte sank innerhalb von 13 Tagen unter Werte von unter 10 KbE/g.

Bis zum Tag 20 war jedoch ein Nachweis der pathogenen Bakterien nach Anreicherung möglich. Ab dem Untersuchungstag 20 konnten keine Salmonellen mehr in den konventionell hergestellten Produkten nachgewiesen werden (siehe Abb. 78). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen in langgereifter Rohwurst (vgl. 3.2.3.3) und zeigen, dass die verschiedenen lebensmittelrelevanten Hürden wie Nitrit, pH-Wertabsenkung und Trocknung wirkungsvoll in einander greifen.

Kochsalzkonzentration: 3,4 %

In Abbildung 79 ist dargestellt, dass ein Anstieg der Keimdichte von *Salmonella* spp. nur in den Chargen ohne Nitrit beobachtet werden konnte. Die Keimzahl stieg innerhalb von sechs Tagen auf Werte von $4,2 \log_{10}$ KbE/g ($2,5 \times 10^4$ KbE/g). In den folgenden Untersuchungstagen konnte eine deutliche Abnahme der Zellzahl im Produkt festgestellt werden. Bereits am Tag 28 sank die Keimdichte auf Werte von $1,2 - 1,7 \log_{10}$ KbE/g (16 – 50 KbE/g) und am Tag 42 war auch nach Anreicherung kein Nachweis von *Salmonella* spp. mehr möglich (siehe Abb. 79). Im Gegensatz zu einem Rohwurstprodukt, welches mit 2,8 % Kochsalz hergestellt wurde, konnte eine Abwesenheit der pathogenen Mikroorganismen bereits am Untersuchungstag 42 in den Rohwürsten ohne Nitrit erzielt werden. In den Nitritchargen wurde im gesamten Zeitraum der Untersuchung keine Vermehrung von *Salmonella* spp. nachgewiesen (siehe Abb. 79).

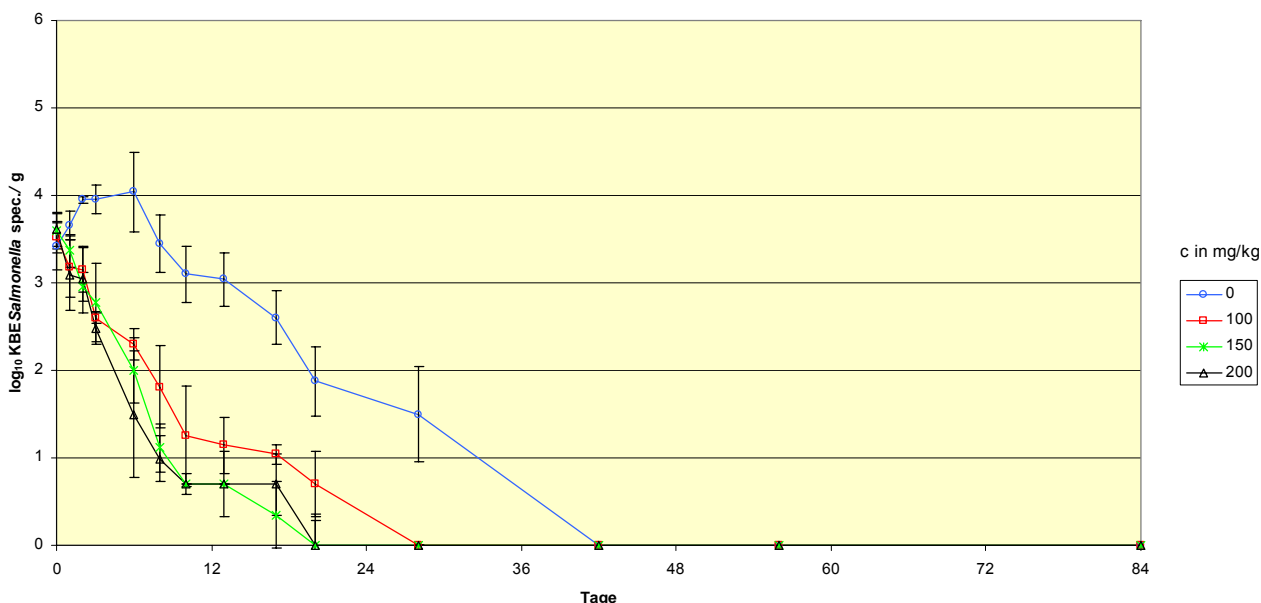


Abb.79: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KbE/g von *Salmonella* spp. in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst mit 3,4 % NaCl

Die Keimdichte sank bereits in den ersten 6 Tagen um zwei Zehnerpotenzen. Ab dem achten Tag wurden Keimdichten von unter 10 KbE/g im Brät erreicht, so dass bis zum 17. Tag ein Nachweis der Organismen nur nach einer Anreicherung gelang. Im Vergleich zu einer Kochsalzkonzentration von 2,82 % erreichte die Keimdichte im Schnitt zwei Tage früher die Nachweisgrenze von unter 10 KbE/g (siehe Abb. 78 und Abb. 79).

In keinem der Versuche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Nitritkonzentrationen nachgewiesen werden (siehe Abb. 78 und Abb. 79). Im Vergleich zu einer langgereiften Rohwurst konnten hinsichtlich des Verhaltens der pathogenen Keime keine großen Unterschiede festgestellt werden.

Der Anstieg des pH-Wertes ab dem zehnten Reifetag machte sich somit nicht negativ bemerkbar. Auch konnten an den Rändern der Rohwurst keine signifikant erhöhten Keimzahlen nachgewiesen werden. Die Gefahr, die von einem steigendem pH-Wert ausgeht, wurde durch die kontinuierliche Abtrocknung des Produktes kompensiert. Ein Wachstum der pathogenen Erreger war in den Nitritchargen nicht möglich.

Verlauf des a_w -Wertes

Der a_w -Wert betrug beim Zusatz einer Kochsalzkonzentration von 2,82 % 0,964 (siehe Abb. 80).

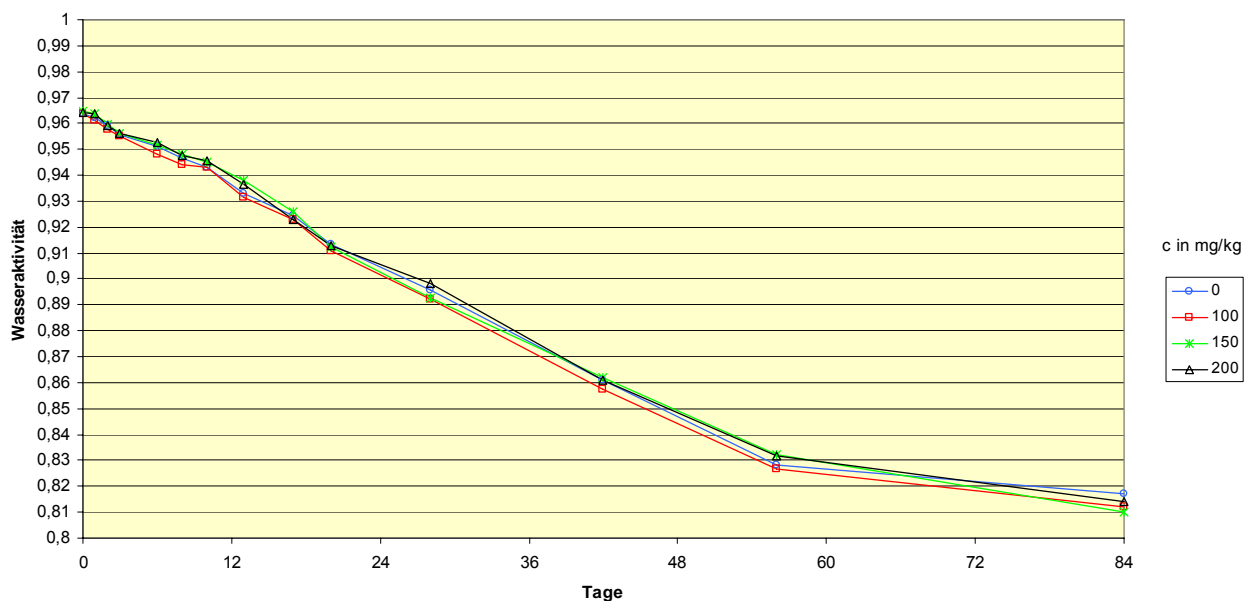


Abb. 80: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 84-tägigen Inkubation einer langgereiften Rohwurst mit 2,82 % NaCl und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Beimpft mit *Salmonella* spp.)

Wurde die Kochsalzkonzentration im Ausgangsbrät auf 3,4 % erhöht so konnte ein Anfangswasseraktivitätswert von 0,958 gemessen werden (siehe Abb.81)

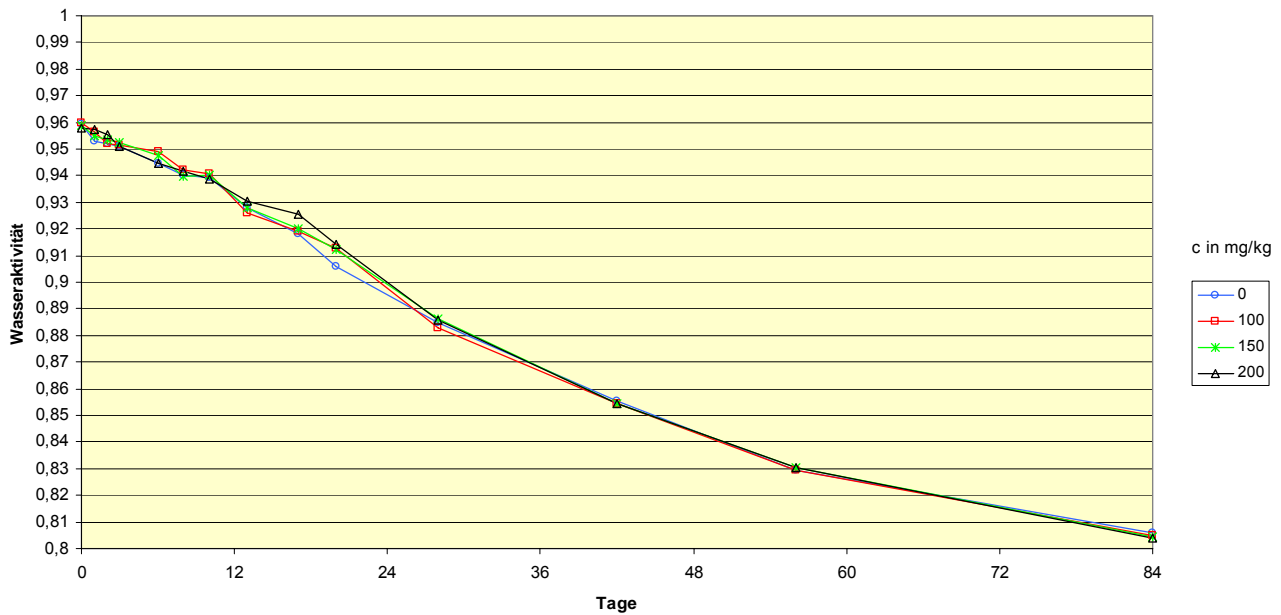


Abb. 81: Verlauf des Wasseraktivitätswertes während einer 84-tägigen Inkubation einer langgereiften Rohwurst mit 3,4 % NaCl und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Beimpft mit *Salmonella spp.*)

Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen vergleichbar, es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ansätzen mit oder ohne Nitrit festgestellt werden. Die Veränderung des a_w -Wertes von Tag 0 bis 84 betrug maximal 0,18 Einheiten. Wie der Vergleich zur unbeimpften Charge zeigte, blieb der a_w -Wert am Anfang und im Verlauf der Reifung durch den eingepfachten Keimpool unbeeinflusst. Dies bestätigte sich bei allen Versuchsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 81 dargestellt. Nach einer 84-tägigen Trocknung betrug der a_w -Wert im Mittel 0,8 – 0,78.

Verlauf des pH-Wertes und der Milchsäurebakterienzahl

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,8 und 5,9 und fiel bei allen Chargen innerhalb von 72 Stunden auf Werte um 5,2 bis 5,3 (Abb. 82) ab.

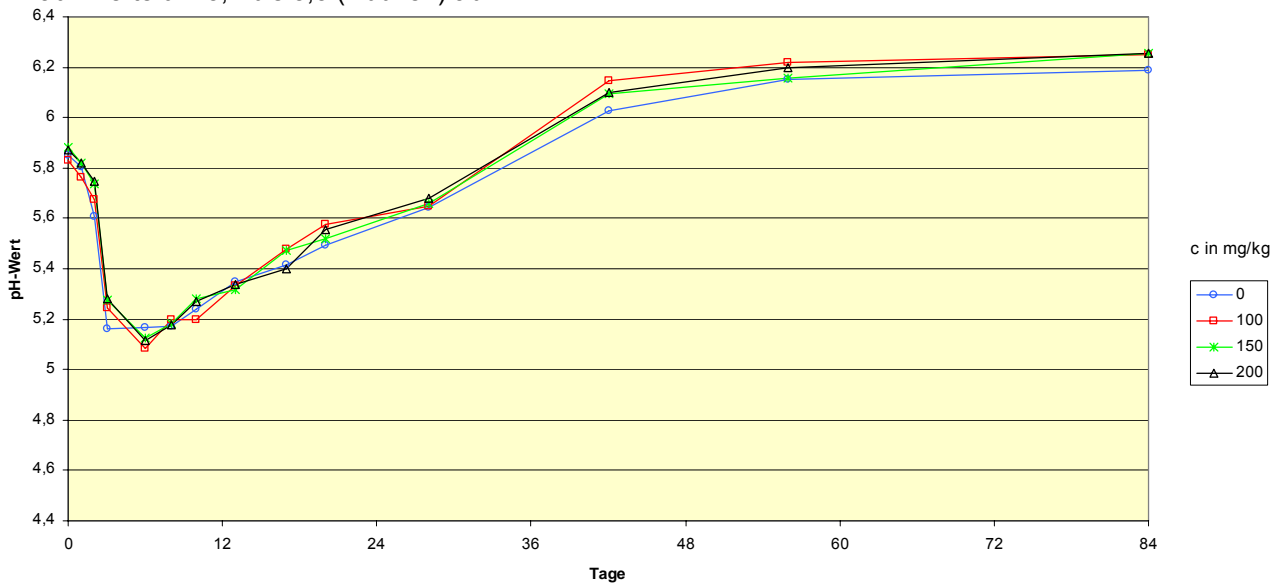


Abb. 82: Verlauf des pH-Wertes während einer 84-tägigen Inkubation einer langgereiften Rohwurst mit 3,4 % NaCl und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). (Beimpft mit *Salmonella* spp.)

Wie die Abbildung 83 zeigt, konnte gleichzeitig eine Vermehrung der Milchsäurebakterien beobachtet werden. Nach 24 bis 48 Stunden betrug der Anstieg etwa zwei Zehnerpotenzen. Innerhalb dieses Zeitraumes war auch die pH-Wertabnahme am größten. Bei den Chargen mit höherer Kochsalzmenge (3,4 %) waren die pH-Wertabsenkung sowie die Zunahme der Milchsäurebakterienzahl leicht verzögert.

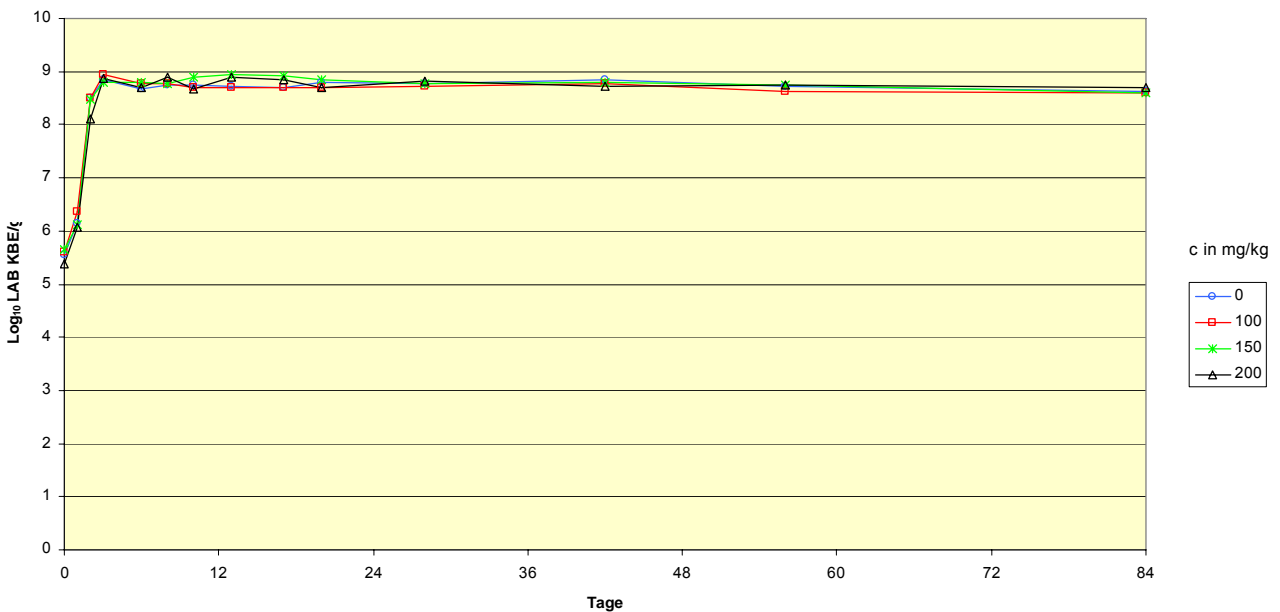


Abb. 83: Verlauf der Milchsäurebakterienzahl (LAB) KBE/g in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst hergestellt mit 3,4 % NaCl und beimpft mit *Salmonella* spp.

Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien nie unter 8,0 log₁₀ KBE/g. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg auf Grund des Wachstums der Edelschimmelkulturen auf der Wursthülle der pH-Wert in der Rohwurst auf 6,2 – 6,3 an. Wie der Vergleich der beimpften zur unbeimpften Charge zeigte, wurde der Verlauf des pH-Wertes durch den eingepflichten Bakterienpool nicht beeinflusst. Dies bestätigte sich auch in allen weiteren Untersuchungsreihen und ist hier beispielhaft in Abbildung 82 dargestellt.

Verlauf der Zahl der aeroben mesophilen Keime

Die Keimzahl auf Standard I-Agar war bei allen Versuchschargen nach 24 Stunden mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl auf dem MRS-Agar vergleichbar. Die Absolutwerte waren auf Grund miterfasster *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen etwas höher. In Abbildung 84 ist dies beispielhaft dargestellt.

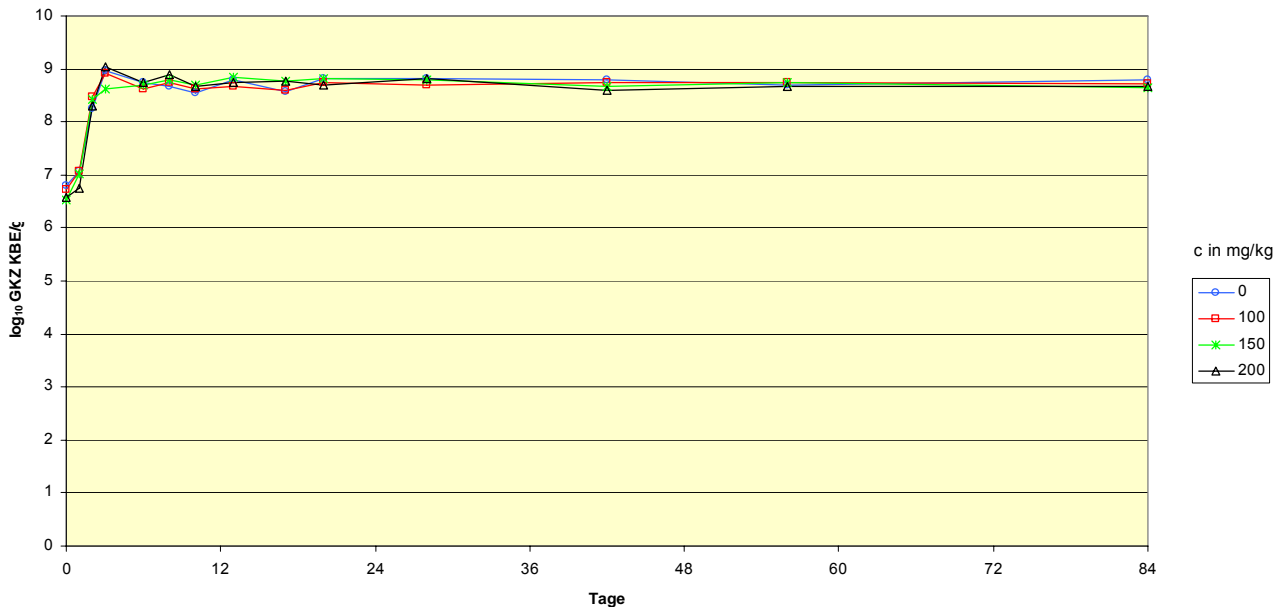


Abb. 84: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) KBE/g in einer schimmelpilzgereiften Rohwurst hergestellt mit 3,4 % NaCl und beimpft mit *Salmonella spec*

4. Diskussion

4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein fakultativ pathogener Erreger der ubiquitär in der Umwelt verbreitet ist (Lianou and Sofos, 2007; Lyautey et al., 2007a; Lyautey et al., 2007b). Das natürliche Habitat des Erregers ist der Boden und verrottendes Pflanzenmaterial. Der Gattung *Listeria* werden neben *L. monocytogenes* nur fünf weitere Spezies zugeordnet. Ein besonderes Merkmal der Listerien ist ihre Fähigkeit, sich auch unter ungünstigen Bedingungen, wie niedrigen Temperaturen (Chattopadhyay, 2008; Francois et al., 2007) bei niedrigem pH-Wert (Skandamis et al., 2008) und hohem Salzgehalt (Duche and Labadie, 2003), zu vermehren (Gandhi and Chikindas, 2007) (siehe Tab. 23).

Tab. 23: Grenzbereiche für das Wachstum von *Listeria monocytogenes*

Parameter	Grenzwerte
Temperatur	
minimale Temperatur	0 – 2,5 °C
maximale Temperatur	43 °C
Wasseraktivität (a_w)	
minimaler a_w -Wert	0,9 -0,89
pH-Wert	
minimaler pH-Wert	4,5
optimaler pH-Wert	6,5 – 7,5
maximaler pH-Wert	9,0

Als humanpathogen wird nur *Listeria monocytogenes* angesehen. Neben einer Übertragung von *L. monocytogenes* durch den direkten Tierkontakt kann sich der Mensch vor allem durch Lebensmittel, insbesondere Rohwurstzeugnisse (Colak et al., 2007; de Cesare et al., 2007), infizieren.

Infektionen mit *Listeria monocytogenes* verlaufen in den meisten Fällen klinisch inapparent, also ohne erkennbare Symptome (Antal et al., 2007). Löst der Erreger jedoch eine Infektionserkrankung bei Mensch und Tier aus, dann weist der Erreger eine der höchsten Erkrankungsraten (10-30 %) und die höchste Mortalitätsrate der Lebensmittelpathogenen auf (Cabellos et al., 2008; Koch and Stark, 2006). Der Erreger wird vor allem mit kontaminierter Nahrung aufgenommen. Eine wichtige Rolle spielen hier vor allem Rohwurst, Milchprodukte und unbehandeltes Obst und Gemüse (Bassett and McClure, 2008; Bizani et al., 2008). *Listeria monocytogenes* verursacht beim Menschen unspezifische und grippeähnliche, eventuell mit Durchfällen verbundene, Symptome.

Daher sind bei der Verarbeitung, Zubereitung und Lagerung von Lebensmitteln, insbesondere ein ausreichendes Erhitzen sowie entsprechende Hygienemaßnahmen notwendig.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird deutlich, dass Natriumnitrit nur unter ganz bestimmten Bedingungen eine antimikrobielle Wirkung besitzt. So konnten für die verschiedenen Natriumnitritkonzentrationen bei einem pH-Wert von 7 keine wachstumshemmenden Wirkungen in den *in vitro* Versuchen beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich mit abnehmendem a_w -Wert eine stimulierende Wirkung des Zusatzstoffes auf das Wachstum von *Listeria monocytogenes*.

Erst mit abnehmenden pH-Wert konnte eine antimikrobielle Wirkung festgestellt werden. Unter diesen Bedingungen katalysieren die Protonen der Säure die Umwandlung des Nitrits zur salpetrigen Säure (Säure-Base-Reaktion) und anschließend weiter zu NO*-Radikalen (Disproportionierung) (siehe Abb.85).

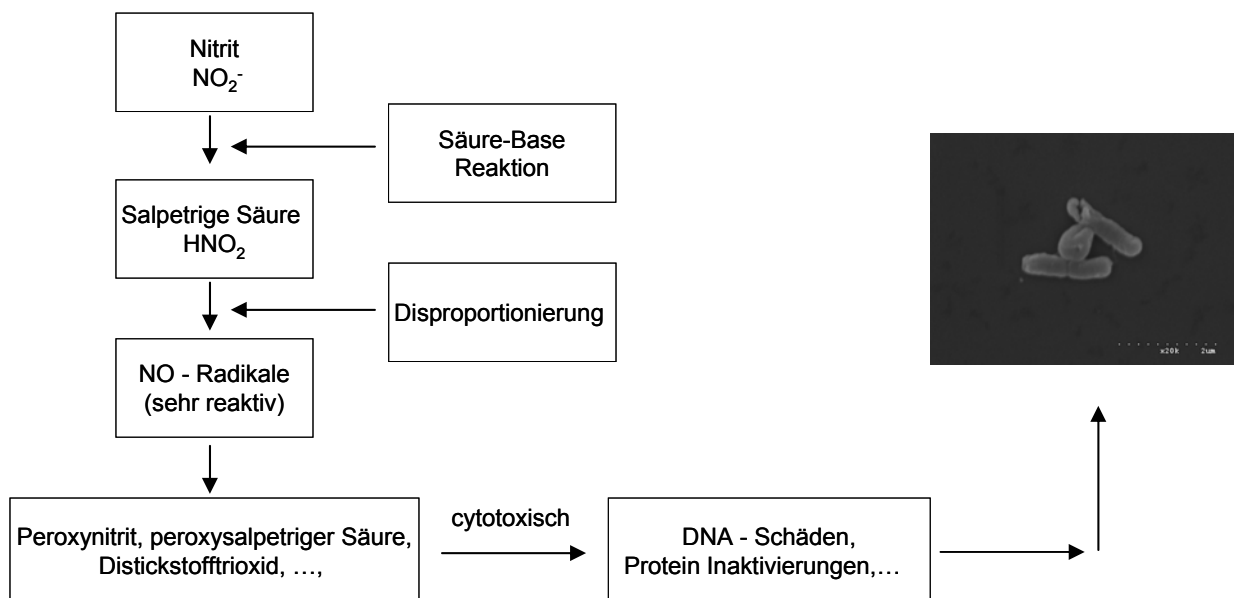


Abb.85: Reaktionsmechanismus des Nitrits im sauren Milieu

Diese NO*-Radikale sind sehr zelltoxisch und führen zu Schäden an Proteinen, der DNA und der Zellwandumhüllung (Fang, 1997). Obwohl schon viele Studien die Aufklärung der „Targets“ der reaktiven Nitritmoleküle zum Inhalt hatten, bleiben doch viele Reaktionsmechanismen, die zu einer Bakteriostase oder zum Tod der Zelle führen, unbekannt (Fang, 1997).

Eine Schwierigkeit hierbei ist, dass die Moleküle auf Grund ihrer Ladung oder ihrer geringen Größe durch die Zellmembran diffundieren und spontan mit Zellbestandteilen und Kompartimenten reagieren. Reaktionen mit NO^{*}-Radikalen, Peroxynitrit oder Distickstofftrioxid können zu einer Desaminierung und zu Strangbrüchen (oxidativer Schaden) der DNA führen.

Proteine können modifiziert und so verändert werden, dass sie ihre Funktion verlieren. Bevorzugte Reaktionspartner sind die Häm- und Thiolgruppen (S-Nitrosylation) der Proteine, hier vor allem Enzyme, die als reaktives Zentrum ein Eisen-Schwefelcluster tragen (Fang, 1997). Peroxynitrit kann aber auch durch eine Peroxydation der Lipide zu Schäden an der äußeren Umhüllung beitragen. Weiterhin wird angenommen, dass Nitrit und seine reaktiven Zerfallsprodukte die Proliferation und die Cytokinproduktion der Mikroorganismen beeinflussen und somit wahrscheinlich den Hauptgrund für eine bakterielle Latenz von intrazellulären Erregern darstellen.

Denn Stickstoffmonoxid und weitere NO-Produkte werden als eine der ersten Antworten des Immunsystems auf eine bakterielle Infektion gebildet (Addiscott and Benjamin, 2004). Demzufolge sind in pathogenen intrazellulären Bakterien wie z.B. *Listeria monocytogenes* die unterschiedlichsten Strategien zur Adaptation an die Umwelteinflüsse vorhanden. Dabei scheinen sich die Abwehrmechanismen gegen die reaktiven Formen des Stickstoffmonoxids mit denen gegen Sauerstoffradikale zu überlappen (Fang, 1997). Glutathion und andere niedermolekulare Verbindungen wie die Aminosäure Homocystein spielen bei der Resistenzentwicklung gegenüber dem Stress durch NO^{*}-Radikale eine wichtige Rolle und so verwundert es nicht, dass sie in hohen Konzentrationen in den Zellen von intrazellulären Erregern nachzuweisen sind.

Aber auch Enzyme wie die Exonuclease und die Endonuclease IV, welche bei der Reparatur von DNA-Schäden in Prokaryonten eine bedeutende Rolle spielen, werden verstärkt exprimiert (Fang, 1997). *Listeria monocytogenes* besitzt somit die genetische Information auf Stress, ausgelöst durch NO^{*}-Radikale, zu reagieren und zu überleben.

Dennoch bleibt die Frage, wie die bei einem pH-Wert von 7 gemachten Beobachtungen zu erklären sind.

Natriumnitrit hat nicht nur negative Auswirkungen auf den Mikroorganismus. Vor allem unter Bedingungen unter denen Nitrit nicht in reaktive toxischere Zwischenprodukte zerfällt, also z.B. bei einem pH-Wert von 7. Unter diesen Bedingungen kann Natriumnitrit von vielen fakultativ oder obligat anaeroben Mikroorganismen bei Abwesenheit von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor dienen.

Die Organismen übertragen in diesem Fall die Elektronen auf die Nitrit-Ionen (Denitrifikation). Da die Redox-Potenziale aller Einzelschritte der Denitrifikation positiv sind, können diese Bakterien Nitrat als Elektronenakzeptor (Oxidationsmittel) für ihren oxidativen Energiestoffwechsel (oxidative Phosphorylierung) nutzen. Durch die chemiosmotische Kopplung des Elektronentransports mit der ATP-Synthese in der Atmungskette führt die Denitrifikation zur Energiegewinnung und ermöglicht auch unter anaeroben Bedingungen ein Wachstum der Mikroorganismen. Während in *Bacillus subtilis*, einem

Modellorganismus der Gram-positiven Bakterien, die anaerobe Atmung mit Nitrat oder Nitrit vollständig aufgeklärt werden konnte (Marino et al., 2000; Marino et al., 2001; Nakano et al., 1998; Nakano et al., 2006; Nakano and Hulett, 1997), ist für *Listeria monocytogenes* bis jetzt nur bekannt, dass der Organismus ebenfalls eine Nitrit-Reduktase (nasDE) bzw. Regulatoren für eine anaerobe Atmung mit Nitrit besitzt (Glaser et al., 2001).

Listeria monocytogenes sollte daher in der Lage sein, unter aneroben Bedingungen Nitrit als E-Akzeptor zu verwenden und damit unter definierten Bedingungen einen Wachstumsvorteil haben. Es wird vermutet, dass *Listeria monocytogenes* Nitrit als terminalen E-Akzeptor unter den anaeroben Bedingungen im Versuchsröhrchen nutzt und daher im Vergleich zu den Organismen der Negativkontrolle, welche unter diesen Bedingungen wahrscheinlich eine homofermentative Gärung mit Glucose durchführen, einen energetischen Vorteil hat. Dass diese Beobachtung erst bei erniedrigten Wasseraktivitätswerten auftritt, könnte auf eine geänderte Stressantwort des Organismus hinsichtlich einer Zunahme der Salzkonzentration im Medium, zurückzuführen sein. Die generelle Stressantwort infolge der a_w -Wert Absenkung (Jordan et al., 2008; Wood, 2007) könnte in den Zellen dazu führen, dass vermehrt stickstoffhaltige Osmoprotektanzien wie z.B. Prolin (Gerhardt et al., 1996; Kempf and Bremer, 1998; Le Marrec et al., 2007; Sleator et al., 2001) produziert werden und Nitrit dafür als Ausgangsmaterial genutzt wird.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sich durch die Zunahme der Salzkonzentration die Zusammensetzung der Zellwandumhüllung ändert. Dadurch könnte ein ungehinderter Eintritt des Nitrits unterbunden und damit eine negative Beeinflussung des Metabolismus verhindert werden. Durch den nun geregelt ablaufenden Eintritt des Nitrits über einen Formiat/Nitrit-Transporter wäre eine anaerobe Atmung mit Nitrit denkbar. Für diese Vermutung sprechen auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Auf den Fotos erkennt man deutlich, dass die mit Nitrit inkubierten Zellen mit zunehmender Salzkonzentration keine Schäden mehr in der Zellumhüllung zeigen. Während bei niedrigen Salzkonzentrationen die mit Nitrit inkubierten Organismen im Vergleich zur Negativkontrolle, deutliche strukturelle Schäden an der Zellumhüllung erkennen lassen (vgl. 3.1.1.3). Ob sich diese Vermutungen bestätigen lassen, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Wurde der pH-Wert in weiteren Versuchen auf 5 abgesenkt, konnte sowohl in den Ansätzen bei 25 °C als auch bei 17 °C keine Vermehrung der Organismen mehr festgestellt werden. Während bei einer Temperatur von 17 °C die Keimzahl nur um eine bzw. eine halbe Zehnerpotenz im Untersuchungszeitraum sank, starben die Mikroorganismen, die bei 25 °C inkubiert wurden, relativ zügig ab (vgl. 3.1.1). Hier ließ sich mit steigender Natriumnitritkonzentration auch eine toxischere Wirkung des Zusatzstoffes erkennen.

Dies könnte auf ein Phänomen zurückzuführen sein, das als „Metabolic Exhaustion“ beschrieben wurde (Leistner, 2000). Nach dieser Theorie wird durch höhere Temperaturen der Stoffwechsel der Organismen gesteigert. Die Bakterien wachsen durch die erhöhte Stoffwechselaktivität. Sie können in diesem Fall nicht, wie andere Mikroorganismen (vgl. 3.1.2) bei niedrigeren Temperaturen, in einem Zustand der Bakteriostase schlechte Umweltbedingungen im Medium überdauern. Sie sterben

letztendlich an dem Stress, der durch den a_w -Wert, pH-Wert und die Nitritkonzentration ausgeübt wird. Um diesen Effekt auszunutzen und die Produkte sicherer zu machen, werden deshalb vielfach bestimmte fermentierte Rohwürste im Einzelhandel nicht mehr in der Kühltheke gelagert, sondern im Verkaufsraum bei moderaten Temperaturen um 22 °C angeboten.

Eine weitere Beobachtung, die bereits von RÖDEL und SCHEUER (2003 b) beschrieben wurde, konnte ebenfalls bestätigt werden. So entfaltet Natriumnitrit bei pH-Werten um 7 erst bei hohen Keimdichten seine antimikrobielle Wirkung im Medium. Bei einem Inokulum von 6,9 log KBE/ ml konnte nur innerhalb der ersten 24 Stunden eine leichte Zunahme der Zellzahl auf 7 log KBE/ml im Medium beobachtet werden. Die Keimdichte blieb anschließend, mit kleineren Schwankungen, über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant auf einem hohen Niveau. Dies erklärt auch, warum bei ähnlichen Versuchen mit geringeren Inokula die Mikroorganismen ungehemmt wachsen konnten, jedoch ohne dabei die Keimzahlen der Negativkontrollen zu erreichen. Es wird angenommen, dass diese Beobachtung auf die steigende Trefferwahrscheinlichkeit eines Nitritmoleküls bzw. deren reaktiver Zerfallsprodukte mit einer Bakterienzelle zurückzuführen ist. Somit scheint auch die Keimdichte bei der Betrachtung der Wirkung des Zusatzstoffes Natriumnitrit eine Rolle zu spielen.

In den Challengeversuchen erwies sich *Listeria monocytogenes* im Vergleich zu *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. als ein sehr robuster Keim (vgl. Tab. 23). Auch unter sehr schwierigen Umweltbedingungen war es kaum möglich, eine Reduktion der Keimzahl durch herkömmliche Reifebedingungen (Nightingale et al., 2006) herbeizuführen (vgl. 3.2.1.1, 3.2.3.1 und 3.2.4.1).

In allen untersuchten Produkten konnten die pathogenen Erreger bis zum Ende des Versuchszeitraumes nachgewiesen werden. Nur selten lag dann die Keimdichte unter der gesetzlich geforderten Höhe von 100 KBE/g. Vor allem in den kurzgereiften streichfähigen Rohwurstprodukten zeigte sich, dass eine Abnahme der Keimdichte im Produkt mit einem Standardreifeprogramm nicht möglich war (vgl. 3.2.1.1.). Jedoch konnte durch die Zugabe von Natriumnitrit ein Wachstum der Zellen von *Listeria monocytogenes* verhindert werden. Im Vergleich dazu nahm in den Chargen ohne Nitrit die Keimzahl im Schnitt um eine Zehnerpotenz zu und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende des Versuchszeitraumes. Eine Reduktion der Keime um eine Zehnerpotenz in diesem Produkt war nur durch die alternative Verwendung eines Reifeprogramms mit einem Temperaturerhöhungsschritt möglich (metabolische Erschöpfung).

Ähnliche Ergebnisse wurden in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst schon von ALBERT (2003) erzielt. Auch hier war es nicht möglich, *Listeria monocytogenes* aus dem Produkt zu entfernen, jedoch konnte mit einem alternativen Reifeprogramm die Keimdichte im Produkt leicht gesenkt werden. Die kurzgereifte streichfähige Rohwurst bedarf daher hinsichtlich der Herstellungshygiene eine besondere Aufmerksamkeit.

In den langgereiften schnittfesten Produkten konnten in Bezug auf eine Reduktion der Keime bessere Ergebnisse erzielt werden, so nahm die Keimdichte im Produkt im Verlauf der Untersuchungen um zwei Zehnerpotenzen ab. Hier konnte vor allem zu Ende der Reifung festgestellt werden, dass die Produkte die mit 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit hergestellt wurden, im Vergleich zu denen mit

100 mg/kg deutlich niedrigere Keimzahlen aufwiesen. Dieser Effekt kann jedoch nicht direkt auf die Wirkung des Nitrits zurückgeführt werden, da ein Nachweis des Zusatzstoffes mit den verwendeten Methoden bereits nach 6 Tagen nicht mehr möglich war. Ob bereits zum Beginn der Reifung in den Organismen durch Nitrit entscheidende Weichen für das weitere Überleben im Produkt gestellt werden, müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen klären.

Die Edelschimmelpilzgereiften Erzeugnisse stellen auf Grund der Anhebung des pH-Wertes im äußeren Randbereich eine besondere Gefahrengruppe dar. In Folge des Wachstums der Kulturen von *Penicillium nalgiovense* werden alkalische Stoffwechselprodukte gebildet, die der von den Starterkulturen produzierten Milchsäure entgegenwirken und somit zu einer Erhöhung des pH-Wertes im Produkt beitragen. Somit könnte potentiell die Gefahr bestehen, dass es dadurch im Produkt zu einer Vermehrung von pathogenen Erregern kommt.

Jedoch konnte eine Zunahme der *Listeria monocytogenes* Keimdichte im Produkt mit steigendem pH-Wert nicht festgestellt werden. Dies ist vor allem auf die dynamischen Prozesse im Produkt zurückzuführen (Uyttendaele et al., 2001), an die sich die Mikroorganismen ständig neu adaptieren müssen (Leistner, 1992; Leistner, 2000).

So verhindert zuerst der Zusatz von Nitrit ein Wachstum der Organismen in den kritischen ersten zwei Reifungstagen. Innerhalb dieser 48 Stunden hat der pH-Wert durch das erst beginnende Wachstum der Starterkulturen noch keinen wachstumshemmenden Bereich erreicht. Erst nach zwei Tagen ist der pH-Wert bei Werten um 5,2 – 5,3. Durch den erniedrigten pH-Wert wird nun ein weiteres Wachstum der Mikroorganismen nach dem Verbrauch des Nitrits verhindert. Neben der Senkung des pH-Wertes im Produkt, setzt nun nach zwei Tagen auch eine verstärkte Abtrocknung des Produktes ein. Der Wasseraktivitätswert beginnt kontinuierlich zu sinken und erreicht nach 8 Tagen Werte unter 0,95. Ab hier ist ein mögliches Wachstum der pathogenen Erreger bereits stark gehemmt und wird durch die weitere Abnahme des a_w -Wertes weiter erschwert bzw. verhindert. Damit kann auch ein ansteigender pH-Wert die Zellen von *Listeria monocytogenes* nicht mehr in die Lage versetzen, erneut zu wachsen.

Die Bakterien gehen in einen bakteriostatischen Zustand über und überdauern. Eine Zunahme der Keimdichte war im Produkt anschließend nicht mehr zu beobachten. Im Gegensatz zur langgereiften Rohwurst fiel auf, dass eine Reduktion der Keimdichte im Produkt um zwei Zehnerpotenzen nicht möglich war. Dies ist wahrscheinlich auf den wieder ansteigenden pH-Wert zurückzuführen. Denn mit jedem Stress mit dem sich die Mikroorganismen zusätzlich auseinandersetzen müssen, benötigt die Zelle Energie zum Aufrechterhalten des inneren Gleichgewichts (Homöostase). Je schneller diese Stoffwechselenergie verbraucht ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Organismus abstirbt. Dies zeigt ganz deutlich, wie wichtig das Zusammenspiel der einzelnen konservierenden Faktoren ist. Ein Weglassen einer Hürde kann wie im Fall einer Rohwurstherstellung ohne Nitrit bedeuten, dass *Listeria monocytogenes* sich auch innerhalb des kurzen Zeitraumes von zwei Tagen vermehren kann.

Wie in dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, ist es sehr schwierig *Listeria monocytogenes* auf Keimdichten unterhalb der geforderten 100 KbE/g zu senken. Daher sollte sowohl auf die Auswahl bzw. Kontrolle des Rohmaterials als auch auf eine gute Betriebshygienebesondere Aufmerksamkeit gelegt werden. In Fleischverarbeitenden Betrieben muss mit einer Kontamination des Rohmaterials mit *Listeria monocytogenes* gerechnet werden, welcher über desinfektionsmittelresistente Biofilme eingetragen wird (Lebert et al., 2007).

4.2 *Escherichia coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme gehören zu den enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Unter EHEC versteht man Shiga- oder Verotoxin produzierende *Escherichia coli* (STEC/VTEC) (Messelhauser et al., 2007; Orth et al., 2007). Shiga- und Verotoxine sind sehr starke Zellgifte, die beim Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen können (Xicohtencati-Cortes et al., 2007). Der bekannteste Vertreter der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* ist der Serotyp O157:H7. Dieses Serovar ist weltweit am häufigsten mit schweren Krankheitsausbrüchen und mit einer Vielzahl von Erkrankten assoziiert (Ngbede et al., 2007; Ogura et al., 2007). Neben dem Serovar O157:H7 produzieren weitere das so genannte Shiga-Toxin, dessen Pathomechanismus mittlerweile aufgeklärt werden konnte. Durch Bindung des Toxins an bestimmte Zellwandrezeptoren wird die Proteinbiosynthese gehemmt und schließlich der Zelltod durch Apoptose ausgelöst (Lee et al., 2008), dies geschieht vor allem durch die Absonderung von regulierenden und inhibierenden Proteinen in die Zelle (Gobert et al., 2007). Die durch eine EHEC-Infektion ausgelöste Symptomatik umfasst ein relativ breites Spektrum, das von wässrigem Durchfall bis zur blutigen Diarrhoe mit Bauchkrämpfen reicht. Eine schwerwiegende Verlaufsform ist das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), das rund fünf bis zehn Prozent der Infizierten entwickeln (Grif et al., 2005).

EHEC lassen sich aufgrund bestimmter Merkmale in mehrere Serotypen (Serovaren) einteilen, von denen der Typus O157:H7 in Deutschland am häufigsten nachgewiesen wird. Der Keim kommt vor allem im Darm von Wiederkäuern wie Rindern (Mainil and Daube, 2005; Wieler et al., 2007), Schafen oder Ziegen vor (Novotna et al., 2005) und gilt als sehr widerstandsfähig (siehe Tab. 24).

Tab. 24: Grenzbereiche für das Wachstum von *Escherichia coli* O157:H7

Parameter	Grenzwerte
Temperatur	
minimale Temperatur	8 °C
optimale Temperatur	37 – 41 °C
maximale Temperatur	45 – 46 °C
Wasseraktivität (a_w)	
minimaler a_w -Wert	0,95
pH-Wert	
minimaler pH-Wert	4,2
optimaler pH-Wert	6,5 – 7,5
maximaler pH-Wert	9,5

Die Infektion mit dem Erreger kann über mehrere Wege erfolgen. Da die Bakterien bei rund acht Prozent der Rinder als Bestandteil der Darmflora nachgewiesen werden konnten, kann sich der Keim durch unsachgemäße Schlachtung leicht weiterverbreiten. Damit ist die Infektion durch den Verzehr von verunreinigten Lebensmitteln der Hauptgrund für eine Erkrankung. Hackfleisch (Barlow et al., 2006; Chinen et al., 2001) und ungenügend gegarte Rindfleischprodukte (Gallien et al., 1999) spielen hier eine bedeutende Rolle. Langgereifte und schnittfeste Rohwürste sollten bei guter Herstellungspraxis und unter Anwendung üblicher Herstellungstechnologien normalerweise kein Sicherheitsrisiko hinsichtlich einer Infektion mit EHEC darstellen (Kofoth, 1999). Dennoch wurden Ausbrüche nach dem Verzehr von langgereiften und fermentierten Rohwürsten dokumentiert (Alexander et al., 1995; Sartz et al., 2008; Timm et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass unter optimalen Bedingungen bei pH 7 und a_w -Werten bis 0,975 der Zusatzstoff Natriumnitrit keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von *Escherichia coli* hatte. Dies konnte auch durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden, bei denen eine Schädigung der Zelloberfläche unter diesen Bedingungen nicht beobachtet wurde.

Im Vergleich zu den Ergebnissen von *Listeria monocytogenes* fällt auf, dass mit abnehmendem Wasseraktivitätswert keine stimulierende Wirkung des Nitrits beobachtet werden konnte. Obwohl *Escherichia coli* unter anaeroben Bedingungen wie auch *Listeria monocytogenes* in der Lage ist, eine anaerobe Atmung mit Nitrat/Nitrit durchzuführen (Clarke et al., 2008; Nilavongse et al., 2006).

Möglich wäre, dass bei *Escherichia coli* als gramnegativen Vertreter, hinsichtlich der Adaptation an den osmotischen Stress, andere Mechanismen eine Rolle spielen. In diesem Fall könnte Nitrit/Nitrat keine Rolle für den geänderten Metabolismus in Folge der Anpassung an den osmotischen Stress spielen. Dies müsste durch molekularbiologische Untersuchungen geklärt werden.

Erst mit sinkendem pH-Wert und a_w -Wert konnte eine Zunahme der antimikrobiellen Wirkung in der Bouillon festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist vor allem auf den verstärkten rein chemischen Zerfall des Nitrits bei pH-Werten unter 6,5 und den damit bekannten Auswirkungen zurückzuführen (siehe 4.1).

Weiterhin fiel unter diesen Bedingungen auf, dass die Zellen von *Escherichia coli* aggregierten. Die Bildung von Biofilmen ist für *Escherichia coli* nicht ungewöhnlich (Gualdi et al., 2007; Oh et al., 2007). Dadurch wird schneller eine hohe Zelldichte erreicht, wodurch die Bakterien wiederum verschiedene Vorteile gegenüber einzelnen Zellen haben (Palmer and Stoodley, 2007). So bietet die Gruppe Schutz vor mechanischen, physikalischen und/oder chemischen Stress, ermöglicht die Spezialisierung einzelner Zellen und erhöht damit die Fähigkeit der Mikroorganismen, auch unter extremen Umweltbedingungen zu überleben (Flemming et al., 2007). Jedoch verloren die Zellen mit Absinken des pH-Wertes auf 5 die Fähigkeit Biofilme zu bilden bzw. unter diesen Bedingungen in Bouillon zu wachsen.

Dass die pathogenen Bakterien im Produkt auch in Form von Mikrokolonien wachsen und nicht gleichmäßig über das Produkt verteilt sind, ist zu vermuten und soll in nachfolgenden Studien

untersucht werden. Auch an anderen Matrices konnte schon gezeigt werden, dass Mikroorganismen natürlicherweise in Mikrokolonien vorkommen und dass eine homogene Verteilung im Lebensmittel eher die Ausnahme ist (Nikolaev and Plakunov, 2007). Dies sollte bei der Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit, vor allem hinsichtlich Beprobung für mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln, berücksichtigt werden.

Neben der Zellaggregation konnte während der Bouillonversuche eine weitere Besonderheit bei *Escherichia coli* beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 5 starben zuerst die Organismen, welche bei 25 °C inkubiert wurden. Während die Bakterien, die bei 17 °C untersucht wurden deutlich länger im Medium nachzuweisen waren. Hinter dieser Beobachtung wird eine so genannte metabolische Erschöpfung vermutet (Albert et al., 2003; Leistner, 2000). Nach dieser Theorie erzwingt die gleichzeitige Einwirkung verschiedener Stressoren die gleichzeitige Aktivierung verschiedener Stressschutzmechanismen. Dies soll zu einer Erschöpfung der metabolischen Reserven sowie zu einer Störung des intrazellulären Gleichgewichts und somit zum Absterben der Erreger führen. Allerdings ist über die an diesem Phänomen beteiligten intrazellulären Vorgänge derzeit nichts bekannt. Bei ambienten Temperaturen sind die Bakterien anfälliger gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie niedrigen pH-, a_w -Werten und Nitrit, während sich bei Kühltemperaturen die Keime als widerstandsfähiger erweisen (Uyttendaele et al., 2001). Somit könnte eine Kühlung von Rohwurstprodukten – während oder nach der Reifung – ein erwünschtes Absterben von Pathogenen verhindern und damit kontraproduktiv für ein mikrobiologisch einwandfreies Produkt sein.

Dazu wurde in den Challengeversuchen bei der schnellgereiften streichfähigen und schnittfesten Rohwurst, neben einem Standardprogramm ein Reifeprogramm mit einer Temperaturerhöhung getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Effekt der metabolischen Erschöpfung bei *Escherichia coli* vor allem bei Produkten mit einer kontinuierlichen Abtrocknung stärker ausgeprägt war (siehe 3.2.1.2). Grundsätzlich wurden mit dem angepassten Reifeprogramm bessere Ergebnisse erzielt als mit einem Standardreifeprogramm. Somit wäre der Einsatz von angepassten Reifeprogrammen zu empfehlen, da z.T. deutlich schneller ein mikrobiologisch einwandfreies Produkt erreicht werden konnte (Rödel et al., 2006; Uyttendaele et al., 2001). Die pathogenen Keime in den Nitritchargen wurden bei einer schnellgereiften schnittfähigen Rohwurst bereits nach 13 Tagen unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g gesenkt. Dies war bei einem herkömmlichen Reifeprogramm erst nach 20 Tagen der Fall.

Etwas schwächer trat dieser Effekt bei den schnellgereiften streichfähigen Produkten auf. Hier konnte die *Escherichia coli* Keimdichte in keiner Charge unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g gesenkt werden. Im Vergleich zu einem herkömmlichen Reifeprogramm konnten jedoch ein bis zwei Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahlen erreicht werden (siehe 3.2.1.2). Diese Beobachtung ist auf eine fehlende Abtrocknung des Produktes zurückzuführen. *Escherichia coli* reagiert im Vergleich zu *Listeria monocytogenes* sehr empfindlich auf eine a_w -Wert Erniedrigung (vgl. Tab. 23 und Tab. 24) (Rödel and Scheuer, 2006). So bewirkt bereits die Absenkung des Wasseraktivitätswertes um 0,01 Einheiten eine Verminderung der Keimzahl um eine Zehnerpotenz (Rödel and Scheuer, 2001). Auch RÖDEL und SCHEUER (2001) konnten keine starke Abnahme der *Escherichia coli* Keimzahl in

kurzgereiften streichfähigen Produkten feststellen. Vielmehr blieb die Keimdichte in den mit Nitrit hergestellten Rohwürsten über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant oder nahm leicht ab.

In Produkten, in denen auf Grund des verwendeten Reifeprogrammes bzw. des wasserdurchlässigen Darmes eine Abtrocknung gewährleistet wurde, konnte z.T. eine sehr deutliche Abnahme der Keimzahl von *Escherichia coli* erfasst werden. So wurden *E. coli* in langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwurstprodukten relativ zügig und vollständig abgetötet. Hier wie auch in anderen Forschungsarbeiten zeigte sich deutlich, wie die einzelnen Hürden ineinander greifen und eine Vermehrung der pathogenen Bakterien verhindern (Nissen and Holck, 1998a; Pichner et al., 2006). Somit könnte auch bei einer relativ hohen initialen Keimdichte bei Beachtung der Reifezeit ein sicheres EHEC- freies Rohwurstprodukt hergestellt werden (Lahti et al., 2001).

Hinsichtlich der antimikrobiellen Effektivität konnte in allen getesteten Produkten, sowohl zwischen Ansätzen mit als auch ohne Nitrit keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Vermehrung von *Escherichia coli* ist in den Produkten durch den bereits erniedrigten pH-Wert von 5,8 und einem a_w -Wert von unter 0,97 gehemmt. Dadurch ist auch die letztendlich eingesetzte Nitritkonzentration nicht entscheidend, da das Wachstum der Organismen zu erst durch chemisch-physikalische Parameter und nach zwei Tagen durch die beginnende Vermehrung der Starterkulturen verhindert wird.

Ein Zusatz von Nitrit war damit nicht erforderlich und steht im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen, in denen eine antimikrobielle Wirkung des Zusatzstoffes bei pH-Werten kleiner gleich 6 nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass *Escherichia coli* im Produkt ein ganz anderes Verhalten als in einer Bouillon zeigt. So wäre zum Beispiel denkbar, dass die Organismen auf Grund der räumlichen Ungleichverteilung nicht mit den reaktiven Nitritmolekülen bzw. deren Zerfallsprodukten in Kontakt kommen. Im Gegensatz dazu ist in Bouillon von einer Gleichverteilung der Nitritspaltprodukte auszugehen.

Andererseits wäre es aber auch denkbar, dass *Escherichia coli* durch Fett- oder Fleischbestandteile geschützt wird, da diese mit Nitritmolekülen reagieren. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass sich der Metabolismus der Organismen auf Grund der geänderten äußeren Umstände dem komplexen Medium Fleisch anpasst und somit möglicherweise die generelle Stressantwort von *Escherichia coli* (Durfee et al., 2008; Flores et al., 2008; Thammavongs et al., 2008) auch Schutz vor der Wirkung des Nitrits bietet. Dies soll in einer weiteren Studie unter Einbeziehung der beteiligten Gen-Regulatoren geklärt werden.

4.3 *Salmonella* spp.

Salmonellosen werden meist durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln verursacht. Besonders kontaminationsgefährdet sind ungekochte (rohe) Fleischwaren (Bianchi et al., 2007) wie Kebap (Evans et al., 1999), Hackfleisch (Jansen et al., 2005), Mettwurst und Huhn (Rasschaert et al., 2008) sowie Muscheln, Eier (Little et al., 2008), Speiseeis und Mayonnaise (Mason et al., 2001). Diese müssen ausreichend gekühlt und innerhalb von ein bis zwei Tagen verzehrt werden.

Salmonellen bilden eine große Gruppe innerhalb der *Enterobacteriaceae* und sind ähnlich wie enterohämorrhagische *Escherichia coli* gut an äußere Umweltbedingungen adaptiert (siehe Tab. 25).

Tab. 25: Grenzbereiche für das Wachstum von *Salmonella* spp.

Parameter	Grenzwerte
Temperatur	
minimale Temperatur	5,2 °C
optimale Temperatur	37 – 42 °C
maximale Temperatur	45 – 46 °C
Wasseraktivität (a_w)	
minimaler a_w -Wert	0,94
pH-Wert	
minimaler pH-Wert	4,2
optimaler pH-Wert	6,5 – 7,5
maximaler pH-Wert	9,5

Als Durchfallerreger sind meist Serovare der Spezies *Salmonella enterica* subsp. *enterica* dokumentiert. Als Erreger für Durchfallerkrankungen sind für den Menschen sind an erster Stelle die Serovare *Salmonella* Enteritidis (Hopkins et al., 2007) und *S. Typhimurium* (Davis et al., 2007) zu nennen. Diese verursachen beim Menschen meist spontan ausheilende Durchfallerkrankungen, die in der Regel nicht antibiotisch behandelt werden müssen. Allerdings können bei Risikogruppen, wie Säuglingen, Kleinkindern (Friesen et al., 2008), alten Menschen, HIV-Patienten und Immungeschwächten Patienten (Davis et al., 2007; Swe et al., 2008), schwere Erkrankungen (Allgemeininfektionen) hervorgerufen werden. Im Darm verursachen die Bakterien durch Lipopolysaccharide (Endotoxine) (Brooks et al., 2008), die an der Oberfläche der Zellwand sitzen oder durch Proteine die beim Zerfall der Zelle freigesetzt werden, eine Störung der Darmschleimhautzellen (Haraga et al.,

2008). Daraus folgt ein massiver Durchfall (Enteritis), unter Umständen auch Erbrechen, mit einem Ungleichgewicht im Wasser- und Elektrolythaushalt.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass Nitrit bei einem pH-Wert von 7 keinen hemmenden Einfluss auf die Vermehrung von *Salmonella* spp. hatte. Wie schon für *Listeria monocytogenes* (vgl. 4.1) und *Escherichia coli* (4.2) beschrieben, muss damit die Aussage, dass Nitrit generell antimikrobiell wirkt, relativiert werden. Der Zusatzstoff wirkt nur unter ganz bestimmten Bedingungen hemmend auf das Wachstum der pathogenen Erreger.

Eine antimikrobielle Wirkung konnte erst mit abnehmenden pH-Wert festgestellt werden. So konnten bereits bei einem pH-Wert von 6 in den Ansätzen mit Nitrit in Reihenfolge der zugesetzten Konzentrationen bakteriostatische Bedingungen erreicht werden (vgl. 3.1.3). Diese verstärkten sich bei einem pH-Wert von 5 und führten zu einem raschen Absterben der Organismen.

Im Vergleich zu *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* reagierten die Zellen von *Salmonella* spp. bei diesem niedrigen pH-Wert am empfindlichsten. Diese Beobachtung ist auf die Zunahme der toxischeren Zerfallsprodukte bei einem pH-Wertabfall zurückzuführen (vgl. 4.1). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Zellen zuerst im Medium starben, die bei einer Temperatur von 25 °C inkubiert wurden. Hinter diesem Phänomen wird eine metabolische Erschöpfung der Keime vermutet (vgl. 4.1).

Im Gegensatz zu *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* konnte bei pH 5 in den Ansätzen ohne Natriumnitrit ein Wachstum der Zellen von *Salmonella* spp. beobachtet werden. Ein pH-Wert von 5 gilt im Allgemeinen für die meisten Bakterien als lebensfeindliche Umgebung in der keine Vermehrung bzw. ein Überleben möglich ist (Rödel and Scheuer, 2007). Jedoch stieg durch das Ausschleusen von alkalischen Stoffwechselprodukten durch die Salmonellen der pH-Wert im Medium an. Damit verbesserten sich die äußeren Umweltbedingungen und ein Wachstum wurde ermöglicht (vgl. 3.1.3).

Dieser hier beobachtete Effekt bewirkte, dass Nitrit bei einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von 17 °C einen höheren antimikrobiellen Effekt auf die Zellen hatte als bei gleichem pH-Wert und einer Temperatur von 25 °C (vgl. 3.1.3.1 und 3.1.3.2). Da die Keime, die bei 25 °C inkubiert wurden, eine höhere Stoffwechselleistung aufwiesen, brauchten sie im Vergleich zu denen, die bei 17 °C inkubiert wurden, eine geringere Zeit um den pH-Wert im Medium zu erhöhen. Durch diese pH-Wert Zunahme sank die chemische Umsetzung des Nitrits in reaktivere und somit toxischere Zerfallsprodukte (vgl. 4.1) und dem zu Folge waren die Zellen bei 25 °C sehr viel weniger den reaktiven Nitritspaltprodukten ausgesetzt.

Die *in vitro* Versuche verdeutlichten bei allen untersuchten Mikroorganismen, dass die antimikrobielle Wirkung des Zusatzstoffes Nitrit direkt an den pH-Wert gekoppelt ist.

In den Challengeuntersuchungen konnte mit Ausnahme der GdL-gereiften Rohwurst eine deutliche Zunahme der Keimdichte in den Würsten ohne Nitrit festgestellt werden. Hier wurde z.T. ein Anstieg der Keimzahl auf $6 \log_{10}$ KbE/g in einer kurzggereiften streichfähigen Rohwurst festgestellt (vgl. 3.2.1.3). Im Vergleich dazu konnte in allen Nitritchargen eine Abnahme der Keimzahl von *Salmonella* spp. beobachtet werden.

In einer langgereiften- und in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (mit entsprechender Reifezeit) sanken die Keimzahlen in den Chargen mit Nitrit im Schnitt nach 14 Tagen unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g und nach Tag 28 waren die Keime auch nach Anreicherung nicht mehr nachzuweisen. Nur in den Ansätzen ohne Nitrit konnten die Keime länger im Produkt festgestellt werden, was jedoch auf die anfängliche Erhöhung der Keimdichte im Brät zurückzuführen war. Aber auch in diesen Chargen waren die Keime im Schnitt nach dem Tag 42 nicht mehr nachzuweisen. Somit war eine sichere Produktion von Rohwürsten auch ohne den Zusatzstoff, jedoch mit Beachtung einer längeren Reifezeit, möglich.

Salmonella spp. reagierte im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Mikroorganismen sehr empfindlich auf die in der Rohwurst vorherrschenden Bedingungen. Und so konnten die Erreger in einer GdL-gereiften und in den langgereiften Rohwürsten mit Natriumnitrit sehr schnell und effektiv abgetötet werden. In den nitritfreien Chargen konnte zwar anfänglich eine Vermehrung der pathogenen Keime beobachtet werden, die jedoch mit beginnender Ansäuerung, aber vor allem mit einsetzender Abtrocknung des Produktes, zu einem Absterben der Mikroorganismen führte. Bei Beachtung einer entsprechenden Verlängerung der Reifezeit kann auch hier ein hygienisch und mikrobiologisch stabiles Produkt ohne den Einsatz von Nitrit hergestellt werden.

Zwischen den Edelschimmelpilzgereiften- und den langgereiften Rohwürsten konnten keine charakteristischen Unterschiede festgestellt werden. Trotz der deutlichen Erhöhung des pH-Wertes in den schimmelpilzgereiften Produkten konnte keine Zunahme der Zahl der Salmonellen beobachtet werden. Dies war auf die kontinuierliche Abtrocknung des Produktes zurückzuführen und stimmt mit den Ergebnissen anderer in anderen Publikationen überein (Dambrosio et al., 2007; Nightingale et al., 2006; Nissen and Holck, 1998b).

Eine Ausnahme stellte erneut die kurzgereifte streichfähige Rohwurst dar. Auf Grund der fehlenden Abtrocknung des Produktes konnten die Keime bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes mit mehr als 10 KbE/g nachgewiesen werden. Jedoch konnte bei Verwendung eines alternativen Reifeprogramms die Keimdichte durch einen Temperaturerhöhungsschritt deutlicher gesenkt werden als mit einem Standardreifeprogramm (vgl. 3.2.1.3). Dieser Effekt ließ sich auch bei einer schnellgereiften Rohwurst mit einem an die metabolische Erschöpfung angepassten Reifeprogramm erkennen (vgl. 3.2.2.3). Die Erhöhung der Reifetemperatur zum richtigen Zeitpunkt bewirkte wie auch schon bei *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* eine schnellere Absenkung der pathogenen Keimdichte im Produkt. Damit die Temperaturerhöhung sinnvoll und zügig wirkt, müssen jedoch in der Rohwurst bestimmte Bedingungen vorherrschen: So sollte der pH-Wert kleiner 5,2 und die Starter- und Schutzkulturen sich auf Keimdichten von $8 \log_{10}$ KbE/g vermehrt haben. Sind diese Parameter noch

nicht erfüllt, kann eine Temperaturerhöhung zu einem zu frühen Zeitpunkt gegenteilig wirken. Hinter dieser Beobachtung ist ein Effekt zu vermuten, der in der Literatur als metabolische Erschöpfung beschrieben ist (Leistner, 1992; Sun-Young, 2004) und bereits unter Punkt 4.1. näher beschrieben wurde.

Eine solche Temperaturerhöhung kann die mikrobiologische und hygienische Stabilität eines typischen Rohwurstproduktes deutlich erhöhen.

Die in den Challengeversuchen zugesetzte Natriumnitritmenge war zweitrangig, denn ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen hinsichtlich der Keimzahlabnahme konnte nicht festgestellt werden. Wie auch schon die Untersuchungen mit *Listeria monocytogenes* und *Escherichia coli* zeigten, war ein Zusatz von 100 mg/kg ausreichend um eine Vermehrung der pathogenen Bakterien effektiv zu verhindern.

Dass sich ein Zusatz von Nitrit positiv auf die mikrobielle Stabilität auswirkt, konnte schon in einer künstlich mit Salmonellen beimpften Zwiebelmettwurst gezeigt werden (Birzele et al., 2005). Hier verhinderte die Zugabe sowohl eines 0,4-0,5 % -tigen als auch eines 0,9 % -tigen Nitritpökelsalzes das Anfangswachstum der zugesetzten pathogenen Keime.

Die Challengeversuche wurden unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt, um die Ergebnisse statistisch abzusichern. Trotzdem muss angemerkt werden, dass eine Beimpfung mit Pathogenen mit 5×10^3 KbE/g sehr hoch ist. Eine solche Belastung des Ausgangsmaterials ist sehr unwahrscheinlich, jedoch sind kleinere Inokula sehr schwer im mikrobiologischen Labor zu handhaben und führen eventuell zu falschen Schlussfolgerungen, da die Wiederfindungsrate mit abnehmendem Keimgehalt exponentiell abnimmt.

5. Zusammenfassung

Natriumnitrit wirkt nur unter ganz bestimmten definierten Bedingungen antimikrobiell auf die Zellen von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. Somit ist die generelle Aussage, dass Nitrit einen keimhemmenden Effekt hat, nicht aufrecht zu erhalten.

So konnte bei einem pH-Wert von 7 gezeigt werden, dass Natriumnitrit keinen hemmenden Einfluss auf die getesteten Stämme hatte. Statt der zu erwartenden Zunahme der antimikrobiellen Wirkung, konnte für *Listeria monocytogenes* insbesondere für den Stamm Li 135 bei einer Absenkung des a_w -Wertes eine Stimulation des Wachstums in Bouillon beobachtet werden. Worauf dieser Effekt zurückzuführen, ist bedarf weiterer Untersuchungen. Es wird vermutet, dass der Stamm Li 135 Nitrit als terminalen E-Akzeptor unter den anaeroben Bedingungen im Versuchsröhrchen nutzt und daher im Vergleich zu den Organismen der Negativkontrolle, welche unter diesen Bedingungen wahrscheinlich eine homofermentative Gärung mit Glucose durchführen, einen energetischen Vorteil hat. Oder es könnte auf eine geänderte Stressantwort des Organismus hinsichtlich einer Zunahme der Salzkonzentration im Medium zurückzuführen sein.

Bei einem pH-Wert von 5 konnte in allen Versuchen mit Nitrit keine Vermehrung der Zellen in Bouillon beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen katalysieren die Protonen der Säure die Umwandlung des Nitrits zur salpetrigen Säure (Säure-Base-Reaktion) und anschließend weiter zu NO^* -Radikalen (Disproportionierung). Diese NO^* -Radikale sind sehr zelltoxisch und führen zu Schäden an Proteinen, der DNA und der Zellwandumhüllung (Fang, 1997).

Weiterhin wurde festgestellt, dass bei erhöhten Temperaturen und einem pH-Wert von 5 in unserem Beispiel mit 25 °C Nitrit toxischer auf die Zellen wirkte als bei 17 °C. Als mögliche Erklärung könnte hier das Phänomen der „metabolischen Erschöpfung“ genannt werden. Hierbei wird der Mikroorganismus durch die erhöhte Temperatur förmlich „gezwungen“ zu wachsen und sich damit aktiv mit den äußeren Umweltbedingungen auseinander zu setzen. Durch die Vielzahl der widrigen äußeren Umstände (niedriger pH, Nitrit, niedriger a_w -Wert) ist der Organismus nicht in der Lage sein inneres Gleichgewicht (Homöostase) wiederherzustellen, folglich stirbt der Mikroorganismus bei dem Versuch, an einer metabolischen Erschöpfung (Leistner, 1992; Leistner, 2000). Während Zellen, die bei 17 °C inkubiert wurden, auf Grund eines verlangsamten Stoffwechsels, in eine Bakteriostase übergehen. Die Zellen können sich bei 17 °C zwar nicht vermehren, aber der Mikroorganismus bleibt lebensfähig.

Die Ergebnisse der ersten Versuchsphase sind in den Tabellen 27 und 28 vereinfacht dargestellt und zusammengefasst.

Tab.27: Vereinfachte Darstellung des Verhaltens von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter dem Einfluss von Natriumnitrit (100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) bei 25 °C unter verschiedenen äußeren Bedingungen innerhalb der ersten 48 Stunden

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,0	0,980	↔	↔	↓
		0,970	↗	↗	↗
		0,955	↗	↗	↗
		0,940	↗	↗	↗
	6,0	0,980	↑	↑	↑
		0,970	↑	↑	↓
		0,955	↔	↓	↓
		0,940	↔	↓	↓
	5,0	0,980	↓	↓	↓
		0,970	↓	↓	↓
		0,955	↓	↓	↓
		0,940	↓	↓	↓

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Escherichia coli</i>	7,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↔	↔	↔
		0,975	↔	↔	↔
		0,965			--
	6,0	0,990	↓	↓↓	↓↓
		0,980	↔	↔	↓↓
		0,975	↔	↓	↓
		0,965	↓↓	↓↓	↓↓
	5,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↓	↓	↓
		0,975	↓	↓	↓
		0,965	↓	↓	↓

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Salmonella spec.</i>	7,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↔	↔	↔
		0,975	↔	↔	↔
		0,965	↔	↔	↔
	6,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↓	↓	↓
		0,975	↓	↓	↓
		0,965	↓	↓	↓↓
	5,0	0,990	↓↓	↓↓	↓↓
		0,980	↓↓	↓↓	↓↓
		0,975	↓↓	↓↓	↓↓
		0,965	↓↓	↓↓	↓↓

- ↗ Zunahme der Keimzahl um 1-2 log₁₀ KbE/ml
- ↑ Zunahme der Keimzahl um 0,5-1 log₁₀ KbE/ml
- ↔ Kein Einfluss des Zusatzstoffes zu erkennen
- ↓ Abnahme der Keimzahl um 0,5-1 log₁₀ KbE/ml
- ↓↓ Abnahme der Keimzahl um 1-2 log₁₀ KbE/ml

Tab.28: Vereinfachte Darstellung des Verhaltens von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter dem Einfluss von Natriumnitrit (100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) bei 17 °C unter verschiedenen äußeren Bedingungen innerhalb der ersten 48 Stunden

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,0	0,980	↔	↔	↔
		0,970	↑	↑	↑
		0,955	↑	↑	↑
		0,940	↑	↔	↔
	6,0	0,980	↔	↓	↓
		0,970	↔	↔	↓
		0,955	↔	↔	↔
		0,940	↔	↔	↔
	5,0	0,980	↓	↓	↓
		0,970	↓	↓	↓
		0,955	↓	↓	↓
		0,940	↓	↓	↓↓

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Escherichia coli</i>	7,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↔	↔	↔
		0,975	↔	↔	↔
		0,965	↔	↓	↓
	6,0	0,990	↓	↓	↓
		0,980	↓	↓	↓
		0,975	↔	↔	↔
		0,965	↔	↔	↔
	5,0	0,990	↓	↓	↓
		0,980	↓	↓	↓
		0,975	↓	↓	↓
		0,965	↓	↓	↓

Organismus	pH-Wert	a _w -Wert	Nitritkonzentration in mg/l		
			100	150	200
<i>Salmonella spec.</i>	7,0	0,990	↔	↔	↔
		0,980	↔	↔	↔
		0,975	↔	↔	↔
		0,965	↔	↔	↔
	6,0	0,990	↓	↓	↓↓
		0,980	↓	↓↓	↓↓
		0,975	↓	↓	↓
		0,965	↔	↔	↔
	5,0	0,990	↓	↓	↓
		0,980	↓	↓	↓
		0,975	↔	↓	↓
		0,965	↔	↔	↔

- ↑↑ Zunahme der Keimzahl um 1-2 log₁₀ KbE/ml
- ↑ Zunahme der Keimzahl um 0,5-1 log₁₀ KbE/ml
- ↔ Kein Einfluss des Zusatzstoffes zu erkennen
- ↓ Abnahme der Keimzahl um 0,5-1 log₁₀ KbE/ml
- ↓↓ Abnahme der Keimzahl um 1-2 log₁₀ KbE/ml

Dieser erste Versuchsabschnitt stellte den Ausgangspunkt für die eigentlichen Versuche in den verschiedenen Rohwurstprodukten. Dazu wurde das Verhalten der pathogenen Lebensmittelinfektionserreger in kurzgereiften streich- und schnittfähigen Rohwurstprodukten sowie in langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Produkten mit Hilfe von Challengeversuchen überprüft.

In den Versuchsreihen wurden die Würste mit praxisüblichen Rezepturen und Reifeprogrammen hergestellt. Daneben wurden für die kurzgereiften streichfähigen und schnittfesten Rohwurstprodukte Versuchsansätze durchgeführt, bei denen die Reifetemperatur auf 25 °C erhöht wurde. Ziel dieser Versuche war es, das Phänomen der metabolischen Erschöpfung, welches in der ersten Versuchsphase bei allen Mikroorganismen auftrat, später im Produkt zu nutzen und somit die Keimzahl schneller unter die entsprechenden Nachweisgrenzen zu senken.

Kurzgereifte streichfähige Rohwürste gelten als Risikoprodukte, da sie auf Grund fehlender Abtrocknung oder anderweitiger stabilisierender Maßnahmen bei einer Kontamination mit *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. eine Vermehrung zulassen können. Um diese Aussage zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit das Verhalten und die Absterbekinetik der drei pathogenen Keime während Reifung und Lagerung erfasst.

In allen Versuchsreihen mit Natriumnitrit konnte während der Reifung und Lagerung keine Vermehrung der eingepflichten Bakterien festgestellt werden. Jedoch war mit praxisüblichen Rezepturen und Reifetechnologien innerhalb der ersten 14 Tage keine wesentliche Reduktion der Keimdichte erkennbar. Erst bei höheren Kochsalzzugaben von 2,89 % war eine leichte Abnahme der Zellzahl zu beobachten. Ähnliche Keimzahlreduktionen wurden durch die Verwendung eines alternativen Reifeprogramms, mit einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur auf 25 °C erreicht. Am sensibelsten reagierten *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. auf die geänderten Bedingungen, so dass eine Abnahme der Keimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden konnte. Für *Listeria monocytogenes* konnte unter allen getesteten Bedingungen keine wesentliche Reduktion der Keimdichte festgestellt werden. Der Einsatz von Natriumnitrit ist bei diesem Produkt unbedingt zu empfehlen, da in Abwesenheit von Nitrit vor allem für *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. eine deutliche Zunahme der Keimzahlen auf gesundheitsgefährdende Werte beobachtet werden konnte.

In den schnellgereiften Rohwürsten mit Glucono-delta-lacton war in Folge der sehr schnellen Absenkung des pH-Wertes keine Vermehrung der pathogenen Infektionserreger möglich. Als besonders vorteilhaft erwies sich hier ein Temperaturerhöhungsschritt auf 25 °C zwischen dem Reifetag 4 und 6. So konnten die Keime von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. deutlich schneller unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g, im Vergleich zu einem herkömmlichen Reifeprogramm gesenkt werden. Für *Listeria monocytogenes* konnte eine Abnahme der Keimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen festgestellt werden, jedoch blieben die Keimzahlen immer über den geforderten Werten von 100 KbE/g.

In den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Produkten konnte eine völlige Abwesenheit der Keime von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. im Schnitt nach einer 42-tägigen Reifung erreicht

werden. Obwohl die Chargen ohne Nitrit vor allem in den ersten drei Reifetagen eine Vermehrung der eingepfunden Salmonellen zuließen, nahm die Zellzahl mit zunehmender Reifung in Folge der zunehmenden Abtrocknung ab. *Listeria monocytogenes* erwies sich in allen Untersuchungen als widerstandsfähiger Keim mit einer hohen Tenazität. So konnte in den Chargen ohne Nitrit eine Vermehrung innerhalb der ersten drei Tage festgestellt werden.

Diese ersten Reifetage sind für das Produkt Rohwurst entscheidend, da hier die stabilisierenden Faktoren wie niedriger a_w - und pH-Wert noch nicht ausgeprägt sind. Hier verhinderte Nitrit sehr effektiv ein Wachstum der pathogenen Bakterien.

Eine Senkung der Keimdichte unter 100 KbE/g war jedoch für *Listeria monocytogenes* in keinem der beiden Produkte möglich.

Trotz der vergleichsmäßig schnellen Anhebung des pH-Wertes in Folge des Wachstums der Edelschimmelpilzkulturen konnte sowohl am Rand als auch in der Mitte des Produktes kein erhöhtes mikrobielles Risiko im Vergleich zu einer langgereiften Rohwurst festgestellt werden.

Ausschlaggebend dafür dürfte die Anwesenheit von Nitrit und der Abfall des pH-Wertes auf Werte um 5,2 gewesen sein. Diese beiden Hürden verhinderten ein Wachstum der zugesetzten Infektionserreger. Mit weiter voran schreitender Reifung nahm der Wasseraktivitätswert auf Werte unter 0,94 ab. Dieser stellt vor allem für gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. eine wichtige Grenze dar, da unterhalb dieses Wertes kaum noch eine Vermehrung möglich ist (vgl. Tab. 23 und 24). Auch für *Listeria monocytogenes* sind die Generationszeiten unter diesen Bedingungen sehr lang. Da es sich hier aber um einen kontinuierlichen Prozess handelt und der Organismus sich ständig an die sich ändernden Bedingungen anpassen muss, war auch für den sonst so robusten Keim ein Wachstum nicht möglich. Jedoch konnte *Listeria monocytogenes* im Gegensatz zu den beiden anderen auch unter diesen extremen Bedingungen bei einem a_w -Wert von 0,85 – 0,8 bis zum Tag 84 überleben.

Damit erwies sich *Listeria monocytogenes* als ein widerstands- und anpassungsfähiger Keim im Lebensmittel. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass höhere Reifetemperaturen von 25 °C den Ergebnissen zu Folge kein mikrobiologisches Risiko darstellen, sondern führen, zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt, zu einer vergleichsweise stärkeren Abnahme der Keimdichte der getesteten Zoonoseerreger.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine Zugabe von 100 mg/kg Natriumnitrit völlig ausreichend ist, um eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. in den wichtigsten Rohwurstzeugnissen zu verhindern. Im Gegensatz zu den kurzgereiften streichfähigen, den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwürsten kann in den mit Glucono-delta-lacton hergestellten Produkten auf den Zusatz von Natriumnitrit komplett verzichtet werden. In diesen Produkten war über den gesamten Versuchszeitraum keine Vermehrung der Infektionserreger möglich. *Listeria monocytogenes* erwies sich als ein sehr widerstandsfähiger Keim, der in keinem der getesteten Produkte in der zugesetzten Inokulumhöhe vollständig eliminiert werden konnte. Dennoch

ist vor allem in den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwürsten bei Beachtung der üblichen Hygienevorschriften und bei Verwendung von Ausgangsmaterial mit sehr guter Qualität eine sichere und hygienische Herstellung von Produkten ohne den Zusatzstoff Natriumnitrit möglich. Jedoch sollte auf eine ausreichende Reifezeit geachtet werden. Die Ergebnisse der Challengeversuche wurden in den Tabellen 29 und 30 vereinfacht dargestellt.

Tab.29: Vereinfachte Darstellung des Verhaltens von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter dem Einfluss von Natriumnitrit (100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) in einer schnellgereifte streichfähigen und einer schnellgereiften schnittfesten Rohwurst unter Verwendung zweier verschiedener Reifeprogramme

Schnellgereifte streichfähige Rohwurst

Mikroorganismus	Zeitpunkt	Standardreifeprogramm				Alternatives Reifeprogramm			
		Natriumnitrit				Natriumnitrit			
		0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
<i>Listeria monocytogenes</i>	Reifetag 2	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
<i>Escherichia coli</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↔	↔	↔	↔	↓	↓	↓	↓
<i>Salmonella spec.</i>	Reifetag 2	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↑	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↔	↓	↓	↓	↔	↓	↓	↓

Schnellgereifte schnittfähige Rohwurst

Mikroorganismus	Zeitpunkt	Standardreifeprogramm				Alternatives Reifeprogramm			
		Natriumnitrit				Natriumnitrit			
		0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg	0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
<i>Listeria monocytogenes</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>Escherichia coli</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
<i>Salmonella spec.</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 6)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 28)	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

↑ Zunahme der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

↔ Keine Veränderung der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

↓ Abnahme der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

- Keimzahl um mehr 2 log₁₀ Stufen über der Nachweisgrenze von 10 KbE/g
- Keimzahl um max 1 log₁₀ Stufen über der Nachweisgrenze von 10 KbE/g
- Keimzahl unter der Nachweisgrenze von 10 KbE/g

Tab.30: Vereinfachte Darstellung des Verhaltens von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter dem Einfluss von Natriumnitrit (100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) in einer lang – und einer schimmelpilzgereiften Rohwurst

Langgereifte Rohwurst

Mikroorganismus	Zeitpunkt	Natriumnitrit			
		0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
<i>Listeria monocytogenes</i>	Reifetag 2	↑	↔	↔	↔
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↓	↓	↓	↓
<i>Escherichia coli</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↓	↓	↓	↓
<i>Salmonella spec.</i>	Reifetag 2	↑	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↓	↓	↓	↓

Schimmelpilzgereifte Rohwurst

Mikroorganismus	Zeitpunkt	Natriumnitrit			
		0 mg/kg	100 mg/kg	150 mg/kg	200 mg/kg
<i>Listeria monocytogenes</i>	Reifetag 2	↑	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↔	↔	↔	↔
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↔	↔	↔	↔
<i>Escherichia coli</i>	Reifetag 2	↓	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↓	↓	↓	↓
<i>Salmonella spec.</i>	Reifetag 2	↑	↓	↓	↓
	Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 42)	↓	↓	↓	↓
	Ende des Versuchszeitraums (Tag 84)	↓	↓	↓	↓

↑ Zunahme der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

↔ Keine Veränderung der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

↓ Abnahme der Keimzahl im Vergleich zum vorherigen Messtag

	Keimzahl um mehr 2 log ₁₀ Stufen über der Nachweisgrenze von 10 KbE/g
	Keimzahl um max 1 log ₁₀ Stufen über der Nachweisgrenze von 10 KbE/g
	Keimzahl unter der Nachweisgrenze von 10 KbE/g

6. Empfehlung

Auf Grund der vorliegenden Untersuchung ist der Einsatz von Natriumnitrit unbedingt in schnellgereiften streichfähigen Produkten zu empfehlen, da es ansonsten bei einer Belastung der Rohmaterialien zu einem sehr schnellen Anstieg der Keimdichte der pathogenen Lebensmittelinfektionserreger kommt. Dieser Anstieg ist gesundheitsgefährdend und stellt ein zu vermeidendes Risiko für den Hersteller von Rohwurstwaren dar. Der Zusatz von Natriumnitrit kann, wie die Challengeversuche zeigen, auf die von uns untersuchte Nitritkonzentration von 100 mg/kg reduziert werden, da diese Menge für die Herstellung eines hygienisch einwandfreien Produktes völlig ausreichend war.

Die schnellgereifte Rohwurst mit GdL ist mikrobiologisch gesehen ein sehr stabiles Produkt, da der schnelle Abfall des pH-Wertes keine Vermehrung der einzelnen Mikroorganismen zuließ. Hier kann auf den Zusatz von Nitrit verzichtet werden.

Durch die Anpassung des Reifeprogramms könnten Bakterien der Gattungen *Salmonella* und *Escherichia* schnell und effizient in den Produkten abgetötet werden. Dazu wäre es nötig, die Temperatur nach dem 3. Reifetag auf Werte von 24 bis 25 °C zu erhöhen. Auch hinsichtlich der Belastung des Ausgangsmaterials mit Listerien lässt sich dieses Verfahren gut anwenden, um zumindest eine Reduktion der Keime von 1 log₁₀ KbE/g zu erreichen.

In langgereiften luftgetrockneten Rohwürsten sollte auf den Zusatz von Natriumnitrit (100 mg/kg) nicht verzichtet werden. Zwar konnten auch in den nitritfreien Produkten gute Ergebnisse bei entsprechender Reifezeit erzielt werden, jedoch kann eine Kontamination des Ausgangsmaterials mit *Listeria monocytogenes* nicht ausgeschlossen werden. Dieser Mikroorganismus könnte sich somit auf Keimmengen von mehr als 100 KbE/g in den ersten zwei Tagen vermehren. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, ist es sehr schwer die Listerien, wenn sie sich erst einmal vermehrt haben, aus dem Produkt zu entfernen. Dieses Risiko sollte daher durch den Zusatz von Nitrit minimiert werden.

Zwischen einer langgereiften Rohwurst und einer mit Edelschimmel hergestellten konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der mikrobiellen Stabilität gefunden werden. Daher wird auch bei diesem Produkt ein Zusatz von 100 mg/kg empfohlen, da eine Belastung des Ausgangsmaterials mit Listerien nicht ausgeschlossen werden kann.

Die mikrobiologische Stabilität eines Lebensmittels sollte immer durch die Durchführung eines Challenge-tests beurteilt werden. Die *in vitro* Versuche zeigten zwar unter den jeweiligen getesteten Bedingungen Tendenzen an, wie sich ein Mikroorganismus verhalten wird und z.T. konnten gemachte Beobachtungen zur schnelleren Abtötung in das Produkt Rohwurst übertragen werden (metabolische Erschöpfung), aber dennoch wurden z.T. während der dynamischen Prozesse bei der Rohwurstreifung andere Ergebnisse erzielt (z.B. *Listeria monocytogenes*) als in den *in vitro* Versuchen. *In vitro* Versuche sind geeignet für die Beschreibung von „worst case“ Szenarien.

Weiterhin wird grundsätzlich empfohlen, auf eine ausreichende Betriebshygiene und auf Verwendung von Ausgangsmaterialien mit ausgezeichneter Qualität zu achten. Denn während Salmonellen und

enterohämorrhagische *Escherichia coli*, die zu einem geringen Prozentsatz in den Rohmaterialien vorkommen können, relativ schnell im Verlauf der Reifung abgetötet werden, stellt *Listeria monocytogenes* die fleischverarbeitenden Betriebe vor Probleme. Kommen noch eine ungenügende Betriebshygiene, eine ungenügende Qualität der Rohmaterialien und Reifefehler zusammen, kann sich *Listeria monocytogenes* auf gesundheitsgefährdende Keimzahlen vermehren. Diese können anschließend nicht durch die derzeit angewandten Technologien zuverlässig bis zur Abgabe an den Verbraucher eliminiert werden.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den erreichten Zielen

7.1 Geplante Ziele

Das Ziel des Projektes war die wissenschaftliche Überprüfung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Nitrit in Rohwurstzeugnissen. Dazu sollte zunächst in der ersten Phase des Projektes die Kinetik des Wachstums/ das Absterben der lebensmittelrelevanten Mikroorganismen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. in flüssigen Kulturmedien untersucht werden. In der zweiten Phase wurden Rohwurstprodukte mit den Lebensmittelinfektionserregern artifiziell belastet und das Verhalten der Keime unter dem Einfluss variabler Faktoren und unter praxisüblichen Reifungsverfahren in entsprechenden Klimakammern überprüft. Aus der Gesamtheit der Daten sollen Empfehlungen und Maßnahmen für einen sinnvollen Einsatz bzw. Nichteinsatz von Nitrit in der Lebensmittelindustrie abgeleitet werden.

Das Projekt verfolgte zum Erreichen des Gesamtzieles folgende Arbeitsziele:

- Entwicklung und Etablierung eines geeigneten Nachweisverfahrens/Messsystems zur Testung der mikrobiologischen Wirkmechanismen von Nitrit
- Modelluntersuchungen mit *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon
- Modelluntersuchungen mit *Escherichia coli* in EC-Bouillon
- Modelluntersuchungen mit *Salmonella* spp. in Peptonwasser
- Modelluntersuchungen zur Wechselwirkung anderer Faktoren mit den Wirkmechanismen von Nitrit
- Ermittlung der quantitativen und qualitativen Ergebnisse aus der ersten Phase, als Grundlage für den zweiten Untersuchungsabschnitt (Challengetest)
- Artifizielle Belastung einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst mit Lebensmittelinfektionserregern,
- Artifizielle Belastung einer schnellgereiften schnittfähigen Rohwurst mit Lebensmittelinfektionserregern,
- Artifizielle Belastung einer langgereiften schnittfähigen Rohwurst mit Lebensmittelinfektionserregern,
- Artifizielle Belastung einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst mit Lebensmittelinfektionserregern,
- Untersuchung verschiedener Reifeprogramme, insbesondere Verfahren, die eine metabolische Erschöpfung von pathogenen Mikroorganismen hervorrufen können

7.2 Erreichte Ziele

Die Arbeiten am Forschungsprojekt resultierten in folgenden Ergebnissen:

1. Es wurde ein geeignetes Nachweisverfahren/Messsystem zur Testung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Nitrit in flüssigen Kulturmedien etabliert.
2. Durchführung von Modelluntersuchungen mit *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter Einbeziehung einer multifaktoriellen Betrachtungsweise (pH-Wert, a_w -Wert, Nitritkonzentration, Temperatur und Redoxwert).
3. Durchführung von Challenge-tests in vier verschiedenen Rohwurstprodukten mit *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. unter dem Einfluss variabler Faktoren (pH-Wert, a_w -Wert, Natriumnitritkonzentration, Reifetemperatur, Starterkulturen, Edelschimmelpilzkulturen) und unter praxisüblichen Reifungsverfahren.
4. Die erarbeiteten Ergebnisse stellen eine der umfangreichsten Datensammlungen zu Natriumnitrit und *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. der jüngeren Zeit dar.
5. Es konnte gezeigt werden, dass die generelle Annahme, dass Natriumnitrit eine antimikrobielle Wirkung besitze, nicht zutrifft. Nitrit hat nur unter ganz bestimmten Bedingungen eine keimhemmende Wirkung.
6. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass Natriumnitrit auf bestimmte Stämme von *Listeria monocytogenes* bei einem pH-Wert von 7 sogar eine stimulierende Wirkung hat.
7. Mit abnehmenden pH-Wert konnte eine zunehmende antimikrobielle Wirkung von Natriumnitrit im Kulturmedium nachgewiesen werden.
8. *Listeria monocytogenes* konnte in keinem Challengeversuch aus den Rohwurstprodukten entfernt werden. Nur mit Hilfe des Zusatzstoffes Nitrit konnte eine Vermehrung verhindert werden.
9. *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. stellen in langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwurstprodukten bei Beachtung der Hygienevorschriften und der Reifezeit kein Problem dar.
10. Es konnte gezeigt werden, dass *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. in den verschiedenen Produkten während der Reifezeit sehr empfindlich auf einen Temperaturerhöhungsschritt (metabolische Erschöpfung) reagieren.
11. Der Zusatz von Natriumnitrit könnte auf 100 mg/kg begrenzt werden, da in den Challengeuntersuchungen zwischen den einzelnen zugesetzten Nitritkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Entscheidend war allein die Anwesenheit des Zusatzstoffes.
12. Ein Verzicht auf Natriumnitrit kann nicht empfohlen werden, da eine Anwesenheit von *Listeria monocytogenes* im Rohmaterial nicht ausgeschlossen werden kann und damit eine Vermehrung vor allem in den ersten beiden kritischen Reifetagen auf gesundheitsgefährdende Keimdichten nicht unterbunden werden kann.

13. *Escherichia coli* reagierte empfindlich gegenüber den in fermentierten Rohwürsten vorherrschenden Bedingungen, eine Ausnahme war jedoch die kurzgereifte streichfähige Rohwurst. -> ein Zusatz von Natriumnitrit war nicht notwendig
14. *Salmonella* spp. erwies sich gegenüber den äußeren Bedingungen in einer Rohwurst ebenfalls als sehr empfindlich, eine Ausnahme bildete erneut die kurzgereifte streichfähige Rohwurst. -> ein Zusatz von Nitrit war notwendig, um eine Vermehrung innerhalb der ersten zwei Reifetage zu verhindern
15. *Listeria monocytogenes* war ein sehr robuster Keim, der selbst durch die sehr starke Abtrocknung in den langgereiften sowie durch die schnelle pH-Wert Absenkung in den schnellgereiften schnittfesten Rohwurstprodukten nicht unter den geforderten Grenzwert von 100 KbE/g gesenkt werden konnte. -> Von diesem Keim geht somit die größte Gefahr für das Produkt fermentierte Rohwurst aus
16. Es konnte gezeigt werden, dass eine elektronenmikroskopische sichtbare Schädigung durch Nitrit nur bei *Listeria monocytogenes* und dies nur bei einem pH-Wert von 7 und einem hohen a_w -Wert beobachtet werden konnte. Ansonsten schienen die Zellen nur durch den pH-Wert bzw. durch den sinkenden Wasseraktivitätswert in Ihrer Gestalt beeinflusst zu werden. Unseres Wissens nach ist dies die weltweit erste elektronenmikroskopische Untersuchung des Einflusses von Natriumnitrit auf die Zelloberfläche von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp..

7.3 Vergleich der geplanten und der erreichten Ziele, weitergehende Fragestellungen

Alle der ursprünglich geplanten Ziele wurden erreicht. Somit wurde das Ziel der wissenschaftlichen Überprüfung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Nitrit in Rohwurstherzeugnissen verwirklicht. Die durchgeführten Modell- und Challengeuntersuchungen mit den lebensmittelrelevanten Mikroorganismen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. stellen eine der umfangreichsten Datensammlungen der jüngeren Zeit dar. Sie dokumentieren, dass Nitrit keine generelle antimikrobielle Wirkung besitzt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich Natriumnitrit unter den in der Rohwurst vorherrschenden Bedingungen positiv auf die hygienische Stabilität des Produktes auswirkt. Es ist letztlich entscheidend, unter welchen äußeren Bedingungen der Zusatzstoff verwendet wird.

Weiterhin wurden in dem Projekt, durch die Testung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit in einem flüssigen Kulturmedium die Grundlagen geschaffen, Änderungen im Metabolismus bzw. im Virulenzverhalten des Mikroorganismus durch die Analyse der Stoffwechselprodukte bzw. des Genexpressionsmusters zu erfassen. Damit wäre es möglich, Aussagen zu treffen, warum *Listeria monocytogenes* in Anwesenheit von Nitrit bei einem pH-Wert von 7 ein besseres Wachstum zeigt als die Negativkontrolle. Nutzt der Stamm hier Nitrit unter anaeroben Bedingungen als terminalen E-Akzeptor im Gegensatz zur Negativkontrolle, die unter diesen Bedingungen nur in der Lage sein dürfte, die energetisch ungünstigere Gärung durchzuführen? Oder ist für diese Beobachtung eine ganz andere Erklärung heranzuziehen? Hierzu ist es erforderlich, dass abschließende

molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Ziel ist es, die verwendeten Stämme zu sequenzieren und anschließend einer genomischen Vergleichsanalyse zu unterziehen. Diese Arbeiten werden unabhängig von der vorliegenden Studie am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (MRI, Kulmbach) in Zusammenarbeit mit der TU-München – Abteilung Mikrobielle Ökologie durchgeführt und entsprechende Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ein niedrigerer Zusatz von Natriumnitrit für ein hygienisch stabiles Produkt ausreichend wäre. Zu überprüfen wäre hier z.B. eine Konzentration von 80 mg/kg, die auch als Richtwert für Produkte unter ökologischen Gesichtspunkten hergestellt wurden. Weiterhin sollte das Phänomen der metabolischen Erschöpfung vor allem auf molekularbiologischer Ebene charakterisiert werden. Da diese Beobachtung bis jetzt in der Literatur nur empirisch beschrieben ist und der Einsatz einer Temperaturerhöhung ein hohes Potential hinsichtlich einer verkürzten Reifezeit und einer schnelleren Erreichung eines mikrobiologisch stabilen Produktes aufweist. Parallel dazu sollten Challengeversuche auch mit einer langgereiften- und Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst, unter dem Gesichtspunkt einer metabolischen Erschöpfung durchgeführt werden, beide konnten aus Zeitgründen im Rahmen dieses Forschungsprojektes nicht verwirklicht werden.

8. Literaturverzeichnis

- Addiscott, T. M. and N. Benjamin. 2004. Nitrate and human health. *Soil Use and Management* 20:98-104.
- Albert T. 2003. Untersuchungen zur Vermehrungsfähigkeit und Absterbekinetik von *Listeria monocytogenes* in streichfähiger Rohwurst. Diss. med. Vet. LMU München.
- Albert, T., M. Gareis, and L. Krockel. 2003. Microbiological quality of organically produced meat products. *Fleischwirtschaft* 83:147-150.
- Albihn, A., E. Eriksson, C. Wallen, and A. Aspan. 2003. Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157: H7 a nationwide Swedish survey of bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica* 44:43-52.
- Alexander, E. R., J. Boase, M. Davis, L. Kirchner, C. Osaki, T. Tanino, M. Samadpour, P. Tarr, M. Goldoft, S. Lankford, J. Kobayashi, P. Stehr-Green, P. Bradley, B. Hinton, P. Tighe, B. Pearson, G. R. Flores, S. Abbott, R. Bryant, S. B. Werner, and D. J. Vugia. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report*: 44 (9) 157-160 44:157-160.
- Antal, E. A., H. R. Hogasen, L. Sandvik, and J. Maehlen. 2007. Listeriosis in Norway 1977-2003. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 39:398-404.
- Arneth, W. 2001. Chemistry of curing meat flavour. *Fleischwirtschaft* 81:85-87.
- Balaban, N. and A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 61:1-10.
- Barlow, R. S., K. S. Gobius, and P. M. Desmarchelier. 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study. *International Journal of Food Microbiology* 111:1-5.
- Bassett, J. and P. McClure. 2008. A risk assessment approach for fresh fruits. *Journal of Applied Microbiology* 104:925-943.
- Bianchi, D., S. Gallina, B. Sona, M. Gennero, L. Masoero, M. Belvedere, and L. Decastelli. 2007. *Salmonella* and pig herds and pork production chain: microbiological isolation and serological prevalence. *Large Animal Review* 13.
- Birzele, B., S. Djordjevic, and J. Kramer. 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. *Food Control* 16:695-699.
- Bizani, D., J. A. C. Morrissy, A. P. M. Dominguez, and A. Brandelli. 2008. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *International Journal of Food Microbiology* 121:229-233.
- Bowman, A. S., C. Glendening, T. E. Wittum, J. T. LeJeune, R. W. Stich, and J. A. Funk. 2007. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms. *Journal of Food Protection* 70:11-16.
- Brooks, B. W., M. B. Perry, C. L. Lutze-Wallace, and L. L. MacLean. 2008. Structural characterization and serological specificities of lipopolysaccharides from *Salmonella enterica* serovar Gallina-

- rum biovar Pullorum standard, intermediate and variant antigenic type strains. *Veterinary Microbiology* 126:334-344.
- Bruningfann, C. S. and J. B. Kaneene. 1993. The Effects of Nitrate, Nitrite and N-Nitroso Compounds on Human Health - A Review. *Veterinary and Human Toxicology* 35:521-538.
- Cabellos, C., P. F. Viladrich, J. Ariza, J. M. Maiques, R. Verdaguer, and F. Gudiol. 2008. Community-acquired bacterial meningitis in cirrhotic patients. *Clinical Microbiology and Infection* 14:35-40.
- Chapman, P. A., C. A. Siddons, A. T. C. Malo, and M. A. Harkin. 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection* 119:245-250.
- Chattopadhyay, M. K. 2008. Adaptation of *Listeria monocytogenes* to low temperature and high salt. *Current Science* 94:301-302.
- Chinen, I., J. D. Tanaro, E. Miliwebsky, L. H. Lound, G. Chillemi, S. Ledri, A. Baschkier, M. Scarpin, E. Manfredi, and M. Rivas. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157 : H7 from retail meats in Argentina. *Journal of Food Protection* 64:1346-1351.
- Clarke, T. A., G. L. Kemp, J. H. Van Wonderen, R. M. A. S. Doyle, J. A. Cole, N. Tovell, M. R. Cheesman, J. N. Butt, D. J. Richardson, and A. M. Hemmings. 2008. Role of a conserved glutamine residue in tuning the catalytic activity of *Escherichia coli* cytochrome c nitrite reductase. *Biochemistry* 47:3789-3799.
- Colak, H., H. Hampikyan, B. Ulusoy, and E. B. Bingol. 2007. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control* 18:30-32.
- Dambrosio, A., N. Quaglia, G. Normanno, V. Lorusso, G. Celano, V. C. d'Angella, G. Germinario, R. Abenante, and G. Mula. 2007. Short seasoned sausages: commercial and microbiological-sanitary quality. *Industria Alimentari* 46.
- Davis, M. A., T. E. Besser, K. Eckmann, J. K. MacDonald, D. Green, D. D. Hancock, K. N. K. Baker, L. D. Warnick, Y. Soyer, M. Wiedmann, and D. R. Call. 2007. Multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium, Pacific Northwest, United States. *Emerging Infectious Diseases* 13:1583-1586.
- de Cesare, A., R. Mioni, and G. Manfreda. 2007. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. *International Journal of Food Microbiology*: 120 (1-2, 20th International ICFMH Symposium on FOOD Microbiology 2006) 124-130 120:124-130.
- Duche, O. and J. Labadie. 2003. Effect of NaCl pretreatment on the growth and survival of *Listeria monocytogenes* at high osmolarity. *Sciences des Aliments* 23:284-292.
- Durfee, T., A. M. Hansen, H. Zhi, F. R. Blattner, and D. J. Jin. 2008. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190:1084-1096.
- EFSA. 2003. The effects of nitrites/nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal* 14:1-31.
- Evans, M. R., R. L. Salmon, L. Nehaul, S. Mably, L. Wafford, M. Z. Nolan-Farrell, D. Gardner, and C. D. Ribeiro. 1999. An outbreak of *Salmonella* typhimurium DT170 associated with kebab meat and yoghurt relish. *Epidemiology and Infection* 122:377-383.
- Fang, F. C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* 100:S43-S50.

- Farber, J. M., G. W. Sanders, and M. A. Johnston. 1989. A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* Species. *Journal of Food Protection* 52:456-458.
- Fischer, A., K. Ulmer, G. Wolf, and A. Bristle. 2005. Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt 2. Influence on microbial growth, shelf life and sensory properties. *Fleischwirtschaft* 85:106-109.
- Flemming, H. C., T. R. Neu, and D. J. Wozniak. 2007. The EPS matrix: The "House of Biofilm cells". *Journal of Bacteriology* 189:7945-7947.
- Flores, N., A. Escalante, R. de Anda, J. L. Baez-Viveros, E. Merino, B. Franco, D. Georgellis, G. Gosset, and F. Bolivar. 2008. New insights into the role of sigma factor RpoS as revealed in *Escherichia coli* strains lacking the phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase system. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14:176-192.
- Fontain, M. C. G., J. M. Lorenzo, S. Martinez, I. Franco, and J. Carballo. 2007. Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *Lwt-Food Science and Technology* 40:1610-1622.
- Francois, K., A. Valero, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe, J. Debevere, R. M. Garcia-Gimeno, G. Zurera, and F. Devlieghere. 2007. Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes*, cultured at refrigeration temperatures. *Food Microbiology* 24:32-43.
- Friesen, C., I. Hill, and C. Woods. 2008. *Salmonella* gastroenteritis mimicking onset of inflammatory bowel disease in children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 46:84-86.
- Gallien, P., H. Richter, H. Klie, M. Timm, S. Lehmann, K. W. Perlberg, H. Karch, P. Teufel, and D. Protz. 1999. Detection of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in foods and characterization of isolates. *Fleischwirtschaft* 79:124-128.
- Gandhi, M. and M. L. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.
- Gerhardt, P. N. M., L. T. Smith, and G. M. Smith. 1996. Sodium-driven, osmotically activated glycine betaine transport in *Listeria monocytogenes* membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* 178:6105-6109.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-Del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
- Gobat, P. F. and T. Jemmi. 1990. Epidemiologic Studies on *Listeria* Spp. in Slaughterhouses. *Fleischwirtschaft* 70:1448-1450.
- Gobert, A. P., M. Vareille, A. L. Glasser, T. Hindre, T. de Sablet, and C. Martin. 2007. Shiga toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* inhibits PI3K/NF-kappa B signaling pathway in globotriaosylceramide-3-negative human intestinal epithelial cells. *Journal of Immunology* 178:8168-8174.

- Gonzalez, C. A., E. Riboli, J. Badosa, E. Batiste, T. Cardona, S. Pita, J. M. Sanz, M. Torrent, and A. Agudo. 1994. Nutritional Factors and Gastric-Cancer in Spain. *American Journal of Epidemiology* 139:466-473.
- Grif, K., D. Orth, I. Lederer, C. Berghold, S. Roedl, C. J. Mache, M. P. Dierich, and R. Wurzner. 2005. Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 24:268-271.
- Gualdi, L., L. Tagliabue, and P. Landini. 2007. Biofilm formation-gene expression relay system in *Escherichia coli*: Modulation of sigma(s)-dependent gene expression by the CsgD regulatory protein via sigma(s) protein stabilization. *Journal of Bacteriology* 189:8034-8043.
- Haraga, A., M. B. Ohlson, and S. I. Miller. 2008. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology* 6:53-66.
- Hechelmann, H., Z. Bem, K. Uchida, and L. Leistner. 1974. Microorganisms of the Klebsiellae tribe in refrigerated meat and products. *Fleischwirtschaft*: 54 (9) 1515-1517 54:1515-1517.
- Honikel, K. O. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* 78:68-76.
- Hopkins, K. L., M. J. Batchelor, M. Anjum, R. H. Davies, and E. J. Threlfall. 2007. Comparison of antimicrobial resistance genes in nontyphoidal *Salmonellae* of serotypes Enteritidis, Hadar, and Virchow from humans and food-producing animals in England and Wales. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* 13:281-288.
- Jansen, A., C. Frank, R. Prager, H. Oppermann, and K. Stark. 2005. Nation-wide outbreak of *Salmonella* give in Germany, 2004. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 43:707-713.
- Jordan, S., M. I. Hutchings, and T. Mascher. 2008. Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *Fems Microbiology Reviews* 32:107-146.
- Kamber, U., H. I. Gokce, and M. Elmali. 2007. *Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey. *Food Additives and Contaminants* 24:673-678.
- Kempf, B. and E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* 170:319-330.
- Klettner, P. G. and K. Troeger. 2000. Technology of processing fermented sausage and cooked sausage with reduced nitrite addition. *Fleischwirtschaft* 80:82-85.
- Koch, J. and K. Stark. 2006. Significant increase of listeriosis in Germany - epidemiological patterns 2001-2005. *Eurosurveillance*: 11 (6) 85-88 11:85-88.
- Kofoth, C. M. 1999. Überlebens- und Wachstumsfähigkeit von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Rohwurstzeugnissen. Diss. med. vet. LMU München.
- Lahti, E., T. Johansson, T. Honkanen-Buzalski, P. Hill, and E. Nurmi. 2001. Survival and detection of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiology* 18:75-85.
- Le Marrec, C., E. Bon, and A. Lonvaud-Funel. 2007. Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants. *International Journal of Food Microbiology* 115:335-342.

- Lebert, I., S. Leroy, P. Giammarinaro, A. Lebert, J. P. Chacornac, S. Bover-Cid, M. C. Vidal-Carou, and R. Talon. 2007. Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science* 76:112-122.
- Lee, S. Y., M. S. Lee, R. P. Cherla, and V. L. Tesh. 2008. Shiga toxin 1 induces apoptosis through the endoplasmic reticulum stress response in human monocytic cells. *Cellular Microbiology* 10:770-780.
- Leistner, L. 1992. Food Preservation by Combined Methods. *Food Research International* 25:151-158.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181-186.
- Lianou, A. and J. N. Sofos. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection* 70:2172-2198.
- Liteplo, R. G. and M. E. Meek. 2001. N-nitrosodimethylamine: Hazard characterization and exposure-response analysis. *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 19:281-304.
- Little, C. L., J. R. Rhoades, L. Hucklesby, M. Greenwood, S. Surman-Lee, F. J. Bolton, R. Meldrum, I. Wilson, C. McDonald, E. de Pinna, E. J. Threlfall, and C. H. Chan. 2008. Survey of *Salmonella* contamination of raw shell eggs used in food service premises in the United Kingdom, 2005 through 2006. *Journal of Food Protection* 71:19-26.
- Lücke, F. K. 1999. Assessment of the technological necessity of the use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. *Fleischwirtschaft* 79:96-98.
- Lücke, F. K. 2003b. Use of nitrite and nitrate in the processing of meat from organic production - benefits and risks. *Fleischwirtschaft* 83:138-142.
- Lücke, F. K. 2003a. Use of nitrite and nitrate in the processing of meat from organic production - benefits and risks. *Fleischwirtschaft* 83:138-142.
- Lyautey, E., A. Hartmann, F. Pagotto, K. Tyler, D. R. Lapen, G. Wilkes, P. Piveteau, A. Rieu, W. J. Robertson, D. T. Medeiros, T. A. Edge, V. Gannon, and E. Topp. 2007a. Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Canadian Journal of Microbiology* 53:1158-1167.
- Lyautey, E., D. R. Lapen, G. Wilkes, K. McCleary, F. Pagotto, K. Tyler, A. Hartmann, P. Piveteau, A. Rieu, W. J. Robertson, D. T. Medeiros, T. A. Edge, V. Gannon, and E. Topp. 2007b. Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5401-5410.
- Mainil, J. G. and G. Daube. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology* 98:1332-1344.
- Marino, M., T. Hoffmann, R. Schmid, H. Mobitz, and D. Jahn. 2000. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology-Sgm* 146:97-105.
- Marino, M., H. C. Ramos, T. Hoffmann, P. Glaser, and D. Jahn. 2001. Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by arfM (ywiD). *Journal of Bacteriology* 183:6815-6821.

- Mason, B. W., N. Williams, R. L. Salmon, A. Lewis, J. Price, K. M. Johnston, and R. M. Trott. 2001. Outbreak of *Salmonella* Indiana associated with egg mayonnaise sandwiches at an acute NHS hospital. *Communicable Disease and Public Health*: 4 (4) 300-304 4:300-304.
- Messelhauser, U., H. Schreiner, G. Schulze, A. Sing, and U. Busch. 2007. Detection of STEC/EHEC in meat, meat products and environmental samples within the scope of the official monitoring. *Fleischwirtschaft* 87.
- Much, P., J. Pichler, and F. Allerberger. 2007. Food borne infectious outbreaks, Austria 2005. *Wiener Klinische Wochenschrift* 119:150-157.
- Nakano, M. M., H. Geng, S. Nakano, and K. Kobayashi. 2006. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *Journal of Bacteriology* 188:5878-5887.
- Nakano, M. M., T. Hoffmann, Y. Zhu, and D. Jahn. 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis* nasDEF encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *Journal of Bacteriology* 180:5344-5350.
- Nakano, M. M. and F. M. Hulett. 1997. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. *Fems Microbiology Letters* 157:1-7.
- Nesbakken, T., K. Eckner, H. K. Hoidal, and O. J. Rotterud. 2003. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures.
- Ngbede, J. E., I. A. Jideani, and E. B. Agbo. 2007. Incidence of verocytotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* O157 : H7 isolated from diarrhoeal patients and its health implication. *Journal of Food Agriculture & Environment* 5:49-51.
- Nightingale, K. K., H. Thippareddi, R. K. Phebus, J. L. Marsden, and A. L. Nutsch. 2006. Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69:794-800.
- Nikolaev, Y. A. and V. K. Plakunov. 2007. Biofilm - "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76:125-138.
- Nilavongse, A., T. H. C. Brondijk, T. W. Overton, D. J. Richardson, E. R. Leach, and J. A. Cole. 2006. The NapF protein of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase system: demonstration of a cytoplasmic location and interaction with the catalytic subunit, NapA. *Microbiology-Sgm* 152:3227-3237.
- Nissen, H. and A. Holck. 1998b. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* 15:273-279.
- Nissen, H. and A. Holck. 1998a. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* 15:273-279.
- Novotna, R., P. Alexa, J. Hamrik, A. Madanat, J. Smola, and A. Cizek. 2005. Isolation and characterization Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157 : H7. *Veterinari Medicina* 50:111-118.
- Ogura, Y., T. Ooka, Asadulghani, J. Terajima, J. P. Nougayrede, K. Kurokawa, K. Tashiro, T. Tobe, K. Nakayama, S. Kuhara, E. Oswald, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2007. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biology* 8.

- Oh, Y. J., W. Jo, Y. Yang, and S. Park. 2007. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157 : H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 107:869-874.
- Orth, D., K. Grif, A. B. Khan, A. Naim, M. P. Dierich, and R. Wurzner. 2007. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59:235-242.
- Palmer, R. J. and P. Stoodley. 2007. Biofilms 2007: Broadened horizons and new emphases. *Journal of Bacteriology* 189:7948-7960.
- Pichner, R., H. Hechelmann, M. Gareis, and H. Steinruck. 2006. Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in conventionally and organically produced salami products. *Fleischwirtschaft* 86:112-114.
- Rasmussen, M. A., W. C. Cray, T. A. Casey, and S. C. Whipp. 1993. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters* 114:79-84.
- Rasschaert, G., K. Houf, C. Godard, C. Wildemaue, M. Pastuszczak-Frak, and L. De Zutter. 2008. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. *Journal of Food Protection* 71:146-152.
- Ray, S. D., H. Parikh, and D. Bagchi. 2005. Proanthocyanidin exposure to B6C3F1 mice significantly attenuates dimethylnitrosamine-induced liver tumor induction and mortality by differentially modulating programmed and unprogrammed cell deaths. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 579:81-106.
- Rödel, W. and R. Scheuer. 2001. Production of safe products - 1. Research into the stop of microorganisms of Teewurst by the example of *Escherichia coli*. *Fleischwirtschaft* 81:81-84.
- Rödel, W. and R. Scheuer. 2006. Behaviour of pathogenic *Escherichia coli* in short fermented spreadable raw sausage. I. The influence of internal physical and chemical parameters. *Fleischwirtschaft*: 86 (10) 119-122 86:119-122.
- Rödel, W. and R. Scheuer. 2007. Recent results on the hurdle technology - Measuring of combined hurdles. *Fleischwirtschaft* 87:111-115.
- Rödel, W., R. Scheuer, and T. Albert. 2006. Behaviour of pathogenic *Escherichia coli* in short fermented spreadable raw sausage - 2. Influence of ripening programs and additives. *Fleischwirtschaft* 86:110-115.
- Rödel, W., R. Scheuer, A. Stiebing, and P. G. Klettner. 1992. Measuring the oxygen content in meat products. *Fleischwirtschaft* 72:966-968.
- Rywotycki, R. 1997. The occurrence of nitrosamines in meat. *Medycyna Weterynaryjna* 53:726-729.
- Rywotycki, R. 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry* 101:540-548.
- rz-consult. 2000. Gutachten zur Gefährdungslage durch den Verzehr von nitrit-/nitratgepökelten Fleischwaren beim Menschen. Gutachten.
- Sartz, L., B. de Jong, M. Hjertqvist, L. Plym-Forsell, R. Alsterlund, S. Lofdahl, B. Osterman, A. Stahl, E. Eriksson, H. B. Hansson, and D. Karpman. 2008. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7

- infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*: 136 (3) 370-380 136:370-380.
- Singh, R. V., K. N. Bhilegaonkar, and R. K. Agarwal. 2005. Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *Journal of Food Safety* 25:146-156.
- Skandamis, P. N., Y. Yoon, J. D. Stopforth, P. A. Kendall, and J. N. Sofos. 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology* 25:294-303.
- Sleator, R. D., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2001. Identification and disruption of the proBA locus in *Listeria monocytogenes*: Role of proline biosynthesis in salt tolerance and murine infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2571-2577.
- Standefor, J. C., A. M. Jones, E. Street, and R. Inserra. 1979. Death Associated with Nitrite Ingestion - Report of A Case. *Journal of Forensic Sciences* 24:768-771.
- Sun-Young, L. 2004. Microbial Safety of Pickled fruits and Vegetables and Hurdle Technology. *Internet Journal of Food Safety* 4:21-32.
- Swe, K. S., G. Nagel, M. Van der Westhuizen, and A. A. Hoosen. 2008. *Salmonella typhimurium* meningitis in an adult patient with AIDS. *Journal of Clinical Pathology* 61:138-139.
- Thammavongs, B., E. Denou, G. Missous, M. Gueguen, and J. M. Panoff. 2008. Response to environmental stress as a global phenomenon in biology: The example of microorganisms. *Microbes and Environments* 23:20-23.
- Timm, M., H. Klie, H. Richter, P. Gallien, K. W. Perlberg, S. Lehmann, and D. Protz. 1999. Detection and prevalence of Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in raw sausages. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 112:385-389.
- Uyttendaele, M., S. Vankeirsbilck, and J. Debevere. 2001. Recovery of heat-stressed *E-coli* O157 : H7 from ground beef and survival of *E-coli* O157 : H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7 degrees C and 22 degrees C. *Food Microbiology* 18:511-519.
- van Loon, A. J. M., A. A. M. Botterweck, R. A. Goldbohm, H. A. M. Brants, J. D. van Klaveren, and P. A. van den Brandt. 1998. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *British Journal of Cancer* 78:129-135.
- Wieler, L. H., G. Sonjinski, T. Schlapp, K. Failing, R. Weiss, C. Menge, and G. Baljer. 2007. Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 120:296-306.
- Wieneke, A. A., D. Roberts, and R. J. Gilbert. 1993. Staphylococcal Food Poisoning in the United-Kingdom, 1969-90. *Epidemiology and Infection* 110:519-531.
- Wild. 2003. Krebs durch Konsum nitritgepökelter Fleischerzeugnisse? *Mitteilungsblatt BAFF* 162:361-367.
- Wirth, F. 1991. Restricting and dispensing with curing agents in meat-products. *Fleischwirtschaft* 71:1051-1054.
- Wood, J. M. 2007. Bacterial osmosensing transporters.

Xicohtencati-Cortes, J., V. Monteiro-Neto, M. A. Ledesma, D. M. Jordan, O. Francetic, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Clinical Investigation* 117:3519-3529.

9. Veröffentlichungen

9.1 Vorträge

1. Kolloquium an der Technischen-Universität München – Abteilung Mikrobielle Ökologie 18.04.2007
„Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage“
2. 48. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG 25.09.-28.09.2007
„Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen“
3. Kulmbacher Woche 2008 06.05.-07.05.2008
„Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen“
4. evtl. Poster „Food Micro“ 2008 01.09.-04.09.2008 Aberdeen
„Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage“

9.2 Veröffentlichungen

1. Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel – Jahresbericht 2006
„Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen“

