

Evaluierung eines neuen Agarmediums zum Nachweis Wasserstoffperoxid bildender Milchsäurebakterien

Evaluation of a novel agar medium for the detection of hydrogen peroxide producing
lactic acid bacteria

L. KRÖCKEL

Zusammenfassung

Der Nachweis der Bildung von Wasserstoffperoxid durch Fleisch assoziierte Milchsäurebakterien ist von großer Bedeutung für die Charakterisierung einzelner Stämme, die Selektion geeigneter Starter- und Schutzkulturen für verschiedene Anwendungen bei Fleisch und Fleischerzeugnissen sowie bei der Suche nach eventuellen mikrobiologischen Ursachen für unerwünschte sensorische Abweichungen. Ein für diesen Zweck vor kurzem vorgestellter neuer Nährboden („Prussian Blue“-Agar) wurde hier nun erstmals auf Fleisch relevante Milchsäurebakterien angewandt. Der PB-Agar weist H_2O_2 über die Bildung von Berliner Blau nach. Er liefert prinzipiell ähnliche Ergebnisse wie der traditionelle MnO_2 -Nährboden, ist aber sensitiver und schneller in der Herstellung und Auswertung. Eine repräsentative Auswahl von Stämmen wurde zur Evaluierung des neuen Mediums eingesetzt. Wie die Untersuchungen zeigten gibt es innerhalb der *Lactobacillus sakei/curvatus* Gruppe große Unterschiede hinsichtlich der H_2O_2 Bildung. Die Bacteriocin bildenden Stämme scheinen dabei häufig relativ schwache Peroxidbildner zu sein. Darüberhinaus erwiesen sich viele kommerzielle Starterkulturen als mehr oder weniger starke Peroxidbildner. Neuere *Lactobacillus sakei/curvatus* Feldisolate von vorverpacktem Brühwurstaufschnitt zeigten ein im Wesentlichen ähnliches Bild, wobei aber nur eines von zehn *Lb. curvatus* Isolaten als Peroxidbildner auffiel.

Summary

The demonstration of hydrogen peroxide formation by meat-borne lactic acid bacteria is of considerable importance for the characterization of individual strains, the selection of suitable starter and protective cultures for various applications for meat and meat products as well as for the search of potential microbiological causes for undesired sensory deviations. In the present study, a recently introduced novel agar medium ('Prussian Blue' Agar) was applied for the first time to lactic acid bacteria relevant to meat and meat products. The PB agar detects H_2O_2 through the formation of Prussian Blue. It principally delivers similar results as the traditional manganese dioxide agar. However, it is more sensitive, and it is also easily prepared and delivers results more quickly. A representative number of strains was used in the evaluation of the new medium.

As to the production of H_2O_2 , the study revealed large differences within the *Lactobacillus sakei/curvatus* group. The bacteriocin producers frequently seemed to be relatively weak peroxide producers, while many commercial starter cultures were recognized as more or less strong peroxide producers. More recent field isolates of *Lactobacillus sakei/curvatus* from prepackaged sliced Bologna-type sausage gave an essentially similar picture. In this case, however, only one of ten isolates of *Lb. curvatus* gave rise to a positive reaction.

Schlüsselwörter

Starter- und Schutzkulturen – Milchsäurebakterien – Peroxidbildner – Bacteriocinbildner – Wasserstoffperoxid – vorverpackter Brühwurstaufschnitt – Berliner Blau-Agar – Mangandioxid-Agar

Key Words

starter and protective cultures – lactic acid bacteria – peroxide producers – bacteriocin producers – hydrogen peroxide – prepackaged sliced Bologna-type sausage – Prussian Blue agar – manganese dioxide agar

Einleitung

In Gegenwart von Sauerstoff werden von vielen Organismen im Rahmen ihres normalen Stoffwechsels reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie Superoxidradikale (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^\cdot) gebildet. Bei aerobem Metabolismus entstehen O_2^- und H_2O_2 durch die Autoxidation respiratorischer Dehydrogenasen. In Gegenwart von zellulärem Eisen (Fe^{2+}) entstehen aus H_2O_2 äußerst reaktive Hydroxylradikale. ROS schädigen DNA und Proteine und induzieren die Peroxidation von Lipiden (IMLAY, 2003, 2008; SEGAL, 2005). Die meisten Mikroorganismen können sich aber in gewissem Umfang vor oxidativem Stress durch ROS schützen (STORZ und ZHENG, 2000). Aerobier und fakultativ anaerobe Mikroorganismen nutzen hierzu die beiden Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase.

Viele Milchsäurebakterien (MSB) können Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt O_2 abhängiger Stoffwechselwege bilden. Diese Eigenschaft kann je nach Umgebung erwünscht oder unerwünscht sein. Bei Lebens- und Futtermitteln kann dies zur Hemmung der unerwünschten Begleitflora beitragen (LÜCKE *et al.*, 1986). Das von den MSB gebildete Wasserstoffperoxid wirkt auf GRAM-positive Bakterien bakteriostatisch, auf GRAM-negative aber bakterizid (CONDON, 1987; HAMMES und HERTEL, 2009). Ein auf pH 4,0 eingestellter Kulturüberstand von *Lactococcus lactis* reduzierte *Yersinia enterocolitica* z. B. innerhalb von 60 min um 6 Zehnerpotenzen, während Staphylococci und Enterococci kaum beeinträchtigt wurden. Bei pH 5,5 war dieser Effekt allerdings eher gering (ITO *et al.*, 2003). H_2O_2 bildende MSB spielen auch eine Rolle für die Stabilisierung einer normalen Microbiota von Schleimhäuten des Menschen. Sie sind der wichtigste Verteidigungsmechanismus gegen die Kolonisierung durch unerwünschte Keime. Häufige und starke Peroxidbildner sind hier vor allem Stämme von *Lb. jensenii*, während sich *Lb. crispatus* und *Lb. gasseri* Stämme variabel verhalten (RABE und HILLIER, 2003; MARTIN und SUAREZ, 2010).

Die Bildung von H_2O_2 durch MSB erfolgt über die Oxidation von Milchsäure, NADH und/oder Pyruvat (LÜCKE *et al.*, 1986; AXELSSON, 1993; MARTY-TEYSSET *et al.*, 2000; KAWASAKI *et al.*, 2009).

Bei Darm assoziierten und freilebenden MSB wie *Lb. plantarum* und *Lb. paracasei* findet man H_2O_2 eher selten bis gar nicht (SONG *et al.*, 1999).

Andererseits sind starke Peroxidbildner äußerst unerwünschte Kontaminanten von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Auch Starter- und Schutzkulturen sollten möglichst kein Peroxid produzieren, da Peroxide auch unerwünschte Farb- und Fettveränderungen verursachen. Die H_2O_2 -Bildung ist daher auch ein Auswahlkriterium bei der Selektion von MSB als Starter- und Schutzkulturen (NIVEN *et al.*, 1957; LÜCKE *et al.*, 1986; WOLF *et al.*, 1991; MARTY-TEYSSET *et al.*, 2000; PEIRSON *et al.*, 2003; ROCHAT *et al.*, 2006).

In der Vergangenheit wurden verschiedene Nährmedien und Nachweismethoden zur Detektierung der Peroxidproduktion von MSB entwickelt (LÜCKE *et al.*, 1986; RABE und HILLIER, 2003). Eine lange Tradition im Bereich der Fleisch assoziierten MSB hat der Mangandioxid-Agar. Nicht nur die Herstellung dieses Agars ist aber relativ umständlich. Auch der Nachweis der Peroxidbildung auf diesem Agar dauert lange und hängt zudem stark von der Säuerungsleistung der Bakterien ab. Nicht zuletzt deswegen führte der Einsatz dieses Agars bei der Analyse von Rohwurstfehlern häufig zu fragwürdigen Ergebnissen, da auch reguläre Starter-MSB für Rohwurst als unerwünschte Peroxidbildner identifiziert und für den Produktfehler als ursächlich betrachtet wurden (LÜCKE *et al.*, 1986).

Vor kurzem wurde ein einfacher herzustellendes Agarmedium vorgestellt, das Peroxid bildende MSB auf der Basis der „Berliner Blau“ (*Prussian Blue*) Bildungsreaktion nachweist (SAITO *et al.*, 2007). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung dieses Mediums für die Charakterisierung Fleisch assoziierter MSB.

Material und Methoden

Nährmedien. PB-Agar auf BHI-Basis wurde im Wesentlichen so hergestellt wie bei SAITO *et al.* (2007) beschrieben. Anstelle von 'brain heart infusion' (Difco) wurde hier aber die vergleichbare Hirn-Herz-Bouillon der Fa. Merck verwendet. Der Einfachheit halber wird im folgenden die Abkürzung BHI beibehalten. Für PB-Agar auf MRS-Basis wurde anstelle des BHI-Mediums MRS-Medium mit einem pH-Wert von 6,5 eingesetzt (KRÖCKEL, 2008). Die Herstellung von Mangandioxid-Agar erfolgte wie bei LÜCKE *et al.* (1986) angegeben. Die Sensitivität des Agarmediums wurde durch Auftropfen verdünnter H₂O₂ Lösungen geprüft.

Mikroorganismen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien handelt es sich um Eigenisolate aus der Sammlung des Instituts für Sicherheit und Qualität bei Fleisch des MRI, Stämme externer Sammlungen sowie Isolate aus verschiedenen kommerziellen Starterkulturen. Stammkulturen wurden gefriergetrocknet in Magermilch bei 5 °C oder in 20 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt. Arbeitskulturen wurden in MRS-pH6,5 oder Std-I Bouillon vermehrt. Die Identität der Stämme wurde mittels mikroskopischer, biochemischer und molekulargenetischer Methoden überprüft (KRÖCKEL, 2008).

Test auf H₂O₂-Produktion. Je 10 µl einer Übernachtskultur des jeweiligen Teststammes wurden auf das vorgetrocknete Agarmedium aufgetropft. Die anschließende Inkubation erfolgte 2-3 Tage bei 30 °C unter

aeroben und/oder anaeroben Bedingungen für PB-Agar und bis zu 5 bzw. 7 Tage für den Mangandioxid-Agar. Die Durchmesser der aus den aufgetropften Übernachtskulturen hervorgegangenen Kolonien lagen zwischen 7 und 10 mm. Die Tests wurden je Stamm 1-2-mal wiederholt. Eine Blaufärbung auf PB-Agar und eine Aufhellung auf MnO₂-Agar wurde als positive Reaktion gewertet. Peroxidbildung auf MnO₂-Agar wird angenommen, wenn unter der Kolonie bzw. zusätzlich noch im Umkreis der Kolonie die MnO₂ bedingte Schwärzung des Agars verschwindet. Für die Aufhellung reicht H₂O₂ alleine nicht aus. Unter dieser Bedingung wird MnO₂ nicht oxidiert sondern es katalysiert lediglich die spontane Zersetzung des H₂O₂ zu Wasser und Sauerstoff. Erst in Kombination mit einer Ansäuerung des Mediums kommt es zu einer Aufhellung der Schwärzung. Um eine ausreichende Säuerung zu erreichen und positive Reaktionen zu erzielen, müssen die Bakterien auf den MnO₂-Platten mindestens 3-5 Tage (oft 7 Tage) wachsen (LÜCKE *et al.*, 1986).

Ergebnisse

Der PB-Agar von SAITO *et al.* ließ sich problemlos auch auf eine MRS-Basis adaptieren. Eine 2,5%ige H₂O₂ Lösung (10 µl) erzeugte auf dem PB-Agar eine Blaufärbung mit 32 mm Durchmesser. Die Nachweisgrenze lag bei 0,02 % H₂O₂. Die Empfindlichkeit gegenüber H₂O₂ war für den Nährboden mit BHI- und MRS-Basis gleich (Abb. 1).

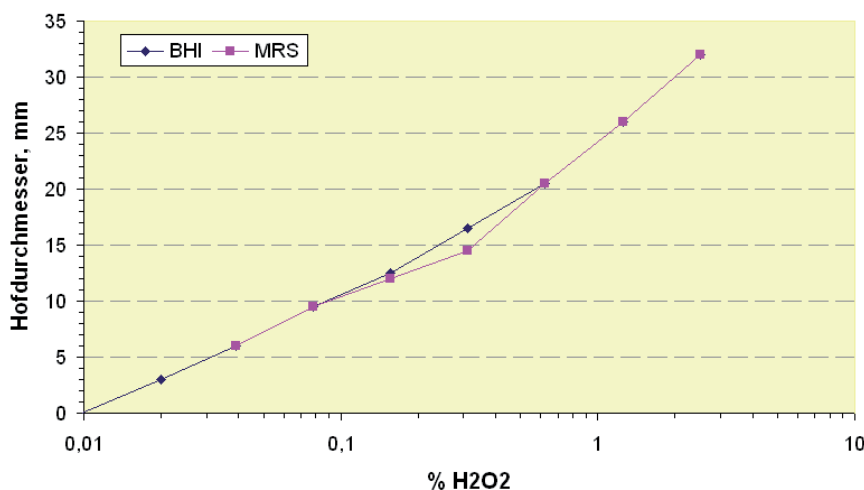


Abb. 1: Sensitivität gegen H₂O₂ von PB-Agar auf BHI- und MRS-Basis

Klassische Aerobier (*Pseudomonas putida* DSM291, *Staphylococcus carnosus* TRADI, *S. xylosus* TRADI) verhielten sich erwartungsgemäß auf PB-(BHI)-Agar stets negativ (keine Blaufärbung). Bei den Milchsäurebakterien wurden je nach Species und Stamm unterschiedliche Reaktionen beobachtet. So war der *Lactobacillus sakei* subspecies *carnosus* Typstamm DSM15831^T auf PB-Agar mit BHI-Basis stets positiv, mit MRS-Basis dagegen nur schwach positiv, auf MnO₂-Agar wieder klar positiv (ABC3 in Abb. 2). Der ehemalige *Lactobacillus curvatus* subspecies *melibiosus* Typstamm DSM15740^T (jetzt *Lb. sakei* ssp. *carnosus* Stamm DSM 15740) erwies sich dagegen auf allen Testmedien eher als H₂O₂ negativ, ebenso der ehemalige *Lb. bavaricus* Typstamm,

jetzt *Lb. sakei* DSM20494. Auch *Lactobacillus hilgardii* DSM20176^T zeigte einen durchweg negativen Befund. Bei *Carnobacterium maltaromaticum* Lb1062 waren auf PB-BHI und MnO₂-Agar sehr schwache positive Reaktionen zu vermerken, nicht aber auf PB-MRS. Bei *Lb. brevis* DSM20054^T wurden mit MnO₂-Agar negative/schwache und mit PB-Agar positive Reaktionen erhalten (vgl. Tab. 1 und Abb. 2, Tab. 2). Die getesteten *Weissella* spp. waren auf PB-Agar stark positiv (vgl. Tab. 1).

Sauerstoff unabhängige (falsch positive) Reaktionen wurden durch parallele anaerobe Inkubation ausgeschlossen. In diesem Fall waren die Reaktionen auf allen Medien negativ.

Tab. 1: Reaktion verschiedener Milchsäurebakterienarten auf PB-Agar mit BHI- oder MRS-Basis und auf MnO₂-Agar. nd, nicht bestimmt

Species	Stamm	PB	MnO ₂
<i>Lb. sakei</i> (<i>Lb. bavaricus</i>)	DSM 20494	-	nd
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>carnosus</i> (subsp. <i>melibiosus</i>)	DSM 15740	+	++
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>carnosus</i>	Lb1047	-	+
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>carnosus</i>	DSM 15831 ^T	++	++
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>carnosus</i>	23K	+++	++
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>carnosus</i>	Lb790	+++	++
<i>Lb. sakei</i> ssp. <i>sakei</i>	DSM 20017 ^T	+++	+
<i>Lb. brevis</i>	DSM 20054 ^T	++	-
<i>Lb. farciminis</i>	DSM 20180	-	nd
<i>Lb. hilgardii</i>	DSM 20176 ^T	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	DSM 20288 ^T	+++	nd
<i>Weissella minor</i>	DSM 20014 ^T	+++	nd
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Lb1259	+	+
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Lb1054	++	+
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Lb1045	++	+

Starter- und Schutzkulturen. Species aus der *Lb. plantarum/casei* Gruppe (*Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*) waren ausnahmslos negativ, sowohl auf beiden PB-Agarmedien als auch auf MnO₂-Agar. *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* verhielten sich unterschiedlich. So erwies sich *Lb. sakei* SafePro als schwach positiv auf allen Medien, während *Lb. sakei* Tradi302 auf PB-Agar mit a) BHI-Basis positiv und b) MRS-Basis negativ und auf MnO₂-Agar stark positiv reagierte. Die *Lb. sakei* Stämme Lb915 und Lb1082 waren auf allen Medien

positiv. *Lb. curvatus* BP-SM-200-02 zeigte auf PB-Agar mit BHI-Basis eine schwach ausgeprägte, mit MRS-Basis aber eine relativ starke Reaktion. Letztere korrelierte mit einem stark positiven Befund auf MnO₂-Agar. *Lb. curvatus* Lb1079 verhielt sich bis auf die etwas schwächere Reaktion auf MnO₂-Agar ähnlich (DEF4 in Abb. 2). Die beiden *Pediococcus pentosaceus* Isolate Lb681 und Lb1083 zeigten nur auf PB-MRS eine stark positive Reaktion (PQR1 und ABC2 in Abb. 2).

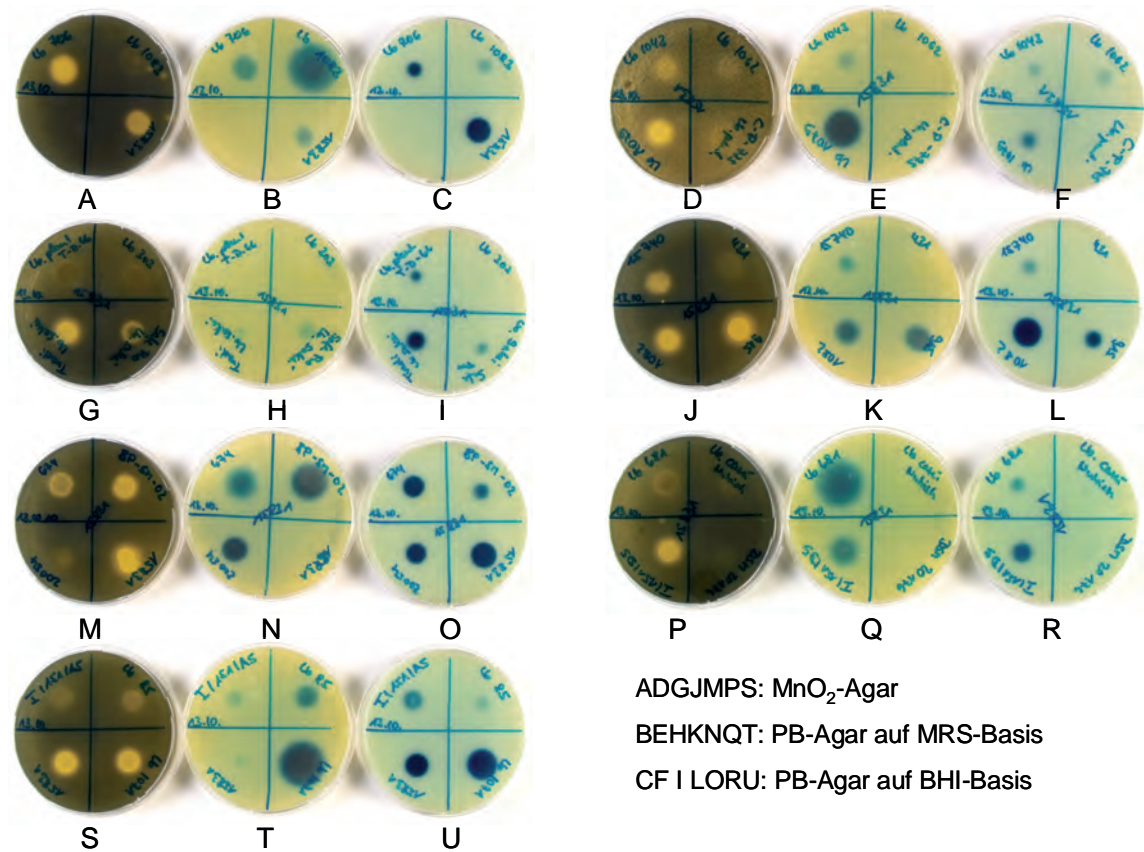


Abb. 2: Reaktionen verschiedener Milchsäurebakterien auf MnO₂-Agar (ADGJMPS) und PB-Agar mit MRS-Basis (BEHKNQT) und BHI-Basis (CFILORU). Die Zuordnung der Stämme in Tab. 2 zu den einzelnen Sektoren der Petrischalen A bis U erfolgte im Uhrzeigersinn von links oben nach links unten

Tab. 2: Milchsäurebakterien Spezies und Stämme, die in Abb. 2 gezeigt sind. Besonderheiten der Stämme sind im Feld <Funktion> aufgeführt (SakA, Sakacin A positiv; SakP, Sakacin P positiv; Car1062, Carnocin 1062 positiv). Alle *Lb. sakei* Stämme gehören der Subspecies *carnosus* an. Weitere Erläuterungen im Text

Sektor	Species	Stamm	Funktion	Sektor	Species	Stamm	Funktion		
ABC	1	<i>Lb. sakei</i>	Lb706	SakA	MNO	1	<i>Lb. sakei</i>	Lb674	SakP
	2	<i>Pc. pentosaceus</i>	Lb1083	Starter		2	<i>Lb. curvatus</i>	BP-SM-200-02	Starter
	3	<i>Lb. sakei</i>	DSM15831 ^T	Typstamm		3	<i>Lb. sakei</i>	DSM15831 ^T	Typstamm
	4	---	---	---		4	<i>Lb. brevis</i>	DSM20054 ^T	Typstamm
DEF	1	<i>Lb. sakei</i>	Lb1043	SakP	PQR	1	<i>Pc. pentosaceus</i>	Lb681	Starter
	2	<i>Cb. maltaromaticum</i>	Lb1062	Car1062		2	<i>Lb. casei</i>	nutrish	Starter
	3	<i>Lb. pentosus</i>	C-P-775	Starter		3	<i>Lb. hilgardii</i>	DSM20176 ^T	Typstamm
	4	<i>Lb. curvatus</i>	Lb1079	Starter		4	<i>Lb. sakei</i>	I/151/D5	SakP
GHI	1	<i>Lb. plantarum</i>	T-D-66	Starter	STU	1	<i>Lb. sakei</i>	I/151/A5	SakP
	2	<i>Lb. plantarum</i>	Lb303	Starter		2	<i>Lb. sakei</i>	Lb85	SakP
	3	<i>Lb. sakei</i>	SafePro	Starter		3	<i>Lb. curvatus</i>	Lb1071	SakP
	4	<i>Lb. sakei</i>	TRADI302	Starter		4	<i>Lb. sakei</i>	DSM15831 ^T	Typstamm
JKL	1	<i>Lb. sakei</i>	DSM15740	(Typstamm)					
	2	<i>Lb. paracasei</i>	431	Starter					
	3	<i>Lb. sakei</i>	Lb915	Starter					
	4	<i>Lb. sakei</i>	Lb1082	Starter					

Bacteriocinbildner. Die Sakacin P produzierenden *Lb. sakei* Stämme Lb1047, Lb 1043, Lb674, Lb85 und I/151/A5 erwiesen sich bis auf Stamm Lb674 als vergleichsweise schwache Peroxidbildner (vgl. DEF1, MNO1, STU2 und STU1 in Abb. 2; Lb1047 ist in Abb. 2 nicht gezeigt). Auf MnO₂-Agar zeigte keiner dieser Stämme einen klar positiven Befund. Der Sakacin P produzierende *Lb. curvatus* Stamm Lb 1071 fiel dagegen auf allen Testmedien als relativ starker Peroxidbildner auf (STU3 in Abb. 2). Der Sakacin A Bildner *Lb. sakei* Lb706 regierte auf PB-Agar schwach positiv und zeigte auf MnO₂-Agar aber einen stark positiven Befund (deutlich stärker als der Sakacin P Bildner Lb674; vgl. ABC1 und GHI1 in Abb. 2). Die Leucocin bildende Schutzkultur *Leuconostoc carnosum* Lb1259 war auf PB- und MnO₂-Agar nur schwach positiv.

Feldisolate von vorverpacktem Brühwurst-aufschnitt. Die Reaktionen von in 2010 von Bierschinken und „Kaiserjagdwurst“ isolierten *Lb. curvatus* und *Lb. sakei* Stämmen reichten von negativ/sehr schwach

bis stark auf PB-Agar und negativ bis sehr schwach auf MnO₂-Agar (Tab. 3). Auffallend war, dass nur eines von zehn *Lb. curvatus* Isolaten eine stärkere Reaktion (++) bis (+++) zeigte, während dies bei 7 von 8 *Lb. sakei* Isolaten der Fall war.

Flüssigmedien. Bei Verwendung von PB-BHI-/PB-MRS-Bouillon wurde keine Blaufärbung nach Inokulation von auf PB-Agar positiven Stämmen beobachtet, auch nicht nach längerer Bebrütung (4 Tage).

Diskussion

Der von SAITO *et al.* (2007) vorgestellte „Prussian Blue“-Nährboden eignet sich sehr gut für die Abschätzung des Peroxidbildungspotentials von Fleisch assoziierten MSB. In den meisten Fällen reagierten die hier getesteten Bakterienstämme auf MnO₂-Agar ähnlich wie auf PB-Agar. Die Ergebnisse des MnO₂-Agars werden jedoch aufgrund der erforderlichen langen Inkubationszeit (5-7 Tage) relativ spät erhalten und sind häufig, insbesondere bei

Tab. 3: Reaktion von *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* Isolaten von Brühwurstaufschnitt verschiedener Milchsäurebakterienarten auf PB-Agar mit BHI- oder MRS-Basis und auf MnO₂-Agar. nd, nicht bestimmt

Species	Isolat	PB-BHI	PB-MRS	MnO ₂
<i>Lb. curvatus</i>	Bs 1	((+))	(+)	-
<i>Lb. curvatus</i>	Bs 2	((+))	(+)	-
<i>Lb. curvatus</i>	Bs 3	(+)	((+))	-
<i>Lb. curvatus</i>	Bs 5	+	((+))	-
<i>Lb. sakei</i>	Bs 6	+++	(+)	-
<i>Lb. sakei</i>	Bs 7	++	((+))	-
<i>Lb. sakei</i>	Bs 8	+++	+++	+
<i>Lb. sakei</i>	Kjw-1/b/1	-	nd	nd
<i>Lb. sakei</i>	Kjw-1b/2	+++	nd	nd
<i>Lb. sakei</i>	Kjw-1b/3	++	nd	nd
<i>Lb. sakei</i>	Kjw-2/1	++	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-2/2	-	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-2/3	+	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-2/4	+	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-1a/1	++	nd	nd
<i>Lb. sakei</i>	Kjw-1a/2	++	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-1a/3	+	nd	nd
<i>Lb. curvatus</i>	Kjw-1a/4	+	nd	nd

schwachen Reaktionen, schlecht zu interpretieren (LÜCKE *et al.*, 1986; WHITTENBURY, 1964). Der MnO₂-Agar ist zudem deutlich aufwändiger in der Herstellung als der PB-Agar nach SAITO *et al.* Da der Nachweis der Peroxidbildung bei letzterem durch einen Farbumschlag erfolgt, können prinzipiell auch trübe Nährböden zur Verwendung kommen. Ein weiterer Vorteil des PB-Agar ist die einfache Zusammensetzung sowie die Adaptierbarkeit an den für Fleisch assoziierte MSB vielfach häufig verwendeten MRS-Nährboden. Wie sich gezeigt hat, ist der PB-Agar deutlich sensitiver als der MnO₂-Agar. Allerdings ist zu beachten, dass die MRS-Basis für den MnO₂-Agar und den PB-MRS-Agar mit 20 g/l zehnmal mehr Glucose enthält als die BHI-Basis. Die höhere Konzentration an Glucose in PB-MRS könnte daher die in einigen Fällen beobachtete stärkere Reaktion auf PB-MRS im Vergleich zu PB-BHI aufgrund des besseren Wachstums der Bakterien erklären (z.B. bei ABC2, MNO2, STU2, STU3, DEF4, PQR1 in Abb. 2). Andererseits ist bei einigen MSB auch eine Hemmung der Peroxidbildung durch Glucose bekannt (SAITO *et al.*, 2007). Es ist auch bekannt, dass *Lb. plantarum* in Gegenwart von Glucose kein H₂O₂ bildet und Milchsäure nicht ohne weiteres oxidiert (LÜCKE *et al.*, 1986). Die prinzipielle Fähigkeit zur Peroxidbildung ist aber auch bei *Lb. plantarum* vorhanden.

Es ist interessant, dass die Bacteriocin bildenden *Lb. sakei* Stämme relativ schwache Peroxidbildner zu sein scheinen. In künftigen Untersuchungen sollten diese potentiellen Schutzkulturen für vorverpackten Brühwurst- und Kochschinken-aufschnitt mit stärkeren Peroxidbildnern verglichen werden und auf den Fleischerzeugnissen direkt vergleichend getestet werden. Die vorliegenden Untersuchungen belegen auch eine Variabilität innerhalb der *Lb. sakei/curvatus* Gruppe was die H₂O₂ Bildung betrifft.

Die hier getesteten Nährböden zum Nachweis der Peroxidbildung bei MSB geben lediglich erste Hinweise für eine potentielle Peroxidbildung durch die getesteten MSB auch im Lebensmittel mit allen daraus resultierenden negativen sensorischen Folgen (Farb- und Aromafehler). Die dort vor-

liegenden Wachstumsbedingungen unterscheiden sich aber unter Umständen in wesentlichen Punkten vom Labormedium. Das betrifft zum einen die Verfügbarkeit von Sauerstoff, die praktisch nur auf Luft exponierten Oberflächen bzw. unter O₂-MAP (*modified atmosphere packaging*) gegeben ist, die gleichzeitige Anwesenheit Katalase positiver Staphylococcen, die einen gewissen Schutz vor Peroxiden bieten, sowie die Versorgung mit Grundkörpern für die Bildung einer Häm abhängigen Katalase bei *Lb. sakei*. Aufgrund dieser Unwägbarkeiten sollten Starter- und Schutzkulturen immer auch in der vorgesehenen Anwendung getestet werden. Die Verwendung von Agarmedien zum Nachweis „Peroxid bildender Laktobazillen“ hat in der Vergangenheit insbesondere bei Rohwurst mit Farbfehlern immer wieder zu Rätseln geführt, da auch in einwandfreier Rohwurst Peroxid bildende *Lb. sakei* und *Lb. curvatus* Stämme in hoher Zahl nachgewiesen wurden. Wie die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen, reagieren auch die meisten heute verwendeten Starterkulturen mit Ausnahme von Kulturen aus der *Lb. plantarum/casei* Gruppe positiv auf MnO₂ oder PB-Agar. Die Ursachen für Vergrauungen und Vergrünungen während der Rohwurstreifung sind daher eher in einem zu hohen Sauerstoff- und Peroxidgehalt des Brätes und einer unzureichenden Peroxid-Zerstörung durch Katalase positive Mikroorganismen zu suchen (WHITTENBURY, 1964; LÜCKE *et al.*, 1986; STEKLENBURG *et al.*, 1990). Ob die „klassischen“ Peroxidbildner dann wenigstens für die „Vergrünung“ von Brühwurst verantwortlich gemacht werden können, muss noch abschließend geklärt werden. PEIRSON *et al.* (2003) haben dies kürzlich in Frage gestellt.

Schlussfolgerungen für die Praxis

Der „Prussian Blue“-Nährboden nach SAITO *et al.* kann für den MRS-Nährboden adaptiert werden und den traditionellen MnO₂-Agar zum Nachweis Peroxid bildender MSB ersetzen. Dies bedeutet einen Zeitgewinn sowohl bei der Herstellung als auch bei der Auswertung. Abstufungen sind mit dem neuen Medium besser zu erkennen.

Danksagung

Frau Jutta POPP danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz, Monique ZAGOREC und Lucca COCOLIN für die Überlassung von Stämmen.

Literatur

- Axelsson, L.T. (1993) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: S. Salmiinen and A. von Wright (eds.) *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, Basel, Hong Kong; pp. 1-63.
- Buckenhüskes, H.J. (1993) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253-272.
- Condon, S. (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 269-280.
- Hammes, W.P., C. Hertel (2009) Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: P. De Vos, G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer, W.B. Whitman (eds.) *The Firmicutes*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three. Springer, Dordrecht, Heidelberg London, New York; pp. 465-511.
- Imlay, J.A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 395-418.
- Imlay, J.A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 755-776.
- Ito, A., Y. Sato, S. Kudo, S. Sato, H. Nakajima, T. Toba (2003) The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic food-borne pathogens. *Curr. Microbiol.* 47, 231-236.
- Kawasaki, S., T. Satoh, M. Todoroki, Y. Niimura (2009) b-Type dihydroorotate dehydrogenase is purified as a H₂O₂-forming NADH oxidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 629-636.
- Kröckel, L. (2008) Mikrobiologische Qualität von vorverpacktem Brühwurst- und Kochschinkenaufschnitt - Aktuelle Untersuchungen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* 47, Nr. 180, 87-97.
- Lücke, F.-K., J. Popp, R. Kreutzer (1986) Bildung von Wasserstoffperoxid durch Laktobazillen aus Rohwurst und Brühwurst-aufschnitt. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10, 78-81.
- Martín R., J.E. Suárez (2010) Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 400-405.
- Marty-Teysset, C., F. de la Torre, J. Garel (2000) Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 262-267.
- Niven, C.F., J.B. Evans (1957) *Lactobacillus viridescens* nov. spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bacteriol.* 73, 758-759.
- Peirson, M.D., T.Y. Guan, R.A. Holley (2003) Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiol.* 20, 149-158.
- Rabe L. K., S. L. Hillier (2003) Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3260-3264.
- Rochat, T., J.J. Gratadoux, A. Gruss, G. Corthier, E. Maguin, P. Langella, M. van de Guchte (2006) Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5143-5149.
- Saito M., M. Seki, K. Iida, H. Nakayama, S. Yoshida (2007) A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the prussian blue-forming reaction. *Microbiol. Immunol.* 51, 889-892.
- Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-223.
- Song, Y.L., N. Kato, Y. Matsumiya, C.X. Liu, H. Kato, K. Watanabe (1999) Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3062-3064.
- Steklenburg, F.K., W.L.J.M. Zomer, S.J. Mulder (1990) A medium for the detection of bacteria causing green discoloration of cooked cured meat products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 76-77.
- Storz, G., M. Zheng (2000) Oxidative stress. In *Bacterial Stress responses*. Edited by: G. Storz and H. Hengge-Aronis. Washington, D.C., ASM Press; pp. 47-59.
- Whittenbury, R. (1964) Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 35, 13-26.
- Wolf, G., A. Strahl, J. Meisel, and W.P. Hammes (1991) Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 133-140.