

Vorkommen und Verhalten von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalamis Teil 2: Ergebnisse von Challengestudien zur Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp. und shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC/EHEC) in Minisalami-Produkten

Occurrence and behaviour of food borne pathogens in minisalami
Part 2: Results of challenge studies on survival of *Salmonella* spp. and
Shiga-toxigenic/enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC/EHEC)

M. GAREIS, J. KABISCH, R. PICHNER und H. HECHELMANN

Zusammenfassung

In Folge einer überregionalen Häufung von Salmonellen durch *Salmonella* Panama bei Kindern und Kleinkindern im Sommer 2007 wurden Minisalamis aufgrund epidemiologischer Daten als mögliche Ausbruchsvehikel und Risikolebensmittel eingestuft (RKI, 2008).

Dies führte zu einer vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz initiierten Studie, bei der das Vorkommen und Verhalten von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalami-Produkten untersucht werden sollte und deren Daten für eine Risikobewertung Verwendung finden werden.

Über die Ergebnisse der zunächst durchgeführten Marktanalyse zur Belastung von handelsüblichen Minisalamis mit Lebensmittelinfektionserregern wurde bereits berichtet (GAREIS *et al.*, 2009). Mit Hilfe von Challengetesten wurden darüber hinaus das Verhalten und die Absterbekinetiken von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Minisalami-Produkten überprüft. Dazu wurden unter definierten Bedingungen fünf unterschiedliche Typen von Minisalami-Produkten hergestellt, die artifiziell mit Keimpools der pathogenen Bakterien in unterschiedlichen Dosierungen (1×10^2 KbE/g und 1×10^4 KbE/g) belastet waren.

Die Ergebnisse zeigen, dass Gram-negative Erreger wie Salmonellen und STEC/EHEC in den kleinkalibrigen Minisalamis aufgrund der produkttypischen Charakteristika keine Überlebenschancen haben und im Laufe der Reifung und nachfolgenden Lagerung schnell und z. T. vollständig absterben. Die Keimzahlen von *Salmonella* spp. und STEC/EHEC lagen zu den Zeitpunkten, an denen die Produkte üblicherweise in den Verkehr gebracht werden (etwa am 8. und 13. Produktionstag bei geräucherten, luftgetrockneten bzw. schimmelpilzgereiften Produkten) oft bereits unter der mikrobiologischen Nachweisgrenze von $1 \log_{10}$ KbE/g (< 10 KbE/g). Die gängigen Herstellungstechnologien für Minisalami-Produkte verhindern somit zweifelsfrei eine Vermehrung von *Salmonella* spp. und STEC/EHEC, wobei die schnelle Abtrocknung auf a_w -Werte $< 0,86$ wesentlich zur mikrobiologischen Stabilität dieser Rohwürste beiträgt. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die Absterbekinetiken der pathogenen Keime durch das Reifeprogramm beeinflusst werden können und eine Optimierung der Reifeparameter zu einer höheren mikrobiologischen Stabilität führt.

Über die Ergebnisse zum Verhalten von Gram-positiven Keimen (*L. monocytogenes* und *S. aureus*) wird im Teil 3 berichtet werden.

Schlüsselwörter	Minisalami – Lebensmittelinfektionserreger – <i>Salmonella</i> Panama – <i>E. coli</i> O157:H7 – Absterbekinetik – Tenazität
Key Words	raw fermented sausage – food borne pathogen – <i>Salmonella</i> Panama – <i>E. coli</i> O157:H7 – challenge test – survival – growth

Summary

To date, the behaviour and survival of *Salmonella* spp. and Shiga-toxigenic/enterohemorrhagic *Escherichia coli* (STEC/EHEC) in minisalami-sausages has not been established. Here we describe the result of challenge studies with these food borne pathogens in five different types of minisalamis including smoked sausages (pork, pork and beef, poultry), air dried and mould ripened salamis.

The German Federal Ministry for Food, Agriculture and Consumer Protection (BMELV) commissioned this study to obtain information on the occurrence and on the decline or potential survival of food borne pathogens in these raw fermented sausages, which are characterized by a small caliber and median a_w levels between 0.82–0.84 (smoked and air dried salamis) and 0.69 (mould ripened salamis) (GAREIS *et al.*, 2009). Background of the project was an outbreak of salmonellosis by *S. Panama* among children in Germany in summer 2007. Based on epidemiological data a discussion about minisalamis as risk foods and their possible role as causative food vector for these cases followed (RKI, 2008).

In a first publication we already reported about the occurrence of *Salmonella* spp., Shiga-toxigenic/enterohemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC), *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in minisalami products obtained from the retail (GAREIS *et al.*, 2009). In the challenge studies, the batter of different types of minisalami products were artificially contaminated prior to further processing with low ($2 \log_{10}$ cfu/g) and high ($4 \log_{10}$ cfu/g) levels of a pool of either *Salmonella* spp. (six different isolates including the outbreak strain *S. Panama*) or STEC/EHEC (three isolates of *E. coli* O157:H7 and one strain of *E. coli* O26:H11). Their survival, as affected by the particular recipe of the product and the ripening program, was monitored over 42 days.

Irrespective of the different types of minisalamis, rapid decline of *Salmonella* spp. and STEC/EHEC was observed in all products tested. The results are supported by previous studies with raw sausages demonstrating that the behaviour of Gram-negative pathogens in long fermented raw sausages was characterized by significant reductions of initial germ counts. The numbers decreased to less than $1 \log_{10}$ cfu/g within 8 or 13 days, the end of the ripening process (smoked, air dried and mould ripened sausages, respectively) and the time when the salamis are usually packed for sale. The technology normally used for the production of minisalamis clearly prevents growth of *Salmonella* spp. and STEC/EHEC. One major reason is the rapid drying to $a_w < 0.86$. Results also indicate that optimization of parameters during the ripening process, especially the temperatures used, enhances the inactivation of the pathogens and attributes to the microbiological stability of the product.

Results about the challenge tests with *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* will be reported in a third publication.

Einleitung

Im Zusammenhang mit einer überregionalen Häufung von Infektionen mit *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Panama bei Kindern und Kleinkindern im Sommer 2007 und auf Basis einer epidemiologischen Untersuchung wurden Minisalami-Sticks als wahrscheinlichste Ausbruchvehikel identifiziert und vom Robert-Koch-Institut als Risikolebensmittel klassifiziert (RKI, 2008).

Vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) wurde daraufhin ein wissenschaftliches Projekt initiiert, das Auskunft

über die mikrobiologische Stabilität und Sicherheit von Minisalami-Produkten geben sollte und dessen Daten als Grundlage für eine durch das BfR zu erstellende Risikobewertung dienen werden.

In einem ersten Beitrag berichteten wir bereits über die Ergebnisse einer Marktanalyse von Minisalami-Produkten, die keinen Hinweis auf eine Belastung der im Handel befindlichen Produkte mit Salmonellen ergab (GAREIS *et al.*, 2009). Alle 206 untersuchten Produkte waren frei von Salmonellen und von durchweg hoher hygienischer Qualität.

Nachfolgend werden nun zunächst die Ergebnisse von Challenge-Untersuchungen mit *Salmonella* spp. und shigatoxin-bildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (STEC/EHEC) in Minisalami dargestellt. In einem weiteren Beitrag wird über die Ergebnisse von Challengetesten mit Gram-positiven Lebensmittelinfektionserregern (*Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*) berichtet.

Die gezielte Belastung von Rohstoffen mit pathogenen Keimen und nachfolgender Herstellung der Produkte unter definierten Bedingungen erlaubt Aussagen über die

Tenazität und das Verhalten der Erreger im betreffenden Lebensmittel und über die mikrobiologische Stabilität des Produktes.

Als Ergebnisse der Challengetests sind prinzipiell drei mögliche Szenarien hinsichtlich des Verhaltens der pathogenen Mikroorganismen möglich (Abb. 1A-C).

Im guten und im besten Fall (Good and Best Case Scenario) können die in das Produkt eingebrachten Keime nicht wachsen und auch nicht überleben. Die Keimzahl der pathogenen Keime reduziert sich sehr schnell und im günstigsten Fall

Abb. 1A: Schematisches Verhalten von pathogenen Mikroorganismen im „Good and Best Case“.
Die inokulierten Keime sterben schnell ab und lassen sich nur noch nach Anreicherung (obere Linie – Good Case) oder nicht mehr nachweisen (untere Linie – Best Case)

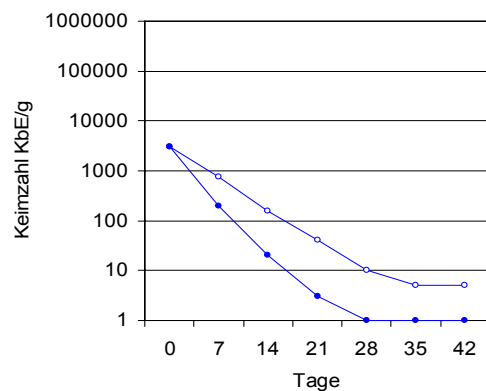


Abb. 1B: Schematisches Verhalten von pathogenen Mikroorganismen im „Bad Case“.
Die Keimzahlen verändern sich nicht und bleiben bis zum Ende auf gleichem Niveau

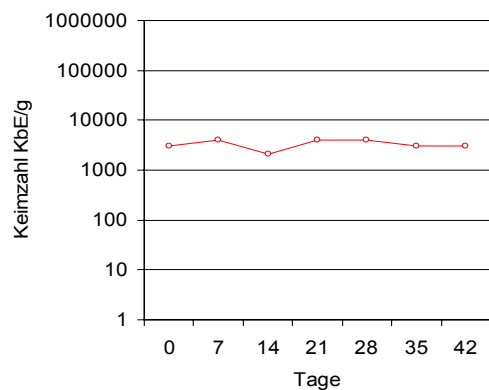
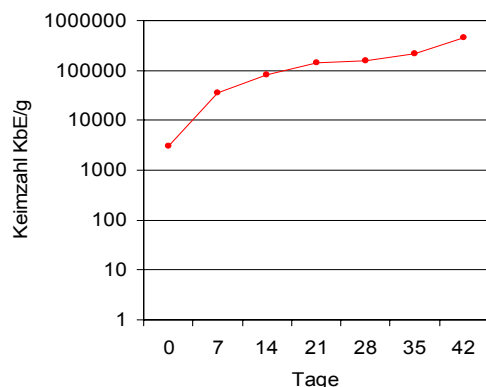


Abb. 1C: Schematisches Verhalten von pathogenen Mikroorganismen im „Worst Case“.
Die inokulierten Keime vermehren sich im Produkt, die Keimzahlen erhöhen sich



sterben sie ab, bevor das Produkt in den Handel gelangt. Ein quantitativer Nachweis gelingt nicht mehr und die Keime lassen sich bis zum Ende der Untersuchungen nur noch nach Anreicherung detektieren (Good Case). Im besten Fall sind die pathogenen Keime vollständig abgetötet und können auch nach Anreicherung nicht mehr nachgewiesen werden (Best Case).

Anders verhält es sich im schlechten Fall (Bad Case Scenario). Die pathogenen Keime können im Produkt nicht wachsen. Sie überleben allerdings und die Keimzahl verbleibt auf dem ursprünglichen Konzentrationsniveau.

Im ungünstigsten Fall (Worst Case Scenario) können die Erreger unter den gegebenen Bedingungen wachsen und sich im Produkt vermehren. Im Vergleich zur Ausgangskonzentration können dabei die Keimzahlen um mehrere log-Stufen ansteigen.

Für die jeweils separat durchgeführten Challengeuntersuchungen mit *Salmonella* spp. und STEC/EHEC wurden insgesamt fünf Produkttypen berücksichtigt und jeweils der Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen auf die Tenazität der Erreger überprüft. Darüber hinaus wurden

die Tests sowohl mit einer niedrigen als auch einer hohen Inokulationsdosis der pathogenen Keime durchgeführt.

Material und Methoden

Für die Challengeuntersuchungen wurden unter definierten Bedingungen die Bräte der typischen Minisalami-Produkte artifiziert mit einem Pool von Salmonellen oder STEC/EHEC kontaminiert, im Anschluss daran die Produkte hergestellt und das Wachstums-/Absterbeverhalten der Pathogene über einen Zeitraum bis zu 42 Tagen überprüft.

Pathogen-Pools

Der Salmonellen-Pool setzte sich aus insgesamt sechs Human- und Produktisolaten zusammen, darunter auch der originale *S. Panama*-Ausbruchstamm. Für den STEC/EHEC-Pool wurden insgesamt vier Isolate verwendet, darunter drei verschiedene *E. coli* O157:H7 sowie ein *E. coli* O26:H11.

Für die Herstellung der Pathogen-Pools wurden neben dem vom Robert-Koch-Institut (RKI, Wernigerode) zur Verfügung gestellten *S. Panama*-Stamm Isolate aus der eigenen Stammsammlung verwendet (Tab. 1).

Tab. 1: Für die Challengeuntersuchungen verwendeten Pathogene

Pathogen	Stammnummer	Herkunft
<i>Salmonella</i> Enteritidis	S 489	Bratwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	S 469	Bratwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Derby Serotyp B	S 589	Fleischprobe / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Goldcoast Serotyp C	S 600	mech. entsehtes Fleisch (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Infantis	S 609	Fleischoberfläche / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Panama (Ausbruchstamm)	S 696	Stuhl / Mensch (D) (RKI, Wernigerode)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	E 118	Faeces / Rind (D) (Uni-Gießen)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 35150 E 134	Kot / Mensch (USA) (MRI, Kulmbach)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 43896 E 135	roher Hamburger (USA) (MRI, Kulmbach)
<i>Escherichia coli</i> O26: H11	E 165	Faeces / Kalb (Japan) (MRI, Kulmbach)

ATCC: American Type Culture Collection

E und S: Stammnummern der Stammsammlung des MRI, Kulmbach

Für die Belastungstests wurden für jeden Pathogen-Pool zwei unterschiedliche Inokulationsdosen eingesetzt (1×10^2 und 1×10^4 KbE/g) und damit eine niedrige bzw. hohe Keimbelastung des Brätes simuliert.

Die Zugabe der Inokula erfolgte bei Herstellungsbeginn während des Kutters. Die unbeimpften Kontrollchargen (Negativkontrollen) wurden dabei immer zuerst produziert, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Zur Herstellung eines Inokulums wurden zunächst Übernachtskulturen der einzelnen Stämme angelegt. Im Anschluss daran wurden die Isolate eines Pools vereinigt und hierzu jeweils 1 ml der Bakteriensuspension (ca. 1×10^9 KbE/ml) verwendet. Über dezimale Verdünnungen wurden danach die gewünschten Inokulationsdosen hergestellt und die jeweilige Konzentration mikrobiologisch überprüft. Für die Beimpfung des Wurstbrätes wurden danach 1,6 ml der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Keimsuspensionen pro kg Rohmaterial verwendet.

Minisalami-Produkte

Für die Challenge-Untersuchungen wurden analog zu den Untersuchungen zum Vorkommen pathogener Keime in Mini-

salamis aus dem Handel insgesamt fünf unterschiedliche Produkttypen verwendet (GAREIS *et al.*, 2009; Tab. 2). Die Herstellung der Minisalamis erfolgte dabei nach Standardrezepturen unter Verwendung von Nitritpökelsalz (NPS), Gewürzen, Starterkulturen und Natriumascorbat (Tab. 3). Die tiefgefrorenen Ausgangsmaterialien wurden in einem Kutter unter gleichzeitiger Zugabe der Zusätze auf eine Körnung von ca. 10 mm zerkleinert und das Brät anschließend in Cellulosedärme der Güteklasse A mit einem Kaliber von 25 mm abgefüllt.

Nach einer Angleichzeit von vier Stunden wurden die Rohwürste zur Vermeidung von Oberflächenbewuchs kurz in eine 20%ige Kaliumascorbat-Lösung bzw. im Fall der schimmelpilzgereiften Minisalamis in eine Edelschimmelpilz-Lösung (*Penicillium nalgiovense*) getaucht.

Die anschließende Reifung in vollautomatischen Klimakammern, die Verpackung unter Schutzatmosphäre und die nachfolgende Lagerung wurden unter praxisüblichen Bedingungen und Angaben der Hersteller durchgeführt. Neben den unterschiedlichen Produkttypen wurde zudem der Einfluss von zwei unterschiedlichen

Tab. 2: Minisalami-Produkttypen für die Durchführung der Challengestests

Typ	Rohstoff	Rezeptur (pro kg)
A Minisalami geräuchert	Schweinefleisch	670 g Schweinefleisch S2 330 g Schweinefett S8
B Minisalami geräuchert	Schweine-/Rindfleisch	350 g Schweinefleisch S2 350 g Rindfleisch R2 300 g Schweinefett S8
C Minisalami geräuchert	Geflügelfleisch	670 g Putenbrust 330 g Schweinefett S8
D Minisalami luftgetrocknet	Schweinefleisch	670 g Schweinefleisch S2 330 g Schweinefett S8
E Minisalami schimmelpilzgereift	Schweinefleisch	670 g Schweinefleisch S2 330 g Schweinefett S8

Tab. 3: Zusätze für die Herstellung von Minisalami

Zusatz	Menge pro kg Rohmaterial
Nitritpökelsalz (0,4-0,5 %)	28 g (2,8 %)
Salamiwürzung	13 g (1,3 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkulturen (<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> , <i>Kocuria varians</i>)	0,8 g (0,08 %)
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

Tab. 4: Reifebedingungen für geräucherte Minisalamis aus Schweinefleisch (Produkttyp A)

Zeit	Reifeprogramm A		Reifeprogramm B		Luftgeschwindigkeit
	Temperatur	relative Feuchte	Temperatur	relative Feuchte	
4 h	22 °C	40-50 %	22 °C	40-50 %	-
24 h	24 °C	94 %	22 °C	94 %	0,3-0,4 m/s
24 h	22 °C	92 %	20 °C	92 %	0,4 m/s
24 h	20 °C	90 %	19 °C	89 %	0,4-0,5 m/s
4 h	Kalt Räuchern (< 30 °C)				
48 h	18 °C	88 %	18 °C	85 %	0,4-0,5 m/s
48 h	18 °C	86 %	18 °C	84 %	0,4-0,5 m/s

Reifeprogrammen, die sich primär bei den verwendeten Temperaturen unterscheiden, untersucht (Beispiel siehe Tab. 4).

Die geräucherten und luftgetrockneten Minisalamis wurden nach der Reifeperiode am 8. Produktionstag unter modifizierter Atmosphäre verpackt (20 % CO₂/80 % N) und anschließend bei 17 °C bis zum Versuchsende (Tag 42) gelagert. Für die schimmelpilzgereiften Salamis erfolgte die Verpackung erst nach etwa zwei Wochen Reifezeit am Tag 13.

Jeder Pathogen-Pool wurde in separaten Versuchsansätzen geprüft, so dass für jede Untersuchungsreihe (*Salmonella*-Challenge und STEC/EHEC-Challenge) eine entsprechend große Anzahl an Würsten für jeden Produkttyp produziert werden musste, um den Einfluss der zwei Inokulationsdosen in Abhängigkeit der beiden Reifeprogramme sowie der vorgesehenen sechs Probennahmezeitpunkte zu überprüfen. Diese Probennahmen erfolgten am Tag der Herstellung (Tag 0) und dann nach den Tagen 1, 3, 6, 13 und 42. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurden sowohl für die unbeimpften Negativkontrollen als auch für die kontaminierten Produkte jeweils drei identische Würste verwendet.

Physikalisch-chemische Parameter

Die Messung der pH- und Wasseraktivitätswerte (a_w -Wert) erfolgte über Dreifachmessungen an den Tagen 0, 1, 3, 6, 8, 13 und 42 wie bereits früher beschrieben (RÖDEL *et al.*, 1989). Verwendet wurden hierzu die jeweiligen Negativkontrollen.

Mikrobiologische Diagnostik

Für die Challengeuntersuchungen wurde ausschließlich hygienisch hochwertiges

Rohmaterial verwendet und die Qualität jeweils vor Versuchsbeginn mikrobiologisch abgesichert. Zu jedem Probennahmezeitpunkt wurden jeweils drei Würste eines Ansatzes untersucht und die Medianwerte inkl. Standardabweichung bestimmt.

Die mikrobiologischen Begleituntersuchungen umfassten die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ), die Pseudomonaden-, *Enterobacteriaceae*- und Milchsäurebakterienkeimzahl wie zuvor beschrieben (GAREIS *et al.*, 2009).

Nachweis von Salmonellen

Der Nachweis der inokulierten Salmonellen erfolgte jeweils im Dreifachansatz (3 Würste) mit kulturellen und PCR-Methoden wie zuvor beschrieben (GAREIS *et al.*, 2009). Beim kulturellen Nachweis nach DIN EN ISO 6579:2003 wurden 25 g Probe mit 225 ml einer 0,85%igen Kochsalzlösung zwei Minuten in einem Stomacher homogenisiert und das Homogenat auf XLD- und DHL-Agar ausgespatelt. Bei Keimzahlen unter 10 KbE/g wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (+ FerriOx) bei 37 °C für 18 Stunden angereichert und aus dieser Voranreicherung 0,1 ml in RVS-Bouillon für weitere 24 Stunden bei 41 °C angereichert, bevor Verdünnungsausstriche auf XLD- und DHL-Agar folgten. Für den genotypischen Nachweis von *Salmonella enterica* wurden die Proben nach einer von MIKO *et al.* (2000) modifizierten Methode nach RAHN *et al.* (1992) auf das Vorliegen des *invA*-Gens untersucht. Hierzu wurde die DNA aus 1 ml des inkubierten Voranreicherungsmediums extrahiert und mittels PCR analysiert (vgl. GAREIS *et al.*, 2009).

Nachweis von STEC/EHEC

Der Nachweis von STEC/EHEC erfolgte ebenfalls jeweils im Dreifachansatz sowohl mit kulturellen als auch molekularbiologischen Methoden (GAREIS *et al.*, 2009).

Für den kulturellen Nachweis wurden 25 g Probe mit 225 ml einer 0,85%igen Kochsalzlösung zunächst homogenisiert und das Homogenisat parallel auf SMAC- und DHL-Agar ausgespatelt. Bei Keimzahlen unter 10 KBE/g wurden 25 g Probenmaterial zunächst 18 Stunden bei 37 °C in 225 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) angereichert und anschließend 1,0 ml der Suspension in 4 ml steriler TSB mit Zusatz von 10 mg Novobiocin/l erneut für 16 Stunden bei 180 rpm angereichert. Nachfolgend wurden Verdünnungsstufen auf SMAC ausplattiert und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden verdächtige Kolonien von den SMAC- und DHL Nährböden abgenommen und auf einem chromogenen Medium (Fluorocult) für 24 Stunden bei 30 °C subkultiviert. β -D-Glucuronidase-positive Kolonien wurden als *E. coli* gewertet. Für den genotypischen Nachweis von STEC/EHEC wurden die Proben nach einer von CEBULA *et al.* (1995) modifizierten Methode nach SCHMIDT *et al.* (1994) auf die Fähigkeit zur Shigatoxinbildung (*stx 1*- und *stx 2*-Gen) untersucht. Dazu wurden verdächtige Kolonien vom Anreicherungsmedium entnommen und mittels Erhitzung aufge-

schlossen. Die extrahierte DNA wurde anschließend mit Hilfe der PCR analysiert.

Ergebnisse

Produkttyp A: Geräucherte Minisalami aus Schweinefleisch

Ein Beispiel für die in den Challengeuntersuchungen produzierten geräucherten Minisalamis aus Schweinefleisch gibt Abbildung 2 wieder.



Abb. 2: Geräucherte Minisalamis am Tag der Herstellung.

Die farbigen Abbindungen kennzeichnen verwechslungsfrei die einzelnen Chargen

Physikalisch-chemische Parameter. Unmittelbar nach der Beimpfung wurde ein a_w -Wert von 0,969 ermittelt, der bis zum Tag 8 abnahm. Die Differenz zwischen beiden Reifeprogrammen betrug am 8. Tag der

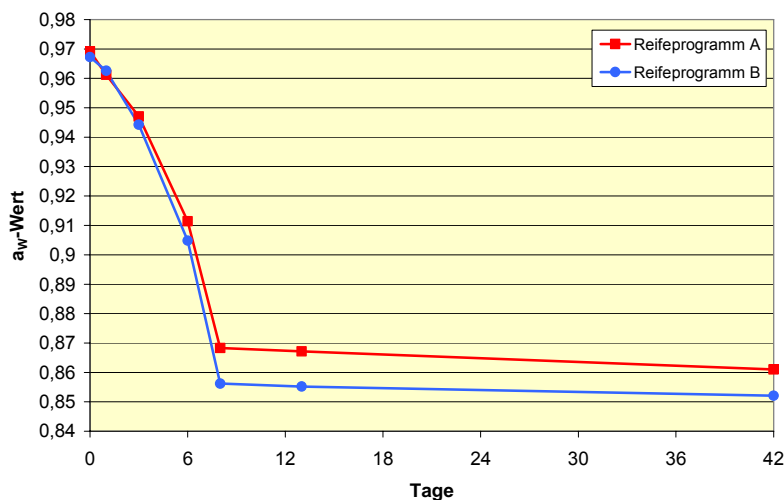


Abb. 3: Verlauf der a_w -Werte in geräucherter Minisalami (Produkttyp A)

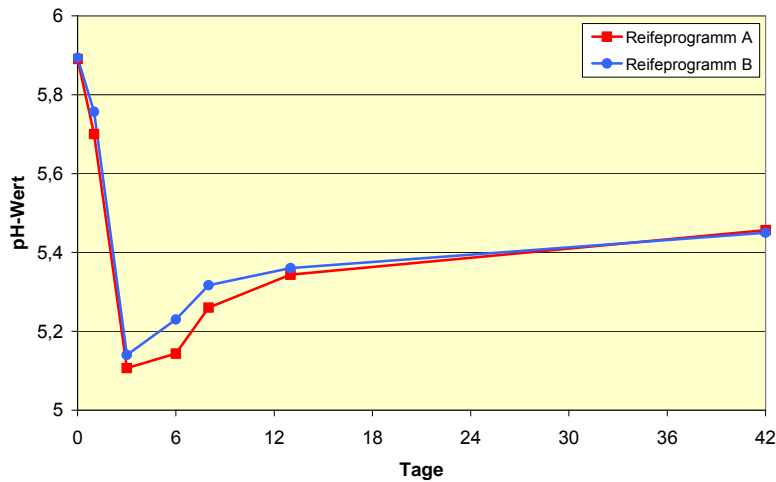


Abb. 4: Verlauf der pH-Werte in geräucherter Minisalami (Produkttyp A)

Reifung 0,01 a_w -Wert Einheiten. Danach und bedingt durch den behinderten Wasseraustausch im Anschluss an die Verpackung nahm der Wasseraktivitätswert nur noch geringfügig ab (Abb. 3).

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,9 und 5,95 und fiel bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,1 und 5,2 (Abb. 4) ab. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg auch der pH-Wert in der Minisalami durch den mikrobiellen und/oder biochemischen Säure- oder Fleischiweißabbau auf pH-Werte von 5,45 an. Ein unterschiedlicher Einfluss der Reifeprogramme war nicht zu erkennen.

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Die Verläufe der GKZ und Milchsäurebakterienzahl waren nahezu identisch, wobei die Keimzahlen bei der Ermittlung der GKZ durch die miterfassten

Mikrokokken der Starterkulturen höher lagen (Abb. 5 und 6). Die Daten dieser begleitenden Diagnostik sind mit denen der Marktanalyse vergleichbar (GAREIS *et al.*, 2009) und dokumentieren eine realitätsnahe Produktion und Herstellung der Minisalamis.

Die Vermehrung der Milchsäurebakterien um zwei Zehnerpotenzen nach drei Tagen erfolgte parallel zur pH-Wertabnahme (vgl. Abb. 4). Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien nicht unter $8,0 \log_{10}$ KbE/g (1×10^8 KbE/g) (Abb. 6).

Salmonella spp. Das Verhalten von *Salmonella* spp. in geräucherten Minisalamis gibt Abbildung 7 wieder. Bei einer Inokulationshöhe des Ausgangsbrätes mit $2,3 \log_{10}$ KbE/g reduziert sich die Keimdichte relativ rasch mit einer Verringerung der Keim-

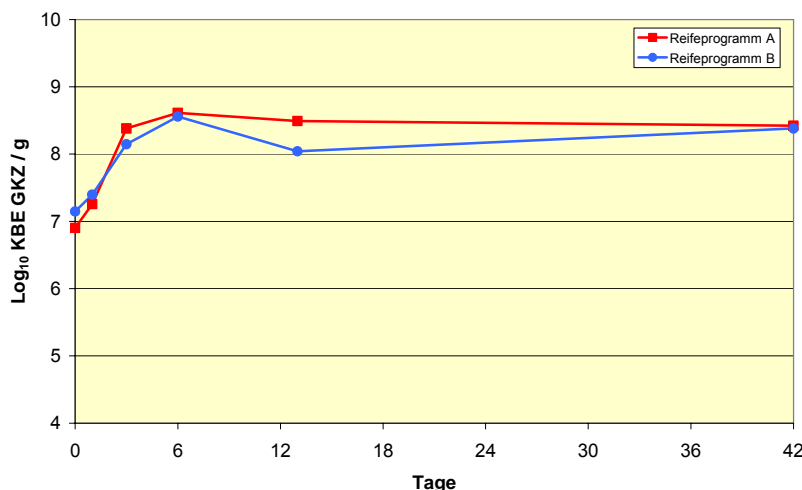


Abb. 5: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) in geräucherter Minisalami (Produkttyp A)

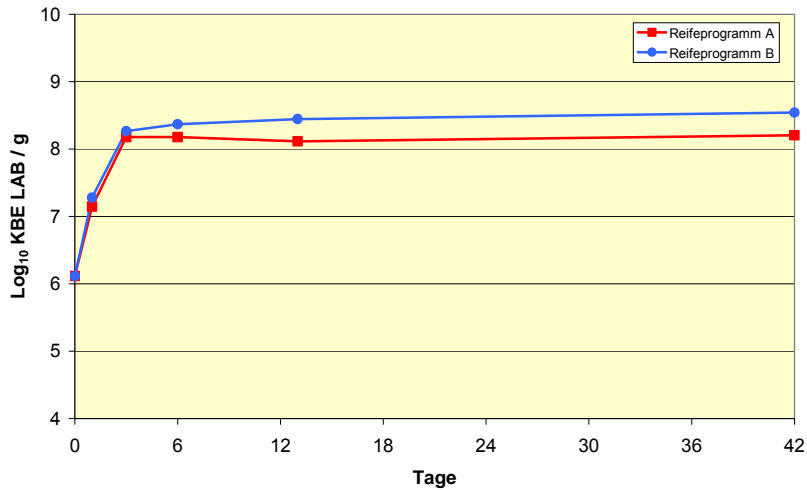


Abb. 6: Wachstum der Milchsäurebakterien in geräucherter Minisalami (Produkttyp A)

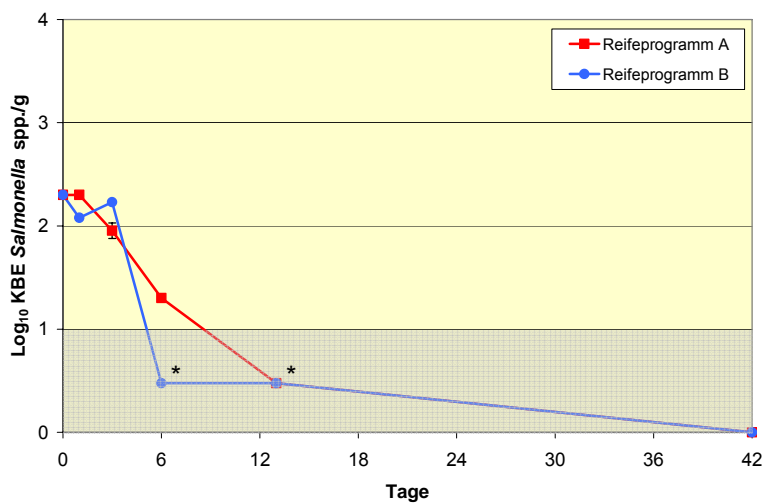


Abb. 7: Absterbeverhalten von *Salmonella* spp. in geräucherten Minisalamis aus Schweinefleisch (Produkttyp A) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KBE/g) unterschritten wurde und Salmonellen nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnten.

zahlen auf Werte knapp über der Nachweisgrenze am Tag 6 (Reifeprogramm A). Beim Reifeprogramm B war die Absterbekinetik deutlicher ausgeprägt und bereits am 6. Tag nur noch ein qualitativer Nachweis (molekularbiologisch nach Anreicherung) möglich. Am Ende des Versuchszeitraumes (Tag 42) waren Salmonellen unabhängig vom Reifeprogramm nicht mehr nachweisbar.

Auch bei einer hohen Inokulationsdosis (1,0 x 10⁴ KBE/g) wurde eine schnelle Absterberate der Salmonellen mit der Folge

beobachtet, dass am Tag 13 nur noch nach Anreicherung ein Nachweis möglich war und am Tag 42 Salmonellen unabhängig vom Reifeprogramm nicht mehr zu detektieren waren (ohne Abbildung).

Shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC). Innerhalb der ersten 24 Stunden konnte beim Reifeprogramm A ein kurzfristiger Anstieg der Keimzahl beobachtet werden. Mit fortschreitender Reifung nahm die Zellzahl kontinuierlich ab. Ab dem Tag 13 war ein Nachweis von STEC nur noch nach Anreicherung mittels

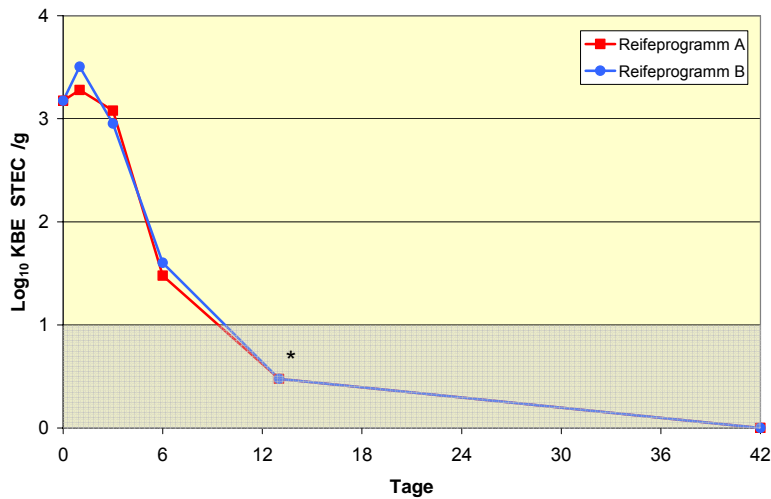


Abb. 8: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in geräucherten Minisalamis aus Schweinefleisch (Produkttyp A) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.
* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

PCR möglich. Am letzten Untersuchungstag waren STEC/EHEC auch nach Anreicherung und PCR nicht mehr in den Produkten nachweisbar (Abb. 8).

Bei einer höheren Inokulationsdosis ($7,0 \times 10^3$ KBE/g) wurden Reduktionen um mehr als 1 log Stufe nach 6 Tagen und um mehr als 2 bzw. 3 log Stufen (Programm A bzw. B) nach 13 Tagen beobachtet. Am Versuchsende waren STEC/EHEC in den Chargen des Reifeprogramms B im Gegensatz zum Programm A auch nach Anreicherung nicht mehr nachweisbar (ohne Abbildung).

Produkttyp B: Geräucherte Minisalami aus Schweine- und Rindfleisch

Physikalisch-chemische Parameter. Der anfängliche a_w -Wert von 0,964 nahm über den Verpackungszeitpunkt (Tag 8) bis zum Tag 13 kontinuierlich ab, wobei die Differenz zwischen beiden Reifeprogrammen am 8. Untersuchungstag 0,005 a_w -Wert-Einheiten ausmachte (Abb. 9).

Der Anfangs-pH-Wert von 5,85 fiel bei allen Chargen zunächst innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,3 und 5,4 ab und stieg anschließend und unabhängig vom Reifeprogramm auf 5,53 an.

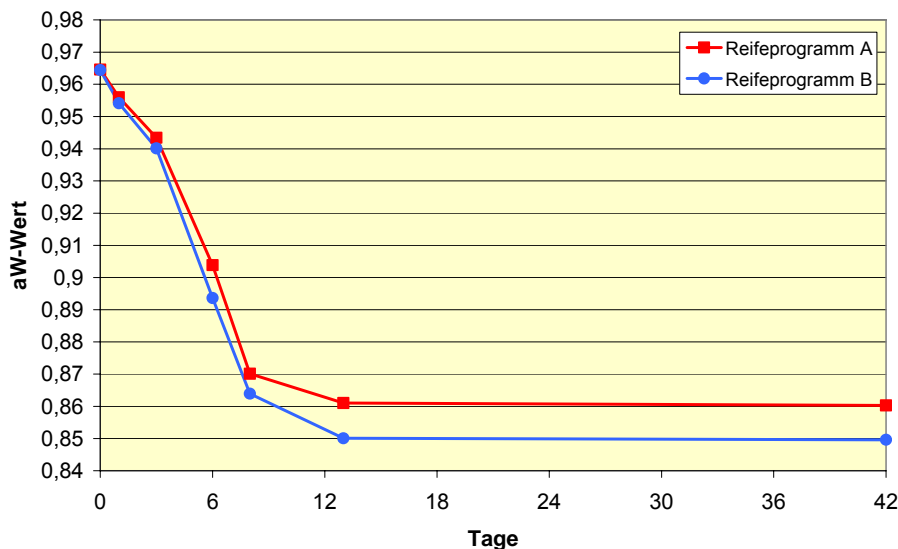


Abb. 9: Verlauf der a_w -Werte bei geräucherten Minisalamis (Produkttyp B)

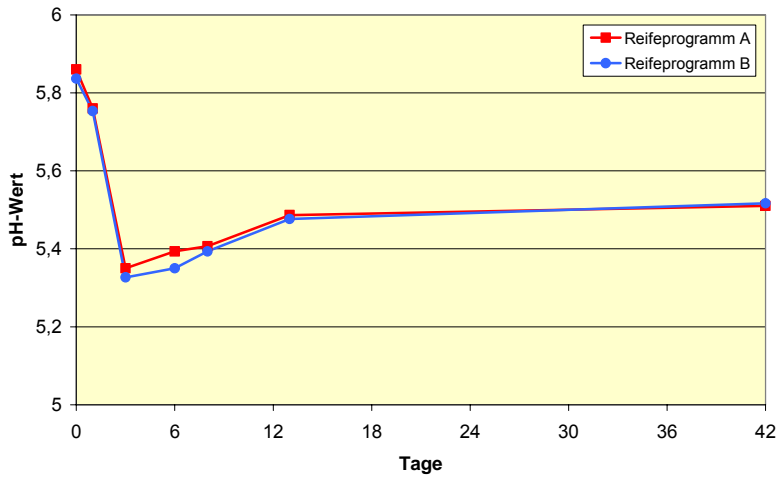


Abb. 10: Verlauf der pH-Werte in geräucherten Minisalamis (Produkttyp B)

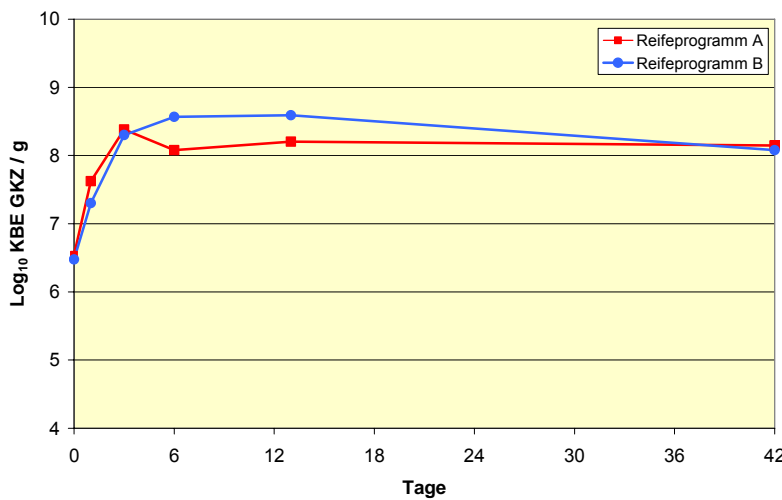


Abb. 11: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) in geräucherter Minisalami (Produkttyp B)

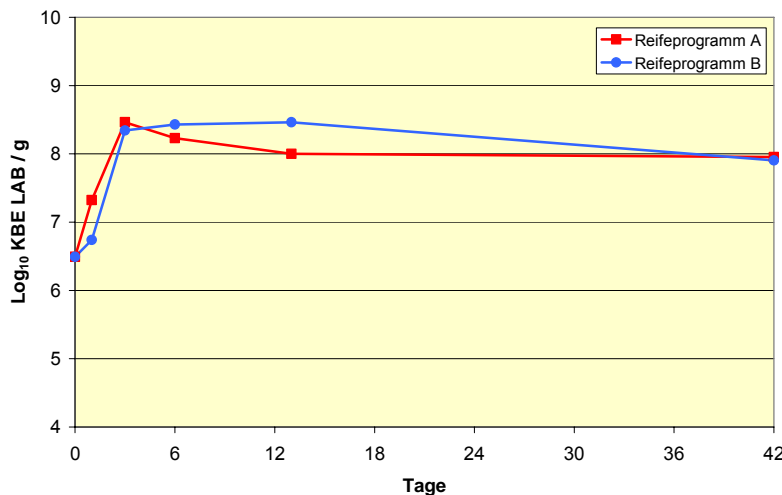


Abb. 12: Wachstum der Milchsäurebakterien in geräucherter Minisalami (Produkttyp B)

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Die Entwicklungen der GKZ und Milchsäurebakterienzahl, die nahezu identisch waren und keine Auffälligkeiten zeigten, sind in den Abbildung 11 und 12 wiedergegeben.

Salmonella spp. Unabhängig von den beiden Reifeprogrammen war in den belasteten Minisalamis eine Reduktion der eingepflichten Salmonellen festzustellen. Die Keimzahlen lagen am Tag 6 noch knapp über der quantitativen Nachweis-

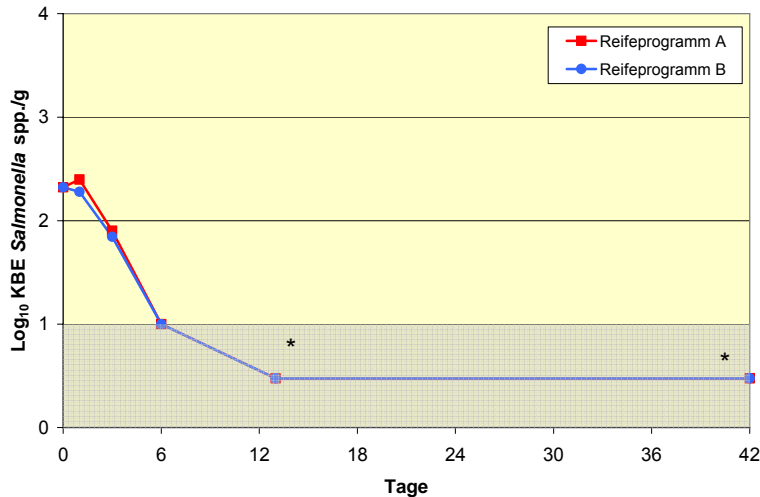


Abb. 13: Absterbeverhalten von *Salmonella* spp. in geräucherten Minisalamis aus Schweine- und Rindfleisch (Produkttyp B) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und Salmonellen nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnten

grenze. Danach war ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR möglich (Abb. 13).

Auch bei einer hohen Inokulationsdosis ($1,9 \times 10^4$ KbE/g) konnte eine schnelle Absterberate der Salmonellen beobachtet werden (ohne Abb.). Am Tag 13 wurden in den Produkten noch Keimichten von 50 bis 100 KbE/g festgestellt werden. Nach 42 Tagen war ein Nachweis nur noch nach Anreicherung möglich.

Shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC). Nach einem kurzen Anstieg der Keimzahlen innerhalb der ersten 24 Stunden, der beim Reifeprogramm A deutlicher ausgeprägt war, fielen die Keimzahlen im weiteren Verlauf der Reifung ab, wobei eine schnellere Reduktion mit dem Reifeprogramm B erzielt werden konnte. Ab dem Probenahmezeitpunkt am Tag 13 waren STEC/EHEC nur noch nach Anreicherung detektierbar (Abb. 14).

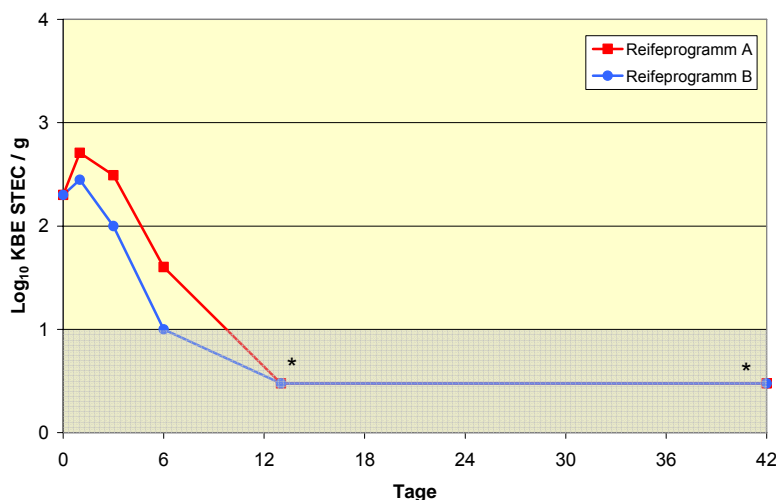


Abb. 14: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in geräucherten Minisalamis aus Schweine- und Rindfleisch (Produkttyp B) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Bei einer hohen Inokulationsdosis ($6,0 \times 10^3$ KbE/g) konnte ebenfalls eine deutliche Abnahme der Zellzahl festgestellt werden, so dass am Tag 42 ein Nachweis in beiden Reifeprogrammen nur noch nach Anreicherung möglich war (ohne Abb.).

Produkttyp C: Geräucherte Minisalami aus Geflügelfleisch

Physikalisch-chemische Parameter. Die ursprünglichen a_w -Werte um 0,965 sanken bis zum Verpackungszeitpunkt deutlich ab und erreichten am Tag 13 Werte von 0,821 (Programm A) und 0,812 (Programm B) (Abb. 15).

Der pH-Wert-Verlauf in Abbildung 16 zeigt eine Säuerung mit einem Abfall von pH 5,85 auf pH 5,3 (Tag 3) und den nachfolgenden Anstieg auf pH-Wert um 5,45.

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. GKZ und Milchsäurebakterienzahl sind in den Abbildungen 17 und 18 wiedergegeben und zeigen einen produktspezifischen Verlauf. Bis zum Ende der Untersuchungen erreichte die Zahl der Milchsäurebakterien Werte von $8,5 \log_{10}$ KbE/g. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Reifeprogrammen war nicht zu erkennen.

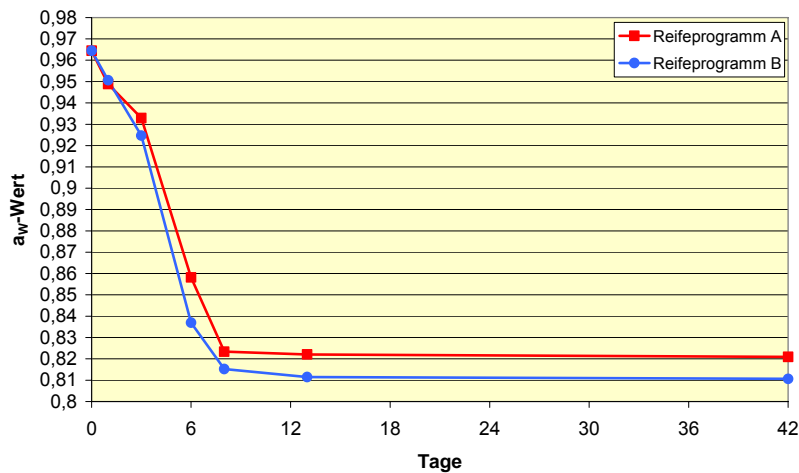


Abb. 15: Verlauf der a_w -Werte bei geräucherten Minisalamis (Produkttyp C)

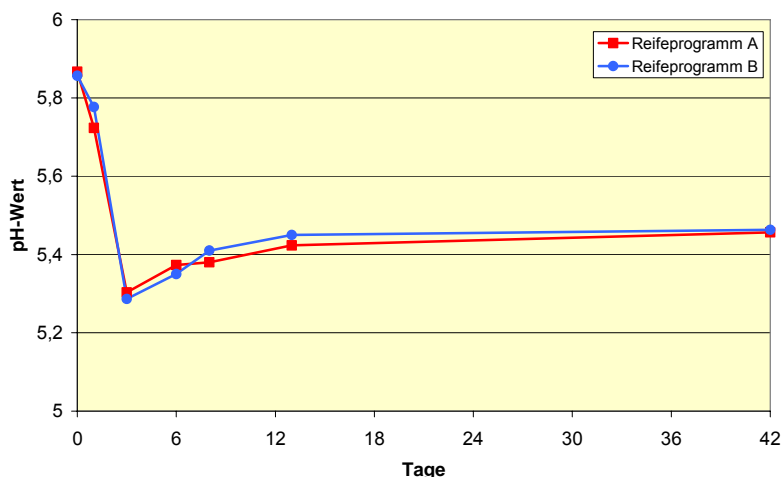


Abb. 16: Verlauf der pH-Werte in geräucherten Minisalamis (Produkttyp C)

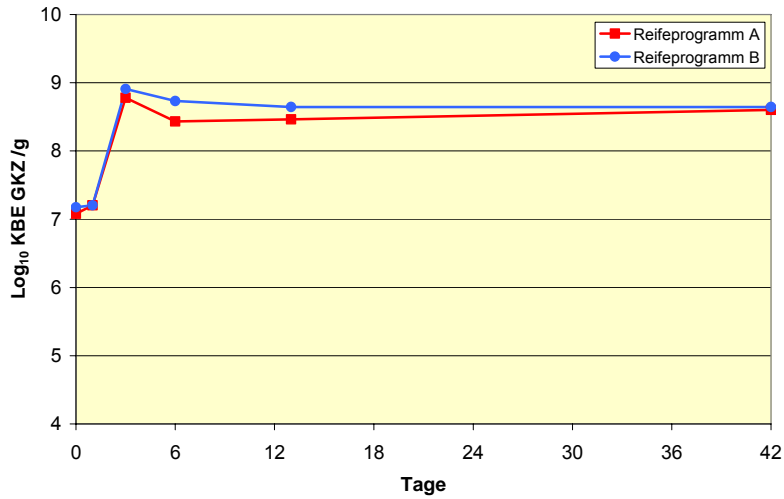


Abb. 17: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) in geräucherter Minisalami (Produkttyp C)

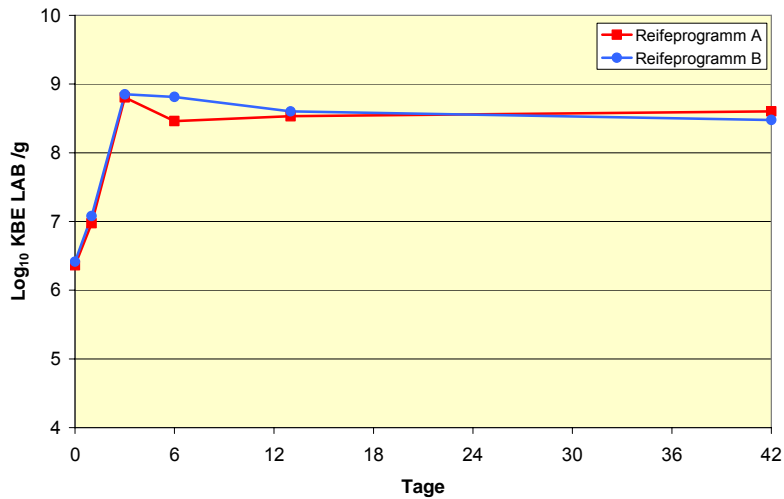


Abb. 18: Wachstum der Milchsäurebakterien in geräucherter Minisalami (Produkttyp C)

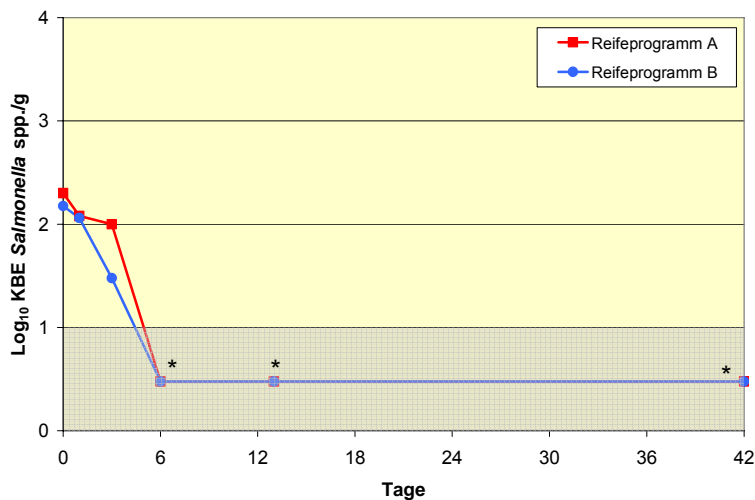


Abb. 19: Absterbeverhalten von *Salmonella* spp. in geräucherten Minisalamis aus Geflügelfleisch (Produkttyp C) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KBE/g) unterschritten wurde und Salmonellen nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnten

Salmonella spp. Auch bei diesem Produkttyp starben die inokulierten Salmonellen schnell ab und konnten am Tag 6 bis zum Ende des Versuchszeitraums nur noch qualitativ nachgewiesen werden. Ein Einfluss des Reifeprogrammes auf die Absterberate war nur anfänglich feststellbar (Abb. 19).

Bei den Chargen mit einer hohen Inokulationsdosis ($1,6 \times 10^4$ KbE/g) wurde ebenfalls eine schnelle Absterberate der Salmonellen mit der Folge beobachtet, dass am Tag 13 im Reifeprogramm B nur noch nach Anreicherung ein Nachweis möglich war (ohne Abb.). Am Tag 42 konnten die Salmonellen in beiden Reifeprogrammen nur noch qualitativ nachgewiesen werden.

Shigatoxinbildende/enterohämorrhagische E. coli (STEC/EHEC). Unterschiede der beiden Reifeprogramme waren im Unterschied zu Salmonellen deutlicher in den

Challengetesten mit STEC/EHEC zu erkennen. Mit den Reifeparametern des Programmes B wurde nach einer anfänglichen Zunahme der Keimzahlen ab dem 6. Tag eine schnelle Reduktion auf Keimzahlen < 10 KbE/g erreicht. Mit dem Programm A wurden diese Absterberaten nicht erzielt, allerdings waren am Tag 42 bei diesen Chargen STEC/EHEC ebenfalls nur nach Anreicherung und PCR detektierbar.

Auch bei einer hohen Inokulationsdichte ($1,7 \times 10^4$ KbE/g) konnte ein deutlich unterschiedlicher Einfluss der Reifeprogramme auf das Absterbeverhalten festgestellt werden. So war ein Nachweis der Keime im Reifeprogramm B nach 13 Tagen nur noch nach Anreicherung möglich, während im Reifeprogramm A noch Keimzahlen von 40 KbE/g detektiert wurden. Am Tag 42 konnten in beiden Chargen STEC/EHEC nur noch qualitativ festgestellt werden.

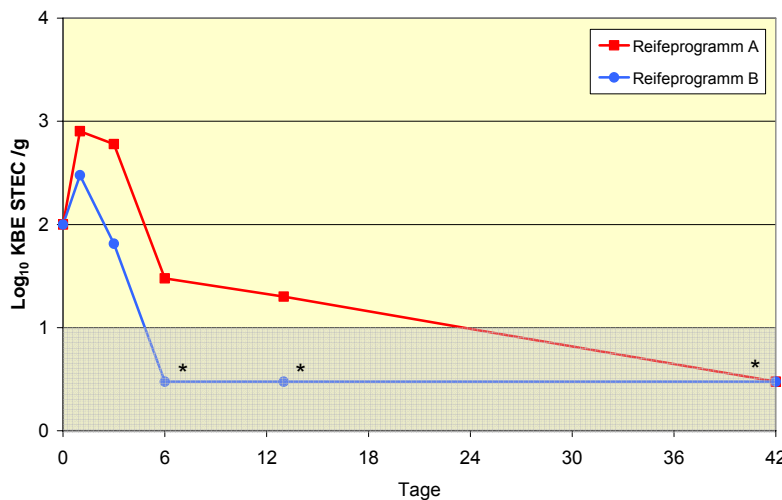


Abb. 20: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in geräucherten Minisalamis aus Geflügelfleisch (Produkttyp C) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Produkttyp D: Luftgetrocknete Minisalami

Physikalisch-chemische Parameter. Der a_w -Wert betrug am Herstellungstag der luftgetrockneten Minisalami kurz nach der Beimpfung 0,972. Die Abnahme der Wasseraktivität wirkte sich bei dem Reifeprogramm B deutlicher aus. Bereits am 6. Tag wurden Werte von 0,9136 (Programm A) und 0,9071 (Programm B) erreicht. Zum

Zeitpunkt der Verpackung lagen die a_w -Werte bei 0,8745 bzw. 0,8656 (Abb. 21).

Die Anfangs-pH-Werte von 5,82 und 5,85 reduzierten sich bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,1 und 5,2 (Abb. 22) und stiegen dann im Laufe der weiteren Reifung und Lagerung auf Werte von 5,55 bzw. 5,58 an.

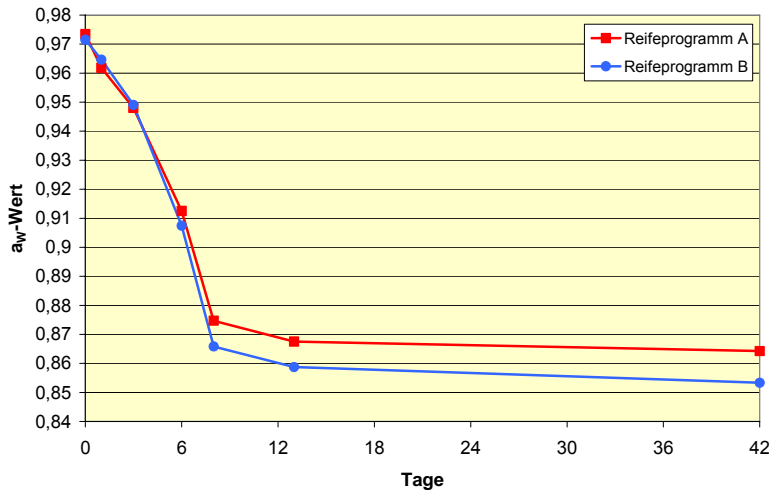


Abb. 21: Verlauf der a_w -Werte bei luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D)

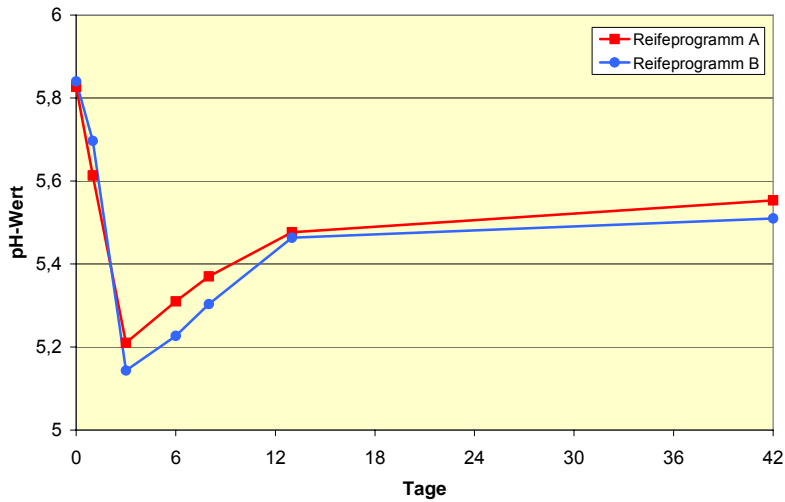


Abb. 22: Verlauf der pH-Werte in luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D)

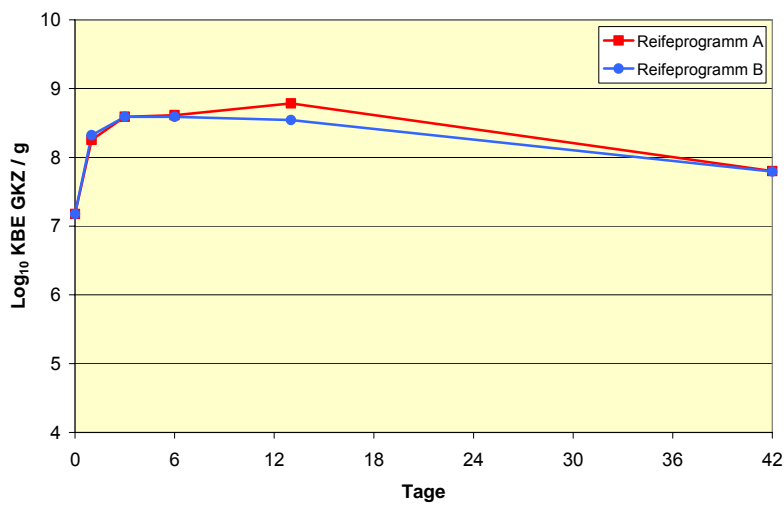


Abb. 23: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) in luftgetrockneter Minisalami (Produkttyp D)

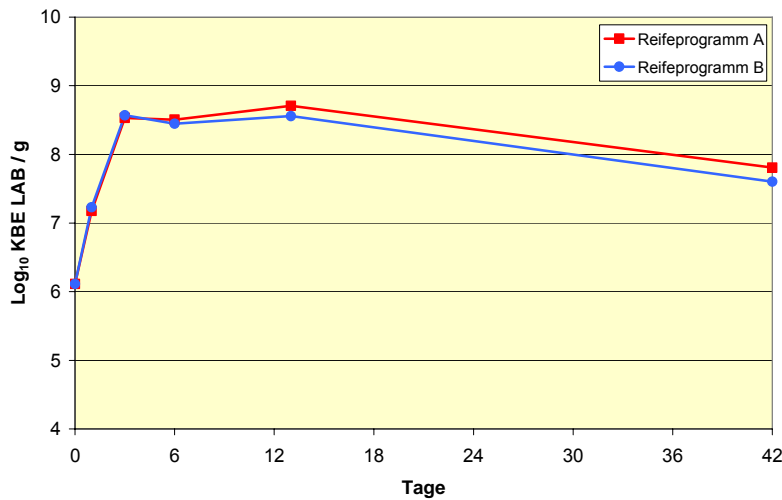


Abb. 24: Wachstum der Milchsäurebakterien in luftgetrockneter Minisalami (Produkttyp D)

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Parallel zum Abfall des pH-Wertes innerhalb der ersten Tage stieg die Anzahl der Milchsäurebakterien an (Abb. 24). Bis zum Ende der Untersuchungen sank diese Keimzahl nicht unter \log_{10} 7 KbE/g (1×10^7 KbE/g). Einen ähnlichen produkttypischen Verlauf nahm die GKZ (Abb. 23). Pseudomonaden waren nicht nachweisbar.

Salmonella spp. In den luftgetrockneten Salamis starben die inokulierten Salmonellen schnell ab und waren nach 6 Tagen nur noch qualitativ bzw. nahe der quan-

titativen Nachweisgrenze detektierbar (Reifeprogramm B und A). Im weiteren Verlauf war der Nachweis nur noch nach Anreicherung und PCR möglich (Tag 13), wobei am letzten Untersuchungstag in keiner Charge Salmonellen nachgewiesen werden konnten (Abb. 25).

Eine schnelle und ausgeprägte Absterbe-kinetik der Salmonellen wurde auch in den Chargen mit einer hohen Inokulationsdosis ($4,0 \times 10^3$ KbE/g) beobachtet (ohne Abb.). Bereits am Tag 13 war bei den Würsten aus dem Reifeprogramm B ein Nachweis nur noch nach Anreicherung möglich. In

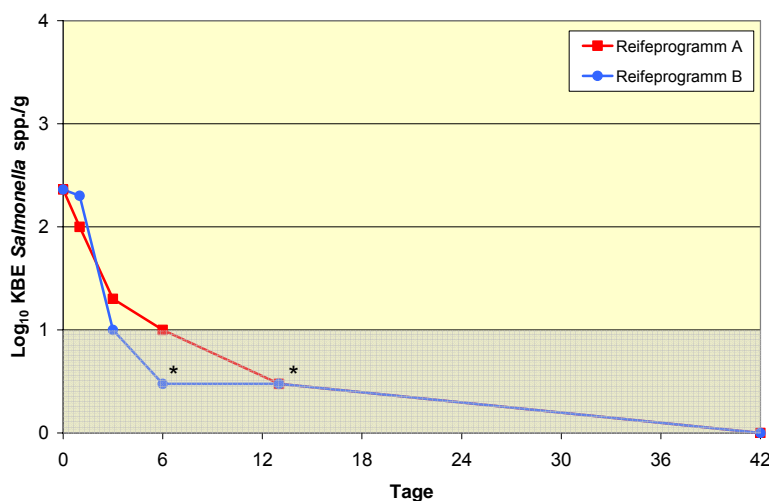


Abb. 25: Absterbeverhalten von *Salmonella* spp. in luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und Salmonellen nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnten

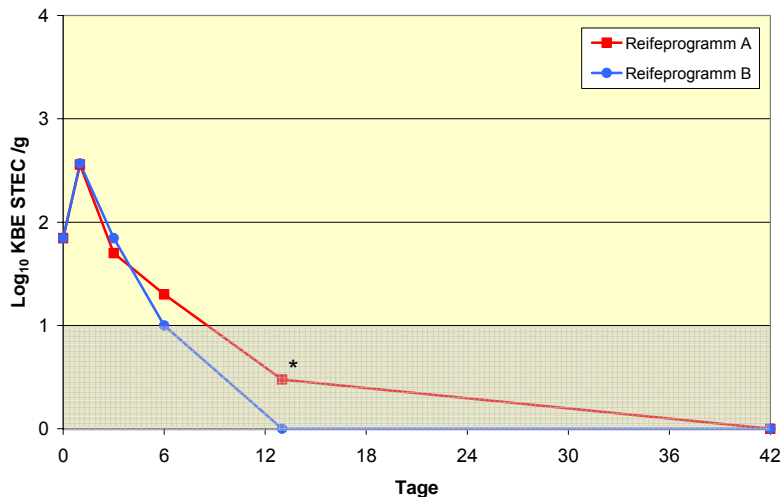


Abb. 26: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

den Chargen aus dem Reifeprogramm A waren zu diesem Zeitpunkt noch ca. 20 KbE/g nachzuweisen. Am Tag 42 waren Salmonellen unabhängig vom Reifeprogramm nur noch nach Anreicherung mittels PCR zu detektieren.

Shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC). Innerhalb der ersten 24 Stunden stiegen die Keimzahlen kurzfristig an und fielen dann rasch auf nicht mehr nachweisbare Werte am Tag 13 (Programm B) ab. Zum gleichen Zeitpunkt konnten in den mit dem Reifeprogramm A hergestellten Chargen STEC/EHEC nach Anreicherung noch detektiert werden (Abb. 26).

Am Tag 42 konnten auch nach selektiver Anreicherung und molekularbiologischer Diagnostik keine STEC/EHEC mehr nachgewiesen werden.

Bei einer Inokulationsdosis ($9,0 \times 10^3$ KbE/g) wurde ebenso eine schnelle Absterberate von STEC/EHEC festgestellt (ohne Abb.). Der STEC/EHEC-Nachweis war bei Würsten aus dem Reifeprogramm B bereits ab dem Untersuchungstag 13 negativ. Bei Würsten aus dem Programm A konnten STEC/EHEC ab Tag 13 nur nach Anreicherung detektiert werden.

Produkttyp E: Schimmelpilzgereifte Minisalami

Die für die Challengeuntersuchungen produzierten schimmelpilzgereiften Minisalamis zeigt Abbildung 27.

Physikalisch-chemische Parameter. Zum Herstellungszeitpunkt wurde ein a_w -Wert von 0,965 gemessen (Abb. 28). Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen bis zum 13. Tag deutlich ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt lagen die a_w -Werte bei 0,7848 (Programm A) und 0,772 (Programm B) und blieben vom Tag der Verpackung unter Schutzatmosphäre bis zum Untersuchungsende am Tag 42 nahezu konstant (0,7866 bzw. 0,7696).



Abb. 27: Schimmelpilzgereifte Minisalamis am Tag 13 der Herstellung.

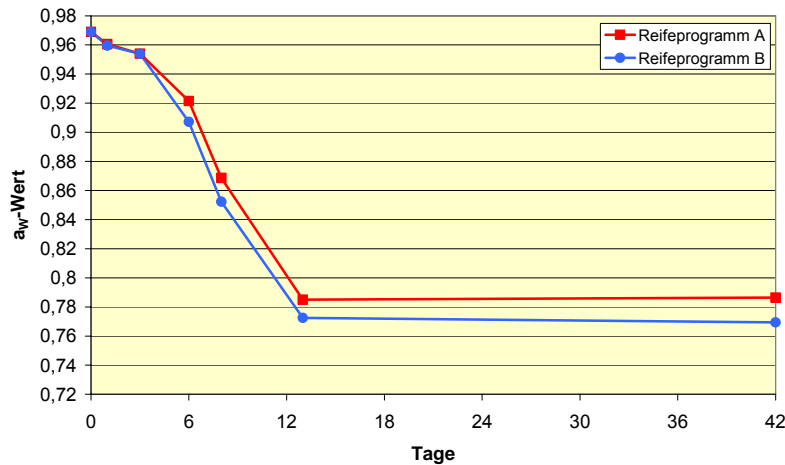


Abb. 28: Verlauf der a_w-Werte bei schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E)

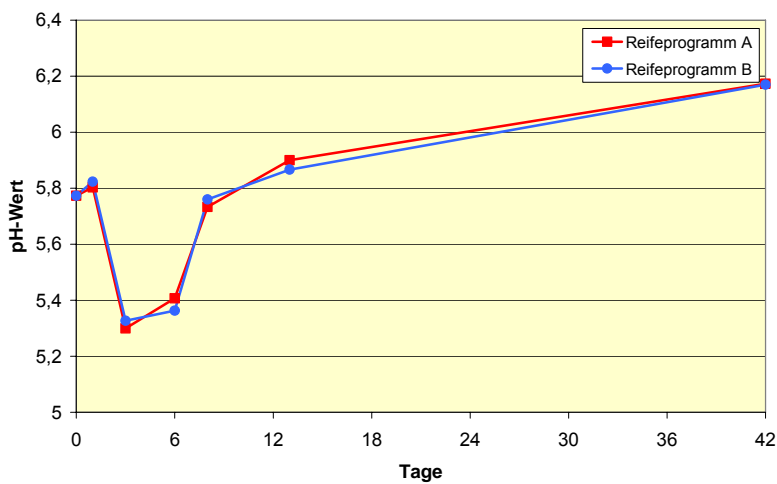


Abb. 29: Verlauf der pH-Werte in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E)

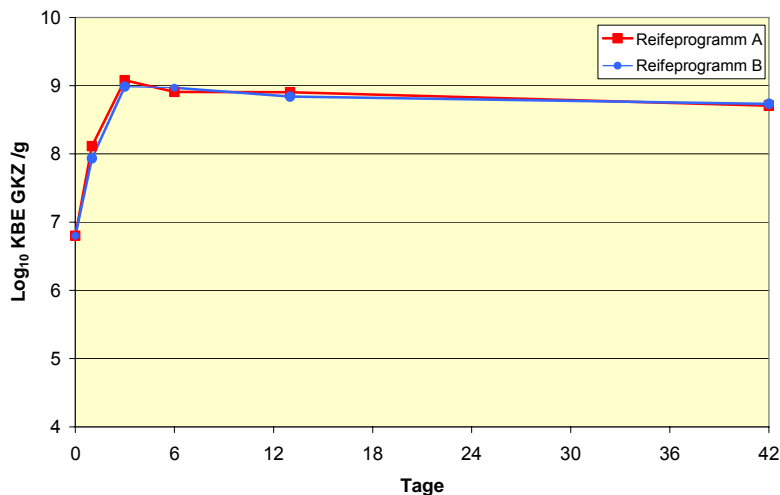


Abb. 30: Verlauf der Gesamtkeimzahl (GKZ) in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E)

Der Anfangs-pH-Wert lag bei 5,78 und fiel bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,3 und 5,35 (Abb. 29) ab. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg der pH-Wert in der Minisalamis an, ein Effekt, der durch die Produktion von basischen Stoffwechselprodukten

durch die Edelschimmelpilzkultur erwartungsgemäß verstärkt wurde, so dass am Tag 42 pH-Werte von 6,18 gemessen werden konnten. Die unterschiedlichen Reifeprogramme wirkten sich dabei nicht auf die Messwerte aus.

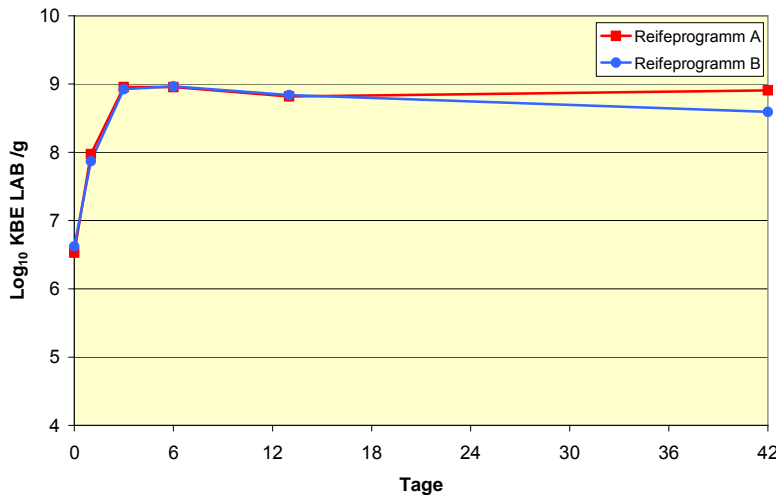


Abb. 31: Wachstum der Milchsäurebakterien in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E)

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Der Verlauf der Gesamtkeimzahlen (Abb. 30) war bei allen Versuchschargen nach 3 Tagen mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl (Abb. 31) vergleichbar. Ein Einfluss der Edelschimmelpilzkultur auf die Höhe und Entwicklung der Gesamtkeimzahlen oder Milchsäurebakterien war in den durchgeführten Untersuchungen nicht zu erkennen.

Salmonella spp.. In den Chargen beider Reifeprogramme reduzierte sich, nach einem sehr kurzen Anstieg der Keimzahlen am 1. Tag, die Ausgangskonzentration bis

zum Tag 13 und darüber hinaus bis zum Ende des Versuchszeitraumes am Tag 42. Zu diesem Zeitpunkt waren Salmonellen nur noch nach Anreicherung und PCR-Detektion nachweisbar. Das Reifeprogramm B wirkte sich effektiver auf die Absterberate der inokulierten Salmonellen aus, was durch die höhere Keimzahl von 40 Kbe/g im Reifeprogramm A am 13. Tag dokumentiert wird.

Für die Chargen mit einer höheren Salmonellenbelastung wurde das Brät mit einer Dosis von $5,0 \times 10^3$ Kbe/g inokuliert. Die Absterbekinetiken der Salmonellen in den Würsten der beiden Reifeprogramme

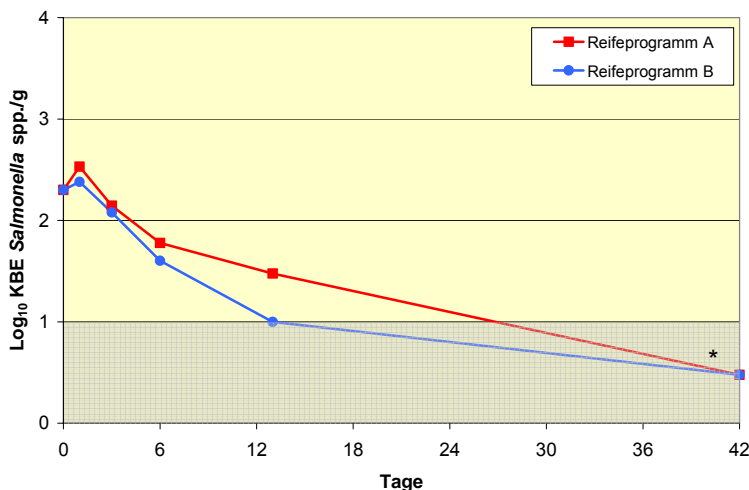


Abb. 32: Absterbeverhalten von *Salmonella* spp. in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen.

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ Kbe/g) unterschritten wurde und Salmonellen nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnten

waren analog zu den Produkten der Challenge-Tests mit niedriger Belastungshöhe (ohne Abb.). Am Tag 13 lag die Keimzahl zwischen 50 (Reifeprogramm A) und 10 KbE/g (Reifeprogramm B), und am Untersuchungstag 42 waren Salmonellen nur noch über Anreicherung nachzuweisen.

Shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC). Innerhalb der ersten 24 Stunden konnte beim Reifeprogramm A zunächst ein Anstieg der Keimzahl beobachtet werden. Mit einsetzender Abtrocknung des Produktes nahm die Zellzahl jedoch im weiteren Verlauf ab. Am Tag 6 wurden in den Chargen beider Reifeprogramme annähernd gleiche Keim-

zahlen im Bereich von 50 KbE/g ermittelt. Mit Erreichen des Tages 13 bis zum Ende des Versuchszeitraumes war ein Nachweis von STEC unabhängig vom Reifungsverfahren nur noch nach Anreicherung und mittels PCR möglich (Abb. 33).

Auch bei einer Inokulationsdosis von $1,2 \times 10^4$ KbE/g wurde eine schnelle Absterberate der pathogenen Keime beobachtet. Am Tag 13 konnten in beiden Reifeprogrammen annähernd gleiche Keimzahlen von etwa 40 KbE/g nachgewiesen werden. Mit fortschreitender Reifung nahm die Zellzahl weiter ab, so dass am Tag 42 ein Nachweis nur noch nach Anreicherung möglich war.

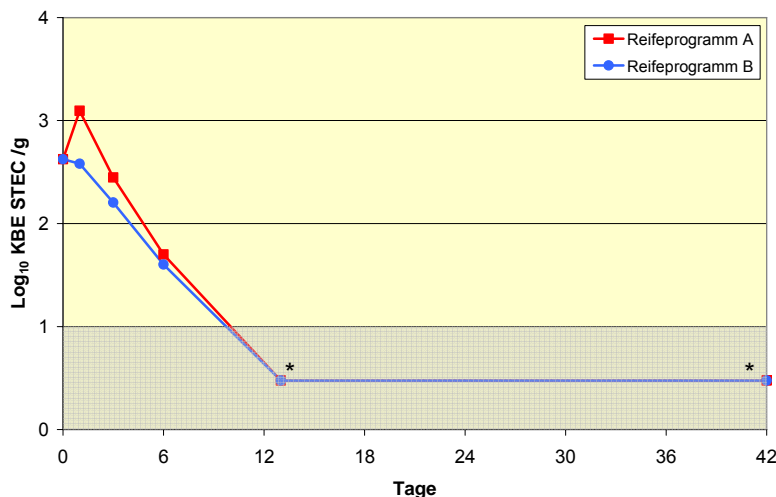


Abb. 33: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.
* Wert ist willkürlich gesetzt und dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Diskussion

In den kleinkalibrigen Minisalamis, die für die Challenge-Teste hergestellt wurden, haben Gram-negative Keime wie Salmonellen und STEC/EHEC aufgrund der produkttypischen Charakteristika keine Überlebenschancen und sterben im Laufe der Reifung und nachfolgenden Lagerung z. T. vollständig ab. Die Ergebnisse der Challengeuntersuchungen mit fünf unterschiedlichen Minisalami-Typen belegen zweifelsfrei, dass die mikrobiologische Stabilität der Produkte hoch ist und das Verhalten der überprüften Lebensmittelinfektionserreger in den Bereich „Good and Best

Case“ eingeordnet werden kann. Unabhängig von den Inokulationsdosen von 10^2 und 10^4 KbE/g Brät konnte bei allen Chargen über den gesamten Versuchszeitraum eine deutliche Abnahme der ursprünglichen Keimdichte beobachtet werden, eine Vermehrung von *Salmonella* spp. und STEC/EHEC fand nicht statt.

In den geräucherten und luftgetrockneten Minisalami-Produkten lag die Keimdichte in den mit der niedrigen Inokulationsdosis belasteten Chargen nach der Reifung am Tag der Abgabe an den Verbraucher (Tag 8) unter der quantitativ erfassbaren mikrobiologischen Nachweisgrenze von $1 \log_{10}$

KbE/g (entspricht zehn KbE/g). Bei den schimmelpilzgereiften Produkten wurde diese Nachweisgrenze nach 13 Tagen unterschritten, ebenfalls also zu einem Zeitpunkt, an dem die Produkte verpackt werden und in den Handel gelangen.

Beim Unterschreiten dieser Grenze war in vielen Fällen nur noch der qualitative Nachweis nach Anreicherungs- und PCR-Verfahren möglich. Vereinzelt war das Absterbeverhalten der pathogenen Keime so ausgeprägt, dass auch mit diesen diagnostischen Methoden kein positiver Nachweis mehr erzielt werden konnte (siehe Abb. 7, 8, 25, 26).

Diese mikrobiologischen Ergebnisse überraschen nicht, da sie mit den relevanten Messdaten zum pH- und a_w -Wert, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Tenazität der Erreger besitzen, sehr gut übereinstimmen. Sowohl diese Daten als auch die Entwicklung der Gesamtkeimzahlen und Milchsäurebakterien dokumentieren den guten hygienischen Status und die gute Herstellungspraxis der Minisalami-Produkte.

Die Ergebnisse bestätigen, dass vor allem die dynamisch ablaufenden Prozesse das Produkt mikrobiologisch stabilisieren. So sinkt der pH-Wert durch die zugegebenen Starterkulturen bereits innerhalb der ersten Tage je nach Produkt auf Werte von 5,1 bis 5,3. Diese sehr niedrigen pH-Werte verhindern bzw. verzögern ein Wachstum der eingepflichten Mikroorganismen. In den mit Edelschimmelpilzkulturen gereiften Erzeugnissen kommt es zu einer Anhebung des pH-Wertes im äußeren Randbereich. Grund dafür ist die Produktion alkalischer Stoffwechselprodukte durch die verwendeten Kulturen (i. d. R. *Penicillium nalgiovense*), die der produzierten Milchsäure entgegenwirken. Damit ist die potentielle Gefahr einer Erregervermehrung gegeben. Beobachtet werden konnte dies aber nicht, da vor allem die starke Abtrocknung der dünnkalibrigen Produkte ein Wachstum der Gram-negativen verhinderte. Wie gut dabei Pathogene mit den Laktobazillen konkurrieren können, hängt davon ab, wie schnell und wie tief der pH-Wert absinkt.

Dies wiederum wird nicht nur von der Art und Dosis der zugegebenen Starterkulturen beeinflusst, sondern auch von den gewählten Reifetemperaturen. So konnten wir in dieser Studie zeigen, dass bei Anfangsreifetemperaturen von 22 °C der pH-Wert zwar etwas langsamer absinkt als bei 24 °C, sich die niedrigere Temperatur jedoch positiv auf die mikrobielle Stabilität des Produktes auswirken kann. Das Reifeprogramm B war somit dem Programm A überlegen und kann daher im Hinblick auf eine Erhöhung der mikrobiologischen Stabilität und Sicherheit der Produkte für die Praxisanwendung empfohlen werden.

Eine höhere Anfangstemperatur zu Beginn der Reifung scheint auch aus technologischer Sicht nicht unbedingt erforderlich zu sein, da sowohl die Umrötung als auch Geschmacksbildung bei tieferen Reifetemperaturen ebenso gut stattfindet.

Der Zusatz von Nitritpökelsalz (0,4-0,5 %) trägt zudem zur mikrobiologischen Stabilität der Produkte bei. Natriumnitrit entfaltet bereits ab pH-Werten von <6 eine antimikrobielle Wirkung (KABISCH *et al.*, 2008). 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). So reagieren die NO^{*}-Radikale, aber auch Peroxynitrit oder Distickstofftrioxid, mit den Bestandteilen der DNA und können zu einer Desaminierung und zu Strangbrüchen (oxidativer Schaden) führen (FANG, 1997). Des Weiteren können Proteine 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). Mit dem Zusatz von Nitrit kann in Rohwürsten eine Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen vor allem in den ersten drei Reifetagen effektiv verhindert werden (KABISCH *et al.*, 2009).

Ein wesentliches Kriterium für das Absterben der Erreger ist die schnelle Abtrocknung der kleinkalibrigen Rohwürste. Gram-negative Keime wie *Salmonella* spp. und STEC/EHEC verhalten sich im Vergleich zu Gram-positiven deutlich weniger resistent. Sie reagieren auf die dynamischen Vorgänge bei der Reifung und hierbei insbesondere auf die starke Abtrocknung sehr empfindlich, was bereits bei früheren Tenazitätsstudien u. a. mit langgereiften Rohwürsten festgestellt werden konnte (KABISCH *et al.*, 2009; KABISCH *et al.*, 2008; WIJNKER, 2009; MELLEFONT *et al.*, 2003). Der Wasseraktivitätswert sank mit fortschreitender Reifung kontinuierlich und erreichte nach 6 Tagen Werte unterhalb von 0,92. Bereits ab einem a_w -Wert von 0,94 wird ein Wachstum der pathogenen Gram-negativen Erreger verhindert (TIGANITAS *et al.*, 2009).

Die Challengeuntersuchungen bestätigen letztendlich auch die Befunde der Marktanalyse (GAREIS *et al.*, 2009) und zeigen, dass es sich bei den Minisalami-Produkten um mikrobiologisch sehr stabile Erzeugnisse handelt. Gram-negative pathogene Mikroorganismen wie Salmonellen und STEC/EHEC reagieren sehr empfindlich auf die in den Minisalamis vorherrschenden Bedingungen. Das Verhalten dieser Lebensmittelinfektionserreger in den kleinkalibrigen Rohwürsten ist durch ausgeprägte Absterbekinetiken gekennzeichnet, die, wie wir zeigen konnten, durch Optimierung der Reifeparameter noch zusätzlich verstärkt werden können. Die Ergebnisse der Challenge-Untersuchungen unterstützen frühere Schlussfolgerungen (GAREIS *et al.*, 2009) und lassen zweifeln, ob Minisalami-Produkte tatsächlich als Risikolebensmittel im Zusammenhang mit Salmonelloseausbruchsgeschehen in Verbindung gebracht werden können.

Danksagung

Wir bedanken uns beim Robert-Koch-Institut, Wernigerode, für die Überlassung des *S. Panama*-Ausbruchstammes und die kollegiale Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Wolfgang Rabsch. Ein herzlicher Dank ist an Frau Elke Gardill, Frau Liane Weber, Frau Georgine Krappmann, Herrn Jörgen Dresel und Herrn Andreas Ernst für die ausgezeichnete technische Assistenz gerichtet.

Literatur

- Cebula, T. A., W. L. Payne, and P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157-H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33:248-250.
- Fang, F. C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* 99:2818-2825.
- Gareis, M., J. Kabisch, R. Pichner, and H. Hechelmann. 2009. Vorkommen und Verhalten von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalamis, Teil 1: Ergebnisse einer Marktanalyse zum Vorkommen von *Salmonella* spp., shiga-toxinbildenden/enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC/EHEC), *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Minisalami-Produkten. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*: 48 (186): 215-224.
- Kabisch, J., R. Pichner, and M. Gareis. 2008a. Die ersten Reifetage sind entscheidend: Wirkung von Pökelsalz auf pathogene Keime in Rohwurstprodukten. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* 89: 409-413.
- Kabisch, J., R. Scheuer, W. Rödel, and M. Gareis. 2008b. Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*: 47 (180):99-105.
- Mellefont, L. A., T. A. McMeekin, and T. Ross. 2003. The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 83:281-293.
- Miko A., C. Dorn, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2000. *Salmonella*. BgVVHefte 2:143-165.
- Rahn, K., S. A. Degrandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galan, C. Ginocchio, R. Curtiss, and C. L. Gyles. 1992. Amplification of an *invA* Gene Sequence of *Salmonella* Typhimurium by Polymerase Chain Reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* 6:271-279.
- RKI. 2008. *Salmonella*-Panama-Erkrankungen: Zu einem überregionalen Ausbruch bei Kindern durch Minisalami-Sticks. *Epidemiologisches Bulletin* 5: 35-38.
- Rödel, W., R. Scheuer, and H. Wagner. 1989. Eine neue Methode zur Messung der Wasseraktivität in Fleischprodukten. *Fleischwirtschaft* 69:1396-1399.

Schmidt, H., H. Russmann, A. Schwarzkopf, S. Aleksic, J. Heesemann, and H. Karch. 1994. Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralblatt für Bakteriologie – International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases* 281:201-213.

Tiganitas, A., N. Zeaki, A. S. Gounadaki, E. H. Drosinos, and P. N. Skandamis. 2009. Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw

stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology: 134* (1-2, Food Micro 2008 'Evolving Microbial Food Safety and Quality' 1-4 September 2008, Aberdeen, Scotland, UK) 104-112.

Wijnker, J. J. 2009. Aspekte der Qualitätssicherung bei Naturdärmen - Review Teil 1. *Fleischwirtschaft* 89:51-58.