

Vorkommen und Verhalten von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalamis Teil 3: Ergebnisse von Challengestudien zur Überlebensfähigkeit von *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Minisalamis-Produkten

Occurrence and behaviour of food borne pathogens in minisalami
Part 3: Results of challenge studies on survival of *Listeria monocytogenes*
and *Staphylococcus aureus*

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

Zusammenfassung

In Challengetesten wurde das Verhalten der Gram-positiven Lebensmittelinfektionserreger *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Minisalami-Produkten überprüft. Bereits zuvor wurden gleiche Studien mit Gram-negativen Erregern (*Salmonella* spp. und shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *E. coli* [STEC/EHEC]) durchgeführt. Ausgelöst wurde die vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz initiierte Studie zur mikrobiologischen Stabilität von Minisalami durch die Einstufung dieser Produkte als ‚Risikolebensmittel‘ (RKI, 2008) und einen möglichen Zusammenhang zwischen Salmonellose-Fällen bei Kindern im Sommer 2007 und dem Verzehr von Minisalamis.

In zwei früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Belastung handelsüblicher Minisalamiprodukte mit Lebensmittelinfektionserregern sehr gering ist und das Verhalten von *Salmonella* spp. sowie STEC/EHEC in den kleinkalibrigen Rohwürsten durch deutlich ausgeprägte Absterbekinetiken gekennzeichnet war (GAREIS *et al.*, 2009 und 2010).

Analog dazu wurde die Tenazität von *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in Challengetesten überprüft. Dazu wurden unter definierten Bedingungen fünf unterschiedliche Typen von Minisalami-Produkten hergestellt, die artifiziell mit den jeweiligen Pathogen-Keimpools in zwei verschiedenen Dosierungen (1×10^2 KbE/g und 1×10^4 KbE/g) belastet wurden. Gegenüber Veränderungen des a_w - und pH-Wertes bei der Reifung der Produkte zeigten sich die Gram-positiven Erreger deutlich weniger beeinflussbar als Gram-negative Keime. Für die luftgetrockneten und geräucherten Produkte wurden Reduktionen der Ausgangskeimzahlen in Abhängigkeit der Inokulationsdosis und des Reifeprogramms bis zu 2 log-Stufen festgestellt. In keinem der überprüften Produkttypen war ein vollständiges Absterben der Pathogene zu beobachten, so dass diese auch am Ende der Versuche nach 42 Tagen nachgewiesen werden konnten. In schimmelpilzgereifter Minisalami blieb die Keimzahl der eingeimpften *Listerien* bis zum Versuchsende auf gleichem Niveau, für *Staphylococcus aureus* wurde ein Wachstum und eine relative Zunahme der Ausgangskeimzahlen um bis zu 4 log-Stufen beobachtet. Damit bergen diese Erzeugnisse bei einer möglichen Belastung mit Gram-positiven Erregern ein Gefährdungspotential, das mit der Auswahl geeigneter Reifeprogramme zwar verringert, jedoch nicht vollständig reduziert werden kann. Bei diesen Produkten ist die hygienische Qualität der Rohstoffe daher von besonderer Bedeutung.

Schlüsselwörter

Minisalami – Lebensmittelinfektionserreger – *Listeria monocytogenes* – *Staphylococcus aureus* – Absterbekinetik – Tenazität

Key Words

raw fermented sausage – food borne pathogen – *Listeria monocytogenes* – *Staphylococcus aureus* – challenge test – survival – growth

Summary

Up to now the behaviour and survival of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in minisalami-sausages have 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.

Minisalamis 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).

We already have reported earlier that the German Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection 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 (GAREIS *et al.*, 2009 and 2010). Minisalamis have been suggested by other authors to be risk foods because of a link between an outbreak of salmonellosis caused by *S. Panama* among children in Germany in summer 2007 and epidemiological data pointing to minisalamis as causative food vector for these cases (RKI, 2008).

The first results of the minisalami project have been already published and give information 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), the behaviour of *Salmonella* spp. in minisalami (GAREIS *et al.*, 2010) and the results obtained in a challenge study carried out with STEC/EHEC (GAREIS *et al.*, 2010). Here we describe the survival of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in five types of artificially contaminated minisalami products. Like before, the batters were inoculated prior to further processing with low ($2 \log_{10}$ cfu/g) and high ($4 \log_{10}$ cfu/g) levels of a pool of three isolates each of *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*, respectively. Their survival, as affected by the particular recipe of the product and the ripening program, was monitored over 42 days.

A decline of the Gram positive pathogens was observed in the smoked and air dried salamis. Depending on the initial dose and ripening programme, a reduction of up to two \log_{10} -units could be observed. A complete reduction to the zero level could, however, not be reached. A bad or even worst case scenario was revealed in batches of mould ripened minisalamis challenged with *Listeria monocytogenes* or *Staphylococcus aureus*. The germ counts remained either steady (*Listeria monocytogenes*) or increased up to 4 log-units (*Staphylococcus aureus*). While the behaviour of Gram-negatives (*Salmonella* spp. and STEC/EHEC) in the minisalami-products was characterized by significant reductions of the initial germ counts, the Gram-positive pathogens proved to be more resistant towards drying and low levels of water activity and pH. This is of particular importance for mould ripened minisalamis, which are characterized by a slower decrease of the pH at the beginning of the ripening process and a faster increase of the pH during the further processing and storage.

Einleitung

Ausgelöst durch eine Einstufung von Minisalamis als Risikolebensmittel (RKI, 2008) in Folge einer epidemiologischen Untersuchung zur Aufklärung einer überregionalen Häufung von Infektionen mit *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Panama bei Kindern und Kleinkindern im Sommer 2007, wurde von uns das Verhalten von Infektionserregern in Minisalami-Produkten überprüft.

In bereits früher publizierten Beiträgen zu dieser Thematik berichteten wir über die Ergebnisse einer Marktanalyse zum Vor-

kommen von Lebensmittelinfektionserregern in Minisalamis sowie das Verhalten von *Salmonella* spp. und shigatoxin-bildenden/enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC/EHEC) in diesen Produkten (GAREIS *et al.*, 2009 und 2010). Diese Ergebnisse zeigten, dass die im Handel befindlichen Produkte durchweg von hoher hygienischer Qualität waren und in keiner der insgesamt 206 untersuchten Proben Salmonellen, STEC/EHEC sowie *Listeria monocytogenes* nachzuweisen waren. In 10 Produkten wurden allerdings Koagulase-positive Staphylokokken mit niedrigen Keimzahlen ($1,0 \times 10^2$ KbE/g) gefunden.

In Challengeuntersuchungen, bei denen Minisalamis bei der Herstellung artifizell mit Gram-negativen Infektionserregern belastet wurden, konnte gezeigt werden, dass sowohl *Salmonella* spp. als auch STEC/EHEC wenig widerstandsfähig gegenüber Abtrocknung und pH-Wert-Änderungen sind und in den Minisalamiprodukten rasch und teilweise vollständig absterben. Auf diese Absterbekinetiken haben die Rezeptur und das verwendete Reifeprogramm Einfluss (GAREIS *et al.*, 2010).

Überprüft wurde in Challengetests auch das Verhalten der Gram-positiven Lebensmittelinfektionserreger *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*, über das in diesem Beitrag berichtet wird.

Wie in den Untersuchungen zuvor wurden die Challengetests mit jeweils fünf verschiedenen Produkttypen durchgeführt und der Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen auf die Überlebensfähigkeit der Erreger überprüft. Hierfür wurden die Minisalamis mit einer niedrigen bzw. hohen Inokulationsdosis des jeweiligen Pathogen-Pools kontaminiert.

Material und Methoden

Pathogen-Pools

In den Challengetests wurden je ein Listerien-Pool und ein Staphylokokken-Pool eingesetzt. Jeder Pool setzte sich aus drei Isolaten aus der Stammsammlung des In-

stitutes zusammen (Tab. 1). Für jeden Pool wurden zwei unterschiedliche Inokulationsdosen ($2 \log_{10}$ KbE/g [= 1×10^2 KbE/g] und $4 \log_{10}$ KbE/g [= 1×10^4 KbE/g]) eingesetzt, um eine niedrige bzw. hohe Keimbelastung des Brätes zu simulieren. Die Zugabe und Herstellung der Inokula erfolgte bei Herstellungsbeginn und wie bereits beschrieben (GAREIS *et al.*, 2010). Die unbeimpften Kontrollchargen (Negativkontrollen) wurden dabei immer zuerst produziert, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Überprüfung des Verhaltens der Zielkeime erfolgte unabhängig voneinander in separaten Testserien. Sämtliche Untersuchungen erfolgten dabei im Dreifachansatz.

Minisalami-Produkte

Eingesetzt wurden fünf unterschiedliche Produkttypen (GAREIS *et al.*, 2009 und 2010). Für die Challengetests wurde ausschließlich hygienisch hochwertiges Rohmaterial verwendet und die Qualität jeweils vor Versuchsbeginn mikrobiologisch abgesichert. Die Herstellung der Minisalamis erfolgte nach Standardrezepturen unter Verwendung von Nitritpökelsalz (NPS), Gewürzen, Starterkulturen und Natriumascorbat. Bei der Reifung wurde analog zu Challengestudien mit Gram-negativen Infektionserregern (*Salmonella* spp. und STEC/EHEC) neben den unterschiedlichen Produkttypen der Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen untersucht (GAREIS *et al.*, 2010).

Tab. 1: Für die Challengetests verwendeten Pathogene

Pathogen	Stammnummer	Herkunft
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	SLCC 6139 Li 127	Liquor / Mensch (D) (Uni-Mannheim)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	NTCC 10527 Li 2	Liquor / Mensch (D) (BfR-Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4d	Li 135	Produktionsumfeld der Rohwurstherstellung (MRI)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A u. C	St 15	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A u. C	St 16	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A u. C	St 35	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)

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

NTCC: National Collection of Type Cultures

Li und St: Stammnummern der Stammsammlung des MRI, Kulmbach

Am Tag der Herstellung (Tag 0) sowie nach einem, 3, 6, 13 und 42 Tagen wurden Proben sowohl von den unbeimpften Negativkontrollen als auch von den kontaminierten Produkten im Dreifachansatz untersucht. Dabei wurden die Medianwerte incl. der Standardabweichungen ermittelt.

Physikalisch-chemische Parameter und mikrobiologische Diagnostik

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. Die mikrobiologischen Begleituntersuchungen umfassten die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ), die Pseudomonaden-, *Enterobacteriaceae*- und Milchsäurebakterienkeimzahl wie zuvor beschrieben (GAREIS *et al.*, 2009 und 2010).

Nachweis von Listeria monocytogenes

Die Rohwürste wurden mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten, anschließend unter sterilen Bedingungen 10 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 90 ml Peptonwasser für 2 min im Stomacher homogenisiert und für 1 h stehengelassen (LFGB § 64 L 00.00-32:2005). Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfolgte auf PALCAM-Medium (Merck, Darmstadt) und parallel dazu auf Chromogen-Listeria-Agar (OCLA; bio-Mérieux, Nürtingen). Kolonien von *Listeria monocytogenes* erscheinen auf diesem Agar türkis und sind von einem hellen Hof umgeben. Die Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden zur Bestätigung auf Standard I-Agar subkultiviert. Zur Bestätigung wurden die HENRY'sche Beleuchtung und der CAMP-Test durchgeführt sowie das Hämolyseverhalten, die Rhamnose- und Xyloseverwertung überprüft.

Nachweis von Staphylococcus aureus

Jeweils 20 g Probe wurden in 180 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Für den quantitativen Nachweis wurde eine dezimale Verdünnungsreihe

angelegt und auf Mannitol-Salz-Agar mit Ei-Emulsion (MSE, Merck, Darmstadt) sowie auf Baird-Parker Agar (RPF-Medium, Oxoid, Wesel) ausgespatelt. Die Agarplatten wurden anschließend für 24 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Dabei zeigten typische, auf MSE-Agar gewachsene Staphylokokken-Kolonien ein goldgelbes Koloniezentrum und eine weiße Randzone. Im Gegensatz dazu konnten auf dem RPF-Nährboden für *Staphylococcus aureus* charakteristische schwarz-graue, glänzende, gewölbte Kolonien mit umgebendem, opakem Präzipitationshof nachgewiesen werden (LFGB § 64 L 00.00-55:2004-12). Zur Bestätigung wurde der Test auf Clumping Factor mit jeweils fünf typischen Kulturen durchgeführt.

Ergebnisse

Produkttyp A: Geräucherte Minisalami aus Schweinefleisch

Physikalisch-chemische Parameter. Die Daten zum Verlauf von a_w - und pH-Werten wurden bereits mitgeteilt (GAREIS *et al.*, 2010). Der a_w -Wert der Produkte lag zu Beginn bei 0,969 und sank bis zum Tag der Verpackung (Tag 8) auf 0,868 (Programm A) und auf 0,856 (Programm B). Danach und bedingt durch den behinderten Wasseraustausch im Anschluss an die Verpackung, nahm der Wasseraktivitätswert nur noch geringfügig ab.

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 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 Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahlen waren nahezu identisch, wobei die Keimzahlen bei der Ermittlung der GKZ durch die miterfassten Mikrokokken der Starterkulturen höher lagen (GAREIS *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes. Das Verhalten von *Listeria monocytogenes* in geräucherten Minisalamis gibt Abbildung 1 wieder. Sowohl bei einer hohen Inokulationsdosis von $4,23 \log_{10}$ KbE/g ($1,7 \times 10^4$ KbE/g) als auch bei der niedrigen Beimpfung von $2,78 \log_{10}$ KbE/g ($6,1 \times 10^2$ KbE/g) konnte nach einer anfänglichen Zunahme am ersten Tag eine Reduktion der Listerien in beiden Reifeprogrammen beobachtet werden. Am Ende des Versuchszeitraumes betrug die Reduktion bei der hohen Kontaminationsdosis im Vergleich zur Ausgangskonzentration fast zwei log Stufen, bei der niedrigen Be-

impfungsmenge dagegen nur ca. eine halbe Zehnerpotenz. Am Tag 42 konnten in allen Chargen annähernd gleiche Keimzahlen im Bereich zwischen 170 und 400 KbE/g detektiert werden (siehe Abb. 1).

Staphylococcus aureus. Das Ausgangsmaterial wurde mit einer Keimsuspension von $2,48 \log_{10}$ KbE/g ($3,0 \times 10^2$ KbE/g) bzw. $4,54 \log_{10}$ KbE/g ($3,5 \times 10^4$ KbE/g) angeimpft (siehe Abb. 2). Nach einem Anstieg der Keimzahl in den ersten 3 Tagen sank die Zellzahl bis zum Tag 6 wieder auf das Ausgangsniveau.

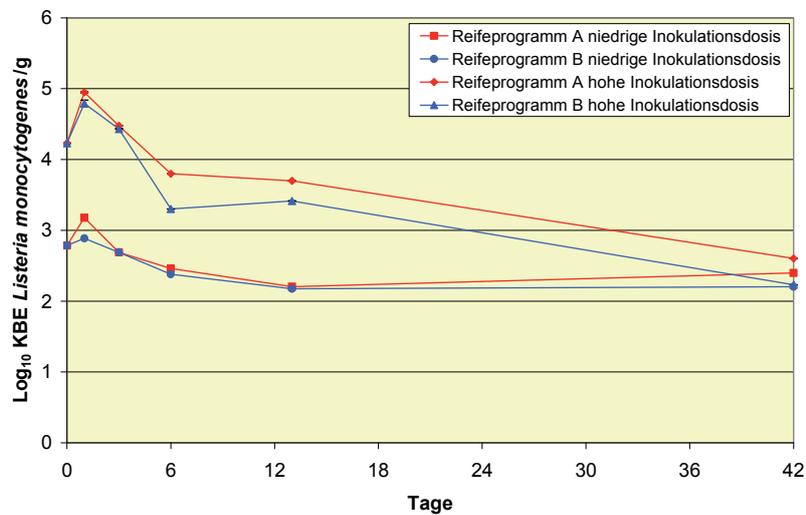


Abb. 1: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in geräucherten Minisalamis aus Schweinefleisch (Produkttyp A) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

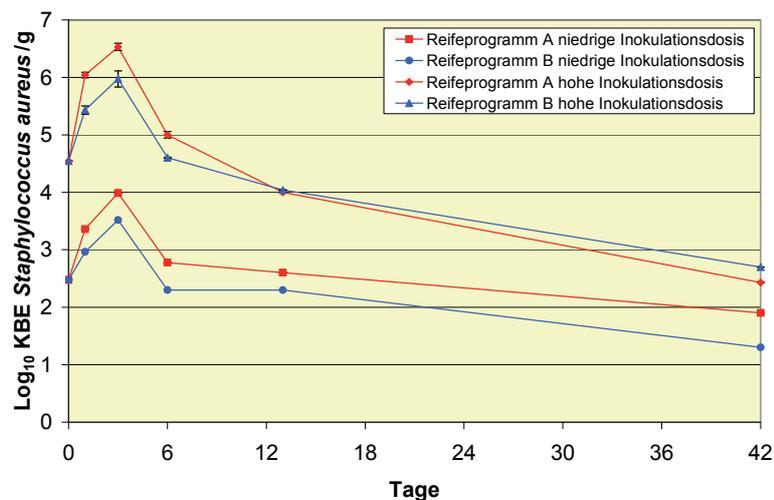


Abb. 2: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in geräucherten Minisalamis aus Schweinefleisch (Produkttyp A) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Hierbei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Reifeprogrammen A und B festgestellt. So war in den Produkten innerhalb der ersten drei Tage bei Reifeprogramm A ein Anstieg um 1,5 und bei Programm B nur um eine Zehnerpotenz zu beobachten. Zwischen den Tagen 6 und 42 sank die Keimzahl dann kontinuierlich ab und erreichte im Falle der hohen Inokulationsdosis Werte von ca. 300 KbE/g. In den Produkten mit der niedrigen Beimpfung fiel der Unterschied zwischen den Reifeprogrammen am Tag 42 deutlicher aus. So wurde im praxisüblichen Verfahren (A) eine Keimzahl von 80 KbE/g und im alternativen Reifeprogramm B am Tag 42 eine Zellzahl von 20 KbE/g detektiert (siehe Abb. 2).

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 13. Untersuchungstag 0,01 a_w -Wert Einheiten ausmachte. Am Tag 42 wurde im Programm A ein a_w -Wert von 0,86 und im Programm B von 0,849 gemessen.

Der pH-Wert fiel von anfangs 5,85 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. Über den Verlauf der a_w - und pH-Werte in diesem Produkttyp wurde bereits früher berichtet (GAREIS *et al.*, 2010).

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Die Verläufe der GKZ und Milchsäurebakterienzahl waren nahezu identisch und produkttypisch (GAREIS *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes. *Listeria monocytogenes* wurde dem Brät in Keimsuspensionen von 2,2 \log_{10} KbE pro g ($1,5 \times 10^2$ KbE/g) bzw. 3,84 \log_{10} KbE/g ($7,0 \times 10^3$ KbE/g) zugegeben (siehe Abb. 3). Nach einer anfänglichen Vermehrung in den ersten ein bis drei Reifetagen nahmen die Keimdichten mit fortlaufender Reifung kontinuierlich ab. Besonders ausgeprägt fand dies in den Chargen mit der hohen Beimpfungsdosis statt. Die Keimzahl reduzierte sich in diesen Ansätzen um nahezu 3 log Stufen.

Wie aus dem Verlauf der Keimzahlen zu erkennen ist, wirkte sich das Reifeprogramm B effizienter auf die Absterbekinetik der pathogenen Keime aus. Bei Versuchsende am Tag 42 wurden in diesen Ansätzen *L. monocytogenes*-Keimzahlen im Bereich von 10-15 KbE/g nachgewiesen.

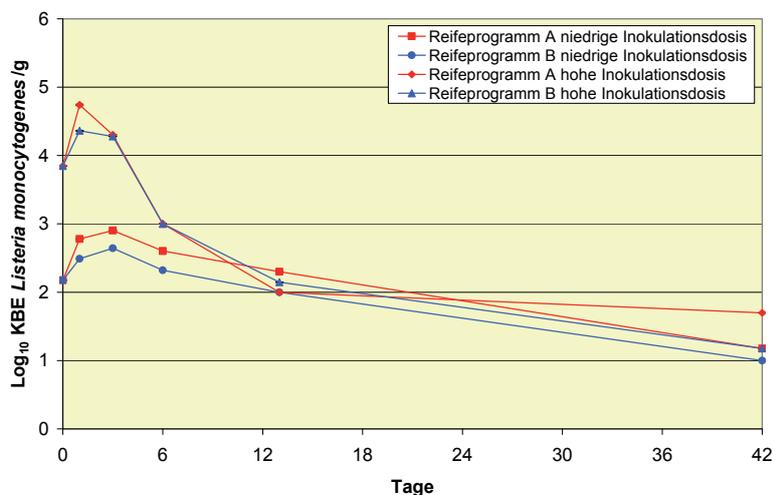


Abb. 3: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in geräucherten Minisalamis aus Schweine- und Rindfleisch (Produkttyp B) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Staphylococcus aureus. Nach einem deutlichen 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. In den Chargen mit einer niedrigen Inokulationsdosis wurde im praxisüblichen Verfahren A am Tag 42 eine Keimzahl von ca. 20 KbE/g und mit dem alternativen Programm B eine Zell-

zahl von 15 KbE/g erreicht (siehe Abb. 4). Im Vergleich dazu konnten in den Chargen mit einem hohen Inokulum Zellzahlen von $3,2 \times 10^3$ KbE/g (Reifeprogramm A) und $2,5 \times 10^2$ KbE/g detektiert werden.

Analog zu den Versuchen mit *Listeria monocytogenes* war die Abnahme der Keimzahl in den Chargen mit einer hohen Beimpfung mit fast 2 Zehnerpotenzen deutlich stärker als in den Produkten mit einem geringen Inokulum.

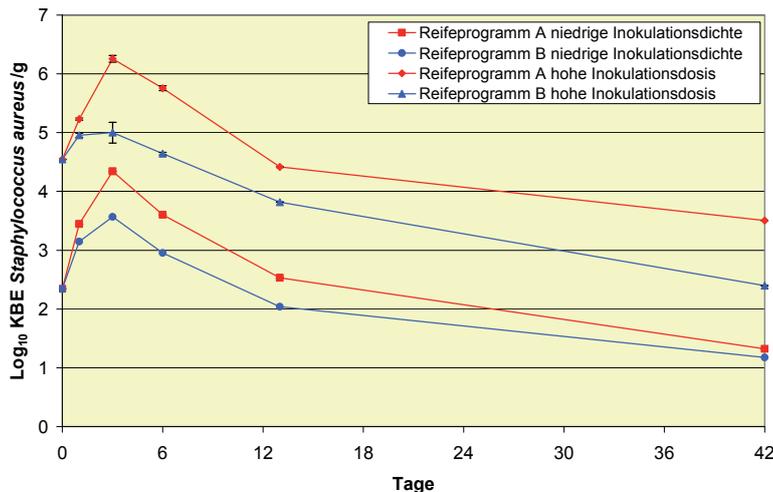


Abb. 4: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in geräucherten Minisalamis aus Schweine- und Rindfleisch (Produkttyp B) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

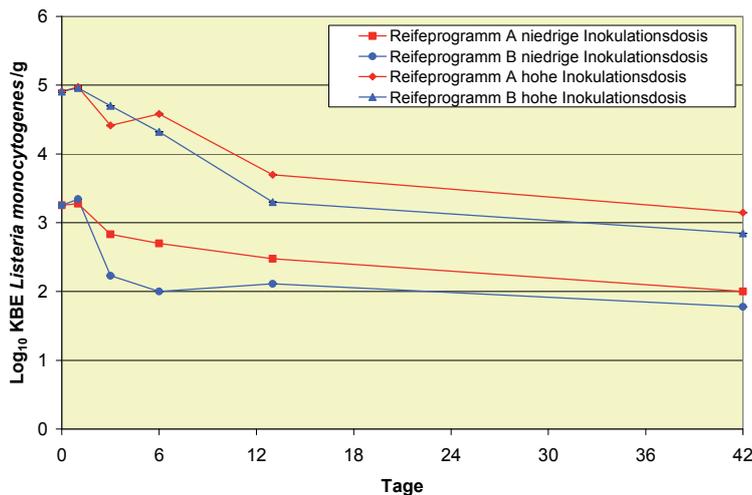


Abb. 5: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in geräucherten Minisalamis aus Geflügelfleisch (Produkttyp C) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Produkttyp C: Geräucherte Minisalami aus Geflügelfleisch

Physikalisch-chemische Parameter. Die anfänglich gemessenen 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). Der pH-Wert nahm von 5,85 auf 5,3 (Tag 3) ab und stieg in den nachfolgenden Tagen wieder auf pH-Werte um 5,45 an (GAREIS *et al.*, 2010).

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Die Gesamt- und Milchsäurebakterienzahlen zeigten 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 (GAREIS *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes. In den Minisalamis aus Geflügelfleisch blieb die Keimzahl der inokulierten Listerien unter dem Einfluss der beiden Reifeprogramme in den ersten 24 Stunden relativ konstant und sank anschließend kontinuierlich bis zum 13. Reifetag. Auch in diesem Produkttyp wirkte sich das Reifeprogramm B deutlicher auf die Keimzahlabnahme aus (Abb. 5). Am Tag 42 konnten in den Chargen mit einer niedrigen Beimpfung Keimzahlen von 60 bis 100 KbE/g nachgewiesen wer-

den, während in den höher belasteten Proben Zellzahlen von $1,4 \times 10^3$ KbE/g (A) und 7×10^2 KbE/g (B) festgestellt wurden (siehe Abb. 5).

Der Vergleich der Absterbekinetiken zeigt, dass in den Chargen mit einer hohen Belastung die Keimzahlreduktion mit 2 Zehnerpotenzen deutlich stärker ausgeprägt ist als in den Produkten mit einer niedrigen Beimpfungsdosis.

Staphylococcus aureus. Das Ausgangsmaterial wurde mit einer Keimsuspension von $2,6 \log_{10}$ KbE pro g ($3,9 \times 10^2$ KbE/g) bzw. von $3,71 \log_{10}$ KbE/g ($5,1 \times 10^3$ KbE/g) inokuliert (siehe Abb. 6). Auffällig war der unterschiedliche Einfluss der beiden Reifeprogramme. Das praxisübliche Programm A führte innerhalb der ersten Tage zu einer deutlichen Vermehrung der inokulierten Staphylokokken um etwa 1 log Stufe. Im weiteren Verlauf nahmen die Keimzahlen wieder ab, um schließlich am Ende des Versuchszeitraumes auf relativ hohem Niveau zu verbleiben. Ein im Vergleich dazu wachstumshemmender Einfluss konnte mit dem Programm B erzielt werden. Hier blieb die Keimzahl bis zum Tag 13 nahezu unverändert und reduzierte sich dann um etwa eine halbe log Stufe auf 1×10^2 KbE/g (niedrige Anfangsdosis) und $9,6 \times 10^2$ KbE/g (hohe Anfangsdosis) bis zum Tag 42 (siehe Abb. 6).

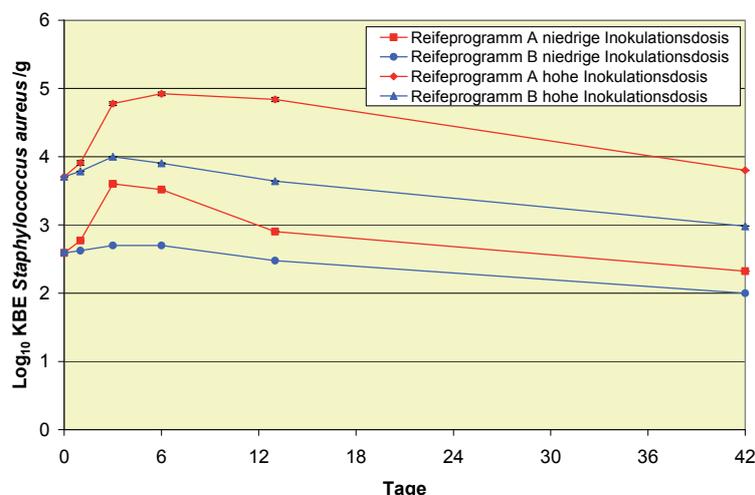


Abb. 6: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in geräucherten Minisalamis aus Geflügelfleisch (Produkttyp C) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Produkttyp D: Luftgetrocknete Minisalami

Physikalisch-chemische Parameter. Der a_w -Wert betrug am Tag der Herstellung der luftgetrockneten Minisalami 0,972. Die Abnahme der Wasseraktivität wirkte sich bei dem Reifeprogramm B deutlich stärker aus. So konnten bereits am 6. Tag mit Werten von 0,9136 (Programm A) und 0,9071 (Programm B) deutliche Unterschiede festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Verpackung lagen die a_w -Werte bei 0,8745 bzw. 0,8656 (GAREIS *et al.*, 2010).

Die anfänglichen 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 und stiegen dann im Laufe der weiteren Reifung und Lagerung auf Werte von 5,55 bzw. 5,58 an.

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Parallel zum Abfall des pH-Wertes innerhalb der ersten Tage stieg die Anzahl der Milchsäurebakterien an. Bis zum Ende der Untersuchungen sank diese Keimzahl nicht unter $7 \log_{10}$ KbE/g (1×10^7 KbE/g). Einen ähnlichen produkttypischen Verlauf nahm die Gesamtkeimzahl (GAREIS *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes. Nach einem in allen Chargen zu beobachtenden kurzzeitigen Anstieg nahm die Listerienzahl im

weiteren Verlauf der Herstellung kontinuierlich ab (Abb. 7). Deutlich ausgeprägt war die Absterbekinetik in den Würsten mit einer hohen Inokulationsdosis ($\log 5$), die mit dem Reifeprogramm B hergestellt wurden. Hier reduzierte sich die Ausgangskeimzahl um 2 log-Stufen auf 6×10^2 KbE/g.

In den Minisalamis mit einer niedrigeren Inokulationsdosis reduzierte sich der Keimgehalt unabhängig vom Programm auf $1,3 \log_{10}$ KbE/g (20 KbE/g).

Staphylococcus aureus. Bei *S. aureus* war innerhalb der ersten 24 Stunden ein Anstieg der Ausgangskeimzahlen von $2,32 \log_{10}$ KbE/g ($2,1 \times 10^2$ KbE/g) auf etwa $\log 3$ (Programm A und B) bzw. von $4,58 \log_{10}$ KbE/g ($3,8 \times 10^4$ KbE/g) auf $9,7 \times 10^4$ KbE/g (Reifeprogramm B) und bis zu $1,3 \times 10^6$ KbE/g (Programm A) zu beobachten (Abb. 8).

In den Chargen mit der hohen Beimpungsdosis wirkte sich das Reifeprogramm B effektiver auf die Wachstumshemmung aus, was zu einer Reduktion von etwa einer log Stufe am Tag 42 führte. Das Verhalten von *S. aureus* in den Ansätzen mit einem niedrigen Inokulum war für beide Herstellungsprogramme ähnlich. Bis zum dritten Tag fielen die Staphylokokkenzahlen wieder auf das Ausgangsniveau und blieben auf diesem Level bis Tag 42.

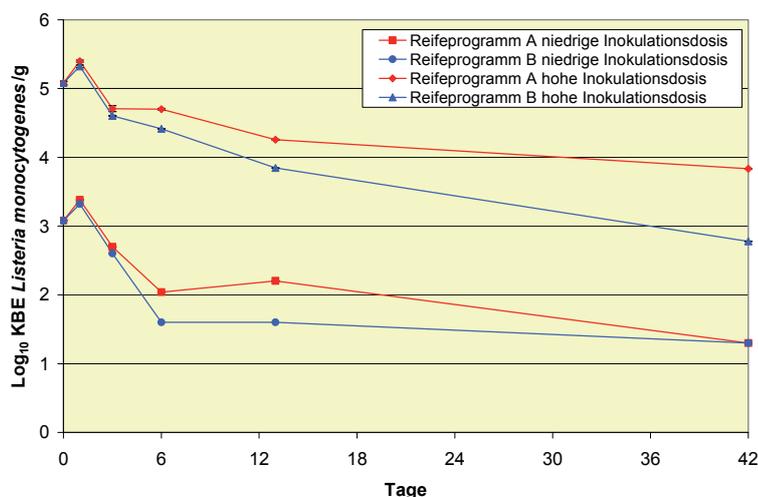


Abb. 7: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

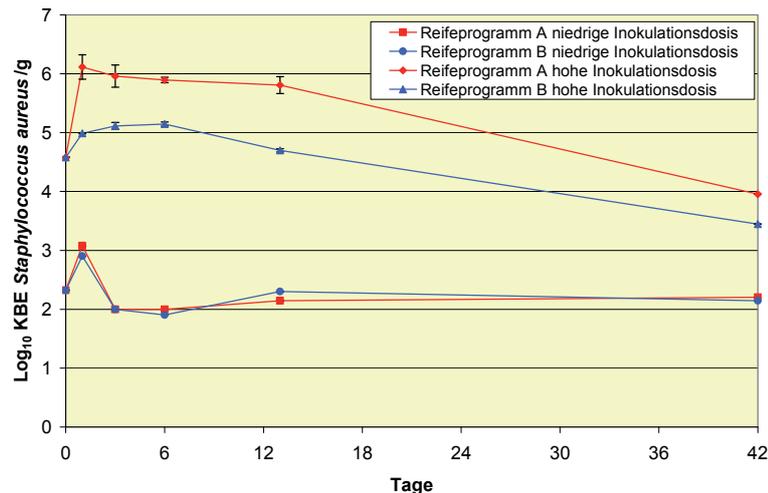


Abb. 8: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in luftgetrockneten Minisalamis (Produkttyp D) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Produkttyp E: Schimmelpilzgereifte Minisalami

Physikalisch-chemische Parameter. Die a_w -Werte der schimmelpilzgereiften Minisalamis lagen anfänglich bei 0,965, am Tag 13 (Verpackungszeitpunkt) dann bei 0,784 (Programm A) und 0,772 (Programm B) und blieben dann bis zum Tag 42 mit 0,786 bzw. 0,769 nahezu konstant (GAREIS *et al.*, 2010).

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 ab. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg der pH-Wert in der Minisalami 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.

Aerobe mesophile Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl. Der Verlauf der Gesamtkeimzahlen war bei allen Versuchschargen nach 3 Tagen mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl vergleichbar. Ein Einfluss der Edelschimmelpilzkultur auf die Höhe und Entwicklung der Gesamtkeimzahlen oder Milchsäurebakterien war in den durchgeführten Untersuchungen nicht zu erkennen (GAREIS *et al.*, 2010).

Listeria monocytogenes. Eine anfängliche Vermehrung der Listerien konnte in allen Chargen beobachtet werden. Mit dem Reifeprogramm B wurde das Wachstum der Listerien effektiver gehemmt als mit dem Reifeprogramm A, was insbesondere bei den Minisalamis mit der niedrigeren Listerienbelastung zu beobachten war (Abb. 9). Zum Ende des Versuches wurden in diesen Chargen Keimzahlen von 1×10^3 KbE/g (Programm A) und 5×10^2 KbE/g (Programm B) nachgewiesen.

In den Würsten mit der hohen Beimpfungs-dosis sanken die Listerien-Keimzahlen ab Tag 6 und erreichten am Tag 42 Keimzahlen von $3,1 \times 10^5$ KbE/g (Programm A) bzw. von $3,7 \times 10^4$ KbE/g (Programm B).

Staphylococcus aureus. Das Ausgangsmaterial wurde mit einer Keimsuspension von $2,11 \log_{10}$ KbE/g ($1,3 \times 10^2$ KbE/g) oder $5,08 \log_{10}$ KbE/g ($1,2 \times 10^5$ KbE/g) belastet (siehe Abb. 10).

Sehr auffällig war der bis zum Tag 6 ausgeprägte starke Anstieg der Keimzahlen um drei bis vier log-Stufen in den mit Programm A gereiften Würsten. In den Produkten mit der niedrigen Inokulationsdosis wurde dieses sehr hohe Niveau bis zum Ende des Versuchszeitraumes nachgewiesen ($5,9 \times 10^5$ KbE/g), in den Würsten mit der höheren Anfangsbelastung waren am

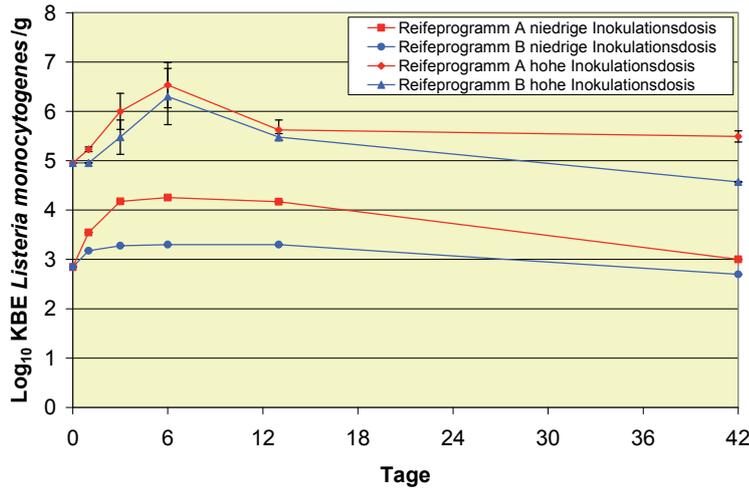


Abb. 9: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Tag 42 immer noch um 2 log Stufen höhere Belastungen festzustellen.

Die Reifung mit dem Programm B resultierte in den Produkten, die mit der niedrigen *S. aureus* Dosis belastet waren, in einer flacheren Wachstumskurve und einer Erhöhung der Keimzahlen um 2 log-Stufen ab dem Tag 13 bis zum Ende des Versuchszeitraumes ($9,0 \times 10^3$ KBE/g). Zum Ende des Versuchszeitraumes konnten in

den Chargen mit der höheren Beimpfung für beide Reifeprogramme annähernd gleiche Keimzahlen von ca. $8,0 \times 10^6$ KBE/g festgestellt werden. Im Vergleich dazu wurden in den Minisalamis mit der niedrigen Beimpfung deutliche Unterschiede bei den Keimzahlen beobachtet. Im Reifeprogramm A wurden nach 42 Tagen noch Zellzahlen von $5,9 \times 10^5$ KBE/g und im Programm B nur noch von $9,0 \times 10^3$ KBE/g detektiert (siehe Abb. 10).

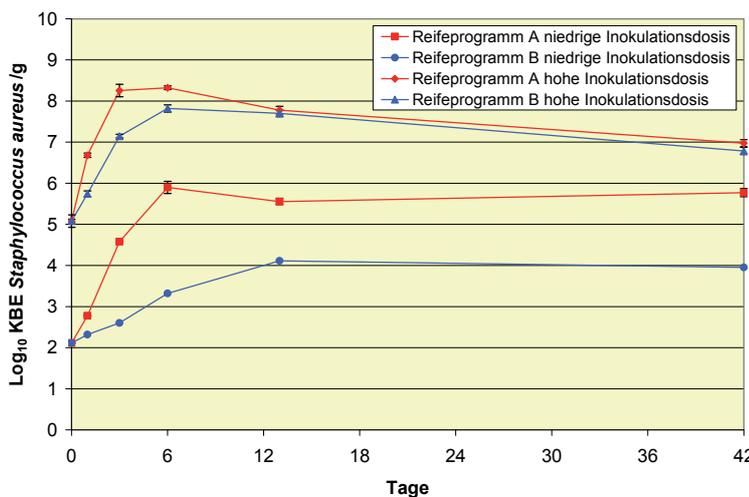


Abb. 10: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in schimmelpilzgereiften Minisalamis (Produkttyp E) unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen. Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Diskussion

In den geräucherten und luftgetrockneten Minisalamis konnte in den ersten Tagen der Reifung eine Vermehrung der beiden Gram-positiven Infektionserreger *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* um bis zu 2 log-Stufen festgestellt werden. Auf Grund der produkttypischen Charakteristika, den niedrigen pH- und a_w -Werten, nahmen die Keimzahlen dann aber im weiteren Verlauf der Reifung und Lagerung, unabhängig von den Inokulationsdosen, ab. Im Gegensatz zu den Gram-negativen Keimen (*Salmonella* spp. und STEC/EHC) konnte in keinem der Produkte ein vollständiges Absterben der Keime beobachtet werden, so dass das Verhalten der überprüften Lebensmittelinfektionserreger im Szenarienbereich zwischen „Good Case“ (Absterben der Keimzahlen, allerdings bis zum Ende des Versuchszeitraumes ein Nachweis möglich) und „Bad Case“ (die ursprünglichen Keimzahlen bleiben bis zum Ende auf etwa gleichem Niveau) eingeordnet werden kann (GAREIS *et al.*, 2010). Auch wenn unter dem Einfluss eines geänderten Reifeprogrammes Reduktionen der ursprünglich aufgebrauchten Keimmengen erreicht werden konnten, so wurden in all diesen Produkten Keimzahlen ohne Anreicherungsverfahren erfasst und im Bereich zwischen 50 und 400 KbE/g detektiert.

In den Chargen mit den höheren Beimpfungsdosen waren die Reduktionen der Ausgangskeimgehalte deutlicher ausgeprägt als in den Würsten, die mit einer niedrigen Dosis belastet waren (vgl. Abb. 1-5 und 8). Denkbare Ursachen für diese Beobachtungen könnten auf den relativ höheren Nährstoffbedarf zurückzuführen sein und die größere Wahrscheinlichkeit, dass bei höheren Keimzahlen Zellen auf reaktive Nitritzerfallsprodukte treffen könnten. Der Kontakt mit Nitritzerfallsprodukten wie NO*-Radikale, Peroxynitrit oder auch Distickstofftrioxid führt bei den Bakterienzellen zu diversen Schäden an DNA, Proteinen und der Zellwand mit nachfolgendem Absterben der Keime (FANG, 1997).

Unterstützung findet dieser Erklärungsansatz insbesondere durch die Ergebnisse der ersten Reifungstage. In den ersten 6 Reifetagen zeigten sich die deutlichsten Reduktionen der Keimzahlen (vgl. Abb. 1-5, 8), also in einem Zeitraum, in dem sich Nitrit noch direkt semi-quantitativ in den Minisalamis nachweisen lässt (Ergebnisse nicht dargestellt).

Im Gegensatz zu den Gram-negativen Keimen (*Salmonella* spp. und STEC/EHEC) sanken die Keimzahlen in keinem Minisalamiprodukt unter die mikrobiologische Nachweisgrenze von 1 log₁₀ KbE/g Brät (GAREIS *et al.*, 2010). Ein verantwortlicher Grund dafür ist die bei *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* vorhandene höhere Tenazität gegenüber osmotischem Stress (GANDHI and CHIKINDAS, 2007; STEWART *et al.*, 2005). Bei Gram-positiven Keimen liegen Transportsysteme zur Aufnahme von Osmoregulatoren bereits konstitutiv vor, während Gram-negative diese erst bei einsetzendem osmotischen Stress bilden müssen (GUTIERREZ *et al.*, 1995; SLEATOR *et al.*, 2003). Somit sind *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* in der Lage, vergleichsweise schnell auf sinkende a_w -Werte zu reagieren (SLEATOR *et al.*, 2003). Gram-negative Bakterien hingegen nehmen zur kurzfristigen Aufrechterhaltung des Zellinnendrucks Kaliumionen auf. Durch die gleichzeitige Aufnahme des Gegenions Glutamat kommt es in der Zelle zur Anreicherung von hohen Konzentrationen von Kaliumglutamat (GUTIERREZ *et al.*, 1995; MELLEFONT *et al.*, 2003) mit der Folge einer möglicherweise gestörten Enzymfunktionalität (GUTIERREZ *et al.*, 1995; MELLEFONT *et al.*, 2003). Zudem zeigen Gram-negative Bakterien einen relativ geringen Turgor, was bei osmotischen Stresssituationen zu einer stärkeren Plasmolyse führt. In Kombination mit beeinträchtigten Enzymfunktionen führt diese Plasmolyse bei *Salmonella* spp. und STEC/EHEC zu höheren Absterberaten und erklärt die gegenüber niedrigeren a_w -Werten ausgeprägte Empfindlichkeit der Gram-negativen Erreger (GUTIERREZ *et al.*, 1995; MELLEFONT *et al.*, 2003; WIJNKER *et al.*, 2006).

In den schimmelpilzgereiften Minisalamis verhielten sich die Gram-positiven Erreger deutlich anders als in den anderen Produkttypen, was zu Szenarien führte, die in die Bereiche „Bad Case“ (*Listeria monocytogenes*) und „Worst Case“ (*Staphylococcus aureus*) eingestuft werden müssen (vgl. Abb. 9 und 10). Während im Reifeprogramm A mit *Listeria monocytogenes* bei beiden Inokulationsdosen eine anfängliche Vermehrung um 1,5 Zehnerpotenzen beobachtet werden konnte (bis zum Tag 6), betrug diese im gleichen Zeitraum bei *Staphylococcus aureus* sogar 3-4 Zehnerpotenzen (vgl. Abb. 9 und 10). Mit dem Programm B konnten diese Wachstumsraten beeinflusst werden, was in deutlich geringeren Zunahmen (0,5-1 bzw. 2-3 log-Stufen) resultierte.

Die schimmelpilzgereiften Minisalamis unterscheiden sich von den anderen Produkttypen durch den gezielten Einsatz von Edelschimmelkulturen für die Reifung und die dadurch bewirkten Änderungen des pH-Wertverlaufes im Produkt. Der Einsatz von Schimmelkulturen wie z.B. *Penicillium nalgiovense* führt zur Bildung von alkalischen Stoffwechselprodukten, die der produzierten Milchsäure antagonistisch entgegenwirken und schließlich in einer Anhebung des pH-Wertes vor allem im Randbereich resultieren. Der initiale pH-Wert-Abfall ist vergleichsweise geringer und der im Laufe der Reifung üblicherweise stattfindende pH-Wert-Anstieg dagegen schneller. Eine Folge ist, dass dadurch der chemische Zerfall des Nitrits in seine toxischeren reaktiven Zerfallsprodukte wie z.B. Peroxynitrit in den ersten Tagen der Reifung langsamer stattfindet und die antimikrobielle Wirkung reduziert ist. Das Fehlen der zwei wichtigen Hürden, pH-Wert-Senkung und Nitritwirkung, wirkt sich in den mit Edelschimmeln gereiften Produkten daher negativ auf die mikrobiologische Stabilität aus und ermöglicht Gram-positiven Keimen ungeachtet der Abtrocknung ein Überleben auf hohem Keimniveau bzw. auch eine Vermehrung.

Im Verlaufe der Reifung und Lagerung bis zum Tag 42 wurde ein weiteres Wachstum von *Listeria monocytogenes* und *Staphy-*

lococcus aureus einhergehend mit der Abtrocknung (<0,87, vgl. GAREIS *et al.* 2010) zwar gehemmt, ein deutliche Absterbekinetik der inokulierten Bakterien war bis zum Versuchsende jedoch nicht zu beobachten (vgl. Abb. 9 und 10).

Diese Ergebnisse bestätigen letztendlich auch die Befunde der Marktanalyse (GAREIS *et al.*, 2009), bei der in den 206 untersuchten Produkten ausschließlich Koagulase-positive Staphylokokken (in n=10 Produkten), nicht jedoch Salmonellen, STEC/EHEC und Listerien detektiert werden konnten.

Danksagung

Ein herzlicher Dank ist an Frau Elke Gardill, Frau Liane Weber, Frau Georgine Krappmann, Frau Hannelore Ponert und Herrn Jörgen Dresel für die ausgezeichnete technische Assistenz gerichtet.

Literatur

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980). Untersuchung von Lebensmitteln, Methode: L 00.00-32:2005: Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes*

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980). Untersuchung von Lebensmitteln, Methode: L 00.00-55:2004-12: Kultureller Nachweis von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und anderen Arten)

Fang, F. C. 1997. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* 99:2818-2825.

Gandhi, M. and M. L. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.

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* (STC/EHEC), *Listeria monocytogenes* und Koagulase-positiven *Staphylokokken* in Minisalamis-Produkten. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 48:215-224.

Gareis, M., J. Kabisch, R. Pichner, and H. Hechelmann. 2010. 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. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* 49:9-32.

Gutierrez, C., T. Abee, and I. R. Booth. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 28:233-244.

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.

RKI. 2008. *Salmonella*-Panama-Erkrankungen: Zu einem überregionalen Ausbruch bei Kindern durch Minisalami-Sticks. *Epidemiologisches Bulletin* 5.

Rödel, W., R. Scheuer, and H. Wagner. 1989. A New Method of Determining Water Activity in Meat-Products. *Fleischwirtschaft* 69:1396-1399.

Sleator, R. D., G. A. Francis, D. O'Beirne, C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2003. Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *Journal of Applied Microbiology* 95:839-846.

Stewart, C. M., M. B. Cole, J. D. Legan, L. Slade, and D. W. Schaffner. 2005. Solute-specific effects of osmotic stress on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 98:193-202.

Wijnker, J. J., G. Koop, and L. J. A. Lipman. 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* 23:657-662.