

Isolierung und Identifizierung von psychrophilen Hefen aus vakuumverpacktem Rindfleisch

Isolation and identification of psychrophilic yeasts from vacuum-packed beef

J. KABISCH, E. ZIEGLER, A. STAUFENBIEL, H.-G. HECHELMANN,
R. PICHNER und M. GAREIS

Zusammenfassung

Hefen sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet und kommen in vielen unterschiedlichen Habitaten vor. So zeichnen sich Hefen dadurch aus, dass Isolate auch bei sehr niedrigen Wasseraktivitätswerten, sehr geringen Sauerstoffkonzentrationen und Temperaturen von $<0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wachsen. Hinsichtlich ihrer Bedeutung als Verderbserreger auf gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch ist nur sehr wenig bekannt. Vakuumierte Rindfleischproben aus Neuseeland und Deutschland wurden daher auf das Vorkommen von Hefen und die Zusammensetzung der Hefepopulation untersucht. Insgesamt 26 Hefeisolate wurden sequenziert und davon alleine 13 der Gattung *Candida* zugehörig bestimmt. Weitere Arten ließen sich den Gattungen *Cryptococcus* und *Debaryomyces* zuordnen. Zudem wurden drei Hefen isoliert und identifiziert, über deren Vorkommen auf Fleisch bislang nicht berichtet wurde. Es handelt sich um Arten der Gattung *Mrakia*, die in der Antarktis, den Gletschern von Patagonien und den Alpen gefunden wurden. Die Isolate H 378 und H 379 wurden mittels molekularbiologischer und biochemisch-morphologischer Verfahren als *Mrakia gelida* identifiziert. Der Stamm H 380 wurde als *Mrakia robertii* bestimmt. Im Vergleich mit den Literaturdaten zeigt das Isolat jedoch einige deutliche Unterschiede bei der Verwertung von Zuckern und Zuckeralkoholen. Nach jetzigem Wissensstand könnte es sich beim Stamm H 380 um eine Subspezies von *Mrakia robertii* oder sogar um eine neue Art handeln.

Summary

Yeasts can be found in many habitats as they are able to grow at very low water activity values, very low oxygen concentrations and even temperatures below $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. However, little is known about their role as possible spoilage organisms on vacuum packed meat. In this study eight bags of vacuum-packed beef were sampled from four different manufacturers. The total counts of yeasts were close to 1×10^4 cells g^{-1} of beef and there was no evidence of systematic contamination and spoilage. Overall, 26 yeasts were isolated and identified as belonging to 4 genera by 26S rRNA gene sequencing of the D1/D2 region. The yeasts identified were *Candida sake*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus laurentii* and *Mrakia gelida* (H 378, H 379), and *Mrakia* spp. (H 380). The psychrophilic yeast genus *Mrakia* is reported for the first time in vacuum-packed beef. Both myo-inositol and D-glucuronate were assimilated. Positive results of the DBB (diazonium blue B) colour reaction and urease test were observed. *Mrakia* strain H 380 was identified by 26S rRNA gene sequencing as *Mrakia robertii* but showed significant biochemical differences to the reference strain indicating that this particular isolate represents a possible new species for *Mrakia*.

Schlüsselwörter Hefen – *Mrakia gelida* – *Mrakia* spp. – vakuumverpacktes Rindfleisch

Key Words yeasts – *Mrakia gelida* – *Mrakia* spp. – vacuum-packed beef

Einleitung

Psychrophile Hefen werden im Gegensatz zu den psychrophilen Bakterien wie z.B. *Clostridium estertheticum* (BRODA *et al.* 2009; BRODA *et al.* 2003), *Pseudomonas* spp. oder *Brochothrix thermosphacta* (ERCOLINI *et al.* 2009; RUSSO *et al.* 2006) beim Verderb von vakuumverpackter Ware als unbedeutend angesehen – ungeachtet dessen, dass Hefen im direktem Vergleich mit psychrophilen Bakterien durchaus auch in der Lage sind sowohl bei Temperaturen von unter 0 °C als auch bei sehr niedrigen a_w - und pH-Werten zu wachsen. Hefen können somit durchaus bei Temperaturen um die –5 °C zur dominierenden Spezies auf Fleisch und Fleischerzeugnissen werden (LOWRY and GILL 1984) und zu Verderbserscheinungen wie Gasbildung, Farbabweichungen und Geschmacksveränderungen führen (DIRIYE *et al.* 1993; ISMAIL *et al.* 2000; QUIROS *et al.* 2008; SANZ *et al.* 2005). Unter Kühlung (0-5 °C) haben psychrophile Hefen im Gegensatz zu den psychrotoleranten Milchsäurebakterien eine zu lange Generationszeit (WALKER and AYRES 1970). Dadurch kann sich normalerweise auf Fleisch- und Fleischprodukten relativ zügig eine von Lactobacillen dominierte Konkurrenzflora etablieren (HU *et al.* 2008; JONES *et al.* 2008).

Durch die Einführung neuer Verarbeitungs- und Verpackungstechniken kann sich jedoch die Zusammensetzung der Mikroorganismen verändern. Dies wiederum könnte ein Vorteil für psychrophile Hefen sein, die durch die fehlende bakterielle Mikrobiota zu dominierenden Spezies werden könnten (ABUNYEWA *et al.* 2000; FLEET 1992; NIELSEN *et al.* 2008; SAMELIS and SOFOS 2003; VANDERZANT *et al.* 1983).

Hefen können über vielfältige Wege auf den Schlachtkörper oder auf das fertige Fleischerzeugnis gelangen. In Studien konnte gezeigt werden, dass Hefen, die in den Stallungen der Tiere gefunden worden waren, bereits kurz nach der Schlachtung von der Fleischoberfläche isoliert werden konnten (BAXTER and ILLSTON 1976;

DALTON *et al.* 1984). Als weitere Kontaminationswege spielen verunreinigte Schlachtwerkzeuge, die Luftumwälzung (NORTHCUTT *et al.* 2004; REN and FRANK 1992) in den Schlachtbetrieben und ungenügende Desinfektionsmaßnahmen in den Betrieben eine bedeutende Rolle (SAMELIS and SOFOS 2003; WALKER and AYRES J.C. 1970). Während in den Stallungen und im Schlachthof ein breites Spektrum an Hefepopulationen nachgewiesen werden konnte, scheinen sich auf Fleischerzeugnissen allerdings nur bestimmte Spezies durchzusetzen. Zur dominierenden mykogenen Mikrobiota auf Fleisch- und Fleischerzeugnissen gehören Arten der Gattungen *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* und *Trichosporon*, wobei mit 60-80 % *Candida* Arten am häufigsten vertreten sind (DILLON 1998; SAMELIS and SOFOS 2003; WOLTER *et al.* 2000). Über das Vorkommen und die Zusammensetzung der Hefepopulationen bzw. deren mögliches Verderbspotential in vakuumverpacktem Fleisch ist bislang wenig bekannt und es existieren zurzeit nur empirische Daten. Ziel war es daher, das Vorkommen von psychrophilen Hefen in vakuumverpackten Rindfleischproben aus dem Handel erstmalig näher zu charakterisieren.

Material und Methoden

Isolierung

Die Isolierung der Hefen erfolgte aus acht vakuumverpackten Rindfleischproben. Diese wurden im Handel von vier verschiedenen Produzenten gekauft. Dabei stammten jeweils vier Produkte aus Neuseeland und vier aus Deutschland. Von jeder Probe wurden 20 cm² in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 180 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der Hefenzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf Malz Extrakt Agar (pH 5,6) ausgespatelt und für 72 Stunden bei 25 °C und parallel bei 4 °C für 168 Stunden aerob inkubiert.

*Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl,
Pseudomonaden-, Enterobacteriaceae-
und Milchsäurebakterienkeimzahl*

Parallel zur Untersuchung auf psychrophile Hefen wurden die Proben einer begleitenden mikrobiologischen Diagnostik unterzogen. Dazu wurden 20 cm² in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 180 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der Gesamtkeimzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf Standard I Agar ausgespatelt und für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die *Enterobacteriaceae*-Keimzahl wurde auf DHL-Agar nach 24 h bei 37 °C und die Milchsäurebakterien-Anzahl auf MRS-Agar nach 48 h bei 30 °C bestimmt. Die Berechnung der *Enterobacteriaceae* sowie die Zahl aerober Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimflora erfolgte wie unter der Methode L 06.00 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Punkt 8 beschrieben.

DNA-Extraktion

Für die molekularbiologische Identifizierung wurden anschließend von den Platten morphologisch verschiedene Isolate ausgewählt und aus diesen die DNA isoliert. Dazu wurden die Hefe-Isolate für 72 h bei 10 °C in Standard I Nährbouillon kultiviert. Anschließend wurde 1 ml der Kultur entnommen und bei 5000xg für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem weiteren Schritt in 600 µl sterilem Sorbit-Puffer aufgenommen und mit dem Hefe-Protokoll (Quiagen, DNeasy Blood and Tissue Kit) weiter aufgearbeitet.

Tab. 2: Cyclerprogramm für die Amplifikation der D1/D2 Domäne

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

PCR

Für die Sequenzierung wurde die D1/D2 Domäne des 26S rRNA Gens ausgewählt. Die D1/D2 Domäne am 5` Ende der großen Untereinheit (26S) weist ausreichend Substitutionen auf, anhand derer Spezies identifiziert werden können und für fast alle Hefespezies liegen Sequenzen dieser Domäne in Datenbanken vor. Dadurch ist eine relativ schnelle und zuverlässige Identifizierung von Hefen mit Hilfe der Sequenzierung der D1/D2 Domäne möglich. Als Primer wurden die von LIBKIND *et al.* 2003 beschriebenen Primer NL 1 (5`GCAT ATCAATAAGCGGAGGAAAAG3`) und NL 4 (5`GGTCCGTGTTTCAAGACGG3`) ausgewählt und wie in Tabelle 1 angegeben dem PCR-Ansatz zugesetzt. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Ansatz. Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine Reagentienkontrolle (*A. bidest.* anstelle von DNA) als Negativkontrolle mitgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden unmittelbar nach dem Pipettieren in den Thermocycler verbracht und die DNA mit dem in Tabelle 2 beschriebenen Programm amplifiziert.

Tab. 1: Reaktionsansatz für die PCR

Reagenz	µl/Mix
LAL-Wasser	29,50 µl
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase	0,5 µl
dNTP-Mix	5,0 µl
MgCl ₂	3,0 µl
PCR Puffer gold	5,0 µl
NL 1	1,0 µl
NL 4	1,0 µl
Aufbereitete Proben-DNA	5,0 µl

Nach dem Ablauf des Cyclerprogrammes (vgl. Tab. 2) wurden die Amplifikate mit je 5 µl Gel-Loading-Puffer gemischt, 10 µl einer Probe auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Je Gel wurden der Molecular Weight Marker XIII (Roche, Mannheim) und eine Reagentienkontrolle mitgeführt. Nach Färben der Gele in Ethidiumbromidlösung wurden die Laufbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Sequenzierung

Die Sequenzierung der D1/D2 Region wurde direkt von den aufgereinigten PCR-Produkten vorgenommen. Dazu wurden die Proben an einen kommerziellen Sequenzierservice (Eurofins MWG, Ebersberg, Deutschland) geschickt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem Aufreinigungskit Qiaquick PCR (Qiagen, Mannheim) entsprechend den Herstellerangaben. Die Stämme wurden anschließend mit Hilfe der GeneBank Database (BLASTN freeware from www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) identifiziert. Die Amplifikation der PCR-Produkte sowie die Sequenzierung der 600-650 bp großen D1/D2 Region wurde zweimal wiederholt. Zur Kontrolle der Aufarbeitung und Sequenzierung wurden die folgenden Referenzstämme der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) mit sequenziert: *Candida zeylanoides* DSMZ Nr. 70185, *Candida sake* DSMZ Nr. 70763, *Cryptococcus curvatus* DSMZ Nr. 70022, *Debaryomyces hansenii* DSMZ Nr. 3428, *Yarrowia lipolytica* DSMZ Nr. 70561 und *Mrakia frigida* DSMZ Nr. 46348 (Typstamm).

Biochemische und morphologische Charakterisierung der Isolate

Zur Bestätigung der Sequenzierung wurden die Hefeisolate anschließend mit Standardverfahren biochemisch und morphologisch näher charakterisiert (KURTZ-MANN and FELL 1998).

Für die Assimilationstests wurden die folgenden Verbindungen ausgewählt: Glucose, D-Galaktose, L-Sorbose, Saccharose, Maltose, Zellobiose, Raffinose, Melezitose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Ribose,

L-Rhamnose, D-Glucosamin, Glycerin, Stärke, myo-Inositol, Arbutin, Melibiose, D-Gluconat, Inulin, Methanol, Ethanol, Citrat, Mannitol und D-Glucuronat.

Neben den Assimilationstests wurden mit dem Diazonium Blue B Test nach PRILINGER *et al.* (1999) und mit dem Urease Test auch enzymatische Leistungen der Hefen untersucht.

Des Weiteren wurde die Wachstumsfähigkeit sowohl bei unterschiedlichen Temperaturen (2 °C, 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C und 25 °C) als auch auf Medien mit einem hohen Zucker- (50 % Glucose/Saccharose) bzw. Salzanteil (2 %, 5 %, 10 % w/v) überprüft.

Alle Untersuchungen wurden im Dreifachansatz bei 10 °C durchgeführt und als interne Kontrollen wurden die Typstämme der Hefen *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* und *Mrakia frigida* (s. o.) verwendet.

Für die morphologische Charakterisierung wurden die Isolate bei 10 °C für 7, 14, 21 und 28 Tage auf Malz Extrakt-Agar und für die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Standard I Bouillon kultiviert. Zur Vorbereitung für die mikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen bei 5000 xg für 8 Minuten abzentrifugiert und anschließend zweimal in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 % NaCl) gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Aufnahme mittels Rasterelektronenmikroskop.

Ergebnisse

Mikrobiologie des vakuumverpackten Rindfleisches

Alle Proben wiesen eine kräftige rote Farbe und einen typischen leicht säuerlichen Rindfleischgeruch auf und waren von sehr guter Qualität. Mit Gesamtkeimzahlen zwischen $5,2 \times 10^7$ - $3,4 \times 10^8$ KbE/cm² und Milchsäurebakterienzahlen im Bereich von über 1×10^7 KbE/cm² wurden in den acht Proben kaum Unterschiede zwischen den Herstellern festgestellt. Auch hinsichtlich der Belastung mit psychrophilen Hefen konnten keine deutlichen Unterschiede

Tab. 3: Gesamtkeimzahlen, Lactobacillen, *Enterobacteriaceae* und Hefezahl (Mittelwerte) der analysierten Rindfleischproben

Code*	Gesamtkeimzahl	<i>Lactobacillaceae</i>	Hefen	<i>Enterobacteriaceae</i>
1 a	$2,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$8,2 \times 10^3$	$4,4 \times 10^4$
1 b	$5,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$
2 a	$1,5 \times 10^8$	$2,7 \times 10^7$	$7,8 \times 10^3$	$4,3 \times 10^5$
2 b	$7,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$3,9 \times 10^4$
3 a	$3,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$4,7 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$
3 b	$3,4 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$8,9 \times 10^3$	$5,1 \times 10^4$
4 a	$5,1 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
4 b	$4,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$9,7 \times 10^3$	$8,3 \times 10^4$

*Code: Die unterschiedlichen Hersteller wurden mit den Zahlen 1, 2, 3 und 4 verschlüsselt. A und B repräsentieren zwei unterschiedliche Proben vom gleichen Hersteller. Die Keimzahlen sind als Kolonie bildende Einheiten pro cm^2 angegeben

zwischen den Produkten festgestellt werden. Hier lagen die Zellzahlen im Bereich von $2,2 \times 10^3$ KbE/ cm^2 - $1,6 \times 10^4$ KbE/ cm^2 . Allein bei den *Enterobacteriaceae* ließen sich geringe Unterschiede erkennen. So konnten in den Proben Keimzahlen zwischen $7,6 \times 10^3$ KbE/ cm^2 und $4,3 \times 10^5$ KbE/ cm^2 detektiert werden (siehe Tab. 3).

Sequenzierung

Von den 26 zur Sequenzierung eingesandten Stämmen gehörten 14 zur Gattung *Candida* (54 %), 5 zur Gattung

Debaryomyces (19 %) und 4 zur Gattung *Cryptococcus* (15 %). Die restlichen drei Isolate wurden als *Mrakia gelida* (n=2) und *Mrakia robertii* (n=1) bestimmt (siehe Tab. 4).

Mit Ausnahme der beiden Stämme H 378 und H 379 (*Mrakia gelida*) betrug der Similarity Index bei allen isolierten und identifizierten Hefen 100 %. Die Isolate H 378 und H 379 wiesen im Vergleich zu den vorliegenden Sequenzen in der Datenbank eine Übereinstimmung von 99 % auf und unterschieden sich vom Typstamm durch eine Base. Da psych-

Tab. 4: Zusammensetzung der Hefepopulation in den untersuchten Rindfleischproben auf der Basis der Sequenziererergebnisse

Code*	Hefen
1 a	<i>Candida sake</i> (n = 2) <i>Cryptococcus laurentii</i> (n = 1)
1 b	<i>Candida zeylanoides</i> (n = 2) <i>Candida sake</i> (n = 1) <i>Cryptococcus curvatus</i> (n = 1)
2 a	<i>Mrakia gelida</i> H 379 (n = 1) <i>Debaryomyces hansenii</i> (n = 1) <i>Candida sake</i> (n = 1)
2 b	<i>Debaryomyces hansenii</i> (n = 2) <i>Mrakia robertii</i> H 380 (n = 1)
3 a	<i>Candida sake</i> (n = 1) <i>Cryptococcus curvatus</i> (n = 1) <i>Cryptococcus laurentii</i> (n = 1)
3 b	<i>Debaryomyces hansenii</i> (n = 1) <i>Candida sake</i> (n = 1) <i>Candida zeylanoides</i> (n = 1)
4 a	<i>Candida zeylanoides</i> (n = 3) <i>Debaryomyces hansenii</i> (n = 1)
4 b	<i>Candida sake</i> (n = 1) <i>Candida zeylanoides</i> (n = 1) <i>Mrakia gelida</i> H 378 (n = 1)

*Code: Die unterschiedlichen Hersteller wurden mit den Zahlen 1, 2, 3 und 4 verschlüsselt. A und B repräsentieren zwei unterschiedliche Proben vom gleichen Hersteller. Die Keimzahlen sind als Kolonie bildende Einheiten pro cm^2 angegeben

rophile Hefen der Gattung *Mrakia* bis zum heutigen Tag nicht auf Fleisch und Fleischprodukten nachgewiesen wurden, wurden die drei Stämme H 378 (*Mrakia gelida*), H 379 (*Mrakia gelida*) und H 380 (*Mrakia robertii*) für eine nähere biochemische und morphologische Charakterisierung ausgewählt.

Biochemische Untersuchungen

Die Ergebnisse der Assimilationstests mit den Isolaten H 378, H 379 und H 380 so-

wie der Vergleich mit Literaturangaben für die Stämme *M. gelida* und *M. robertii* sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Ein Wachstum der Hefeisolate war bei 2 °C, 5 °C, 10 °C und 15 °C möglich, wobei die optimale Wachstumstemperatur bei 10 °C lag. Bei 20 °C und bei 25 °C wurde keine Vermehrung festgestellt. In Anwesenheit von Natriumchlorid war ein Wachstum bis zu einer Konzentration von 10 % (w/v) möglich, auch wenn dieses im Vergleich zur Kontrolle ohne Natriumchlorid deutlich verzögert war.

Tab. 5.: Assimilationsverhalten der aus Fleisch isolierten *Mrakia* spezies H 378, H 379 und H 380 im Vergleich zu den Typstämmen *M. gelida* und *M. robertii*

Test	H 378	H 379	H 380	<i>M. gelida</i> *	<i>M. robertii</i> **
Assimilation:					
Glucose	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	-	+d	v
D-Glucosamin	-	-	+d	+d	+d
D-Xylose	+	+	-	+	+d
L-Arabinose	+	+	+	+	+d
L-Rhamnose	+d	+	-	v	+d
Saccharose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Melezitose	+	+	+	+	+
Stärke (löslich)	+d	+d	v	+	v
Glycerin	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	nd
Melibiose	+	v	v	v	+
D-Ribose	-	-	-	v	v
D-Glucuronat	+	+	+	+	+
D-Gluconat	nd	nd	nd	+	+
Myo-Inositol	-d	-d	-	-d	+d
Inulin	-	-	-	-	v
Methanol	-	-	-	-	-
Ethanol	+	+	-	+	v
Citrat	v	v	v	+d	+d
D-Mannitol	+d	v	-	+d	+
Weitere Tests					
Wachstum ohne Vitamine	+	+	+	+	+d
mit 50 % Glucose	+	+	+	nd	-
mit 50 % Saccharose	+	+	+	nd	nd
Diazonium Blue B Test	+	+	+	+	+
Urease/Harnstoff Test	+	+	+	+	+

Legende: + Wachstum, - kein Wachstum, +d schwaches Wachstum, -d verzögertes Wachstum, v variabel, nd nicht durchgeführt

* Daten von DIAZ and FELL 2000; ** Daten von THOMAS-HALL 2010

Morphologie

Die beiden Isolate H 378 und H 379 sind sich morphologisch sowohl im Mikroskop (siehe Abb. 2 und 3) als auch in ihrer Kolonieform sehr ähnlich (siehe Abb. 1). Sie sind eiförmig gestreckt (5-9 μm) und haben einen Durchmesser von 2-4 μm . Die Fortpflanzung geschieht zum einem vegetativ durch polare Sprossung (siehe Abb. 2 A und 3 A), aber auch sexuell durch die Ausbildung von terminal gelegenen Teliosporen (siehe Abb. 2 B und 3 B). Die Bildung von Teliosporen konnte erst nach einer 3 bis 4-wöchigen Inkubation auf Malz Extrakt-Agar (MEA⁺) beobachtet werden. Die Kolonien waren auf MEA⁺ cremefarben und durch die Bildung von Myzel stark ausgefranst (siehe Abb. 1).

Im Vergleich dazu waren die Zellen von H 380 (*Mrakia robertii*) ebenfalls ovoid, jedoch bedeutend kleiner als die Zellen von H 378 und H 379. So betrug der Durchmesser im Schnitt 2-3 μm und die Länge ca. 3-7 μm . Die asexuelle Vermehrung mittels polarer Sprossung konnte ebenfalls bei H 380 beobachtet werden (siehe Abb. 4A). Die sexuelle Fortpflanzung mit Hilfe von Teliosporen konnte nicht festgestellt werden, ist aber nicht auszuschließen (vgl. Abb. 4). Die Kolonien von H 380 waren glänzend weiß und glatt ohne sichtbares Myzel (siehe Abb. 1).

Diskussion

Auf Grund ihrer ubiquitären Verbreitung gehören Hefen zur normalen mikrobiellen Mikrobiota von Fleisch und Fleischerzeugnissen (SAMELIS and SOFOS 2003). Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits Kontaminationswege vom Feld/Stall über den Schlachthof bis in den verarbeitenden Betrieb nachvollziehen (DALTON *et al.* 1984).

Neben einer ungenügenden Schlachthygiene spielt bei der primären, aber auch bei der sekundären Kontamination der Eintrag über die Luft eine besondere Rolle. Während in der Umgebung des Schlachthofes sehr viele verschiedene Hefearten identifiziert werden konnten, scheinen sich auf den Fleischprodukten

nur einige wenige durchzusetzen. Auf rotem Fleisch dominieren vor allem Hefen der Gattungen *Candida*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* und *Trichosporon* (FLEET 1992; NIELSEN *et al.* 2008; SAMELIS and SOFOS 2003), aber mit 60-80 % gehören die meisten isolierten Stämme zur Gattung *Candida*. Diese Konzentration auf nur sehr wenige Arten konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden. Auch wenn das Verhältnis der Hefen zueinander nicht so stark ausgeprägt war wie in der Literatur beschrieben, stellten doch Arten der Gattung *Candida* mit fast 54 % den Hauptanteil der Hefeflora dar.

Auf Grund der Fähigkeit, auch bei sehr tiefen Temperaturen z.T. auch unter 0 °C und unter stark sauerstoffreduzierten Bedingungen zu wachsen (LOWRY and GILL 1984), könnten Hefen bestimmter Gattungen in der Lage sein, auch einen Verderb bei vakuumierter Ware hervorzurufen. Die durch *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* und *Trichosporon* verursachten Abweichungen auf rotem Fleisch können dabei sehr vielfältig sein. Eine deutliche Vermehrung der Hefen kann zu Verfärbungen, zum Aufgasen, zur Schleimbildung, zu Geschmacksabweichungen und so zu einem verkehrsuntauglichen Produkt führen (DILLON 1998; FLEET 1992). Derartige Abweichungen wurden in den uns untersuchten vakuumverpackten Rindfleischproben allerdings nicht beobachtet und stimmen mit dem Nachweis relativ geringer Hefezahlen (10^3 bis 10^4 KbE/cm²) überein.

Erstmalig wurden von uns in derartigen Proben Arten der Gattung *Mrakia* nachgewiesen. Bisher waren *Mrakia* spp. vor allem nur aus Umweltproben in sehr kalten Gebieten der Erde bekannt. So konnte die Hefe aus dem Permafrostboden in Alaska (PANIKOV and SIZOVA 2007) und Russland (BAB'EVA *et al.* 2002), aus Gletscherschmelzwasser in Argentinien (de GARCIA *et al.* 2007) und aus alpinen Gletschern in Italien (TURCHETTI *et al.* 2008) isoliert werden. Aber auch Nachweise aus Bodenproben aus der Antarktis sind bestätigt (THOMAS-HALL *et al.* 2010; XIN MING-XIU and ZHOU 2007).



Abb. 1: Kulturmorphologie von *Mrakia* spp. H 378 (A), H 379 (B) und H 380 (C) nach vierwöchiger Inkubation auf Malz Extrakt Agar bei 10 °C

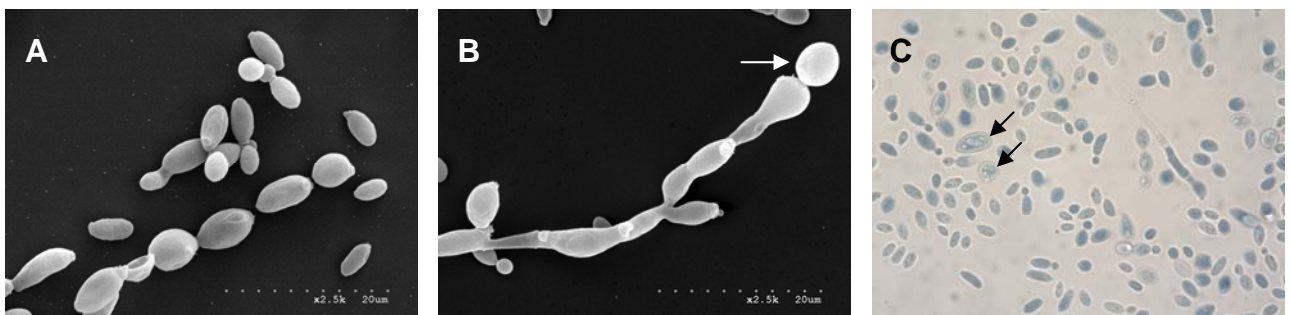


Abb. 2: Morphologische Charakteristika des Hefeisolats H 378.
A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme typischer Sprosszellen (x 2500, Skala 20 µm)
B) Ausbildung von Hyphen mit Teliosporen (siehe Pfeil, x 2500, Skala 20 µm)
C) Lichtmikroskopische Aufnahme von vegetativen Zellen, Hyphen und Teliosporen (x 400)

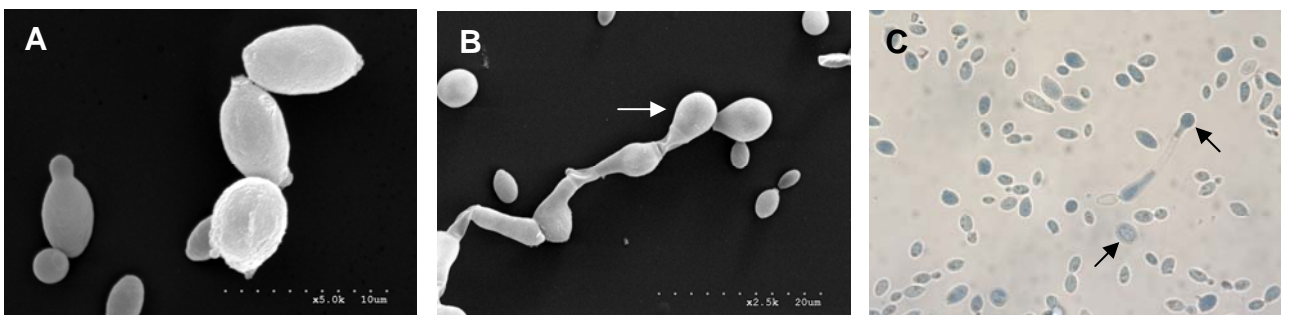


Abb. 3: Morphologische Charakteristika des Hefeisolats H 379.
A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme typischer Sprosszellen (x 5.000, Skala 10 µm)
B) Ausbildung von Hyphen mit Teliosporen (siehe Pfeil, x 2500, Skala 20 µm)
C) Lichtmikroskopische Aufnahme von vegetativen Zellen, Hyphen und Teliosporen (x 400)



Abb. 4: Morphologische Charakteristika des Hefeisolats H 380.
A) und B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von vegetativen Zellen (x 5000, Skala 10 µm),
C) Lichtmikroskopische Aufnahme der Hefezellen (x 400)

Im Lebensmittelbereich wurden *Mrakia* spp. bislang nur aus drei verschiedenen Lebensmitteln isoliert. KOMAGATA und NAKASE isolierten 1963 aus einem gefrorenen barschartigen Brackwasserfisch (*Sillago japonica*) die Hefe *Candida curiosa*, welche später zu *Mrakia frigida* umbenannt wurde. *Mrakia frigida* wurde zudem in einem kühl gelagerten Orangensaft (FELL and STATZELL-TALLMAN 1988) und einem Joghurt in Brasilien nachgewiesen (MOREIRA *et al.* 2001).

Der Nachweis von *Mrakia* spp. in gekühltem, vakuumiertem Rindfleisch ist eigentlich nicht überraschend, da sich diese Hefen an sehr kalte Habitate adaptiert haben. Genau diese Bedingungen herrschen auch in den Kühlhäusern der Schlachthöfe und später auch auf kühl gelagerten Fleischprodukten vor.

Zwei der drei isolierten *Mrakia*-Stämme konnten über die Sequenzierung der 26 S rRNA, der biochemischen und morphologischen Untersuchungen eindeutig als *Mrakia gelida* identifiziert werden. Dieses Ergebnis für die beiden Isolate H 378 und H 379 wird auch durch den Vergleich mit Literaturdaten bestätigt (DIAZ and FELL 2000). Eine eindeutige Identifizierung des Stammes H 380 war jedoch bislang nicht möglich. Mit Hilfe der Sequenzierung konnte zwar eine 100%ige Übereinstimmung mit Isolaten, die aus einem italienischen Gletscher und der Antarktis stammten, erzielt werden, jedoch weist das Isolat H 380 im Vergleich zur von THOMAS-HALL *et al.* (2010) identifizierten Hefe *Mrakia robertii* mehrere biochemische Abweichungen speziell bei den Zuckern/Zuckeralkoholen D-Xylose, L-Rhamnose, myo-Inositol und D-Mannitol auf. Inwieweit es sich bei der von uns aus vakuumiertem Rindfleisch isolierten Hefe H380 möglicherweise um eine neue Art oder Subspezies handelt, wird in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Danksagung

Für die ausgezeichnete technische Assistenz bedanken wir uns bei Frau Petra Peetz, Frau Liane Weber und Herrn Jörgen Dresel.

Literatur

- Abunyewa, A.A.O., Laing, E., Hugo, A. and Viljoen, B.C. (2000) The population change of yeasts in commercial salami. *Food Microbiology* 17, 429-438.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (1980). Untersuchung von Lebensmitteln, Beuth Verlag.
- Bab'eva, I.P., Lisichkina, G.A., Reshetova, I.S. and Danilevich, V.N. (2002) *Mrakia curviuscula* sp nov.: A new psychrophilic yeast from forest substrates. *Microbiology* 71, 449-454.
- Baxter, M. and Illston, G. (1976) Psychrotrophic meat spoilage fungi within a freezing works. *New Zealand Veterinary Journal* 24, 177-180.
- Broda, D., Boerema, J. and Brightwell, G. (2009) Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *Journal of Applied Microbiology* 107, 178-186.
- Broda, D.M., Boerema, J.A. and Bell, R.G. (2003) PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology* 94, 515-522.
- Dalton, H.K., Board, R.G. and Davenport, R.R. (1984) The yeasts of british fresh sausage and minced beef. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 50, 227-248.
- de Garcia, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P. and van Broock, M. (2007) Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *Fems Microbiology Ecology* 59, 331-341.
- Diaz, M.R. and Fell, J.W. (2000) Molecular analyses of the IGS & ITS regions of rDNA of the psychrophilic yeasts in the genus *Mrakia*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 77, 7-12.
- Dillon, V.M. (1998) Yeasts and moulds associated with meat and meat products. In: *The Microbiology of Meat and Poultry* ed. Davies, A. and Board, R. pp. 85-117. London: Blackie Acad. Profess.
- Diriye, F.U., Scorzetti, G. and Martini, A. (1993) Methods for the separation of yeast-cells from the surfaces of processed, frozen foods. *International Journal of Food Microbiology* 19, 27-37.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P. and Villani, F. (2009) Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *In Vitro* and in beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1990-2001.
- Fell, J.W. and Statzell-Tallman, A. (1988) *Mrakia*. In: *The yeasts: a taxonomic study* ed. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. pp. 676-677. Amsterdam: Elsevier.
- Fleet, G. (1992) Spoilage Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12, 1-44.
- Hu, P., Xu, X.L., Zhou, G.H., Han, Y.Q., Xu, B.C. and Liu, J.C. (2008) Study of the *Lactobacillus sakei*

protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR-DGGE. *Meat Science* 80, 462-469.

Ismail, S.A.S., Deak, T., Abd El-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M. and Beuchat, L.R. (2000) Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* 62, 113-121.

Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G. and Tagg, J.R. (2008) Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology* 25, 228-234.

Komagata, K., Nakase, T. (1965) New species of genus *Candida* isolated from frozen foods. *Journal of General and Applied Microbiology* 11 (3), 255-267.

Kurtzmann, C.P. and Fell, J.W. (1998) *The Yeasts, A Taxonomic Study*. New York: Elsevier.

Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M. and Sampaio, J.P. (2003) Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 84, 313-322.

Lowry, P.D. and Gill, C.O. (1984) Development of a yeast microflora on frozen lamb stored at -5-Degrees-C. *Journal of Food Protection* 47, 309-311.

Moreira, S.R., Schwan, R.F., de Carvalho, E.P. and Wheals, A.E. (2001) Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 32, 117-122.

Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G. and Arneborg, N. (2008) Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Science* 80, 919-926.

Northcutt, J., Jones, D., Ingram, K., Hinton, A. and Musgrove, M. (2004) Airborne microorganisms in commercial shell egg processing facilities. *International Journal of Poultry Science* 3.

Panikov, N.S. and Sizova, M.V. (2007) Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35 degrees C. *Fems Microbiology Ecology* 59, 500-512.

Prillinger, H., Molnar, O., Eliskases-Lechner, F. and Lopandic, K. (1999) Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 75, 267-283.

Quiros, M., Martorell, P., Querol, A., Barrio, E., Peinado, J.M. and de Sioniz, M.I. (2008) Four new *Candida cretensis* strains isolated from Spanish fermented sausages (chorizo): Taxonomic and phylogenetic implications. *Fems Yeast Research* 8, 485-491.

Ren, T.J. and Frank, J.F. (1992) Sampling of microbial aerosols at various locations in fluid milk and ice-cream plants. *Journal of Food Protection* 55, 279-283.

Russo, F., Ercolini, D., Mauriello, G. and Villani, F. (2006) Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. *Food Microbiology* 23, 797-802.

Samelis, J. and Sofos, J.N. (2003) Yeasts in meat and meat products. In: *Yeasts in food. Beneficial and detrimental aspects* ed. Boekhout T. and Robert, V. pp. 239-265. Hamburg: Behr's Verlag GmbH.

Sanz, A., Martin, R., Mayoral, M.B., Hernandez, P.E., Gonzalez, I. and Lacarra, T.G. (2005) Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packed ham. *Meat Science* 71, 230-237.

Thomas-Hall, S.R., Turchetti, B., Buzzini, P., Branda, E., Boekhout, T., Theelen, B. and Watson, K. (2010) Cold-adapted yeasts from Antarctica and the Italian Alps-description of three novel species: *Mrakia robertii* sp nov., *Mrakia blollopis* sp nov and *Mrakiella niccombsii* sp nov. *Extremophiles* 14, 47-59.

Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C. and Vaughan-Martini, A. (2008) Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. *Fems Microbiology Ecology* 63, 73-83.

Vanderzant, C., Chesser, L.K., Savell, J.W., Gardner, F.A. and Smith, G.C. (1983) Effect of addition of glucose, citrate and citrate-lactic acid on microbiological and sensory characteristics of steaks from normal and dark, firm and dry beef carcasses displayed in polyvinyl-chloride film and in vacuum packages. *Journal of Food Protection* 46, 775-780.

Walker, H.M. and Ayres, J.C. (1970) Yeasts as spoilage organisms. In: *The Yeasts Vol. 3, yeast technology* ed. Rose A.H. and Harrison J.S. pp. 463-527. London: Academic Press.

Wolter, H., Laing, E. and Viljoen, B.C. (2000) Isolation and identification of yeasts associated with intermediate moisture meats. *Food Technology and Biotechnology* 38, 69-75.

Xin Ming-xiu and Zhou, P. (2007) *Mrakia psychrophila* sp nov., a new species isolated from Antarctic soil. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B* 8, 260-265.