

Wirkung von Nitrit auf Gram positive Infektionserreger in Rohwurstzeugnissen

Impact of nitrite on gram positive food pathogens in raw sausage products

J. KABISCH, R. PICHNER, D. KASPAR¹, S. WÜSTNER¹, S. MÜLLER¹, S. SCHERER¹
und M. GAREIS

¹ Abteilung Mikrobiologie, ZIEL, TU München

Zusammenfassung

Infektionen, hervorgerufen durch den Verzehr von mit pathogenen Bakterien kontaminierten Lebensmitteln, stellen ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher dar. Dabei kann das Rohmaterial (Schweine- bzw. Rindfleisch) für die Herstellung von Rohwurst neben Gram negativen enterischen Bakterien auch mit Gram positiven Erregern belastet sein. Durch die Zugabe von Nitritpökelsalz soll eine Vermehrung der pathogenen Bakterien verhindert werden. Allerdings liegen nur wenige wissenschaftlich fundierte Daten über den Wirkmechanismus von Nitrit auf fleischrelevante Gram positive Problemkeime wie *Listeria monocytogenes* vor.

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt von Nitrit in verschiedenen Rohwurstprodukten auf *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* und *Staphylococcus aureus* zu untersuchen. Das Überleben der pathogenen Bakterien *L. monocytogenes*, *S. aureus* und *C. perfringens* in kurzgereifter streichfähiger Rohwurst, schnellgereifter Rohwurst mit Glucono-delta-Lacton (GDL), langgereifter schnittfähiger Rohwurst und schimmelpilzgereifter Rohwurst wurde in Abhängigkeit der dem Brät zugegebenen Nitritmenge (0, 50, 100 und 150 mg/kg) in Challengeversuchen überprüft. Die Wirkung von Nitrit auf die Teststämme war dabei nicht gleich effektiv und unterschied sich je nach Rohwursttyp. Dennoch können aus den Ergebnissen allgemeine Empfehlungen abgeleitet werden. Für die Herstellung von Rohwurstzeugnissen wird zur mikrobiologischen Stabilisierung die Zugabe von mindestens 100 mg Natriumnitrit pro kg empfohlen. Einzig bei der Herstellung von mit GDL-gereiften Produkten kann bei Beachtung der Prinzipien guter Herstellungspraxis auf den Einsatz von Natriumnitrit verzichtet werden. Weiterhin wurde die Wirkung von Nitrit auf *L. monocytogenes* unter Einbezug weiterer praxisrelevanter Parameter wie pH-Wert, NaCl₂-Konzentration, Sauerstoffverfügbarkeit und Temperatur im Hochdurchsatz-Verfahren analysiert. Die effektivste inhibitorische Wirkung von Nitrit auf das Wachstum von *L. monocytogenes* wurde dabei in Kombination mit einem Absenken des pH-Wertes beobachtet.

Schlüsselwörter	Mikrobiologische Sicherheit – Nitritpökelsalz – Rohwurst – <i>Clostridium perfringens</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>
Key Words	microbiological safety – nitrite curing salt – raw sausage – <i>Clostridium perfringens</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> – <i>Staphylococcus aureus</i>

Summary

Food borne infections are a health risk for the consumers of contaminated foods. The raw material (pork or beef) for sausage production can be contaminated with various pathogenic bacteria. Gram negative enteric bacteria as well as gram positive bacteria can be found in the raw material. The addition of nitrite should result in a growth inhibition of pathogenic bacteria. However, well-founded scientific data concerning the mode of impact of nitrite on relevant food borne gram positive bacteria like *L. monocytogenes*, *C. perfringens* and *S. aureus* are not yet available.

The objectives of this study were i) to investigate the actual impact of nitrite on various gram positive pathogens and ii) to analyze multifactorial aspects like a_w-value, pH, and temperature on the effectiveness of nitrite against *L. monocytogenes* EGDe. The impact of nitrite (0,

50, 100 or 150 mg sodium nitrite/ kg) on the survival of the respective pathogen was investigated in short-, rapid-, long- and mould-ripened raw sausage using challenge tests.

The results indicate a variation in effects concerning the different bacterial species and the different products. Nevertheless, general recommendations can be given: For microbiological stabilisation the addition of at least 100 mg/kg sodium nitrite for raw sausage is suggested. Only the fermentation of rapid-ripened raw sausages could be done without addition of nitrite. Furthermore, the impact of nitrite on growth of *L. monocytogenes* EGDe was analysed in combination with parameters relevant for raw sausage fermentation like pH-value, NaCl₂-concentration, oxygen availability and temperature in a high throughput approach. The strongest inhibitory effect of nitrite on the growth of *L. monocytogenes* EGDe could be observed in combination with a low pH.

Einleitung

Infektionen, hervorgerufen durch den Verzehr von mit pathogenen Bakterien kontaminierten Lebensmitteln, stellen ein gesundheitliches Risiko für den Verbraucher dar. Betroffen von einem Kontaminationsrisiko ihrer Erzeugnisse sind hierbei auch Produzenten von Rohfleischerzeugnissen wie Rohwurst (KAHRAMAN and AYDIN, 2009; NASTASIJEVIC *et al.*, 2009; RAHIMIFARD *et al.*, 2008). Das üblicherweise für die Herstellung von Rohwürsten verwendete Schweine- bzw. Rindfleisch kann mit verschiedenen Krankheitserregern belastet sein (BEUTIN *et al.*, 2007; BRUUN *et al.*, 2009; FOSSE *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009; MEYER *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2011). Bei den Gram positiven Bakterien ist dies vor allem *Listeria monocytogenes* (COLAK *et al.*, 2007; THEVENOT *et al.*, 2006), für den insbesondere Wiederkäuer ein Reservoir darstellen (BUNDRANT *et al.*, 2011; FARBER *et al.*, 1989; FOX *et al.*, 2011; GOBAT and JEMMI, 1990; GUERINI *et al.*, 2007). Weitere Krankheitserreger wie *Clostridium perfringens* und *Staphylococcus aureus* kommen als Kontaminanten auf Fleisch und Fleischerzeugnissen vor (ARKOUDELOS *et al.*, 1997; KAMBER *et al.*, 2007; MESSELHÄUSSER *et al.*, 2007; MOROT-BIZOT *et al.*, 2006) und sind hauptsächlich wegen ihrer Toxinbildung gefürchtet (KEROUANTON *et al.*, 2007; TAORMINA *et al.*, 2003).

Bei einer guten Herstellungspraxis wird in Rohwürsten keine Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen beobachtet, jedoch werden diese in den Produkten nicht immer vollständig eliminiert. Entsprechend der VO (EC) 2073/2005 darf in Rohwürsten innerhalb der angegebenen Halt-

barkeit ein Warnwert von 100 KBE *Listeria monocytogenes*/g nicht erreicht werden. Daher wird seitens der Fleisch verarbeitenden Industrie mit unterschiedlichen Maßnahmen angestrebt, unerwünschte Bakterien im Produkt zu eliminieren bzw. so weit wie möglich zu minimieren.

Bei der Rohwurstherstellung wird dem Produkt zu Konservierungszwecken Nitrit zugesetzt. Die Zugabe von Nitritpökelsalz soll dabei das Wachstum von pathogenen Bakterien inhibieren (BIRZELE *et al.*, 2005; LÜCKE, 2003). Allerdings liegen kaum wissenschaftlich fundierte Daten über den Wirkmechanismus von Nitrit auf fleischrelevante Gram positive Problemkeime wie *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* und *Staphylococcus aureus* vor.

Obwohl der Zusatz von Nitrit in Form von Nitritpökelsalz oder Natriumnitrat bei vielen Fleischerzeugnissen allgemein üblich ist, wird der Einsatz weiterhin kontrovers diskutiert. Verbraucher befürchten eine gesundheitsschädliche Wirkung v.a. hinsichtlich einer möglichen Nitrosamin-Belastung (RYWOTYCKI, 1997; RYWOTYCKI, 2007). Daher streben die Hersteller eine Reduktion der Menge an Nitrit in den Rohwürsten auf ein notwendiges Minimum an. Ziel ist dabei, dem Wunsch des Verbrauchers nach einer Minimierung von Zusatzstoffen nachzukommen, dabei aber gleichzeitig die mikrobiologische Stabilität und Sicherheit der Produkte zu gewährleisten.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieses Projektes i) den tatsächlichen Effekt von Nitrit in verschiedenen Rohwurstprodukten (kurzgereifte streichfähige Rohwurst,

schnellgereifte Rohwurst mit Gluconodelta-Lacton, langgereifte schnittfähige Rohwurst und schimmelpilzgereifte Rohwurst) auf verschiedene Gram positive Problemkeime zu untersuchen, sowie ii) die Wirkung von Nitrit auf den Gram positiven Modellorganismus *L. monocytogenes* EGDe (sequenzierter Referenzstamm) unter dem erforderlichen Einbezug multifaktorieller, für die Rohwurstherstellung relevanter Parameter wie a_w -Wert, pH-Wert und Temperatur zu analysieren. Die erzielten Ergebnisse sind eine wichtige Voraussetzung, um die den Rohwurstprodukten zugegebene Nitritmenge auf ein gewünschtes Mindestmaß zu reduzieren.

Material und Methodik

Challengeversuche

Für die Challengeuntersuchungen wurden unter definierten Bedingungen die Bräte der Rohwurstprodukte artifiziell mit einem Pool von jeweils drei unterschiedlichen Stämmen (Human- und/oder Produktisolate) von *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* oder *Clostridium perfringens* kontaminiert, im Anschluss daran die Produkte hergestellt und das Wach-

tums-/Absterbeverhalten der Pathogene über einen definierten Zeitraum von bis zu 84 Tagen überprüft. Verwendet wurden Isolate der Stammsammlung des Max Rubner-Institutes in Kulmbach (vgl. Tab. 1).

Für die Belastungstests wurde für jeden Pathogen-Pool eine Inokulationsdosis von ca. $2,7 \log_{10}$ KbE/g (500 KbE/g) eingesetzt und damit eine niedrige 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, wozu die Keime bei 37 °C und 180 u/min in Standard-I-Bouillon (VWR, Darmstadt, Deutschland) inkubiert wurden. 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 wurde die gewünschte Inokulationsdosis hergestellt und die jeweilige Konzentration mittels Keimzählung in der Thoma-Kammer

Tab. 1: Spezies, Stammnummer und Herkunft der verwendeten Inokulationstämmen

Spezies	Stammnummer	Herkunft
<i>Clostridium perfringens</i>	C 27	Bulette / Schwein (D) (Labor, Kiel)
<i>Clostridium perfringens</i> Typ A	C 219 DSMZ 756 ATCC 13124 ^T	Rind (D) (DSMZ, Braunschweig)
<i>Clostridium perfringens</i> Typ A	C 220 DSMZ 11778	Hamburger / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4 b	Li 2 NTCC 10527	Liquor / Mensch (D) (BgVV-Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	Li 127 SLCC 6139	Liquor / Mensch (D) (Uni-Mannheim)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4 d	Li 135	Produktionsumfeld der Rohwurstherstellung (MRI)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A und C	St 15	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A und C	St 16	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A und C	St 35	Rohwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)

SLCC: Seeligers Listeria Culture Collection (Prof. Seeliger, Würzburg)
 NTCC: National Collection of Type Cultures
 ATCC: American Type Culture Collection
 C, Li und S: Stammnummern der Stammsammlung des MRI, Kulmbach
 T: Typstamm

überprüft. Für die Beimpfung des Wurstbräts wurden 1,6 ml der mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnten Keimsuspension pro kg Rohmaterial verwendet, so dass eine initiale Inokulationsdosis von etwa 500 KbE/g Brät erreicht wurde. Jeder Pathogen-Pool wurde in separaten Versuchsansätzen geprüft, so dass für jede Untersuchungsreihe (*Clostridium*-Challenge, *Listeria*-Challenge und *Staphylococcus*-Challenge) eine entsprechend große Anzahl an Würsten für jeden Produkttyp produziert werden musste.

Rohwurstprodukte. Für die Challenge-Untersuchungen wurden die vier am häufigsten im Handel vertretenen Rohwurstsorten verwendet (KABISCH *et al.*, 2008). Bei diesen handelte es sich um kurzgereifte streichfähige (Typ A), schnellgereifte mit GDL hergestellte (Typ B), langgereifte schnittfeste (Typ C) und Edelschimmelpilzgereifte Rohwürste (Typ D). Die Herstellung der Rohwürste erfolgte dabei nach Standardrezepturen (KABISCH *et al.*, 2008). Natriumnitrit (VWR, Darmstadt, Deutschland) wurde in den Konzentrationen von 0 mg/kg, 50 mg/kg [0,73 mM], 100 mg/kg [1,45 mM] und 150 mg/kg [2,17 mM] eingesetzt.

Die tiefgefrorenen Ausgangsmaterialien wurden in einem Kutter unter gleichzeitiger Zugabe der Zusätze je nach Produkt auf die entsprechende Körnung zerkleinert und das Brät anschließend in Cellulose-/Naturdärme der Güteklasse A (Metzgereigenossenschaft, Bayreuth, Deutschland) mit einem Kaliber von 38 mm (Typ: A) – 60 mm (Typ: B-D) abgefüllt. Nach einer Angleichzeit von vier Stunden wurden die Rohwürste zur Vermeidung von Oberflächenbewuchs kurz in eine 20%ige Kaliumascorbat-Lösung (VWR, Darmstadt, Deutschland) bzw. im Fall der schimmelpilzgereiften Rohwurst in eine Edelschimmelpilz-Suspension (*Penicillium nalgiovense*) getaucht (Chr. Hansen, Pohlheim, Deutschland). Die anschließende Reifung und Lagerung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern unter praxisüblichen Bedingungen (Tab. 2-5).

Physikalisch-chemische Parameter. Die Messung der pH- und Wasseraktivitätswerte (a_w -Wert) erfolgte über Dreifach-

messungen an den Tagen 0, 1, 3, 6, 13 und 28 für die kurzgereiften Produkte (Typ A und B) und zusätzlich für die langgereiften am Tag 42 (Typ C) und 84 (Typ D) wie bereits früher beschrieben (RÖDEL *et al.*, 1989). Verwendet wurden hierzu die jeweiligen Negativkontrollen.

Um die Konzentration von Natriumnitrit im Wurstbrät zu verfolgen, wurde der Nitritgehalt semi-quantitativ mit kommerziell erhältlichen Teststäbchen [Merckoquant®, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland] bestimmt. Die Teststäbchen decken einen Bereich von 2 bis 80 mg/l ab, für höher konzentrierte Proben wurde eine 1:10 Verdünnung mit A.dest. verwendet.

Mikrobiologische Diagnostik. Für die Challengeuntersuchungen wurde ausschließlich hygienisch hochwertiges Rohmaterial verwendet und die Qualität jeweils vor Versuchsbeginn mittels Keimzählung mikrobiologisch geprüft. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurden jeweils drei Würste eines Ansatzes untersucht und die Mittelwerte inkl. Standardabweichung bestimmt. Diese Probenahmen erfolgten am Tag der Herstellung (Tag 0) und dann nach den Tagen 1, 3, 6, 13, 28 (Typ A und B), 42 (Typ C) und 84 (Typ D). Für jede Probenahme wurden sowohl für die unbeimpften Negativkontrollen als auch die kontaminierten Produkte jeweils drei identische Würste verwendet.

Die Erfassung der aeroben mesophilen Keimzahl (Gesamtkeimzahl), der Pseudomonaden-, *Enterobacteriaceae*- und Milchsäurebakterienkeimzahl erfolgte wie bereits beschrieben (GAREIS *et al.*, 2009).

Der Nachweis von *Clostridium perfringens* erfolgte jeweils im Dreifachansatz (3 Würste) mit kulturellen und PCR-Methoden. Der kulturelle Nachweis erfolgte nach DIN EN ISO 7937:2004. Bei Keimzahlen unter 10 KbE/g wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (Sifin, Berlin, Deutschland) bei 37 °C für 20 Stunden unter anaeroben Bedingungen angereichert. Für den genotypischen Nachweis von *Clostridium perfringens* wurden die Proben nach einer modifizierten Methode nach TITBALL *et al.* (1989) auf das Vorliegen des *cpa*-Gens (Phospholipase C)

Tab. 2: Reifeprogramm für die Herstellung von kurzgereifter streichfähiger Rohwurst (Typ A)

Zeit	Temperatur [°C]	Rel. Luftfeuchte [%]	Luftgeschwindigkeit [m/s]
4 h	22	40 – 50	-
72 h	22	92	0,05 – 0,1
48 h	20	92	0,05 – 0,1
24 h	18	92	0,05 – 0,1
Lagerung 22 d	17	85	0,05 – 0,1

h = Stunden; d = Tage

Tab. 3: Reifeprogramm für die Herstellung von schnellgereifter Rohwurst mit Glucono-delta-Lacton (Typ B)

Zeit	Temperatur [°C]	Rel. Luftfeuchte [%]	Luftgeschwindigkeit [m/s]
4 h	22	40 – 50	-
24 h	24	93 – 94	0,1 – 0,2
24 h	21	90 – 92	0,3 – 0,4
24 h	20	90	0,4 – 0,5
72 h	18	88	0,4 – 0,5
Lagerung 22 d	17	85	0,05 – 0,1

h = Stunden; d = Tage

Tab. 4: Reifeprogramm für die Herstellung von langgereifter schnittfester Rohwurst (Typ C)

Zeit	Temperatur [°C]	Rel. Luftfeuchte [%]	Luftgeschwindigkeit [m/s]
4 h	22	40 – 50	-
24 h	22	94 – 95	0,1 – 0,2
24 h	21	92 – 93	0,2 – 0,3
24 h	20	90	0,4 – 0,5
72 h	18	88	0,4 – 0,5
48 h	18	85	0,3 – 0,4
Lagerung 34 d	17	83 – 85	0,05 – 0,1

h = Stunden; d = Tage

Tab. 5: Reifeprogramm für die Herstellung von edelschimmelpilzgereifter Rohwurst (Typ D)

Zeit	Temperatur [°C]	Rel. Luftfeuchte [%]	Luftgeschwindigkeit [m/s]
4 h	22	40 – 50	-
3 d	20	92 – 93	0,01 – 0,05
4 d	18	88	0,05 – 0,1
7 d	17	85	0,1 – 0,2
7 d	15	80	0,1 – 0,2
14 d	15	75	0,1 – 0,2
7 d	15	72	0,1 – 0,2
Lagerung 42 d	15	72	0,01 – 0,05

h = Stunden; d = Tage

untersucht. Hierzu wurde die DNA aus 1 ml des inkubierten Voranreicherungsmediums extrahiert und mittels PCR (MESSELHÄUSSER *et al.*, 2007) analysiert.

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurden die Rohwürste mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten, anschließend unter sterilen Bedingungen 10 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 90 ml Peptonwasser für zwei Minuten im Stomacher (Seward, Worthing, UK) homogenisiert. Bei Proben mit Keimzahlen <10 KbE/g wurden die Proben für 24 h in Peptonwasser angereichert. Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfolgte auf PALCAM-Medium (VWR, Darmstadt, Deutschland) und parallel dazu auf Chromogen-Listeria-Agar (BioMerieux, Nürtingen, Deutschland). Die Agarplatten wurden für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Verdächtige Kolonien wurden 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.

Für den Nachweis von *Staphylococcus aureus* wurden jeweils 20 g Probe in 180 ml physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Für den quantitativen Nachweis wurde eine dezimale Verdünnungsreihe angelegt und auf MSE-Agar sowie auf RPF-Medium ausgespatelt (LFGB § 64.00.00-55:2004-12). Die Agarplatten wurden anschließend für 24 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. War kein direkter Nachweis möglich, wurden 25 g Probe in 225 ml Peptonwasser aufgenommen und 24 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte ein Nachweis der Keime auf MSE-Agar (Mannitol-Salz-Eigelbagar) und parallel auf dem RPF-Nährboden (Oxoid, Wesel, Deutschland). Zur Bestätigung wurde der Koagulase Test (VWR, Darmstadt, Deutschland) mit fünf typischen Kulturen durchgeführt.

In vitro Hochdurchsatz-Wachstumsanalysen am Modellkeim *Listeria monocytogenes*

Für das Hochdurchsatzverfahren zum Testen des Einflusses verschiedenster

Parameter auf das Wachstum von *L. monocytogenes* EGDe (GLASER *et al.*, 2001) wurden Wachstumsanalysen in BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion) mittels des automatisierten mikrobiologischen Lesegeräts für Trübungs- und Farbmessungen, Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki), durchgeführt. Übernachtskulturen von *L. monocytogenes* EGDe wurden für die Wachstumsanalysen 1:100 verdünnt und das Wachstum in 100-Well Honeycomb Platten analysiert. Die Wachstumsanalyse der 200 µl Kulturen erfolgte über halbstündliche, automatisierte Aufzeichnung der Trübungszunahme bei OD₆₀₀ (Optische Dichte bei der Wellenlänge 600). Für die Kultivierung unter Sauerstoffmangelbedingungen wurden die Kulturen mit je 200 µl Paraffin-Öl überschichtet.

Folgende Wachstumsbedingungen wurden in allen möglichen Kombinationen getestet:

Temperatur:	17 °C, 20 °C, 24 °C
pH-Wert (eingestellt mit Milchsäure):	5; 5,5; 6; 6,5; 7
NaCl-Konzentration:	0, 1, 2, 3, 4 %
NaNO ₂ :	0, 200 mg/l
Sauerstoffverfügbarkeit:	hoch/niedrig

Für jede mögliche Parameter-Kombination wurden 6 Wachstumskurven aufgezeichnet (je 2 Duplikate von 3 biologisch unabhängigen Experimenten). Es wurde jeweils der Mittelwert bestimmt. Für die Auswertung wurde analysiert, welche maximale Veränderung der OD bei der entsprechenden Wachstumsbedingung zu beobachten war. Die maximale Veränderung der OD (ΔOD) wurde berechnet, indem die Differenz zwischen der höchsten und der niedrigsten OD-Messung gebildet wurde ($\Delta OD = OD_{max} - OD_{min}$).

Entsprechend der berechneten ΔOD wurden die Wachstumsbedingungen in drei Klassen eingeteilt:

$\Delta OD < 0,05$:	Bedingungen, die kein Wachstum erlauben
$\Delta OD > 0,05$ und $< 0,5$:	Bedingungen, die ein mäßiges Wachstum erlauben
$\Delta OD > 0,5$:	Bedingungen, die ein gutes Wachstum erlauben

Ergebnisse

Challengeversuche

Produkttyp A: kurzgereifte, streichfähige Rohwurst

Physikalisch-chemische Parameter. Unmittelbar nach der Beimpfung wurde ein a_W -Wert von 0,96 ermittelt. Auf Grund des wasserundurchlässigen Darmes und des damit behinderten Wasseraustausches nahm der Wasseraktivitätswert nur geringfügig ab und erreichte nach 28 Tagen Werte um 0,954.

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,70 und 5,75 und fiel bei allen Chargen zügig ab. Dabei sank der pH-Wert in den Rohwürsten mit den geringsten Nitritkonzentrationen am stärksten und es konnten am Tag 6 in den Ansätzen mit 0 und 50 mg/kg Nitrit pH-Werte von 5,25 gemessen werden. Zum selben Zeitpunkt wurde in den Chargen mit 100 und 150 mg/kg Natriumnitrit ein pH-Wert von 5,4 festgestellt.

Aerobe mesophile Keimzahl (GKZ) und Lactobacillenzahl. 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. Nach 28 Tagen konnten Keimdichten zwischen 8,4 Log₁₀ KbE/g ($2,5 \times 10^8$ KbE/g)

und 8,8 Log₁₀ KbE/g ($6,3 \times 10^8$ KbE/g) nachgewiesen werden.

Listeria monocytogenes. In den mit *Listeria monocytogenes* belasteten Produkten konnte in den Chargen ohne Nitrit in den ersten beiden Reifetagen ein Listerien-Wachstum beobachtet werden. Mit zunehmender Absäuerung sank die Keimzahl bis zum Tag 28 auf Werte von ca. 1,8 Log₁₀ KbE/g (63 KbE/g). Bei den nitrit-haltigen Rohwürsten sank die Keimzahl von Beginn an auf Keimdichten zwischen 20 und 50 KbE/g. Ein deutlicher Unterschied zwischen den eingesetzten Nitritkonzentrationen war nicht feststellbar.

Staphylococcus aureus. Das Ausgangsmaterial wurde mit Keimsuspension von ca. 2,5 log₁₀ KbE/g (320 KbE/g) angeimpft (siehe Abb. 1). Innerhalb der ersten 24 Stunden konnte in allen Chargen ein leichter Anstieg der Keimdichte beobachtet werden, dabei fiel die Zunahme in den Würsten am deutlichsten aus, die die niedrigsten Nitritkonzentrationen enthielten.

Mit fortschreitender Reifung nahm dann die Zellzahl von *Staphylococcus aureus* kontinuierlich ab, in den Chargen mit Nitrit bis auf Keimzahlen von etwa 70 KbE/g. In den Chargen ohne Nitrit waren nach 28 Tagen noch etwa 350 KbE *Staphylococcus aureus* pro g Brät vorhanden (siehe Abb. 1).

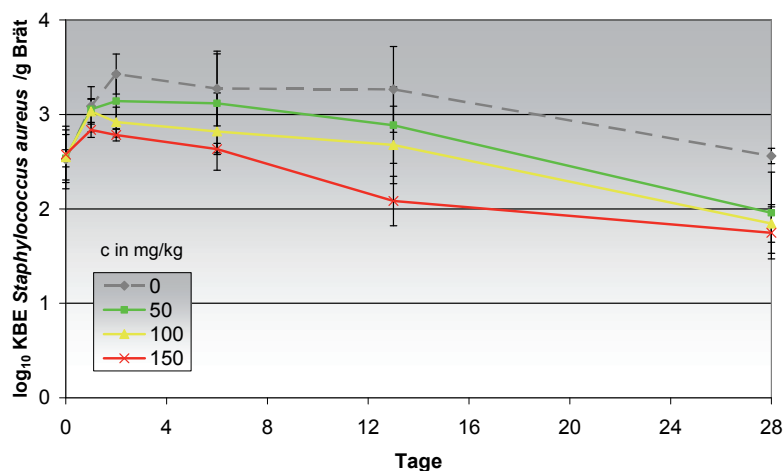


Abb. 1: Verhalten von *Staphylococcus aureus* in kurzgereiften streichfähigen Rohwürsten (Produkttyp A) unter dem Einfluss von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (c: 0, 50, 100 und 150 mg/kg).

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

***Clostridium perfringens*.** In den kurzgereiften streichfähigen Rohwürsten nahm die Keimzahl von *Clostridium perfringens* unabhängig von der eingesetzten Nitritkonzentration schnell ab. Nach 28 Tagen war dieser Keim nur noch qualitativ nach Anreicherung nachweisbar.

Produkttyp B: schnellgereifte schnittfeste Rohwurst mit Glucono-delta-Lacton Zusatz

Physikalisch-chemische Parameter. Unmittelbar nach der Beimpfung wurde ein a_w -Wert von 0,961 ermittelt, der bis zum Tag 28 kontinuierlich abnahm. Zum Ende der Untersuchung konnten im Mittel a_w -Werte zwischen 0,897 und 0,906 gemessen werden.

Die Anfangs-pH-Werte lagen zwischen 5,77 und 5,84 und reduzierten sich bei allen Chargen auf Grund des Zusatzes von GDL gleichmäßig. Innerhalb von 24 Stunden wurden pH-Werte von ca. 4,95 erreicht. Im Laufe der Reifung und Lagerung stiegen die pH-Werte leicht auf 5,0 an.

Aerobe mesophile Keimzahl und Lactobacillenzahl. Die Verläufe der Gesamtkeim- und Milchsäurebakterienzahl waren nahezu identisch, wobei die Keimzahlen bei der Ermittlung der Gesamtkeimzahl durch die miterfassten Mikrokokken der Starterkulturen höher lagen. Im Vergleich zu den kurzgereiften streichförmigen Rohwürsten

konnte innerhalb der ersten 24 Stunden eine Reduktion der Keimzahl um fast eine Log Stufe festgestellt werden. Diese Beobachtung kann auf die schlagartige Absenkung des pH-Wertes zurückgeführt werden. An diese Änderung des Milieus müssen sich auch die Milchsäurebakterien anpassen und zeigten so in Folge des GDL-Zusatzes ein stark verzögertes Wachstum. Erst ab dem Tag 6 konnten Keimzahlen über $8 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen werden. Auf diesem stabilen Niveau blieben sie bis zum Ende der Untersuchungen.

Listeria monocytogenes

Das Verhalten von *Listeria monocytogenes* in schnellgereiften schnittfesten Rohwürsten mit GDL-Zusatz gibt Abbildung 2 wieder. Sowohl in den Chargen mit 0 mg/kg als auch in denen mit Natriumnitrit konnte eine starke Reduktion der Listerien-Keimdichte beobachtet werden.

Bis zum Tag 28 sank die Listerien-Zahl auf ca. 10 KbE/g ab. Ein deutlicher Einfluss der eingesetzten Nitritkonzentration war hierbei nicht zu erkennen (siehe Abb. 2).

***Staphylococcus aureus*.** Innerhalb der ersten 24 Stunden konnte eine deutliche Abnahme der Keimzahl von ca. 470 KbE *Staphylococcus aureus* pro g auf etwa 36 KbE/g beobachtet werden. Auf diesem

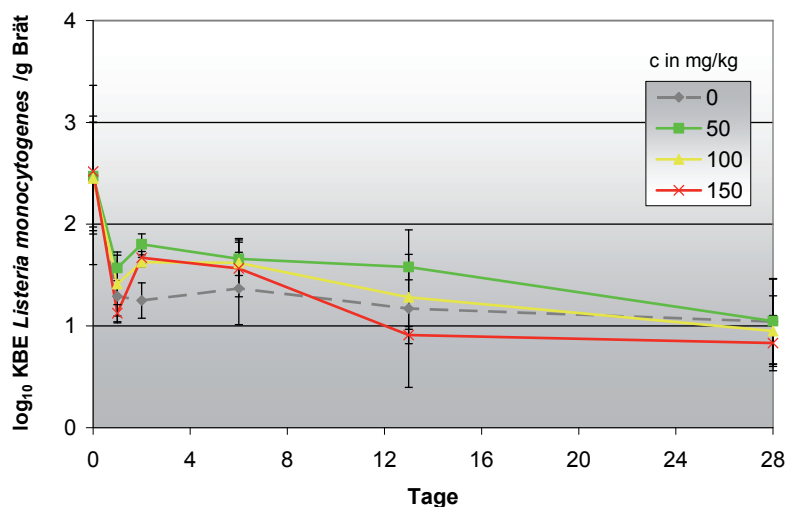


Abb. 2: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in schnellgereiften schnittfesten Rohwürsten mit GDL-Zusatz (Produkttyp B) unter dem Einfluss von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (c: 0, 50, 100 und 150 mg/kg).

Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

niedrigen Niveau blieben die Staphylokokken-Zahlen bis zum Tag 28. Ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Natriumnitritkonzentrationen wurde nicht festgestellt.

Clostridium perfringens. In den schnellgereiften Rohwürsten starben die inokulierten Clostridien (ca. 400 KbE/g) schnell ab und waren nach 6 Tagen nur noch qualitativ detektierbar. Ein Nachweis der Keime war nach Anreicherung und molekularbiologischer Diagnostik bis zum Tag 28 möglich. Die unterschiedlichen Nitritkonzentrationen beeinflussten das Absterbeverhalten der Clostridien nicht.

Produkttyp C: langgereifte schnittfeste Rohwurst

Physikalisch-chemische Parameter. Der a_w -Wert betrug am Herstellungstag kurz nach der Beimpfung ca. 0,962. Mit fortschreitender Reifedauer und Lagerung nahm der a_w -Wert kontinuierlich in allen Chargen gleichmäßig ab. Am Tag 42 zum Ende der Untersuchung lagen die a_w -Werte zwischen 0,87 bzw. 0,86.

Die Anfangs-pH-Werte (zwischen 5,79 und 5,85) fielen bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,2

und 5,3 ab und stiegen anschließend im Laufe der weiteren Reifung und Lagerung auf pH-Werte von 5,56 an. Dabei wurden vor allem in den ersten sechs Reifetagen zwischen den einzelnen Nitritkonzentrationen Unterschiede festgestellt. So lag der pH-Wert in der Charge ohne Nitrit am Tag 3 bei 5,19 und in der mit 150 mg/kg Nitrit am gleichen Reifungstag bei 5,27.

Aerobe mesophile Keimzahl und Lactobacillenzahl. Die Entwicklungen der aeroben mesophilen Keimdichte und Milchsäurebakterienzahl, die nahezu identisch waren, zeigten keine Auffälligkeiten und erreichten nach 3 Tagen Keimzahlen über 8 \log_{10} KbE/g (1×10^8 KbE/g).

Listeria monocytogenes. Nach einem kurzen Anstieg der Keimzahlen innerhalb der ersten 24 Stunden, der bei der Charge mit 0 mg/kg Nitrit deutlicher ausgeprägter war, fiel die Keimdichte von *Listeria monocytogenes* im weiteren Verlauf der Reifung ab, wobei eine schnellere Reduktion in den Chargen mit Natriumnitrit erzielt werden konnte. Hinsichtlich der zugesetzten Nitritmenge konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Ab dem Tag 42 waren die Listerien in den Ansätzen mit 100 und 150 mg/kg nur noch nach Anreicherung detektierbar (siehe Abb. 3).

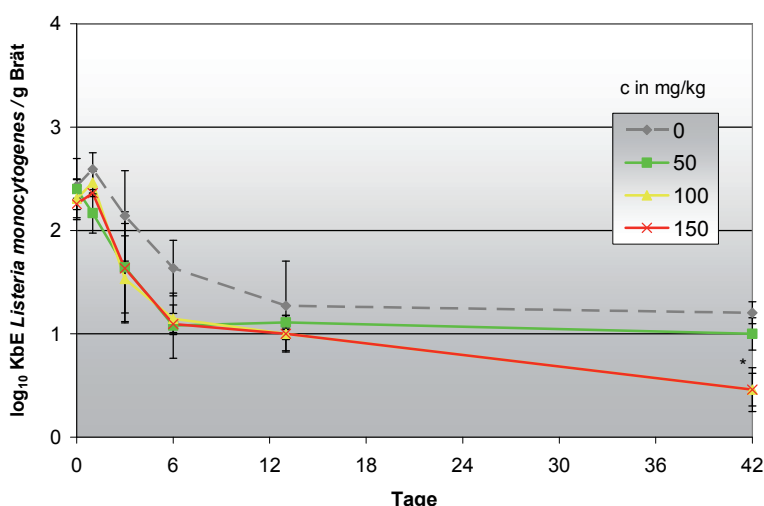


Abb. 3: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in langgereiften schnittfesten Rohwürsten (Produkttyp C) unter dem Einfluss von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (c: 0, 50, 100 und 150 mg/kg).

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 *Listeria monocytogenes* nur noch qualitativ nach Anreicherung nachgewiesen werden konnte

Staphylococcus aureus. Innerhalb der ersten 24 Stunden stiegen die Keimzahlen von ca. 2,4 log₁₀ KbE/g (250 KbE/g) kurzfristig an. Mit fortschreitender Reifung und Lagerung nahm die Keimdichte anschließend kontinuierlich ab und erreichte am Tag 42 Werte zwischen 20 und 40 KbE/g. Die eingesetzte Nitritkonzentration hatte dabei keinen Einfluss auf den Keimzahlverlauf.

Clostridium perfringens. Eine schnelle und ausgeprägte Absterbekinetik der Clostridien wurde in allen Chargen beobachtet. Die Reduktion fiel jedoch in den Rohwürsten mit den höchsten Nitritkonzentrationen am deutlichsten aus. Von Tag 6 bis zum Ende des Lagerungszeitraums nach 42 Tagen waren diese Keime nur noch qualitativ nachweisbar.

Produkttyp D: Edelschimmelpilzgereifte Rohwurst

Physikalisch-chemische Parameter. Unmittelbar nach der Beimpfung wurde ein a_w-Wert von 0,962 ermittelt, der bis zum Tag 8 abnahm. Mit fortschreitender Reifedauer und Lagerung nahm der a_w-Wert in allen Chargen gleichmäßig ab. Am Tag 84 zum Ende der Untersuchung lagen die a_w-Werte zwischen 0,84 und 0,85.

Die pH-Werte lagen anfangs zwischen 5,75 und 5,82 und fielen in allen Chargen

innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,2 und 5,3 ab. Dabei wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Nitritkonzentrationen festgestellt. So wurde in der Charge ohne Nitrit am Tag 3 ein pH-Wert von 5,2 und in den Proben mit 150 mg/kg Nitrit ein Wert von 5,3 gemessen. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg der pH-Wert produkttypisch durch die Bildung von basischen Stoffwechselprodukten an. Nach 84 Tagen wurden in den Würsten pH-Werte zwischen 6,18 und 6,3 gemessen.

Aerobe mesophile Keimzahl und Lactobacillenzahl. Der Verlauf der Gesamtkeimzahlen entsprach bei allen Versuchschargen nach 3 Tagen weitestgehend dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl. Die höheren Werte bei den Gesamtkeimzahlen erklären sich durch die Miterfassung der *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen. Ein Einfluss der Edelschimmelpilzkultur auf die Höhe und Entwicklung der Gesamtkeimzahlen oder Milchsäurebakterien war in den durchgeführten Untersuchungen nicht zu erkennen.

Listeria monocytogenes. Nach einem kurzen Anstieg der Listeriendichte in den Produkten ohne Natriumnitrit von ca. 400 KbE/g auf ca. 800 KbE/g nahm die Zellzahl mit einsetzender Abtrocknung im weiteren Verlauf der Reifung ab. In den

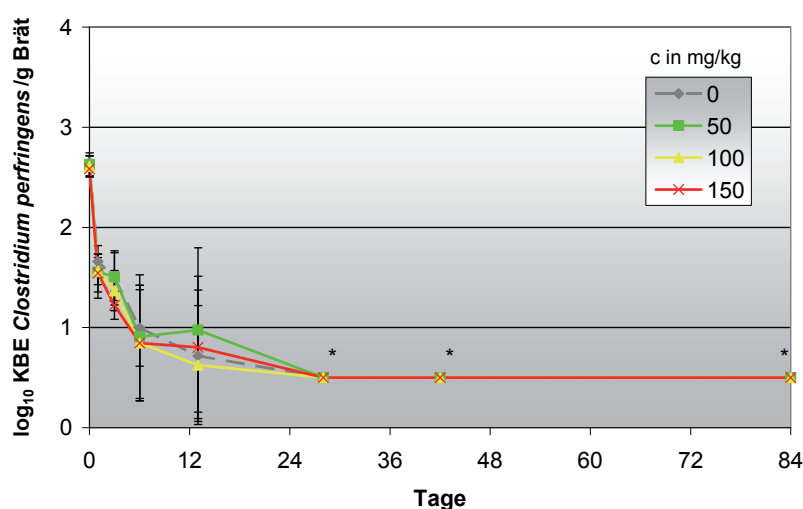


Abb. 4: Verhalten von *Clostridium perfringens* in edelschimmelpilzgereifter Rohwurst (Produkttyp D) unter dem Einfluss von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen (c: 0, 50, 100 und 150 mg/kg).

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 *Clostridium perfringens* nur noch qualitativ nach Anreicherung und PCR nachgewiesen werden konnte

Rohwürsten mit Zusatzstoff nahm die Keimdichte kontinuierlich ab und erreichte am Tag 6 annähernd gleiche Keimzahlen im Bereich von 50-80 KbE/g. Ab dem Tag 42 war ein Nachweis der inokulierten Listerien in den Chargen mit Nitrit nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich. Dagegen konnten die Keime in den Edelschimmelpilzgereiften Würsten ohne Natriumnitrit bis zum Tag 84 quantitativ in einer Höhe von ca. 30 KbE/g nachgewiesen werden.

Staphylococcus aureus. Innerhalb der ersten 24 Stunden stiegen die Keimzahlen kurzfristig von 2,4 Log₁₀ KbE/g ($2,5 \times 10^2$ KbE/g) auf Werte um 2,8 Log₁₀ KbE/g ($6,3 \times 10^2$ KbE/g) an und fielen dann kontinuierlich infolge der starken Abtrocknung auf Werte von 10 KbE/g am Tag 84 ab. Ein deutlicher Unterschied zwischen den zugesetzten Nitritkonzentrationen konnte nicht beobachtet werden.

Clostridium perfringens. *Clostridium perfringens* starb in den mit Schimmelpilz gereiften Produkten schnell ab. Ab Tag 6 war der Keim bis zum Versuchsende nur noch nach Anreicherung detektierbar (siehe Abb. 4). Ein Einfluss der Nitritkonzentration auf die Keimzahlreduktion konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 4).

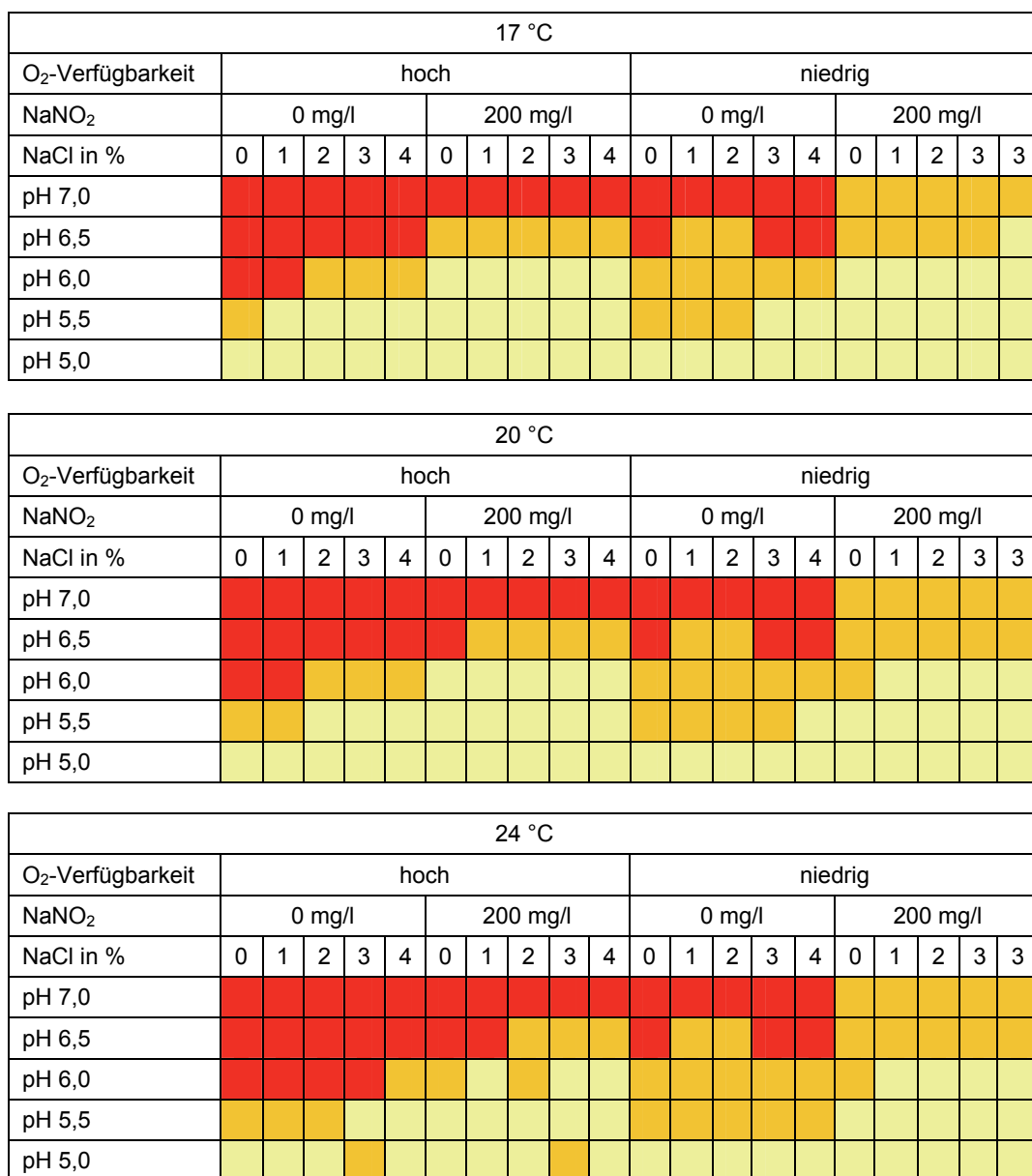
Wirkung von Natriumnitrit auf das Wachstum von L. monocytogenes EGDe unter Einbezug praxisrelevanter Parameter

Im Hochdurchsatzverfahren sollte analysiert werden, ob weitere Reifeparameter der Rohwurstherstellung wie Temperatur (17 °C, 20 °C, 24 °C), pH-Wert (5; 5,5; 6; 6,5; 7), NaCl-Konzentration (0, 1, 2, 3, 4 %) und Sauerstoffverfügbarkeit (hoch/niedrig) die mögliche wachstumshemmende Wirkung von Natriumnitrit (0, 200 mg/l) noch verstärken. 300 Wachstumsparameter wurden jeweils 6-malig getestet und die Wachstumszunahme der Kulturen über die Bestimmung der ΔOD (s. oben) ermittelt. Es konnten dabei Bedingungen ermittelt werden, die kein Wachstum, mäßiges Wachstum oder gutes Wachstum erlauben (Abb. 5).

Alle untersuchten Parameter wurden miteinander kombiniert, so dass das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* EGDe bei 300 verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert wurde. Basierend auf der maximalen Veränderung der optischen Dichte (OD) konnten die Wachstumsbedingungen in drei Kategorien eingeteilt werden: $\Delta OD < 0,05$ (kein Wachstum möglich), $\Delta OD > 0,05$ und $< 0,5$ (mäßiges Wachstum möglich), und $\Delta OD > 0,5$ (gutes Wachstum möglich).

Deutlich zu erkennen ist, dass sich unter den getesteten Wachstumsbedingungen die Zugabe von 200 mg/ml NaNO₂ nachteilig auf das Wachstum von *L. monocytogenes* EGDe auswirkt. Dabei ist festzustellen, dass die gleichzeitige Einwirkung von weiteren „Stressfaktoren“ wie niedrige Sauerstoffverfügbarkeit, Erhöhung der NaCl-Konzentration sowie Absenken des pH-Wertes zu einer deutlicheren Verminderung des Wachstums beiträgt. Besonders deutlich wird der inhibitorische Effekt von Nitrit in Kombination mit einem Absenken des pH-Wertes. Beispielsweise kann bei einer Temperatur von 17 °C, 0 % NaCl und einem pH-Wert von 7 sowohl in Kulturen ohne, als auch in Kulturen, denen Natriumnitrit zugesetzt wurde, ein gutes Wachstum beobachtet werden. Wird der pH-Wert auf 6,5 abgesenkt, so kann in den Kulturen ohne Nitrit ebenfalls ein gutes Wachstum, in Kulturen, denen Nitrit zugesetzt wurde, nur ein mäßiges Wachstum beobachtet werden. Ab einem pH-Wert von 6 führt die Zugabe von Nitrit zu einer vollständigen Wachstumsinhibition.

Diese Daten decken sich auch mit Daten aus globalen Transkriptionsstudien (Daten nicht dargestellt). Hier konnte gezeigt werden, dass bei einem pH-Wert von 7 die Zugabe von Nitrit in geringen Änderungen des Transkriptionsprofils resultiert. Bei einem pH-Wert von 6 hat die Zugabe der gleichen Menge Natriumnitrit (200 mg/l) jedoch einen enormen Einfluss auf die Transkription in *L. monocytogenes* EGDe. Das Bakterium reagiert mit einer massiven Stressantwort.



gelb: $\Delta OD < 0,05$ – Bedingungen, die kein Wachstum erlauben
orange: $\Delta OD > 0,05$ und $< 0,5$ – Bedingungen, die ein mäßiges Wachstum erlauben
rot: $\Delta OD > 0,5$ – Bedingungen, die ein gutes Wachstum erlauben

Abb. 5: Wirkung von Natriumnitrit auf das Wachstum von *L. monocytogenes* EGDe unter Einbezug praxisrelevanter Parameter wie Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, NaCl-Konzentration und pH-Wert

Fazit

In den Challengeversuchen wurden unterschiedliche Überlebens-/Absterbekinetiken von Gram positiven Lebensmittelinfektionserregern in den verschiedenen Rohwurstzeugnissen ermittelt. Für das Produkt Rohwurst sind die ersten Reifetage entscheidend, da stabilisierende Faktoren wie niedriger a_W - und pH-Wert noch nicht ausgeprägt sind (KABISCH *et al.*, 2009).

Hier verhinderte der Zusatz von Natriumnitrit sehr effektiv das Wachstum von *Clostridium perfringens* und *Listeria monocytogenes*. Mit fortschreitender Reifung bzw. Lagerung sind es dann vor allem die dynamischen Prozesse im Produkt, die eine weitere Vermehrung der pathogenen Erreger verhindern (LEISTNER, 1992; LEISTNER, 2000; UYTENDAELE *et al.*, 2001) und zu einer Stabilisierung über den Reifezeitraum hinaus führen.

Für *Staphylococcus aureus* konnte in allen Produkten in den ersten 24 h eine leichte Zunahme der Zellzahl beobachtet werden. Diese Vermehrung wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet (GAREIS *et al.*, 2010) und verdeutlicht, dass vor allem Gram positive Infektionserreger in Rohwurstprodukten eine höhere Tenazität als Gram negative enterische Erreger besitzen und eine rasche Abtötung nicht immer möglich ist (GAREIS *et al.*, 2010).

Der Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen Natriumnitrit hatte in den schnellgereiften (Typ B), den langgereiften (Typ C) und den Edelschimmelpilzgereiften (Typ D) Rohwürsten keinen Einfluss auf das Wachstum-/Absterbeverhalten von *Staphylococcus aureus*. Ausschließlich in den kurzgereiften streichfähigen Würsten (Typ A) konnte ein Einfluss der zugesetzten Nitritmenge festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit Ausnahme der mit GDL-gereiften Rohwurst ein Zusatz von Natriumnitrit unbedingt erforderlich ist, um die mikrobiologische Sicherheit der Produkte zu gewährleisten. Nach den vorliegenden Ergebnissen sollte bei Rohwurstzeugnissen eine Zugabe von mindestens 100 mg Natriumnitrit/kg Rohwurstbrät erfolgen.

Die Wachstumsanalysen im Hochdurchsatzverfahren sowie die globalen Transkriptionanalysen deuten darauf hin, dass der Effekt von Nitrit auf *L. monocytogenes* EGDe umso deutlicher ist, je saurer der pH-Wert ist. Die rasche Ansäuerung bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nitritpökelsalz ist daher die wichtigste Maßnahme für die Gewährleistung der mikrobiologischen Stabilität.

Danksagung

Das Forschungsvorhaben (AiF 15835 N) wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

Literatur

- Arkoudelos, J. S., G. J. E. Nychas, and F. Samaras. 1997. The occurrence of Staphylococci on Greek fermented sausages. *Fleischwirtschaft* 77:571-574.
- Beutin, L., A. Miko, G. Krause, K. Pries, S. Haby, K. Steege, and N. Albrecht. 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4769-4775.
- Birzele, B., S. Djordjevic, and J. Kramer. 2005. A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. *Food Control* 16: 695-699.
- Bruun, T., G. Sorensen, L. P. Forshell, T. Jensen, K. Nygard, G. Kapperud, B. A. Lindstedt, et al. 2009. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. *Eurosurveillance* 14.
- Bundrant, B. N., T. Hutchins, H. C. den Bakker, E. Fortes, and M. Wiedmann. 2011. Listeriosis outbreak in dairy cattle caused by an unusual *Listeria monocytogenes* serotype 4b strain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:155-158.
- Colak, H., H. Hampikyan, B. Ulusoy, and E. B. Bingol. 2007. Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage (sucuk). *Food Control* 18:30-32.
- Farber, J. M., G. W. Sanders, and M. A. Johnston. 1989. A Survey of Various Foods for the Presence of *Listeria* Species. *Journal of Food Protection* 52:456-458.
- Fosse, J., H. Seegers, and C. Magras. 2009. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: A review. *Zoonoses and Public Health* 56:429-454.
- Fox, E. M., N. Leonard, and K. Jordan. 2011. Molecular Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Irish Dairy Farms. *Foodborne Pathogens and Disease* 8:635-641.
- Gareis, M., J. Kabisch, R. Pichner, and H. Hechelmann. 2010. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in minisalami. *Fleischwirtschaft* 90:103-109.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, et al. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
- Gobat, P. F. and T. Jemmi. 1990. Epidemiologic Studies on *Listeria* Spp. in Slaughterhouses. *Fleischwirtschaft* 70:1448-1450.

- Guerini, M.N., D.M. Brichta-Harhay, S.D. Shackelford, T.M. Arthur, J.M. Bosilevac, N. Kalchayanand, et al. 2007. *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the united states. *Journal of Food Protection* 70:2578-2582.
- Kabisch, J., R. Pichner, H. Hechelmann, and M. Gareis. 2009. Sodium nitrite versus plant extract: antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 48:149-155.
- Kabisch, J., R. Scheuer, W. Roedel, and M. Gareis. 2008. Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 47:99-105.
- Kahraman, T. and A. Aydin. 2009. Prevalence of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in meat and meat products in Turkey. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 60:6-11.
- Kamber, U., H. I. Gokce, and M. Elmali. 2007. *Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey. *Food Additives and Contaminants* 24:673-678.
- Kerouanton, A., J. A. Hennekinne, C. Letertre, L. Petit, O. Chesneau, A. Brisabois, and M. L. De Buyser. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology* 115:369-375.
- Lee, G. Y., H. I. Jang, I. G. Hwang, and M. S. Rhee. 2009. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology* 134:196-200.
- Leistner, L. 1992. Food Preservation by Combined Methods. *Food Research International* 25:151-158.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181-186.
- Lücke, F. K. 2003. Use of nitrite and nitrate in the processing of meat from organic production - benefits and risks. *Fleischwirtschaft* 83:138-142.
- Messelhäusser, U., R. Zucker, D. Elmer-Engelhard, U. Busch, S. Hörmansdorfer, U. Pudich, and C. Höller. 2007. Detection and characterization of *Clostridium perfringens* via real-time-PCR. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 2:194-197.
- Meyer, C., M. Fredriksson-Ahomaa, B. Sperner, and E. Märtilbauer. 2011. Detection of *Listeria monocytogenes* in pork and beef using the VIDAS (R) LMO2 automated enzyme linked immunoassay method. *Meat Science* 88:594-596.
- Meyer, C., S. Thiel, U. Ullrich, and A. Stolle. 2010. *Salmonella* in Raw Meat and By-Products from Pork and Beef. *Journal of Food Protection* 73:1780-1784.
- Morot-Bizot, S. C., S. Leroy, and R. Talon. 2006. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 108: 210-217.
- Nastasijevic, I., R. Mitrovic, and S. Buncich. 2009. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science* 82:101-105.
- Rahimifard, N., S. Shoeibi, M. Hamedani, M. Saleh, F. Bagheri, S. Saadati, and Z. Noori. 2008. The presence and control of *Salmonella* in food stuffs. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* 5.
- Rödel, W., R. Scheuer, and H. Wagner. 1989. Eine neue Methode zur Messung der Wasseraktivität in Fleischprodukten. *Fleischwirtschaft* 69: 1396-1399.
- Rywotycki, R. 1997. The occurrence of nitrosamines in meat. *Medycyna Weterynaryjna* 53:726-729.
- Rywotycki, R. 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry* 101:540-548.
- Taormina, P. J., G. W. Bartholomew, and W. J. Dorsa. 2003. Incidence of *Clostridium perfringens* in commercially produced cured raw meat product mixtures and behavior in cooked products during chilling and refrigerated storage. *Journal of Food Protection* 66:72-81.
- Thevenot, D., A. Dernburg, and C. Vernozy-Rozand. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101:7-17.
- Titball, R. W., S. E. C. Hunter, K. L. Martin, B. C. Morris, A. D. Shuttleworth, T. Rubidge, D. W. Anderson, and D. C. Kelly. 1989. Molecular-Cloning and Nucleotide-Sequence of the Alpha-Toxin (Phospholipase-C) of *Clostridium perfringens*. *Infection and Immunity* 57:367-376.
- Uyttendaele, M., S. Vankeirsbilck, and J. Debevere. 2001. Recovery of heat-stressed *E-coli* O157 : H7 from ground beef and survival of *E-coli* O157 : H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7 degrees C and 22 degrees C. *Food Microbiology* 18:511-519.