

Keime, die aus der Kälte kommen: *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch

Clostridium estertheticum in vacuum-packaged fresh beef

E. ZIEGLER, H. HECHELMANN, R. PICHNER und M. GAREIS

Zusammenfassung

Clostridium estertheticum ist ein anaerob wachsender, kältetoleranter Verderbniserreger, über dessen Vorkommen, insbesondere in Deutschland, bislang nur wenig gesicherte Erkenntnisse vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zuverlässiges Nachweisverfahren unter Einbeziehung eines PCR-Screenings mit zwei Primersets etabliert, mit dem Sporen und vegetative Keime gleichermaßen gut erfasst werden können und eine Differenzierung zwischen *C. estertheticum* im eigentlichen Sinne und *C. estertheticum*-like organisms möglich ist. Die Nachweisgrenze liegt bei $\geq 10^3$ Organismen/ml Tropfsaft, nach Anreicherung ist die Erfassung von etwa 10 Keimen/ml Tropfsaft möglich. Insgesamt wurden 20 vakuumverpackte Rindfleischproben (n=9 Verdachtsproben, n=11 Stichproben aus dem Handel) visuell, sensorisch und mikrobiologisch unter Einbeziehung der PCR-Systeme sowie Kultivierungen unter anaeroben Bedingungen und bei 4 °C untersucht. Das Vorkommen von *C. estertheticum* bzw. *C. estertheticum*-like organisms wurde in acht der neun Verdachtsproben bestätigt, die Handelsproben waren nicht belastet.

Summary

To date, little data are available concerning the prevalence of meat spoilage caused by *Clostridium estertheticum*. Standard methods for detection of this organism are also lacking at present. Aim of this study was therefore to establish reliable detection methods for *C. estertheticum* and to get first information about the occurrence of this spoilage organism in vacuum-packaged beef samples. For that purpose a total of 20 samples (spoiled samples n=9, samples randomly bought at local supermarkets and wholesale traders n=11) were examined by use of a PCR screening method using two primer sets, routine microbiological methods, sensory evaluation and isolation of causative *Clostridia* with subsequent classification as *C. estertheticum* or *C. estertheticum*-like organisms. The limits of detection were 10^3 spores or vegetative cells per ml meat drip without enrichment and 10 cells/ml after enrichment. The majority of the spoiled packs were tested positive for *C. estertheticum*/*C. estertheticum*-like organisms (n=8), whereas all other samples were found to be negative.

Schlüsselwörter *Clostridium estertheticum* – Vakuumverpackung – Verderb

Key Words *Clostridium estertheticum* – vacuum packaging – blown pack spoilage

Einleitung

Clostridium estertheticum, ein psychrophiler, anaerober Sporenbildner, wurde Ende der 80er Jahre erstmals beschrieben und als Verursacher der so genannten „blown-pack spoilage“ identifiziert. Dieser Art sehr nahe stehende Clostridien werden als *Clostridium estertheticum*-like organisms bezeichnet. Der Verderb durch diese

psychrophilen Clostridien ist gekennzeichnet durch z.T. erhebliche Bombagen (Abb. 1) mit massiven Verderbsgerüchen und dafür, dass die betroffene Ware in der Regel keiner Unterbrechung der Kühlhaltung ausgesetzt war, wie es bei ähnlichen Fällen von Verderb durch kältetolerante Vertreter der *Enterobacteriaceae* häufig der Fall sein kann.



Abb. 1: Bombage von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien („Blown Pack Spoilage“)

Der Eintrag von *C. estertheticum* in vakuumverpackte Fleischwaren erfolgt sehr wahrscheinlich im Schlachthof durch Kontamination der Schlachtkörper mit Sporen. Als Hauptkontaminationsquelle wurden Tierhäute identifiziert. Auch in Kot- und Bodenproben konnten die Organismen nachgewiesen werden, und es wird angenommen, dass sie ursprünglich aus der Umgebung der Schlachttiere vom Boden, dem Futter oder Pflanzenoberflächen stammen (BOEREMA *et al.*, 2003).

C. estertheticum ist in der Lage, bei Kühltemperaturen von -1,5 bis 2 °C auf Fleisch zu wachsen und Gas zu produzieren. Auf-

grund ihrer obligat anaeroben Natur sowie niedrigen Wachstumsoptima von 12 bis 15 °C und der Unfähigkeit bei über 20 °C zu wachsen, werden diese Organismen bei mikrobiologischen Routineuntersuchungen nicht erfasst. Ihr kultureller Nachweis ist sehr arbeits- und zeitaufwändig, da er strikt anaerobe Bedingungen, spezielle Nährmedien und lange Inkubationszeiten bei tiefen Temperaturen erfordert. Die Ergebnisse sind daher erst mehrere Wochen später verfügbar.

Der molekularbiologische Nachweis mittels PCR ist spezifisch und zuverlässig (BRODA *et al.*, 2003) und kann diese Probleme zum Teil umgehen. Die Isolierung und Konservierung der betreffenden Keime ist jedoch Grundvoraussetzung für das gezielte wissenschaftliche Arbeiten mit diesen Verderbniserregern.

Material und Methoden

Als Referenzstamm für *C. estertheticum* diente DSMZ 8809 von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen. Einen Überblick über die Logistik der Untersuchungen ist in Abbildung 2 dargestellt.

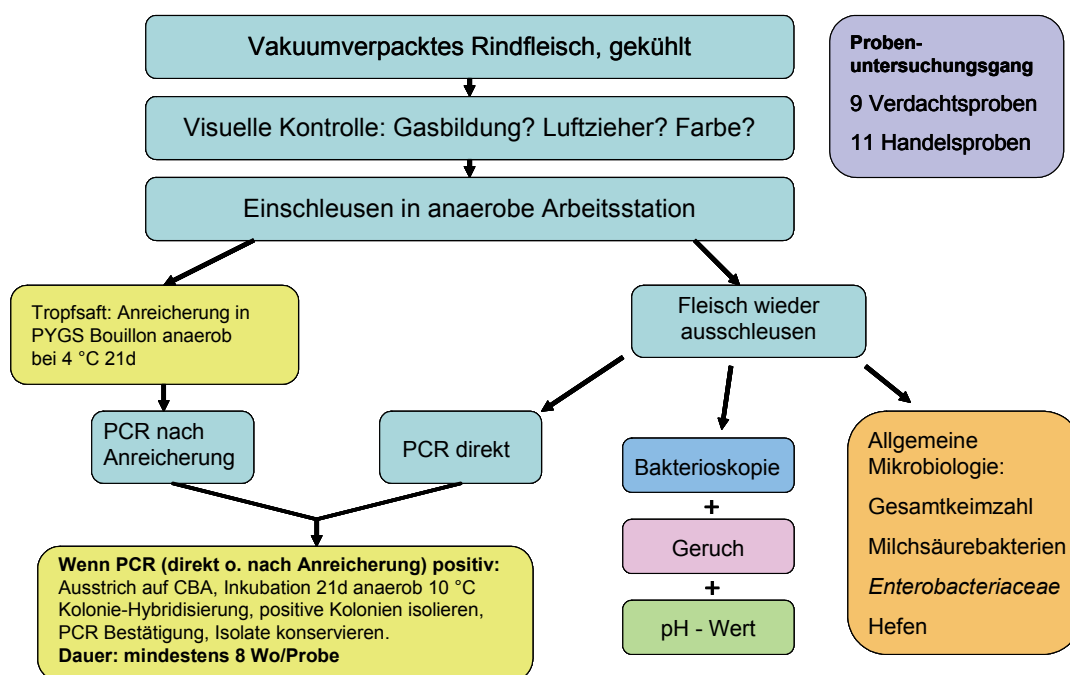


Abb. 2: Übersicht zur Vorgehensweise

Tab. 1: Pack-Blowing Score nach BOEREMA *et al.*, 2007

Score	Zustand der Vakuumverpackung
0	Keine sichtbaren Gasblasen
1	Wenige kleine Gasblasen im Fleischsaft sichtbar
2	Aussehen wie bei Vakuumverlust
3	Offensichtlich aufgebläht, puffig
4	Auf volle Größe aufgebläht, noch nicht straff gespannt
5	Auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt

Aussehen/Intaktheit der Verpackung

Die Vakuumbutel wurden visuell sorgfältig auf eventuelle Beschädigungen untersucht und der „pack-blowing score“, also die Menge der in der Packung vorhandenen Gasansammlungen, nach BOEREMA *et al.*, 2007 nach einer Skala von 0 bis 5 bewertet (Tab. 1). Eine Einstufung mit Score 1 wird noch als normal betrachtet.

Bakterioskopie des Fleischsaftes

Ein Tropfen Fleischsaft von jeder Probe wurde auf einen Objektträger verbracht und als Nativpräparat mikroskopisch untersucht. Das Präparat wurde mäanderförmig durchmustert und sowohl im Hellfeld als auch mittels Phasenkontrast betrachtet. Endosporen von Sporenbildnern sind dabei als stark lichtbrechende Strukturen leicht zu identifizieren.

Geruch

Die Beurteilung des Geruchs erfolgte nach dem Öffnen der Verpackung durch mindestens drei Personen. Es wurde eine einfach beschreibende Prüfung in Anlehnung an L00.90-6 der amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB durchgeführt.

Nachweisverfahren mit PCR

Der PCR-Nachweis erfolgte in Anlehnung an BRODA *et al.*, 2003. Für das Screening direkt aus Fleischsaft wurden die Primer 16SEF/16SER verwendet, mit denen sowohl *C. estertheticum* als auch *C. estertheticum*-like organisms erfasst werden.

Eine erneute PCR nach Kälteanreicherung in Nährbouillon wurde für die Proben durchgeführt, bei denen das PCR-Screening des Fleischtropfsaftes negativ verlief. Zur Anreicherung kältetoleranter

Clostridien wurde 1 ml Fleischtropfsaft der jeweiligen Probe in 9 ml präreduzierte PYGS-Bouillon (LUND *et al.*, 1990) überführt und 21 Tage bei 4 °C unter anaeroben Bedingungen inkubiert (vgl. Abb. 3).

Anzucht kältetoleranter Clostridien

Bei positiven PCR-Befunden wurden die entsprechenden Anreicherungen unter anaeroben Bedingungen auf präreduzierten Columbia-Blutagar-Platten plattiert und für weitere 21 Tage bei 10 °C anaerob inkubiert (BOEREMA *et al.*, 2003).

Koloniehybridisierung und Isolierung

Die Identifizierung der relevanten Clostridienkolonien erfolgte mittels Koloniehybridisierung (Boehringer Mannheim, 1995). Als markierte Gensonde diente ein Abschnitt der 16s-23s internal transcribed spacer region von *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*, der durch Amplifikation mit DIG-markierten Nukleotiden in einer PCR-Reaktion mit den Primern EISRF/EISRR (BRODA *et al.*, 2003) hergestellt wurde. Von den ermittelten Kolonien wurden Reinkulturen auf Columbia Blutagar hergestellt.

Bestätigung und Einordnung der Isolate mittels PCR

Von den erhaltenen Reinkulturen wurde der PCR Nachweis mit den beiden Primersets 16SEF/16SER und EISRF/EISRR durchgeführt. Dadurch wurde zum einen bestätigt, dass die richtigen Kolonien zur Isolation ausgewählt wurden, und zum anderen die Einordnung als *Clostridium estertheticum* oder *C. estertheticum*-like organism ermöglicht, da mit 16SEF/16SER bei beiden ein Amplifikat von 790 bp entsteht, während mit EISRF/EISRR nur *Clostridium estertheticum* eine spezifische Bande bei 235 bp produziert.

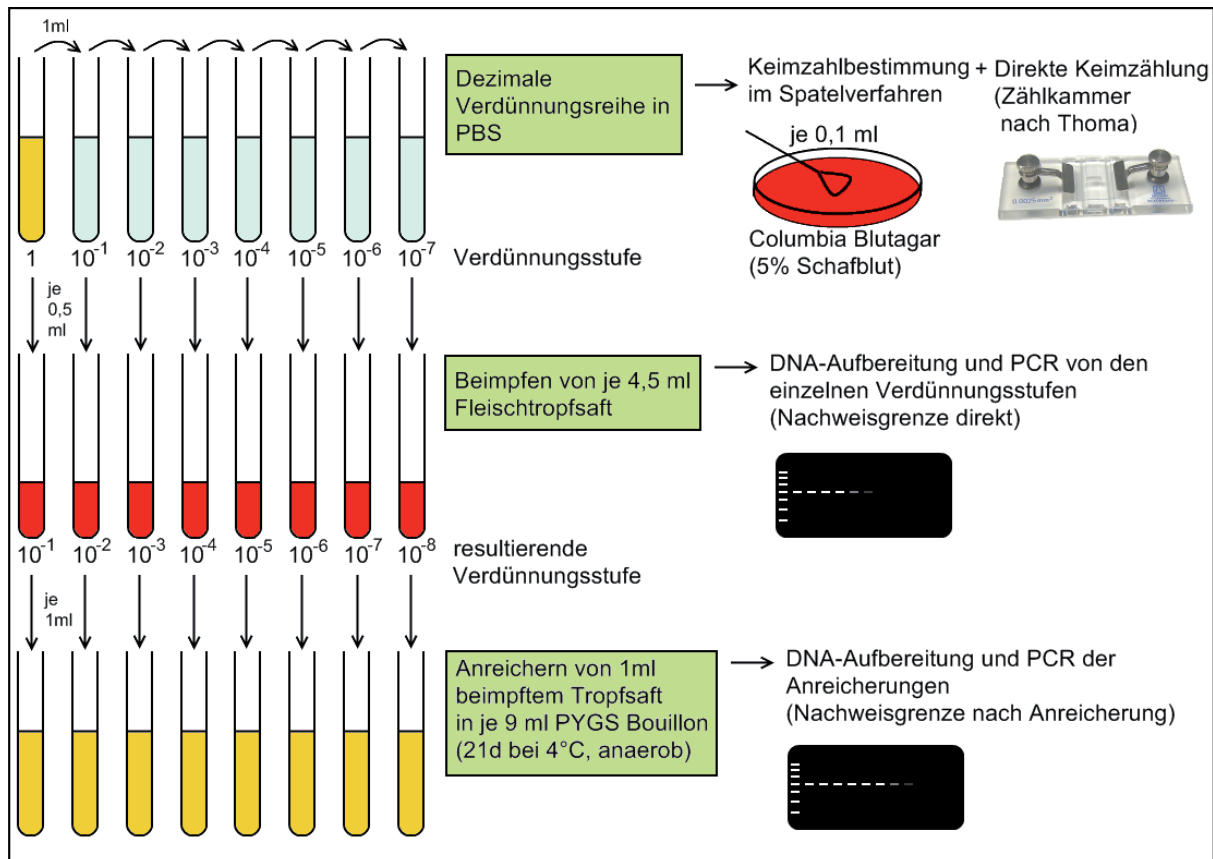


Abb. 3: Versuchsschema zur Nachweisrate von *C. estertheticum* in Fleischtropfsaft

Nachweisgrenze der PCR-Reaktionen in Fleischtropfsaft

Unter strikt anaeroben Bedingungen wurde die Nachweisgrenze für die PCR-Methode für *C. estertheticum* in Fleischtropfsaft ermittelt (vgl. Abb. 3). Hierzu wurden als Ausgangsmaterial zum einen Sporensuspensionen und zum anderen vegetative Zellen (96h-Kultur) von *C. estertheticum* verwendet. Die direkte Keimzählung sowie die PCR-Reaktion wurden nach Ausschleusen des Materials aus der anaeroben Arbeitsstation durchgeführt. Es wurden jeweils beide PCR-Reaktionen (Primerset 16SE und Primerset EISR) durchgeführt.

Ergebnisse

Vakuumverpackte Rindfleischproben

Insgesamt wurden 20 Proben mit den beschriebenen Verfahren näher untersucht. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tabelle 2. In acht von neun Verdachtsproben (V1-V9) wurden auffällige Pack-Blowing-

Scores (2-5), typische Verderbsgerüche, charakteristische bakterioskopische Befunde (Sporenbildende Clostridien) und positive PCR-Screening-Befunde ermittelt. Fünf dieser Proben stammten aus Brasilien, zwei aus Deutschland und eine Rindfleischprobe aus der Schweiz.

Die bisher nach der sehr aufwändigen anaeroben Kultivierung gewonnenen Isolate verhielten sich bei der Differenzierung mit den beiden Primersets 16SE/16SER und EISR/EISRR überwiegend wie *C. estertheticum*-like organisms. Für diese, dem eigentlichen *Clostridium estertheticum* „ähnlichen“ Stämme, liefert das PCR-System mit dem Primerset 16SEF/16SER ein positives und das PCR-System mit dem Primerset EISRF/EISRR ein negatives Ergebnis. Für *C. estertheticum* im engeren Sinne reagieren beide PCR-Systeme positiv. Lediglich bei den Proben V1 und V2 wurde *C. estertheticum* zweifelsfrei nachgewiesen. Bislang noch nicht abgeschlossen sind allerdings die Untersuchungen der Proben V7-V9.

Tab. 2: Ergebnisse der Probenuntersuchung

Probe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	H1-H11
Herkunft	D	BR	BR	BR	BR	BR	BR	D	CH	BR, D, RA
Pack-Blowing Score	2	4	4	3	3	n.d.	1-2	2	5	0-1
Bakterioskopie	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Typischer Geruch	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PCR-Screening (16SEF/16SER)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PCR nach Anreicherung							-	a	a	-
Kultivierungsergebnisse	+	+	+	+	+	-		a	a	
Koloniehybridisierung	+	+	+	+	+	-	a	a	a	
PCR-Bestätigung der Isolate										
16SEF/16SER	+	+	+	+	+					
EISRF/EISRR	+	+/-	-	-	-					

V=Verdachtsprobe, H=Handelsprobe, D=Deutschland, BR=Brasilien, RA=Argentinien, CH=Schweiz, a=Arbeiten dauern noch an, n.d.=wegen Verletzung der Packung nicht durchgeführt

Im Unterschied zu den Verdachtsproben ergab eine erste Studie zum möglichen Vorkommen von *C. estertheticum* in Proben aus dem Handel keinen Hinweis auf eine Kontamination (vgl. Tab. 2).

Nachweisgrenze der PCR-Reaktionen in Fleischtropfsaft

Die Nachweisgrenze liegt sowohl für Sporen als auch für vegetative Zellen bei 10^3 Organismen/ml Tropfsaft. Nach Anreicherung konnten bis zu 10 Organismen/ml nachgewiesen werden.

Die Keimzahlbestimmung im Spatelverfahren ergab trotz strikt anaerober Technik und Kühlung Keimzahlen, die um den Faktor 10^2 niedriger lagen als die direkte Zählung in der Thoma-Zählkammer. Dies ist vermutlich auf die insgesamt schwierige Kultivierbarkeit von *C. estertheticum* auf künstlichen Nährmedien zurückzuführen (BRODA *et al.*, 1998, BOEREMA *et al.*, 2003). Als Grundlage für die Berechnung der Nachweisgrenze diente deshalb die direkt ermittelte Keimzahl.

Schlussfolgerung

Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch kann im Falle einer Kontamination mit *C. estertheticum/C. estertheticum*-like organisms trotz einwandfreier Kühlung auftreten und hohe wirtschaftliche Schäden verursachen, da in der Regel hochwertige Teilstücke betroffen sind.

Die besonderen Eigenschaften des Verderbniserregers – Sporenbildner, Wachstum nur unter anaeroben und tiefen Temperaturen – erschweren den Nachweis. Mit den üblichen Routineverfahren der lebensmittelmikrobiologischen Diagnostik lassen sich diese kältetoleranten Bakterien nicht erfassen, da die Kulturmedien und Inkubationsbedingungen primär auf übliche aerobe Bakterien und pathogene Keime, die am besten bei 37 °C wachsen, ausgerichtet sind.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals über das Vorkommen von kältetoleranten *C. estertheticum/Cl. estertheticum*-like-Isolaten in vakuumverpacktem Rindfleisch für den deutschen Markt berichtet und die mögliche Präsenz derartiger Verderbniserreger bestätigt, auch wenn erste Ergebnisse von Handelsprobenuntersuchungen auf ein eher seltenes Vorkommen hinweisen. Eigene Erfahrungen zeigen, dass vor allem Importware aus Südamerika, insbesondere Brasilien, mit einer derartigen Problematik belastet sein kann.

Mit Hilfe der in diesem Forschungsvorhaben etablierten Nachweismethodik lassen sich Verdachtsfälle schnell und zuverlässig abklären. Die ursächliche Beteiligung kältetoleranter Clostridien kann somit relativ rasch bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Danksagung

Wir danken der Förderergesellschaft für Fleischforschung e. V. für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Literatur

Boehringer Mannheim (1995): *The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation*, ISBN: 3-88630-200-8

Boerema, J.A.; Broda, D.; Penney, N.; Brightwell, G. (2007): Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. *J Food Protect* (70) 6, 1434-1439

Boerema, J.A.; Broda, D.M.; Bell, R.G. (2003): Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-

based and molecular detection procedures. *Lett Appl Microbiol* (36) 6, 406-411

Broda, D.M.; Boerema, J.A.; Bell, R.G. (2003): PCR detection of psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled meats. *J Appl Microbiol* (94) 3, 515-522

Dainty, R.H.; Edwards, R.A.; Hibbard, C.M. (1989): Spoilage of Vacuum-Packed Beef by *A Clostridium* Sp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (49) 4, 473-486

Kalchayanand, N.; Ray, B.; Field, R.A.; Johnson, M.C. (1989): Spoilage of Vacuum-Packaged Refrigerated Beef by *Clostridium*. *Journal Food Protect* (52) 6, 424-426

Lund, B.M.; Graham, A.F.; George, S.M.; Brown, D. (1990): The Combined Effect of Incubation-Temperature, Ph and Sorbic Acid on the Probability of Growth of Nonproteolytic, Type-B *Clostridium-Botulinum*. *J Appl Bacteriol* (69) 4, 481-492