

## Untersuchungen zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit bei Rohwurstzeugnissen

Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage

J. KABISCH, R. SCHEUER, W. RÖDEL und M. GAREIS

### Zusammenfassung

Basierend auf dem Mangel wissenschaftlicher Daten zur mikrobiologischen Wirksamkeit von Natriumnitrit wurden in diesem Projekt Studien mit den Lebensmittelinfektionserregern der Gattungen *Escherichia*, *Listeria* und *Salmonella* durchgeführt. Die mikrobiologische Wirksamkeit von Natriumnitrit gegenüber diesen pathogenen Bakterien wurde unter *in vitro*-Bedingungen in flüssigen Kulturmedien und an Hand eines realistischen Modells (Challenge-tests) charakterisiert. In den Challenge-tests wurden unterschiedliche Nitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg) in einer Standardrezeptur verglichen, um die Frage zu klären, inwieweit der Verzicht auf Nitritpökelsalz bzw. eine Reduzierung des Zusatzes ohne Erhöhung des mikrobiologischen Risikos gerechtfertigt ist. In den Untersuchungen zeigte sich, dass vor allem dynamische Vorgänge in den Produkten zu einer sicheren Abtötung der Keime beitragen. Natriumnitrit hatte nur in Kombination mit einem erniedrigten pH-Wert eine antimikrobielle Wirkung.

### Summary

Only a few studies have addressed the use of nitrite against pathogens associated with meat (with the exception of *C. botulinum* – which seems to be of minor importance in raw fermented meat). Besides the investigation of the dynamic processes (ripening programs, reduction of pH-value and water activity) during the production of the fermented raw sausages, the aim of this study was to measure the influence of the additive sodium nitrite on the stability of these products. We investigated whether 0, 100, 150 or 200 mg/kg nitrite concentrations improve the microbiological stability of raw fermented sausages. For the challenge study different batches of short fermented, long fermented and mould-ripened sausages were produced. The batches were inoculated with 1000 cfu/g of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (O157:H7) and *Salmonella* spp.. Sausages were examined microbiologically in regular intervals. Our investigations showed that primarily dynamic effects and an attentive control of the ripening programs ('metabolic exhaustion') reduce the bacterial count. Additionally, it could be clearly demonstrated that the addition of sodium nitrite resulted in an antimicrobial effect.

---

**Schlüsselwörter**

Natriumnitrit – fermentierte Rohwurst – *Escherichia coli* – *Listeria monocytogenes* – *Salmonella* spp.

**Key Words**

sodium nitrite – fermented sausage – *Escherichia coli* – *Listeria monocytogenes* – *Salmonella* spp.

---

### Einleitung

Rohwurstzeugnisse stabilisieren sich ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess. Ablauf und Bedingungen dieses Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien entscheiden dabei letztlich über die

Sicherheit des Endproduktes. Zur Haltbarmachung und Wachstumshemmung von unerwünschten Keimen wird Rohwürsten Nitrit zugesetzt. Nitrit hat sowohl positive als auch negative Eigenschaften. Positive Effekte sind Umrötung (WIRTH, 1991), Aromabildung (FISCHER *et al.*, 2005), Konservierung (ALBERT *et al.*,

2003; HECHELMANN *et al.*, 1974) und Oxidationsschutz (ARNETH, 2001; RÖDEL *et al.*, 1992). Die Zugabe von Nitrit kann aber auch unerwünschte Folgen haben. So reagiert Nitrit in eiweißhaltigen Lebensmitteln zu Nitrosaminen (RYWOTYCKI, 1997; RYWOTYCKI, 2007) und ist in höheren Dosen toxisch (BRUNINGFANN and KANEENE, 1993; STANDEFER *et al.*, 1979). Neben den gesundheitlichen Aspekten ist generell zu beachten, dass chemische Zusatzstoffe vom Verbraucher weniger akzeptiert werden. Einige Verbände im Bereich des ökologischen Landbaus (z. B. Bioland, Demeter, Ökosiegel, Gää) haben sich daher gegen die Verwendung von Nitrit ausgesprochen. Die Sicherheit solcher Produkte kann jedoch zurzeit nicht ausreichend bewertet werden (FISCHER *et al.*, 2005), da entsprechende wissenschaftliche Studien fehlen.

Die konventionelle Herstellung von Fleischerzeugnissen mit Pökelsalz ist auf 150 mg/kg Natriumnitrit begrenzt. Für eine wissenschaftliche Überprüfung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Nitrit in Rohwurstzeugnissen müssen sämtliche Aspekte und Faktoren, die einen wechselseitigen Einfluss auf pathogene Keime haben, in die Untersuchungen einbezogen werden. Diese Faktoren konzentrieren sich im Wesentlichen auf die jeweilige Keimart, das Vorhandensein von apathogenen Konkurrenzkeimen und Starterkulturen, die Reifetemperatur, den Säuregrad und den Wasseraktivitätswert des Produktes sowie den Einfluss von Zusatzstoffen. Da diese Faktoren nicht isoliert betrachtet werden können, muss der Ansatz einer Überprüfung multifaktoriell sein, d. h. es müssen die sich gegenseitig unterschiedlich stark beeinflussenden Faktoren auf das Wachstum und Überleben pathogener Keime gleichermaßen berücksichtigt werden.

Das Ziel dieses Forschungsprojektes ist die Überprüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Natriumnitrit auf die wichtigsten pathogenen Lebensmittelinfektionserreger in Rohwurstzeugnissen. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, Empfehlungen abzuleiten, ob und unter welchen Bedingungen eine Herstellung von hygienisch einwandfreien Rohwurstprodukten

auch ohne den Zusatzstoff Nitrit möglich sein könnte.

## Material und Methoden

Bei den verwendeten Stämmen handelte es sich um *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (EHEC) und *Salmonella* spp. aus der Stammsammlung des Max Rubner-Institutes in Kulmbach.

### *In vitro*-Versuche

In der ersten Phase des Projektes wurde die Wachstumskinetik der hygienisch relevanten Keime in flüssigen Kulturmedien unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen 0 mg/l 100 mg/l [1,45 mM], 150 mg/l [2,17 mM] und 200 mg/l [2,9 mM] untersucht. Die Auswirkungen der variablen Faktoren auf das Wachstumsverhalten wurden auf der Basis von Potentialmessungen und paralleler mikrobiologischer Diagnostik dokumentiert. Insbesondere die Online-Erfassung von Redoxpotentialen der Kulturansätze ermöglicht hierbei und wie frühere Untersuchungen zeigten, ein tief greifendes Verständnis des Mikroorganismenverhaltens auf negative und positive Einflüsse (RÖDEL und SCHEUER, 2003a; RÖDEL und SCHEUER 2003b). Die quantitativen und qualitativen Ergebnisse bildeten die Grundlage für den zweiten Untersuchungsabschnitt.

### *Challengeversuche*

In diesem Abschnitt wurden verschiedene Rohwurstprodukte mit den Lebensmittelinfektionserregern artifiziell belastet (Challengetests) und das Verhalten der Keime unter dem Einfluss variabler Faktoren und unter praxisüblichen Reifungsverfahren in entsprechenden Klimakammern überprüft. Die verwendeten Rezepturen sind detailliert in Tabelle 1 angegeben. Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen wurde der Keimzahlverlauf der eingepflichten Stämme der Milchsäurebakterienflora, der Enterobacteriaceen sowie der aeroben mesophilen Mikroorganismen bestimmt. Dazu wurden die Rohwürste mit einem sterilen Skalpell in der Mitte senkrecht aufgeschnitten, anschließend wurden unter sterilen Bedingungen, je nach Keim, 10 g bzw. 25 g Probenmate-

rial entnommen und zusammen mit 90 ml bzw. 225 ml 0,85%iger Kochsalzlösung für zwei Minuten im Stomacher homogenisiert. Die Keimzahlbestimmung erfolgte mit zwei verschiedenen definierten Medien. Eine selektive Anreicherung erfolgte erst, nachdem die Keimzahl der Proben auf kleiner 10 abgesunken war. Dazu wurden 10 g bzw. 25 g Probe in 90 ml bzw. 225 ml gepuffertes Peptonwasser überführt, zerkleinert und für 18 Stunden bei 37 °C be-

brütet. Von der Voranreicherung wurden anschließend 0,1 ml auf die verschiedenen Nährmedien pipettiert. Parallel dazu erfolgte ein molekularbiologischer Nachweis der Keime mittels PCR. Die Berechnung der Keimdichte der pathogenen Bakterien sowie die Zahl der aeroben Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimflora erfolgten wie unter Punkt 8 der Methode L 06.00 § 64 LFGB beschrieben.

Tab. 1: Für alle Versuchsansätze verwendete Grundrezeptur für die Herstellung von Rohwurst

Wurstart	Rezept	Menge/kg
kurzgereifte streichfähige Rohwurst	Schweinefleisch, fettfrei und ohne sichtbare Sehnen S1	550 g
	Schweinefleisch, mittelfette Wammen ohne Schwarten und Drüsen S10	450 g
	Kochsalz	25 u. 30 g
	Glucose	3 g
	Pfeffer	3 g
	Starterkultur	0,8 g
	Natriumascorbat	0,5 g
kurzgereifte schnittfeste Rohwurst	Rindfleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil R2	330 g
	Schweinefleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil S2	330 g
	Schweinefleisch, kerniger Rückenspeck S8	300 g
	Kochsalz	28 g
	Glucono-delta-lacton	5 g
	Pfeffer	3 g
	Starterkultur	0,8 g
	Natriumascorbat	0,5 g
langgereifte Rohwurst	Rindfleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil R2	330 g
	Schweinefleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil S2	330 g
	Schweinefleisch, kerniger Rückenspeck S8	300 g
	Kochsalz	28 u. 34 g
	Pfeffer	3 g
	Starterkultur	0,8 g
	Natriumascorbat	0,5 g
mit Edelschimmeln gereifte Rohwurst	Rindfleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil R2	330 g
	Schweinefleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil S2	330 g
	Schweinefleisch, kerniger Rückenspeck S8	300 g
	Kochsalz	28 u. 34 g
	Pfeffer	3 g
	Starterkultur	0,8 g
	Natriumascorbat	0,5 g
	Edelschimmelpilzsuspension	

## Ergebnisse

### *In vitro*-Versuche

Natriumnitrit hatte in den verschiedenen Nährmedien nur unter ganz bestimmten Bedingungen eine antimikrobielle Wirkung auf die untersuchten Mikroorganismen. So

wirkte Natriumnitrit bei einem pH-Wert von 7 und  $a_w$ -Werten ab 0,97 als ein Wachstumsbeschleuniger für die Zellen von *Listeria monocytogenes* (siehe Abb. 1). Auf das Wachstum von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. hatte Nitrit bei einem pH-Wert von 7 keinen Einfluss. Mit ab-

nehmendem pH-Wert konnte jedoch eine Zunahme der antimikrobiellen Wirkung von Natriumnitrit im Medium beobachtet werden. In Kombination mit einer Absenkung des  $a_w$ -Wertes stieg die Toxizität des Nitrits weiter an, so dass bakteriostatische bzw. bakterizide Zustände erreicht wurden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die gewählten Bedingungen bei pH-Werten von 5 und einer Temperatur von 25 °C toxischer auf die Organismen wirkten als bei einer Temperatur von 17 °C (siehe Abb. 2).

### Challengeversuche

Für die kurzgereiften streichfähigen und schnittfesten Rohwurstprodukte wurden Versuchsansätze durchgeführt, bei denen die Reifetemperatur auf 25 °C erhöht war. Ziel dieser Versuche war es, das Phäno-

men der metabolischen Erschöpfung, welches in der ersten Versuchsphase bei allen Keimen auftrat, später im Produkt zu nutzen und somit die Keimzahl schneller unter die entsprechenden Nachweisgrenzen zu senken.

### Kurzgereifte streichfähige Rohwürste

In allen Versuchsreihen mit Natriumnitrit konnte während der Reifung und Lagerung keine Vermehrung der eingepfropften Bakterien festgestellt werden. Jedoch war mit praxisüblichen Rezepturen und Reifetechnologien innerhalb der ersten 14 Tage keine wesentliche Reduktion der Keimdichte erkennbar (siehe Abb. 3). Erst bei höheren Kochsalzzugaben von 2,89 % war eine Abnahme der Zellzahl zu beobachten.

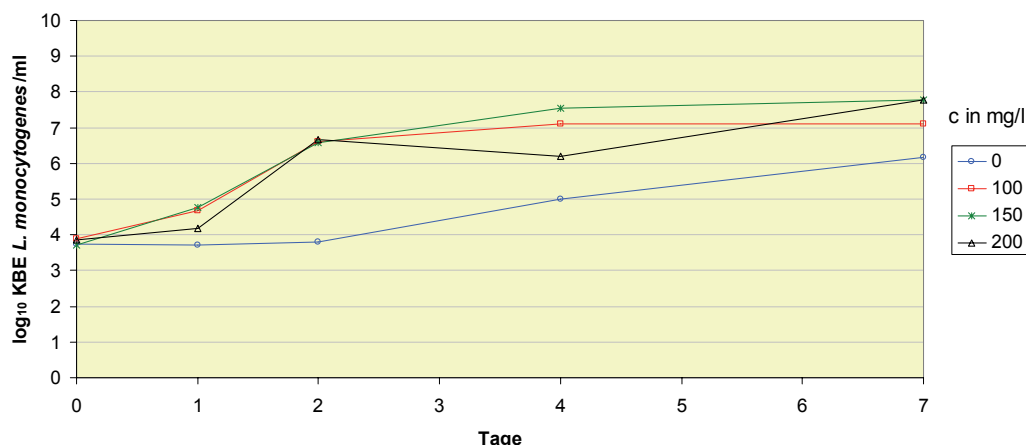


Abb. 1: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und  $a_w$ : 0,94

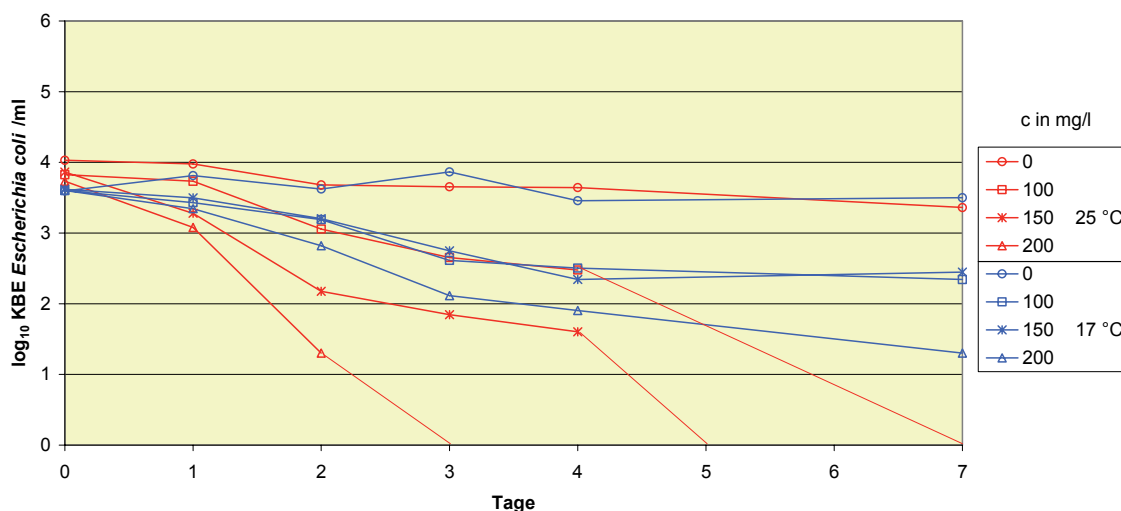


Abb. 2: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum KBE/ml von *Escherichia coli* in EC-Bouillon bei pH 5,  $a_w$ : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l)

Ähnliche Keimzahlreduktionen wurden durch die Verwendung eines alternativen Reifeprogramms mit einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur auf 25 °C erreicht. Am empfindlichsten reagierten *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. auf die geänderten Bedingungen, so dass eine Abnahme der Keimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3 und 4). Für *Listeria monocytogenes* konnte keine Reduktion der Keimdichte festgestellt werden. In den Chargen ohne Nitrit wurde für *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. eine deutliche Zu-

nahme der Keimzahlen auf gesundheitsgefährdende Werte beobachtet.

#### Kurzgereifte schnittfeste Rohwürste

Die Verwendung von Glucono-delta-lacton bewirkte eine schnelle Absenkung des pH-Wertes und somit war keine Vermehrung der pathogenen Infektionserreger zu beobachten. Als besonders vorteilhaft erwies sich hier eine Erhöhung der Temperatur auf 25 °C zwischen dem 4. und 6. Reifetag. So konnten die Keimzahlen von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. deutlich schneller unter die Nachweisgrenze

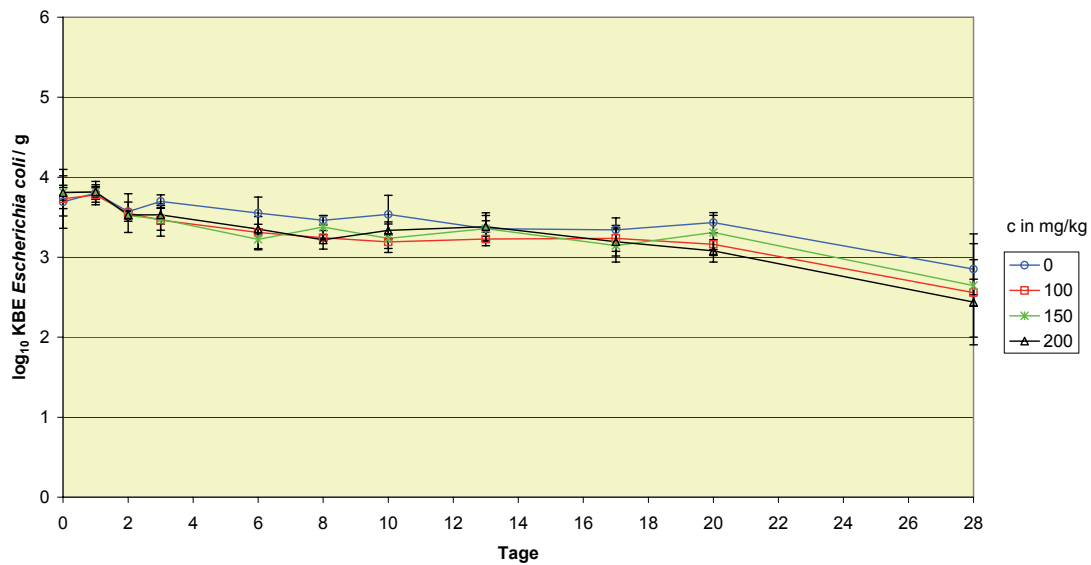


Abb. 3: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst (Reifeprogramm A und 2,89 % NaCl)

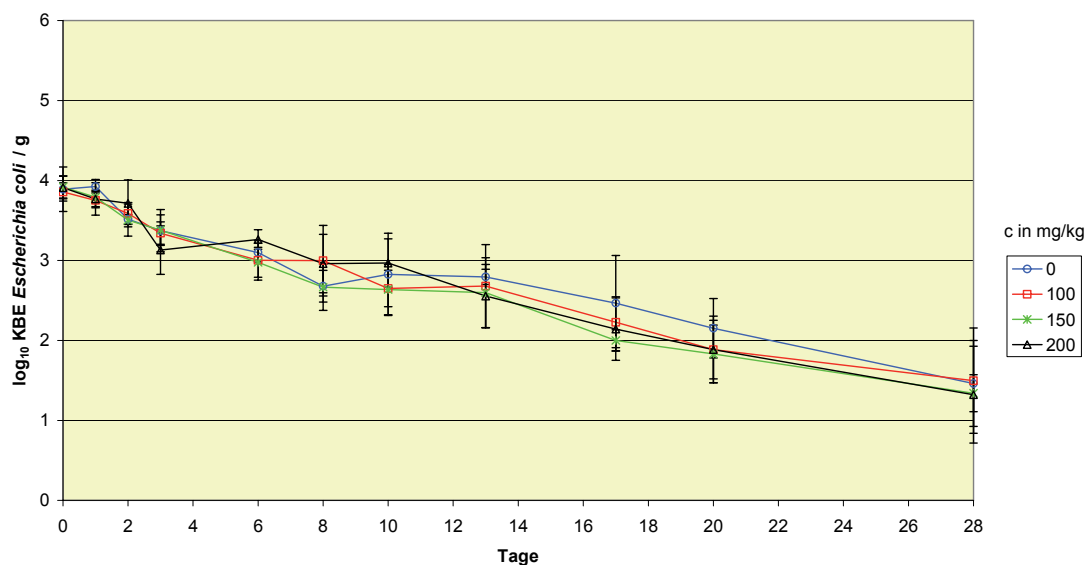


Abb. 4: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Escherichia coli* in einer Teewurst (Reifeprogramm B und 2,89 % NaCl)

von 10 KbE/g im Vergleich zu einem herkömmlichen Reifeprogramm gesenkt werden. Für *Listeria monocytogenes* konnte eine Abnahme der Keimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen festgestellt werden, jedoch blieben die Keimzahlen immer über dem Grenzwert von 100 KbE/g.

**Langgereifte schnittfeste Rohwürste**

In den langgereiften Produkten konnte eine völlige Abwesenheit der Keime von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. im

Schnitt nach einer 42-tägigen Reifung erreicht werden. Obwohl die Chargen ohne Nitrit vor allem in den ersten drei Reifetagen eine Vermehrung der eingepfropften Salmonellen zuließen, nahm die Zellzahl mit fortschreitender Reifung in Folge der zunehmenden Abtrocknung ab (siehe Abb. 5). *Listeria monocytogenes* erwies sich als widerstandsfähiger Keim mit einer hohen Tenazität und konnte bis zum 84. Tag in den Rohwürsten nachgewiesen werden. In den Chargen ohne Nitrit konnte

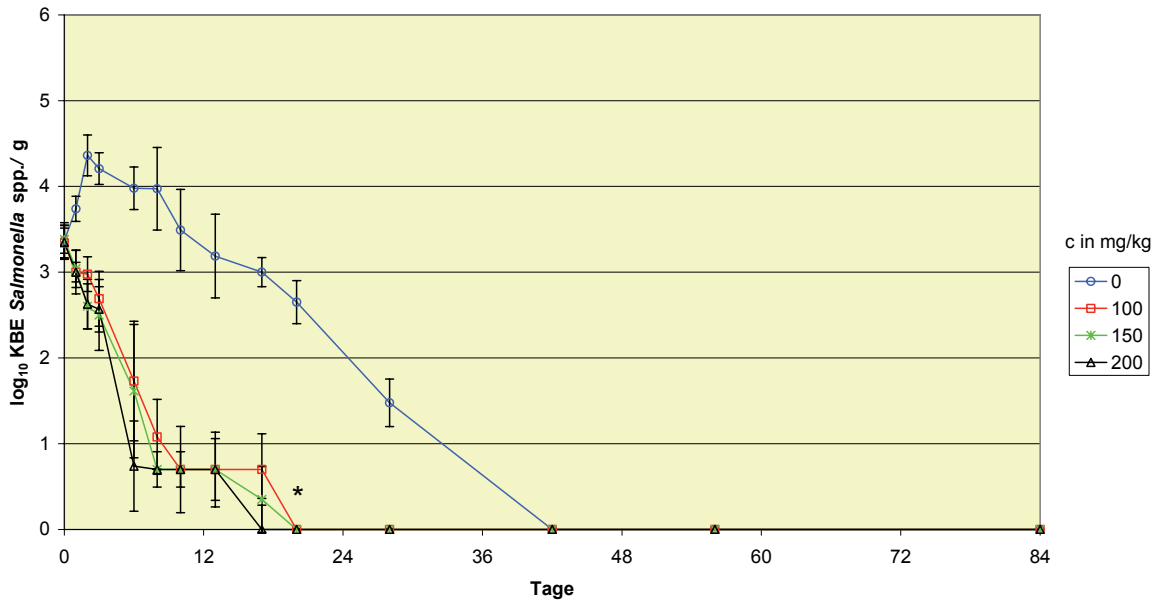


Abb. 5: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella* spp. in einer langgereiften Salami mit 3,4 % NaCl (\*= Nachweis nur noch nach Anreicherung möglich)

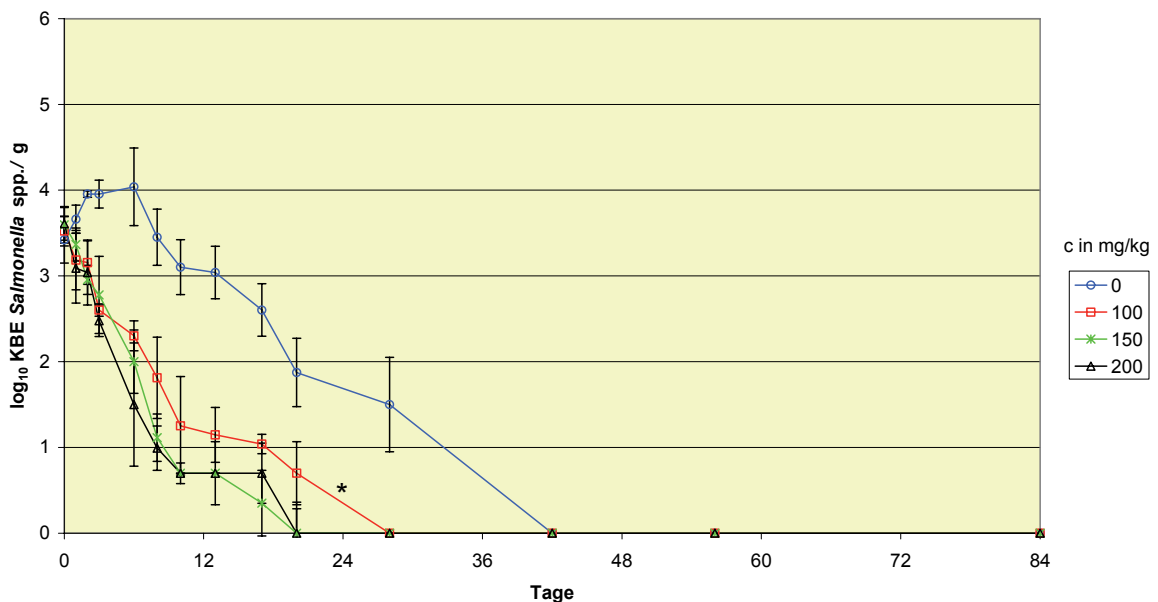


Abb. 6: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150, und 200 mg/kg) auf das Keimwachstum KBE/g von *Salmonella* spp. in einer mit Edelschimmel gereiften Salami mit 3,4 % NaCl (\*= Nachweis nur noch nach Anreicherung möglich)

eine Keimvermehrung um eine Zehnerpotenz festgestellt werden. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes blieb die Keimzahl konstant.

#### *Edelschimmelpilzgereifte Rohwürste*

Trotz der vergleichsmäßig schnellen Anhebung des pH-Wertes in Folge des Wachstums der Edelschimmelpilzkulturen konnte sowohl am Rand als auch in der Mitte des Produktes kein erhöhtes mikrobielles Risiko im Vergleich zu einer langgereiften Rohwurst festgestellt werden (vgl. Abb. 5 und 6). Ausschlaggebend dafür dürfte die Anwesenheit von Nitrit und der Abfall des pH-Wertes auf Werte um 5,2 gewesen sein. Diese beiden Hürden verhinderten ein Wachstum der zugesetzten Infektionserreger. Mit weiter voranschreitender Reifung nahm der Wasseraktivitätswert auf Werte unter 0,94 ab. Dieser stellt vor allem für gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. eine wichtige Grenze dar, da unterhalb dieses Wertes kaum noch eine Vermehrung möglich ist. Auch für *Listeria monocytogenes* sind die Generationszeiten unter diesen Bedingungen sehr lang. Da es sich hier aber um einen kontinuierlichen Prozess handelt und der Organismus sich ständig an die sich ändernden Bedingungen anpassen muss, war auch für den sonst so robusten Keim ein Wachstum nicht möglich. Jedoch konnte *Listeria monocytogenes* im Gegensatz zu den beiden anderen auch unter diesen extremen Bedingungen bei einem  $a_w$ -Wert von 0,85-0,8 bis zum Tag 84 überleben.

#### **Schlussfolgerung**

Die ersten Reifetage sind für das Produkt Rohwurst entscheidend, da hier die stabilisierenden Faktoren wie niedriger  $a_w$ - und

pH-Wert noch nicht ausgeprägt sind. Hier verhinderte Nitrit sehr effektiv ein Wachstum der pathogenen Bakterien. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass höhere Reifetemperaturen von 25 °C den Ergebnissen zu Folge kein mikrobiologisches Risiko darstellen. Sie führen, zum richtigen Zeitpunkt eingesetzt, zu einer vergleichsweise stärkeren Abnahme der Keimdichte der getesteten Zoonoseerreger.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine Zugabe von 100 mg/kg Natriumnitrit völlig ausreichend ist, um eine Vermehrung von *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. in den wichtigsten Rohwurstzeugnissen zu verhindern. Im Gegensatz zu den kurzgereiften streichfähigen, den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwürsten kann in den mit Glucono-delta-lacton hergestellten Produkten auf den Zusatz von Natriumnitrit komplett verzichtet werden. In diesen Produkten war über den gesamten Versuchszeitraum keine Vermehrung der Infektionserreger möglich. *Listeria monocytogenes* erwies sich als ein sehr widerstandsfähiger Keim, der in keinem der getesteten Produkte in der zugesetzten Inokulumhöhe vollständig eliminiert werden konnte. *Listeria monocytogenes* bedarf daher in den Fleischverarbeitenden Betrieben besondere Beachtung.

#### **Literatur**

Rödel W., Scheuer R. (2003a) Beobachtungen zur Beziehung von Redoxpotential und Keimwachstum Teil 1. *Fleischwirtsch.* 83 (8): 98-101

Rödel W., Scheuer R. (2003b) Beobachtungen zur Beziehung von Redoxpotential und Keimwachstum Teil 2. *Fleischwirtsch.* 83 (9): 127-131

