

## Beobachtungen zur Beziehung von Redoxpotential und Keimwachstum (Teil 1)

Findings on the relationship between redoxpotential and bacterial growth (part 1)

W. RÖDEL und R. SCHEUER

### Zusammenfassung

Die Praktikabilität der Hürdentechnologie ist derzeit noch dadurch eingeschränkt, dass kaum geeignete Verfahren zur Verfügung stehen, die Hürden quantitativ und qualitativ genau zu erfassen. Bisher beruht die Hürdentechnologie lediglich auf Erfahrungswerten. Unsere Untersuchungen zur Beziehung zwischen Redoxpotential und Keimwachstum sollen dazu beitragen, die für die mikrobiologische Stabilität von Lebensmitteln relevanten Hürden quantitativ zu erfassen. Im Gegensatz zur klassischen Lebensmittelmikrobiologie, die vor allem eine nachgelagerte Bestimmung von Keimzahlhöhen ermöglicht, erlaubt die Beobachtung von Redoxpotentialverläufen das aktuelle mikrobiologische Geschehen in einem Messsubstrat zu verfolgen. In der vorliegenden Studie wird über den Einfluss verschiedener Hürden auf die Keimvermehrung und die Redoxpotentialverläufe berichtet. Neben einer rein quantitativen Erfassung erlaubt die Beobachtung der Redoxpotentialverläufe auch eine genauere Interpretation der Wirkmechanismen bestimmter Hürden.

### Summary

The practical use of the hurdle technology is at present hampered by the fact that valid procedures to determine hurdles in qualitative and quantitative terms are hardly available. Up to now, the hurdle technology is merely based on experience. It is the aim of our studies on the relationship between redox potential and microbial growth to contribute to a quantitative assessment of hurdles relevant for the microbiological stability of foodstuffs. Whereas the classical food microbiology primarily observes resulting final bacterial counts, the examination of the redox potential and its time course allows to follow actual microbiological processes in a substrate. The present study reports the influence of various hurdles on the microbial growth and time course of the redox potential. The examination of the time course of the redox potential furthermore can provide insight into the action mechanisms of certain hurdles.

---

**Schlüsselwörter** Redoxpotential – Hürdentechnologie – *Escherichia coli* – *Listeria innocua*

**Key Words** redox potential – hurdle technology – *Escherichia coli* – *Listeria innocua*

---

### Einleitung

Dem Lebensmittelhersteller steht ein umfangreiches Instrumentarium von Methoden und technologischen Maßnahmen zur Verfügung, um die mikrobiologische Sicherheit seiner Erzeugnisse zu gewährleisten. Diese Methoden und Maßnahmen werden in der moderneren Terminologie als „Hürden“ bezeichnet (GOULD, 1995; LEISTNER, 1995, 1996). Die Verfahren

sind aber teilweise sehr traditionell. Zu nennen wären: Beachtung von Hygienemaßnahmen, der Wasseraktivitätswert ( $a_w$ -Wert), der Säuregrad (pH-Wert), der Erhitzungsgrad und die Erhitzungsdauer (F-Wert), das Redoxpotential (der Eh-Wert), der Einsatz von Konservierungsmitteln (z. B. Natriumnitrit), der Einsatz einer Konkurrenzflora (z. B. Milchsäurebakterien) sowie die Lagerungstemperatur und -zeit. Daneben gibt es modernere

Verfahren, die aber oft weniger erwünscht oder weniger praktikabel sind, wie die radioaktive Bestrahlung, die Anwendung hoher Drücke, gepulste elektrische Felder oder wechselnde magnetische Felder (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 1998; KNORR, 1998).

Die einzelnen Hürden können sich gegenseitig ergänzen (LEISTNER, 1999). Soll beispielsweise ein Erzeugnis nur in geringerem Umfang erhitzt werden (Verminderung des F-Wertes) kann diese Maßnahme durch eine entsprechend erhöhte Salzzugabe (Verminderung des  $a_w$ -Wertes) kompensiert werden. So ist es möglich durch eine Kombination verschiedener Hürden ein Lebensmittel sicher zu machen, ohne die sensorische Qualität des Lebensmittels ungünstig zu beeinflussen (Hürdentechnologie).

Bisher stehen dem Produzenten dazu aber in der Regel lediglich Erfahrungswerte zur Verfügung. Quantitative Werte über die Höhe der Hürden und deren Bedeutung sowie ein besseres Verständnis des Zusammenwirkens der Hürden miteinander fehlen derzeit in der Praxis noch. Der Hersteller muss mit entsprechenden Sicherheiten arbeiten, um ein Risiko auszuschließen. Lebensmittel werden dadurch häufig in nicht notwendigem Maße konserviert und behandelt.

Unsere Untersuchungen zur Beziehung zwischen Redoxpotential und Keimwachstum sollen dazu beigetragen, die für die mikrobiologische Stabilität von Lebensmitteln relevanten Hürden quantitativ zu erfassen. Im Gegensatz zur klassischen Lebensmittelmikrobiologie, die vor allem eine nachgelagerte Erfassung von Keimzahlhöhen ermöglicht, erlaubt die Beobachtung von Redoxpotentialverläufen, das aktuelle mikrobiologische Geschehen in einem Messsubstrat zu verfolgen. Durch diese zeitnahe und kontinuierliche Messung der mikrobiologischen Vorgänge sind Beobachtungen möglich, die einer klassischen Mikrobiologie verschlossen sind. Aufgrund der hohen Auflösung des Messverfahrens ergeben sich daraus quantifizierende Betrachtungen der ein-

zelnen Hürden sowie Informationen zu deren Wechselwirkung zueinander.

In der vorliegenden Studie wird über den Einfluss verschiedener Hürden auf die Keimvermehrung und die Redoxpotentialverläufe berichtet. Neben einer rein quantitativen Erfassung erlaubt die Beobachtung der Redoxpotentialverläufe auch eine genauere Interpretation der Wirkmechanismen bestimmter Hürden.

## Material und Methoden

**Messanordnung.** Das System zur kontinuierlichen Messung der Redoxpotentiale besteht aus Einstabmessketten (Fa. Schott, Typ SaPt6140) und einer Datenerfassungsanlage (Fa. Ahlborn Mess- und Regeltechnik, Datenlogger<sup>®</sup> ALMEMO 2590-9 V5) zur Aufnahme und Speicherung der Messsignale (s. Abb. 1). Die Redoxelektroden steckten in passgenauen Messröhrchen. Jedes Messröhrchen war mit etwa 4 ml der entsprechend zubereiteten Nährbouillon befüllt. Eine eingehende Beschreibung der Methodik zur Redoxpotentialmessung wurde von uns bereits publiziert (RÖDEL und SCHEUER, 1998, 2003).

Neun Messungen konnten simultan mit einem Messsystem vorgenommen werden. Vier Messsysteme mit insgesamt 36 Redoxelektroden wurden bei unseren Untersuchungen eingesetzt. Die Untersuchungen wurden in Messkammern mit konstant eingestellter Temperatur durchgeführt und waren als Doppelmessungen angelegt.

Vom Messgerät wurden die Redoxsignale an einen PC übermittelt und über eine Software (Fa. akrobit<sup>®</sup> software, AMR WinControl) graphisch weiterverarbeitet.

**Mikrobiologische Methoden.** Einzelne Chargen der Nährbouillon wurden mit *Escherichia coli* Isolaten (Stämme: E 162, E 163, E 164 der Stammsammlung der Bundesanstalt für Fleischforschung) beimpft. Am häufigsten jedoch wurde das *Listeria innocua* Isolat Li 13 der Stammsammlung der Bundesanstalt für Fleischforschung für unsere Untersuchungen eingesetzt. Die

*Escherichia coli* Stämme (*E. coli*) wurden in ein Medium aus Standard-I-Nährbouillon (Merck) überführt. Bei *Listeria innocua* lief die Untersuchung in einem Selektivmedium ab (Fraser-Bouillon und Supplement, Merck).

Zur Keimzählung von *E. coli* und *Listeria innocua* wurde jeweils 1 ml der Nährbouillon entnommen und mit 9 ml physiologischer Kochsalzlösung gut vermischt. Nach Anlegen von Verdünnungsreihen wurden jeweils 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe auf DHL-Agar (Merck) zur Bestimmung der *E. coli* Zahl und auf Palcam-Agar (Oxoid) zur Bestimmung der *L. innocua* Zahl aufgetragen. Der DHL-Agar sowie der Palcam-Agar wurde bei 37 °C für 24 Stunden bebrütet.

**Physikalisch-chemische Parameter.** Der pH-Wert wurde mit einer Einstichelektrode (Fa. Mettler Toledo, Inlab 427) gemessen. Aus den Einzelwerten einer Zweifachmessung wurde der Mittelwert als pH-Wert der Untersuchung festgelegt. Der Wasseraktivitätswert wurde mit einem  $a_w$ -Kryometer AWK-10 (Fa. NAGY) - ebenfalls über Doppelmessung - ermittelt (RÖDEL *et al.*, 1989).

## Ergebnisse

**Aufzeichnung der Rohdaten.** In Abbildung 2 ist die graphische Direkt-Aufzeichnung der Redoxverläufe über mehrere Stunden zu sehen. Der gemessene Millivolt-Wert des Redoxpotentials ist auf der y-Achse und die Messzeit auf der x-Achse angegeben. Mit dieser kontinuierlichen Aufzeichnung der Redoxpotentialverläufe werden gewissermaßen in „Echtzeit“ die Signale aus dem direkten Umfeld der Mikroorganismen aufgenommen. Alle Geschehnisse, die das umgebende Milieu beeinflussen, teilen sich der Redoxelektrode unmittelbar mit. Durch die ständige Teilung der Mikroorganismen verändert sich auch laufend das sie umgebende Milieu in seiner Zusammensetzung und zwar in Abhängigkeit zur Menge und Art der gebildeten Stoffwechselprodukte. Alle hemmenden und begünstigenden Faktoren beeinflussen direkt diese Stoffwech-

selaktivität und damit das Milieu des Bakterienumfeldes.

Kurz nach Verimpfung der Keime wird, abhängig von der Zielsetzung und Fragestellung der Untersuchung, eine Nullstellung der Messwerte aller Elektroden des Versuchs durchgeführt. So werden die Differenzen des mikrobiologischen Geschehens an den einzelnen Elektroden im weiteren Messverlauf klar erkennbar und rein messtechnische Elektrodenabweichungen ausgeglichen. Dieser Wert wird von uns als „Relatives Redoxpotential“ bezeichnet.

**Einfluss der Anfangskeimdicke.** In Abbildung 3 ist der Kurvenverlauf des Redoxpotentials in Abhängigkeit zur Anfangskeimdicke von 1 Million ( $\log=6$ ), von 10000 ( $\log=4$ ) und von 100 ( $\log=2$ ) *E. coli* Keimen pro ml in Standard-I-Bouillon dargestellt. Der Versuch lief über 24 Stunden. Die Temperatur wurde konstant auf 37 °C gehalten.

Der erste Abschnitt der Redoxpotentialkurve, der grundsätzlich die Stoffwechselfvorgänge bzw. die Vermehrung von Mikroorganismen bis zu einer Keimzahlhöhe von etwa 1 bis 10 Millionen Keimen ( $\log=6$  bis  $\log=7$ ) repräsentiert, wird in seiner Länge und Steigung von Einflüssen geprägt, die auch die Keimvermehrung in irgendeiner Form beeinflussen.

Ganz offensichtlich sind erst mehr als 10 Millionen Keime bzw. deren stark reduzierende Stoffwechselprodukte in der Lage, das Redoxpotential um bis zu 700 mV abzusenken (zweiter Abschnitt der Redoxpotentialkurve). Dieser Redoxpotentialabfall kann relativ schnell erfolgen und repräsentiert die Stoffwechselfvorgänge von mehr als 10 Millionen Keimen bis hin zur maximal erreichbaren Keimdicke, im vorliegenden Beispiel von mehr als 1 Milliarde ( $\log=9$ ) Keimen.

Der dritte Abschnitt der Kurve entspricht mehr oder weniger der stationären Phase der Mikroorganismen, die dann in eine Absterbephase übergeht. In diesen beiden Phasen reduziert sich der Stoffwechsel der Keime offensichtlich derart, dass die

Redoxpotentialkurve nicht weiter absinkt, sondern langsam ansteigt.

Die Redoxpotentialkurven zeigen deutliche Unterschiede in Abhängigkeit zur Inokulationsdichte zu Beginn der Messung. Während bei 100 Keimen die Redoxpotentialkurve erst nach 7 Stunden abfällt, kann bei einer Inokulationsdichte von 1 Million Keimen der Abfall des Redoxpotentialwertes bereits nach 3 Stunden festgestellt werden. Die Kurve für 10 000 Keime liegt etwa dazwischen. Dieses Ergebnis ist nicht unerwartet. Bei geringer Keimdichte dauert es in der Regel länger, bis eine entsprechende Keimhöhe erreicht ist und das Redoxpotential in entsprechender Weise beeinflusst werden kann.

Bei *Listeria innocua* zeigt sich ein sehr ähnliches Bild (s. Abb. 4). In Abbildung 4 ist zusätzlich auf der rechten Achse die Keimdichte mit angegeben. An der schwarzen Redoxpotentialkurve für die Anfangskeimdichte von 10 Keimen pro ml ist zu entnehmen, dass erst eine Keimdichte von mehr als  $10^7$  Keimen pro ml eine starke Absenkung des Redoxpotentials auslöst. Diese starke Stoffwechselaktivität der Bakterien zeigt sich in diesem Beispiel erst nach 24 Stunden. Die im 24-Stunden Rhythmus ermittelten Keimzahlhöhen sind im oberen Teil durch die farbigen Punkt-kurven dargestellt. Sie werden durch die farblich entsprechenden Redoxpotentialkurven gut differenziert wiedergegeben.

Unterschiedliche Anfangskeimdichten beeinflussen somit sehr deutlich den Verlauf des Redoxpotentials. Durch die von der Anfangskeimdichte abhängigen Zeit bis zum Erreichen der Keimzahl von etwa 10 Millionen ergibt sich hier ebenfalls eine parallel versetzte Kurvenschar. Durch die unterschiedlichen Keimdichten von  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  und 10 sind die Redoxpotentialkurven bis hin zu 21 Stunden zeitversetzt.

**Einfluss der Temperatur.** Die beiden Redoxpotentialkurven für 37 °C (rot markiert) und für 22 °C (grün markiert) divergieren zu Beginn der Messung bereits um ca. 2 Stunden (s. Abb. 5). Die höchste Keimdichte von  $10^8$  Keimen pro ml wird bei der niedrigeren Temperatur mit einer

zeitlichen Verzögerung von 6 bis 7 Stunden erreicht. Die Kurven zeigen im Verlauf keinen stetigen Abfall, sondern einen deutlichen Einknick mit Plateaubildung. Dieser Kurvenverlauf ist nach unserer Auffassung durch eine Reaktion der Keime auf den starken Redoxpotentialabfall hervorgerufen. Der Einfluss, den das Redoxpotential selbst auf den Verlauf des Redoxpotentials hat, wird weiter unten gesondert beschrieben werden.

Der Redoxpotentialverlauf lässt gut erkennen, wie verringerte Temperaturen die Teilungsgeschwindigkeit der Bakterien herabsetzen und dadurch erst zeitverzögert hohe Keimdichten erreicht werden können.

**Einfluss der Wasseraktivität.** Geht man von einer sehr geringen Bakteriendichte aus, wie im vorliegenden Beispiel von 10 Listerien pro ml (s. Abb. 6), kann der enge Zusammenhang zwischen den Stoffwechselfvorgängen der Bakterien und dem Verlauf des Redoxpotentials demonstriert werden. Die farbigen Strich-Punkt-kurven zeigen die Keimdichten der Listerien in Abhängigkeit zum  $a_w$ -Wert des Nährsubstrates, die übrigen Kurven farbzugeordnet die jeweiligen Redoxpotentiale. Anhand von Abbildung 6 wird der enge Zusammenhang von Bakterienwachstum und dem messbaren Redoxsignal besonders deutlich. Ein Wasseraktivitätswert von 0,942 führt zu einer völligen Wachstumsblockade von *Listeria innocua* innerhalb der beobachteten drei Versuchstage. Die vollständige Stagnation der Keimzahlhöhe (die schwarze Punkt-Strichlinie am unteren Rand der Abbildung) ist auch an dem unverändert waagerechten Verlauf der Redoxpotentialkurve (die schwarze durchgezogene Kurve) zu erkennen.

Vergleicht man den Verlauf der rot markierten Redoxkurven mit der grün markierten Redoxkurve (Abb. 6), so geht daraus hervor, dass eine  $a_w$ -Reduzierung von 0,98 auf 0,97 eine Verschiebung des Kurvenverlaufes um ca. 7 Stunden hervorruft, reduziert man auf einen  $a_w$  0,955, das wäre die blau markierte Redoxkurve, sogar um mehr als 28 Stunden. Es wird auch an diesem Beispiel deutlich, dass mit einer

Redoxmessung, auch ohne eine Keimzählung, die sehr genaue quantitative Erfassung der Hürde Wasseraktivität möglich ist. Die Redoxmessung gibt nicht nur eine zeitnahe Erfassung der mikrobiologischen Geschehnisse wieder. Sie stellt auch eine der Keimzahlmessung zumindest ebenbürtige Methode dar, Hürden in einem Nährmedium exakt quantitativ zu bestimmen.

Im letzten Diagramm wurden die elektrischen Signale ausgehend von etwa 10 Listerien pro ml Bouillon verfolgt. In Abbildung 7 handelt es sich nun um die Aufzeichnung der Signale von Listerien, ausgehend von etwas weniger als 4 Millionen Keimen. Aus dieser Untersuchung ergeben sich folgende bemerkenswerte Beobachtungen: Aus der Grafik ist zu erkennen, dass bei dieser Keimdichte alle messbaren Vorgänge, verglichen mit denen bei geringeren Keimzahlen (Abb. 6), in viel kürzerer Zeit auftreten und dass bei dieser hohen Ausgangs-Keimdichte die Wachstums-Blockade bedingt durch die  $a_w$ -Hürde von 0,942 bereits schon nach etwa 13 Stunden überwunden wird. Dies zeigen sowohl die gemessenen elektrischen Signale als auch die ermittelten Keimdichten. Innerhalb von 24 Stunden haben die Listerien von 4,4 Millionen auf etwa 10 Millionen Keime zugenommen.

Diese letztgenannte Beobachtung ist deshalb recht interessant, da ganz offensichtlich die Effektivität einer Hürde auch von der Ausgangskeimdichte abhängig ist. Hürden stellen somit keine fixierten Grenzen für das Wachstum einer Keimart dar und sind streng genommen erst definiert durch die Angabe der Ausgangskeimdichte.

**Einfluss des Säuregrades.** Bei einem pH-Wert von 7,0 sinkt das Redoxpotential (s. in Abb. 8 die rote Kurve) in einer Nährbouillon bei einer Anfangskeimdichte von  $\log=6,8$  nach einer 3-stündigen Anpassungsphase innerhalb der nächsten 6 Stunden um mehr als 500 mV auf einen minimalen Redoxpotentialwert ab, der aus

der Stoffwechselaktivität einer maximalen Endkeimzahl von fast 1 Milliarde Listerien pro ml resultiert.

Wird der pH-Wert bei sonst gleichen Bedingungen auf 6,0 abgesenkt, verlängert sich die Adaptierungsphase von 3 auf ca. 4 Stunden. Diese Verzögerung wird aber offensichtlich durch einen zusätzlichen Vermehrungsschub kompensiert (in der Abb. 8 mit einem Pfeil markiert), so dass fast gleichzeitig mit der Kurve für pH 7,0 das Minimum der jeweiligen Redoxkurve durchlaufen wird. Es entspricht einer Keimdichte etwa 560 Millionen Keimen ( $\log=8,75$ ).

Auch hier ist wieder eine Plateaubildung innerhalb des starken Abfalls vor allem bei der Redoxpotentialkurve ( $\text{pH}=6,0$ ) zu beobachten. Die pH-Senkung um eine Einheit führt somit zu deutlich veränderten Potentialverläufen. Beobachtungen derartiger Abstufungen würden mit Keimzählungen nur schwer interpretierbar sein. Auch in der Abschätzung der pH-Wert-Hürde zeigt die Potentialmessung einen deutlichen Vorteil gegenüber einer klassischen Keimzahlmessung.

Im Vergleich dazu wird, wie in Abbildung 9 gezeigt, die Adaptierungsphase um etwa 2 bzw. 3 Stunden verlängert, wenn eine zusätzliche Hürde, wie im vorliegenden Fall ein  $a_w$ -Wert von 0,953, hinzukommt. Ansonsten laufen beide Redoxkurven grundsätzlich ähnlich wie in Abbildung 8, jedoch viel flacher. Die Endkeimzahl ist nun um eine Zehnerpotenz verringert. Die Differenz zwischen beiden Kurvenverläufen aufgrund des pH-Unterschiedes ist deutlich erkennbar.

Die Kombination des pH-Einflusses mit einer zusätzlichen Hürde, wie z. B. die Wasseraktivität, verringert im Resultat, verglichen mit der ursprünglichen Wasseraktivität von 0,979, die Keimdichte innerhalb von 24 Stunden für beide geprüften pH-Werte um 500 bis 800 Millionen Keime.

(wird fortgesetzt)

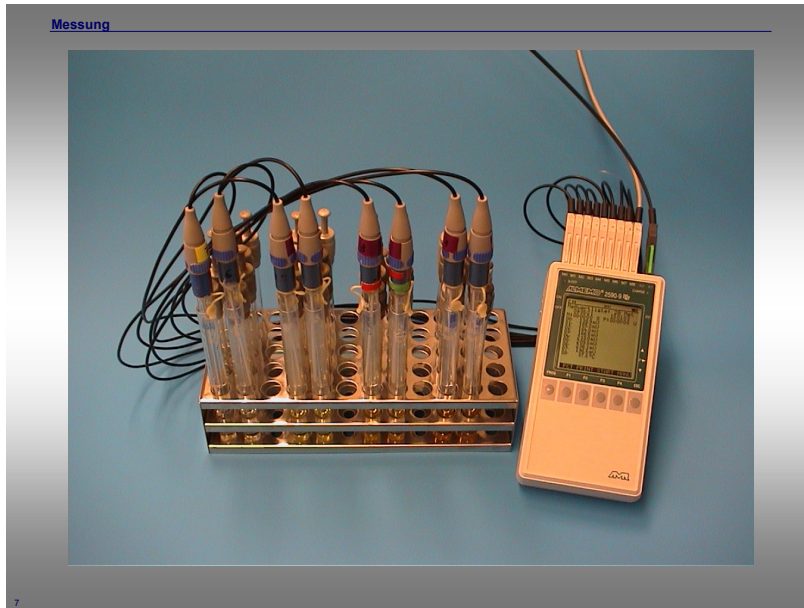


Abb. 1: Messanordnung zur Erfassung der Redoxpotentialwerte

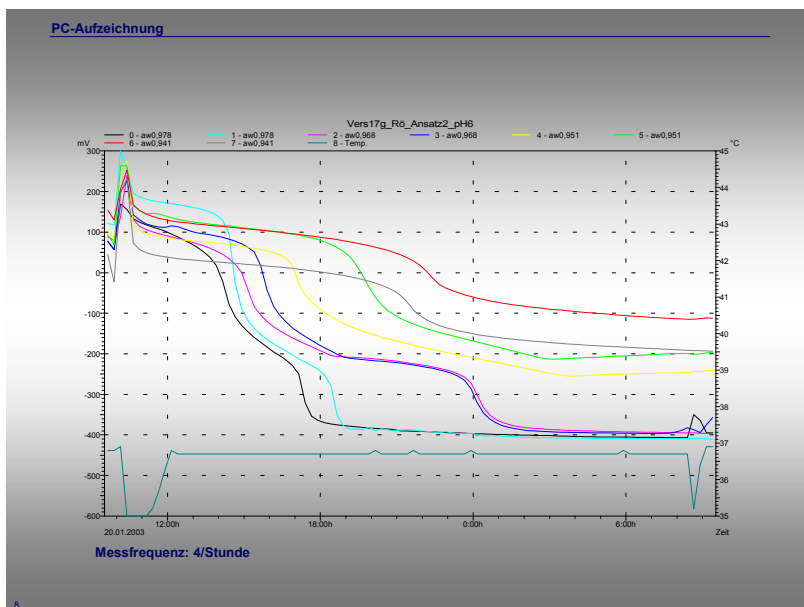


Abb. 2: Aufzeichnung der rohen Messdaten

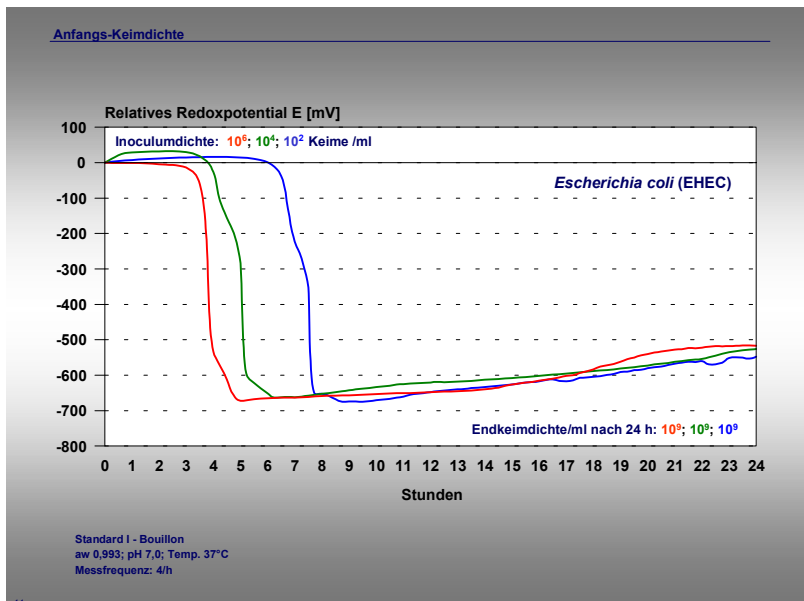


Abb. 3: Einfluss der Anfangskeim-  
dichte von *Escherichia coli*  
auf die Redoxpotential-  
verläufe

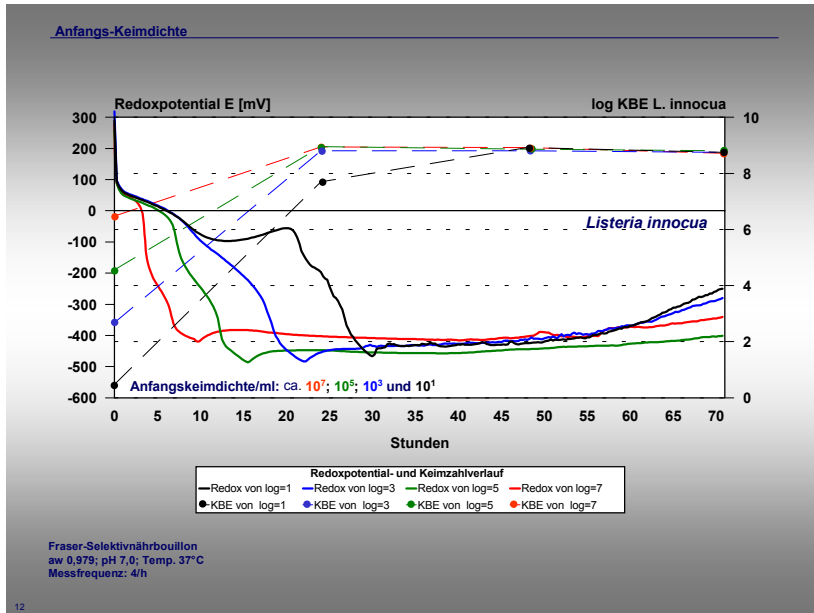


Abb. 4: Einfluss der Anfangskeimichte von *Listeria innocua* auf die Redoxpotentialverläufe

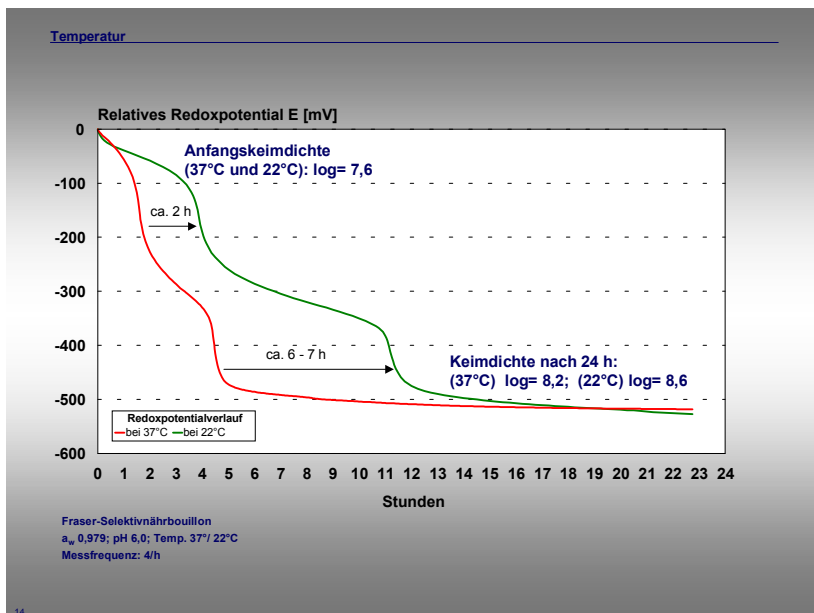


Abb. 5: Einfluss der Temperatur auf die Redoxpotentialverläufe

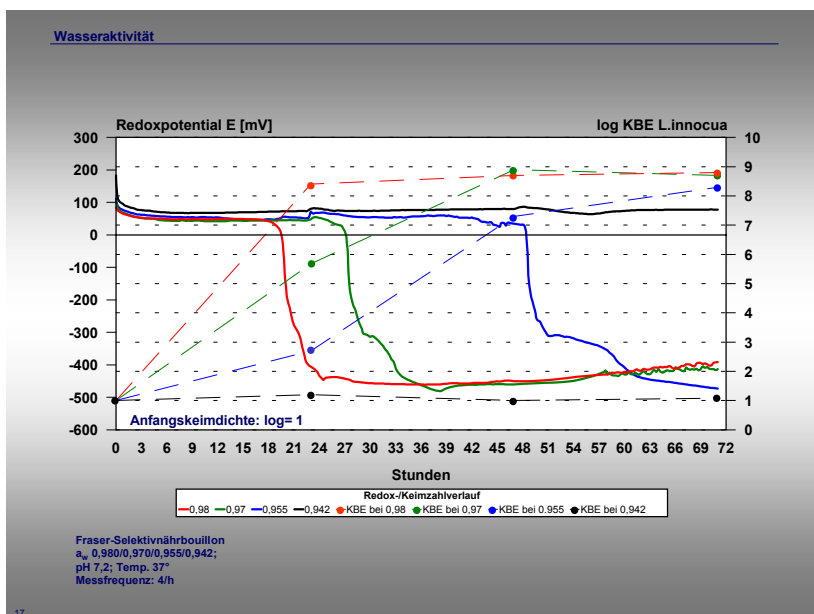


Abb. 6: Einfluss der Wasseraktivität auf die Redoxpotentialverläufe bei niedrigen Keimzahlen

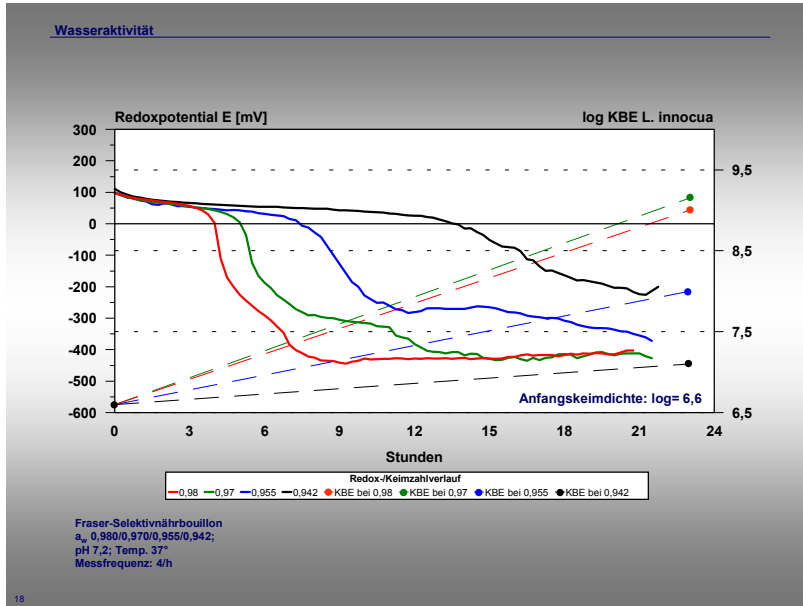


Abb. 7: Einfluss der Wasseraktivität auf die Redoxpotentialverläufe bei hohen Keimzahlen

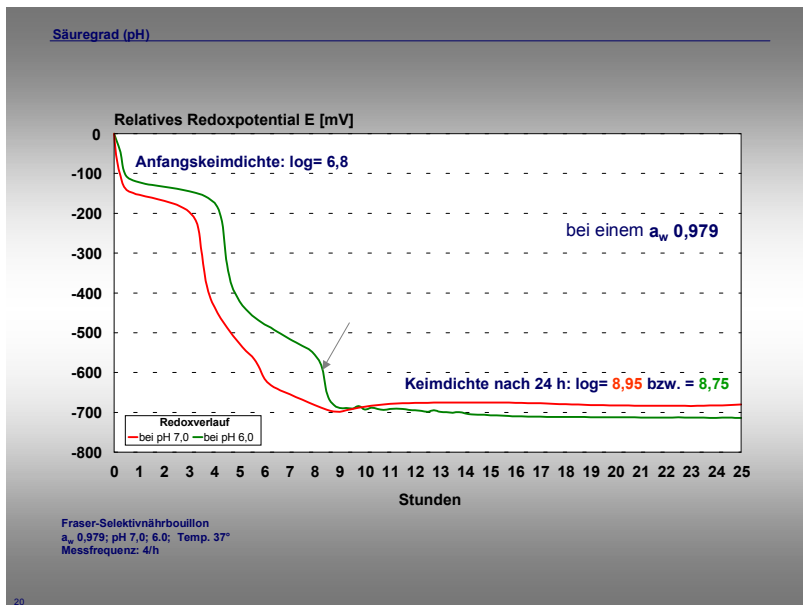


Abb. 8: Einfluss des pH-Wertes auf die Redoxpotentialverläufe bei  $a_w = 0,979$

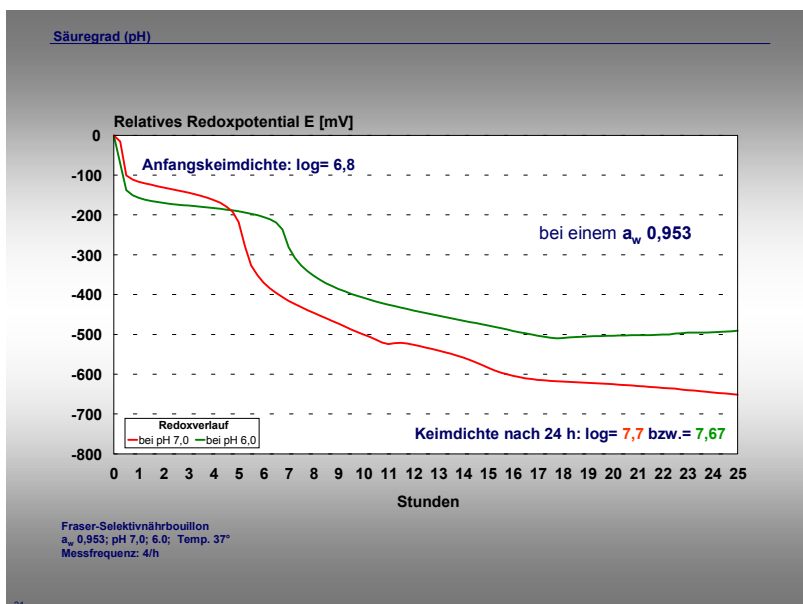


Abb. 9: Einfluss des pH-Wertes auf die Redoxpotentialverläufe bei  $a_w = 0,953$