

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Psychrotrophe Fleischmikroflora

2.1.1 Begriffsklärung

2.1.1.1 Psychrotrophe Mikroorganismen

Zu den Autoren, die zuerst den Begriff "psychrophil" benutzten, gehörte SCHMIDT-NIELSEN (1902), welcher Bakterien als Psychrophile definierte, die nicht nur in der Lage waren, bei 0°C zu überleben, sondern auch sich bei dieser Temperatur zu vermehren. Von MÜLLER (1903) wurde bereits ein Jahr später angemerkt, daß solche Bakterien nicht grundsätzlich als psychrophil bezeichnet werden können, da bei vielen die optimale Wachstumstemperatur zwischen 20 und 30°C liegt. Damit handelt es sich um "mesophile" Bakterien, die auch in der Lage sind, sich bei niedrigen Temperaturen zu vermehren. Diese Keime sollten nach KRUSE (1910), wie in seinem Lehrbuch der Allgemeinen Mikrobiologie vermerkt, als "Psychrotolerante" bezeichnet werden. Dagegen schlug INGRAHAM (1958) vor, daß psychrophile Bakterien nicht nach ihrer Maximum- oder Optimaltemperatur definiert werden sollten, sondern danach, ob sie bei 0°C schnell "wachsen", darunter ist die Vermehrung zu verstehen. Der Begriff "schnell" umschrieb das Wachstum innerhalb von 1 oder 2 Wochen. INGRAHAM und STOKES (1959) bemängelten, daß oft unzureichende Angaben zur Generationsdauer der Bakterienvermehrung gemacht wurden, wenn als Wachstumsoptimum "unter 20°C" vermerkt wurde. Diese Angabe allein läßt keinen Rückschluß zu, ob die Wachstumsgeschwindigkeit bei niedriger Temperatur ein Optimum aufweist. So gingen sie auf die ursprüngliche Definition zurück, nach der "Psychrophile" ohne Rücksicht auf das Optimum durch Wachstum bei 0°C innerhalb von 14 Tagen zu charakterisieren seien. Wachstum bedeutet dabei: mit bloßem Auge sichtbare Kolonien auf festen Nährböden oder Trübung des flüssigen Nährmediums.

Der Begriff "psychrotroph", ein von MOSSEL und ZWART (1960) vorgeschlagener Terminus, wurde von EDDY (1960) solchen Bakterien zugeordnet, welche bei +5°C und niedrigeren Temperaturen wachsen können, unabhängig davon, welches Temperaturoptimum sie aufweisen. Er behielt den Begriff "psychrophil" für solche Bakterien bei, die ihr Temperaturoptimum bei niedrigen Temperaturen besitzen und eine maximale Wachstumstemperatur von weniger als 35°C besitzen. So besteht die Möglichkeit der Kombination der Begriffe in der Form, daß z.B. mesophile Arten, die ein Wachstumsminimum bei 5°C und weniger aufweisen, als psychrotrophe mesophile Keime bezeichnet werden. Eine weitere Differenzierung innerhalb der Gruppe der "Psychrophilen" nahm STOKES (1963) vor. Keime, die bei einem Wachstumsminimum von 0°C ein Wachstumsoptimum von unter 20°C aufweisen, sollten als "obligat Psychrophile", Keime mit einem höher liegenden Optimum als "fakultativ Psychrophile" bezeichnet werden. Gegen diese Einteilung sprach sich INGRAM (1965) aus.

Aus der Darstellung (Abb. 1) von KANDLER (1966) können die Wachstumseigenschaften von Mikroorganismen, eingeteilt nach Wachstumsoptima (-phil) und Grenztemperaturen (-troph), entnommen werden. Danach haben "Psychrophile" ein Wachstumsoptimum zwischen 8 und 20°C, "Mesophile" zwischen 20 und 40°C sowie "Thermophile" zwischen 40 und 55°C. Allgemein lassen sich extreme Abweichungen der Minimal- und Maximaltemperaturen vom Wachstumsoptimum durch den Zusatz "-troph" charakterisieren. COUSIN et al. (1992) haben dann solche Mikroorganismen als "Psychrotrophe" bezeichnet, welche unabhängig vom Wachstumsoptimum ein sichtbares Wachstum bei $7 \pm 1^\circ\text{C}$ innerhalb von 7 bis 10 Tagen zeigen.

JAY (1987) schlug zwei Erweiterungen des Begriffs "psychrotroph" vor, um zwischen psychrotrophen Bakterien zu unterscheiden, die einen weiteren oder engeren Temperaturwachstumsbereich besitzen. Erstere sollten als "eurypsychrotroph" bezeichnet werden und durch ein langsames Wachstum bei 7°C sowie der Fähigkeit, bei 40°C zu wachsen, gekennzeichnet sein. "Stenopsychrotrophe" Bakterien sollten dagegen in der Lage sein, bei 7°C schnell zu wachsen, jedoch nicht bei 40°C.

In der Literatur werden die Begriffe psychrotolerant, psychrotroph und psychrophil zum Teil synonym verwendet. Da sie bislang nicht eindeutig definiert sind, werden sie z.T. mißverständlich benutzt.

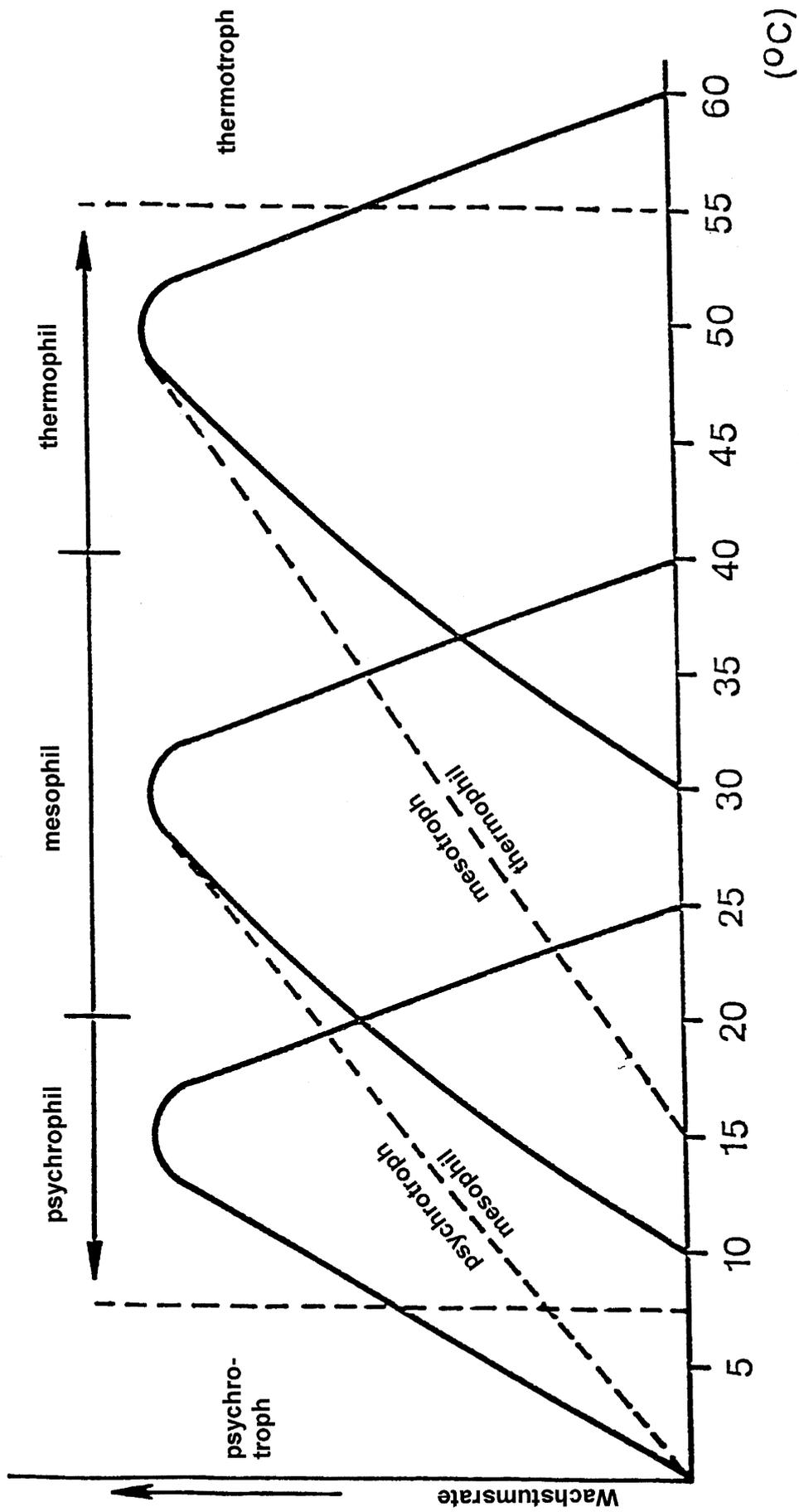


Abb. 1: Einteilung der Mikroorganismen nach Wachstumsoptima (-phil) und unteren und oberen Wachstumsgrenzttemperaturen (-troph) (nach KANDLER, 1966, modifiziert von REUTER, 1999)

In dieser Arbeit wird der Begriff "Psychrotrophe" für solche Mikroorganismen verwendet, welche sich unterhalb von +5°C vermehren können und ihr Wachstumsoptimum zwischen 20 bis 30°C besitzen (Tab. 1). Im übrigen wird der von KANDLER (1966) und REUTER (1999) propagierte Kombinationsmöglichkeit nachgegangen, ohne die in Tab. 1 vorgeschlagene Einteilung zu ignorieren.

Tab. 1: Gruppen von Mikroorganismen auf der Grundlage ihrer ungefähren Kardinaltemperaturen (ICMSF, 1980; FEHLHABER und JANETSCHKE, 1992; MOSSEL et al., 1995; KRÄMER, 1997)

Keimgruppe	Temperatur (°C)		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophile	-10 bis 5	10 bis 15	15 bis 20
Psychrotrophe	-5 bis 5	20 bis 30	30 bis 35
Mesophile	5 bis 10	30 bis 45	35 bis 47
Thermophile	25 bis 45	50 bis 80	60 bis 85

2.1.1.2 Definition und Rechtgrundlagen für Hackfleisch

Nach Deutschem Lebensmittelbuch (1994) ist unter Hackfleisch (in Österreich "Faschiertes") eine Vielzahl gewolfter oder ähnlich zerkleinerter Fleischerzeugnisse zu verstehen. Hierzu zählen unter anderem:

- Schabefleisch (Leitsatz 2.507.13): sehnen- und fettgewebsarmes Rindfleisch;
- Rindergehacktes (Leitsatz 2.507.21): grob entsehntes Rindfleisch;
- Schweinegehacktes (Leitsatz 2.507.22): grob entfettetes Schweinefleisch;
- Gemischtes Hackfleisch (Leitsatz 2.507.23): grob entfettetes Schweinefleisch, grob entsehntes Rindfleisch.

Grundlage für die Herstellung und das Inverkehrbringen von Hackfleisch sind zwei verschiedene Rechtsnormen.

Handwerksbetriebe, darunter fallen Fleischereien und Fleischabteilungen von Supermärkten, in denen Hackfleisch selbst produziert wird ("handwerklich" hergestelltes Hackfleisch) unterliegen der nationalen Hackfleisch-Verordnung (HFIV, 1976). In ihr ist unter anderem festgelegt, daß das frisch hergestellte Hackfleisch strikt bei 4°C gelagert und noch am Herstellungstag an den Verbraucher abgegeben werden muß, bei alsbaldiger Abgabe ist eine kurzfristige Lagerung bei 7°C erlaubt. Vorschriften zur mikrobiologischen Untersuchung sind nicht vorhanden.

EU-zugelassene Betriebe unterliegen den Rechtsvorgaben der seit dem 01.01.1996 in Kraft getretenen EU-Richtlinie 94/65/EG (Hackfleisch-Richtlinie, HFI-RL), wie sie in der Fleischhygiene-Verordnung (FIHV) vom 21.05.1997 umgesetzt wurde. Darin finden sich in Anlage 2a unter anderem besondere Forderungen an Raumausstattung, Personalhygiene sowie mikrobiologische Kriterien, die als Grundlage für betriebsinterne und amtliche Kontrollen dienen. Auf allen Stufen der Herstellung, Verteilung sowie im Verkaufsbereich muß die Umgebungstemperatur von 2°C eingehalten werden. Auf der Endverbraucherpackung ist gemäß Lebensmittel-Kennzeichnungsverordnung (LMKV, 1999) die Temperatur von 2°C anzugeben. Gemäß der HFI-RL ist bei frischen Hackfleischerzeugnissen das Verfallsdatum, bei tiefgekühlten des Mindesthaltbarkeitsdatum anzugeben. Dies bedeutet, daß ein EU-zugelassener Betrieb die Haltbarkeitsfristen seiner Hackfleischerzeugnisse, die in Endverbraucherpackungen abgegeben werden, selbst festsetzen kann (BÜLTE, 1996). Dieses ergibt sich auch aus § 5 (1a) der HFIV.

In der vorliegenden Arbeit wird für das in einem EU-zugelassenen Betrieb hergestellte Hackfleisch der Begriff "industriell" verwendet, um deutlich zu machen, daß dieses Lebensmittel unter den strengen Auflagen der Anlage 2a FIHV (2001) gewonnen wurde.

2.1.2 Herkunft und Wachstum der psychrotrophen Hackfleischmikroflora

2.1.2.1 Einflußfaktoren auf das Bakterienwachstum

Die Vermehrung von Mikroorganismen wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, welche in folgende Gruppen eingeteilt werden können (MOSSEL, 1979; GIBBS et al., 1982; NYCHAS und DROSINOS, 2000):

- **intrinsic factors:** Eigenschaften, die dem Lebensmittel innewohnen, z.B. Nährstoffangebot, Zerkleinerungsgrad, a_w , pH- und Eh-Wert, Vorhandensein antimikrobieller Bestandteile oder struktureller Hindernisse;
- **extrinsic factors:** äußere Einflüsse: z.B. Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Zusammensetzung der Gasatmosphäre;
- **implicit factors:** bakterielle Eigenschaften, z.B. die Interaktionen (Synergismen und Antagonismen) der Mikroflora bei der Konkurrenz um Nährstoffe sowie spezifische Wachstumseigentümlichkeiten (Grenzen der Wachstumsrate);
- **processing factors:** lebensmitteltechnologische Verfahren, die Einfluß auf die Mikroflora haben.

An dieser Stelle soll nur auf Einflußfaktoren gesondert eingegangen werden, die für die Bakterien im Fleisch eine besondere Rolle spielen. Der **a_w -Wert** ist ein Maß für das frei verfügbare Wasser (Wasseraktivität). Je höher der a_w -Wert ist, um so mehr Wasser steht den Mikroorganismen zur Verfügung und um so besser sind ihre Vermehrungsbedingungen. Frisches Fleisch weist einen Wert zwischen 0,995 und 0,985 auf und bietet daher gute Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen (LEISTNER und WIRTH, 1972; REUTER, 1999).

Der **pH-Wert** stellt einen weiteren wichtigen Faktor für das mikrobielle Wachstum dar. Im allgemeinen befindet sich der optimale pH-Wert für lebensmittelverderbende und pathogene Mikroorganismen im Neutralbereich (SINELL, 1985a). Ein pH-Wert von 4,5 stellt etwa die untere Grenze der Vermehrungsfähigkeit von mit Fleisch assoziierten Mikroorganismen dar (REUTER, 1999). Fleisch erreicht nach der pH-Wert-Absenkung aufgrund der postmortalen Glykolyse einen End-pH-Wert von etwa 5,6 beim Rind und 5,4 beim Schwein. Kommt es aufgrund von Streß und körperlicher Anstrengung vor der Schlachtung zur Glykogenerniedrigung, so liegt der End-pH-

Wert des Fleisches relativ hoch (DFD-Fleisch: dark, firm and dry). Dieses Fleisch weist bessere Wachstumsbedingungen für Bakterien auf als normales Fleisch.

Das Redoxpotential (**Eh-Wert**) des umgebenden Mediums beeinflusst außerdem das Wachstum der Mikroorganismen und wird vorwiegend durch die Anwesenheit von Sauerstoff bestimmt (LEISTNER, 1981; WOLTERING, 1990). Aerobe Mikroorganismen, benötigen zur Gewinnung von Energie durch Abbau organischer Substanzen Sauerstoff (MÜLLER, 1996). Obligate Anaerobier, z.B. *Clostridium* spp., sind in Anwesenheit von Sauerstoff nicht lebensfähig, fakultative Anaerobier dagegen sind in der Lage, sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen zu vermehren, hierzu gehören z.B. die Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* (MÜLLER, 1996). Als mikroaerophile Mikroorganismen werden solche bezeichnet, die sich bei erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck der Atmosphäre besser entwickeln als bei normalem (MÜLLER, 1996), wie z.B. die Laktobazillen (REUTER, 1970b).

Durch Änderung der **Zusammensetzung der Gasatmosphäre** bei der Verpackung von Fleisch werden die Anteile der Mikroflora in eine bestimmte Richtung gedrängt. Wird das Fleisch unter Vakuum verpackt, so sind aerobe Verderbniserreger, wie z.B. die Pseudomonaden, nicht in der Lage, sich zu vermehren. Das gleiche Prinzip macht man sich bei dem "modified atmosphere packaging" (MAP) zunutze, wo neben Stickstoff Kohlendioxid als bakterizid wirkendes Gas eingesetzt wird.

Die **Temperatur** ist der wichtigste Einflußfaktor auf das Wachstum von Mikroorganismen (JACKSON et al., 1997). Drei Kardinaltemperaturen kennzeichnen die Lebensfunktionen: Minimum, Optimum und Maximum. Als Vermehrungsbereich wird der Temperaturbereich zwischen unterer und oberer Wachstumsgrenze bezeichnet. Ein großer Teil der Verderbniserreger und Lebensmittelvergifter gehört zu den psychrotrophen, mesophilen Mikroorganismen (GILL und NEWTON, 1978; BÜLTE, 1983; REUTER, 1986b und 1990), d.h., sie sind in der Lage, sich bei den Lagerungstemperaturen des Fleisches (2 bis 4°C) zu vermehren. Es gibt einige Theorien, die die Mechanismen des Wachstums von psychrotrophen Bakterien zu charakterisieren versuchen. Sie konzentrieren sich auf das Vorhandensein von ungesättigten Fettsäuren in der Zellmembran, Konformationsänderungen in den ribosomalen Proteinen und Regulationsenzymen, alternativer Substrataufnahme und Zellpermeabilität (MORITA, 1975; HERBERT, 1981; REICHARDT und MORITA, 1982; STANNARD, 1985; BERRY und FOEGEDING, 1997).

Tab. 2: Wachstumskriterien der Mikroflora in Fleisch und Fleischwaren (modifiziert nach REUTER, 1999)

		Minimalwerte		
	Gruppe/Spezies	T (°C)	pH	a _w
V	Bazillen, thermophil ¹	45/15	5,2	0,93
P	<i>Campylobacter</i> spp.	30	5,9	
V	Bazillen, mesophil	20/ 5	4,6/4,2	0,90
P	<i>Bac. cereus</i>	12/ 7	4,9	0,91
	Clostridien, mesophil ²	20/10	4,6	0,94
P, V	<i>Cl. perfringens</i> ²	15/12	5,0	0,93
P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9,0	5,0	0,95
10 °C >				
P; V	<i>Escherichia/Proteus</i>	7,0	4,4	0,95
P	<i>Staph. aureus</i>	6,7	4,5	0,86/0,83
P; V	<i>Salmonella/Citrobacter</i>	7,0/5,2	4,5	0,95
V	<i>Enterococcus</i>	5,0	4,5	0,94
V	<i>Micrococcus</i>	5,0	5,6	0,90
V	<i>Bacillus</i> spp. ³	5,0		
4 °C >				
P	<i>Clostridium botulinum</i> E, B ³ , F ^{3 4}	3,0	5,0/4,7	0,97
V	<i>Micrococcus</i>	2,0	5,6	0,93/0,86
V	<i>Lactobacillus/Leuconostoc</i> ⁵	2	3,0/4,5	0,90/0,94
V	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0	5,0/6,0 ²	0,94
V	<i>Enterobacter/Hafnia/Klebsiella</i>	0	4,0	0,95
P	<i>Listeria monocytogenes</i>	0-0,4	4,4	0,92
P	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	5,5	0,98
0 °C >				
P	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-2,0	4,5/5,8 ²	0,96
V	<i>Pseudomonas</i> }			
V	<i>Acinetobacter</i> }	-5,0	5,3	0,98/0,95
V	<i>Flavobacterium</i> }			
V	Hefen	-12,0	1,5/2,3	0,92/0,62
V	Schimmel	-5,0/-18,0	1,5/2,0	0,94/0,61

V: Verderbniserreger

P: pathogene Mikroorganismen

¹: B. stearothermophilus

²: anaerob

³: einige Stämme

⁴: nicht proteolytisch

⁵: mikroaerophil

Das Lebensmittel Fleisch, d.h. die Muskulatur verschiedener Tierarten, stellt aufgrund seiner Zusammensetzung (etwa 75% Wasser, 19% Eiweiß, 2,5% Fett, 1,2% Kohlenhydrate, 1,65% Reststickstoff und 0,65% Asche; JACKSON et al., 1997; REUTER, 1999) ein optimales Medium zum Wachstum von Mikroorganismen dar. Die verschiedenen Verarbeitungsstufen des Fleisches nach dem Schlachtprozeß verändern die Einflußfaktoren und damit auch die Vermehrungsbedingungen der Mikroorganismen, so daß sich die Flora in einem ständigen Wandel befindet. Die Wachstumskriterien der in Fleisch und Fleischwaren vertretenen Mikrofloraanteile sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

2.1.2.2 Mikrobielle Kontamination

Psychrotrophe Bakterien kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Sie finden sich vor allem im Erdboden und in den freien Gewässern der gemäßigten und kalten Zonen (STOKES und REDMOND, 1966; DRUCE und THOMAS, 1970). In großen Mengen sind sie in Futtermitteln (DRUCE und THOMAS, 1970) sowie an und in der Umgebung der Schlachttiere nachzuweisen (LOTT, 1970).

Bei der mikrobiellen Kontamination kann zwischen zwei Formen unterschieden werden, nämlich primärer (endogener), welche intra vitam stattfindet, und sekundärer (exogener), welche sich als Folge des Schlachttier- und Bearbeitungsprozesses intra oder post mortem ereignet (SCHÜPPEL et al., 1994).

Die Muskulatur gesunder Tiere wird von verschiedenen Autoren als keimfrei (NOTTINGHAM, 1982; MOSSEL et al., 1995; ICMSF, 1998; REUTER, 1999), bzw. keimarm (GILL und NEWTON, 1978; SCHÜPPEL et al., 1994; BEZIRTZOGLU et al., 2000) angesehen. Eine **endogene Kontamination** kann auftreten, wenn die Tiere vor der Schlachtung Streßbedingungen (Transport u.a.) oder einer Infektion ausgesetzt sind und es bereits vor dem Schlachten zu einem Durchbrechen der Darm-Leber-Schranke kommt, so daß die Mikroorganismen in den großen Körperkreislauf gelangen und tiefere Gewebe besiedeln (SMULDERS und VAN LAACK, 1992; SCHÜPPEL et al., 1994; REUTER, 1999). Zur **exogenen Kontamination** kann es kommen, wenn das Fleisch bei der Gewinnung und Verarbeitung etlichen technologischen Behandlungs- und Bearbeitungsstufen unterzogen wird. Ein zunächst entstehender

Oberflächenkeimgehalt ist unvermeidbar (GIBBS et al., 1982; REUTER, 1986b; SNIJDERS, 1988a; KASPROWIAK und HECHELMANN, 1990; SKOVGAARD, 1996) und prägt den später durch die Bearbeitungsschritte entstehenden Tiefenkeimgehalt des Fleisches (REUTER, 1999).

Die Mikroflora auf frisch gewonnenen Schlachttierkörpern wird einerseits von der originären, "autochthonen" Mikroflora der lebenden Tiere (Mikroorganismen z.B. von der Haut, dem Kot), welche von diesen frisch in den Schlachtprozeß eingebracht wurde, andererseits durch die Mikroflora der Betriebe, d.h. die in den Räumen und Einrichtungen vorhandene Mikroflora, einschließlich der Körperflora des Personals bestimmt (NEWTON et al., 1978; GRAU, 1986; REUTER, 1994 und 1999; BEZIRTZOGLU et al., 2000). Die Oberflächenbelastung des Tierkörpers mit Mikroorganismen (mesophile Gesamtkeimzahl) kann nach der Schlachtung zwischen $2 \log_{10}$ (lg) und $4 \lg$, z.T. auch $5 \lg$ Kolonie-bildende-Einheiten (KbE) pro cm^2 Hautoberfläche betragen (FRIES und LENZ, 1984; WOLTERING, 1990; GUSTAVSSON und BORCH, 1993; UPMANN, 1996; REUTER, 1986b und 1999; GILL et al., 2000). Während der Schlachtung ist an verschiedenen kritischen Punkten ("Critical Control Point": CCP) eine erhöhte Kontamination durch Verderbnis- und pathogene Erreger möglich. Bei Schlachttierkörpern von Rindern und Schafen ist aufgrund einer geringeren Anzahl von CCP's während der Schlachtung die Belastung im allgemeinen geringer als bei Schweinen und Geflügel (KASPROWIAK und HECHELMANN, 1990; GILL et al., 1998). Unzureichende Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen der Einrichtungs- und Bearbeitungsgegenstände führen zu einer verstärkten Kontamination des Fleisches mit der betriebseigenen Flora (SCHMIDT-LORENZ und SPILLMANN, 1988). So stellt REUTER (1986b) z.B. das fehlende Geräteentkeimen bei Arbeitspausen als einen besonderen Risikofaktor heraus. Andere Schwachstellen sind schwer zu reinigende Maschinen sowie das unhygienische Verhalten des Personals (KASPROWIAK und HECHELMANN, 1990; UPMANN et al., 2000b). Die Möglichkeit der Kontamination über die Luft ("airborne contamination") kann in Bereichen des fleischgewinnenden und – verarbeitenden Betriebes als gering eingeschätzt werden (GIBBS et al., 1982; NOTTINGHAM, 1982; EISEL et al., 1997).

Die technologischen Weiterbehandlungen (Abkühlungs-, Aufbewahrungs-, Verpackungs-, Lager- und Transportbedingungen) können die Milieubedingungen im

Fleisch stark verändern und so die Zusammensetzung der Mikroflora beeinflussen (REUTER, 1972a). Bei der Hackfleischherstellung ist die Gefahr der mikrobiellen Kontamination mit Verderbniserregern und pathogenen Bakterien aus der Umgebung und durch das Personal aufgrund der Oberflächenvergrößerung besonders groß. Außerdem werden bei dem Zerkleinerungsprozeß natürliche mikrobiologische Barrieren, wie Sehnen und Faszien, zerstört. Erheblichen Einfluß auf die mikrobiologische Beschaffenheit des Hackfleisches hat die mikrobiologische Qualität des Ausgangsmaterials (KLEIN und LOUWERS, 1994; EISEL et al., 1997; REUTER, 1999; HILDEBRAND et al., 2001). Liegt keimarmes Ausgangsmaterial vor, so bleibt die Mikroflora die ersten beiden Tage nach der Herstellung in einem niedrigen Bereich, die strikte Kühllagerung unterhalb von 4°C vorausgesetzt (KLEIN und LOUWERS, 1994).

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben über die zu erwartenden Keimzahlen bei Hackfleisch und ähnlichen Produkten (Hackfleischzubereitungen). Stärkere Schwankungen der Keimzahlen treten aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmaterialien auf. Es muß unterschieden werden zwischen "industriell" hergestelltem Hackfleisch nach Anlage 2a der Fleischhygiene-Verordnung (FLHV, 2001), welches in EU-zugelassenen Betrieben gewonnen wurde, und nach Hackfleisch-Verordnung (HFLV, 1976) in einem Verkaufsbetrieb direkt hergestelltem Hackfleisch, welches unverpackt "frisch" direkt von der Theke abgegeben wurde. KLEIN und LOUWERS (1994) sowie HILDEBRANDT et al. (2001) stellten fest, daß Hackfleisch aus "industrieller" Produktion von guter mikrobiologischer Qualität ist und ein deutlicher Zusammenhang zwischen Betriebsform und mikrobiologischer Beschaffenheit des Hackfleisches besteht.

Die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl (GKZ) in Hackfleisch kann sich allerdings in Größenordnungen von etwa 4,0 lg KbE/g bis 5,7 lg KbE/g, in Extremfällen sogar bis zu 7,0 lg KbE/g bewegen (TEUFEL et al., 1982; NORTJE et al., 1990a; REUTER, 1990 und 1994; KLEIN und LOUWERS, 1994; KÖPKE und REUTER, 1995; SCHALCH et al., 1996; HILDEBRAND et al., 2001). Das hängt von den vielen bereits genannten Einflußfaktoren ab.

Angaben zu Quantitäten der psychrotrophen Keimflora in Hackfleisch finden sich kaum. ABD EL-RHMAN et al. (1998) ermittelten die psychrotrophe Gesamtkeimzahl

(pGKZ) nach Vorgabe der American Public Health Association durch Bebrütung der Nährbodenplatten für 48 h bei 20° und erhielten dadurch für aus dem Einzelhandel erworbenes Hackfleisch vom Rind mittlere Keimzahlwerte von 3,38 lg KbE/g. Nachdem sie die Proben bei 4°C für 5 Tage lagerten, stiegen die Werte auf 4,89 lg KbE/g an. NORTJE et al. (1990a) konnten bei Rinderhackfleischproben aus dem Einzelhandel Mittelwerte der pGKZ nach 7 Tagen Bebrütung der Nährbodenplatten bei 5°C von 5,6 bis 6,3 lg KbE/g nachweisen.

Änderungen in der Zusammensetzung der Fleischmikroflora unter aeroben Bedingungen

Unmittelbar am Ende der Schlachtlinie wird die Oberflächenflora der Schlacht tierkörper von den Gram-positiven Mikroorganismen dominiert (BLÄSCHKE und REUTER, 1984; WOLTERING, 1990), welche sich bei Rind und Schwein hauptsächlich aus Mikrokokken zusammensetzen (GILL und NEWTON, 1978; GILL und BRYANT, 1992; GILL und MCGINNIS, 1993). WOLTERING (1990) fand auf der Schweinehaut vor allem Gram-positive, Katalase-positive unregelmäßige Stäbchen. Die Mikrokokken werden während der Kühlphase von *Brochothrix thermosphacta* und Milchsäurebakterien (besonders *Lactobacillus sakei* und *Lactobacillus curvatus*) abgelöst (GARDNER et al., 1976; GILL und NEWTON, 1978; NEWTON et al., 1978; REUTER, 1981; DAINTY und MACKAY, 1992; PRIETO et al., 1994; NYCHAS und DROSINOS, 2000). Einen geringeren Anteil nehmen dann auch *Carnobacterium* spp, *Leuconostoc* spp. und Pediokokken ein (REUTER, 1981; DAINTY und MACKAY, 1992). BORCH et al. (1996) stellten fest, daß nur etwa 10% der ursprünglich vorhandenen Bakterien später bei Kühltemperaturen wachsen können. Die bei Untersuchungen von Hackfleisch ermittelten Keimzahlen für Milchsäurebakterien und *Brochothrix thermosphacta* können der Tab. 3 entnommen werden.

An Gram-negativen Keimen sind auf schlachtfrischem Fleisch vor allem *Enterobacteriaceae* sowie Spezies der *Pseudomonas-Acinetobacter-Psychrobacter*-Gruppen zu finden, wobei mesophile Arten anfangs den dominierenden Part einnehmen (GILL und NEWTON, 1978; SHAW und LATTY, 1988; REUTER, 1999). Sinkt die Temperatur auf der Schlacht tieroberfläche unter 10°C, nehmen die psychrotrophen

Bakterien den überwiegenden Anteil ein (NOTTINGHAM, 1982; DAINTY und MACKEY, 1992; REUTER, 1999). Unter aeroben Kühlbedingungen und bei höherer Luftfeuchtigkeit waren bei Rind- und Schweinefleisch vor allem Pseudomonaden, *Acinetobacter* spp. und *Psychrobacter* spp. anzutreffen (GARDNER et al., 1976; GILL und NEWTON, 1977; NEWTON et al., 1978; GILL, 1986; NORTJE et al., 1990b; DAINTY und MACKEY, 1992; JACKSON et al., 1997). Die dominierende Stellung der Pseudomonaden (GARDNER, 1965; GILL und NEWTON, 1977; NEWTON et al., 1978; GILL, 1983; BLÄSCHKE und REUTER, 1984; DAINTY und MACKEY, 1992; SMULDERS und VAN LAACK, 1992; KÖPKE und REUTER, 1995; JACKSON et al., 1997) nimmt im Verlauf der Kühlphase weiter zu. In numerischen Taxonomiestudien wurden auf der Basis von biochemischen und physiologischen Tests Identifizierungen der aus gekühlten Rind- und Schweinefleischproben isolierten *Pseudomonas* (*Ps.*)-Stämmen vorgenommen (SHAW und LATTY, 1982; MOLIN und TERNSTRÖM, 1982 und 1986). Dabei dominierten die Spezies *Ps. fragi* und *Ps. lundensis* vor *Ps. fluorescens* (Biovar I und III). In 5 Tagen bei 4°C gekühlten Hackfleischproben vom Schaf (Fleischerei) wurde von DROSINOS und BOARD (1995) die Umschichtung der Pseudomonaden-Flora von zunächst *Ps. fluorescens* vor der Kühlung zu *Ps. fragi* am Ende der Lagerung nachgewiesen. GUSTAVSSON und BORCH (1993) fanden dagegen auf gekühlten Rindfleischproben (2°C, 14 Tage) *Ps. fluorescens* als den dominierenden Teil der *Pseudomonas* spp., gefolgt von *Ps. lundensis* und *Ps. fragi*. Die Zusammensetzung auf gekühlten Schafschlachttierkörpern verhielt sich ähnlich, nur daß außerdem 5,9% der Stämme als *Ps. putida* identifiziert werden konnten (PRIETO et al., 1992b). Bei gekühlten Hühnerschlachttierkörpern wurden vor allem *Ps. fragi* und *Ps. fluorescens* (Biovar A und B) gefunden, gefolgt von *Ps. lundensis* (ARNAUT-ROLLIER et al., 1999).

GENNARI et al. (1992) fanden "*Moraxella*-ähnliche" Stämme (Gram-negative, unbewegliche, Katalase- und Oxidase-positive Bakterien) auf schlachtfischem Fleisch (Rind, Schwein, Geflügel, Schaf) in 70% der Proben, auf Fleisch nach Kühlung (7-8 Tage bei 5°C) noch bei 39%. Die Stämme wurden als *Psychrobacter immobilis* identifiziert. *Acinetobacter* (*A.*) spp. waren in 75% der gekühlten Fleischproben nachzuweisen. Die *Moraxellaceae* (*Acinetobacter* und "*Moraxella*-like") machten 0,1 bis 5% der Gesamtkeimflora aus. Nach KÄMPFER et al. (1993) kommen für die Fleischmikroflora *A. johnsonii* und 2 bisher unbenannte Stammformen in Betracht. In

frischem Rinderhackfleisch wurden die *Acinetobacter*-Spezies *A. Iwoffii* und *A. calcoaceticus* nachgewiesen (ERIBO und JAY, 1985). *Psychrobacter* spp. und *Acinetobacter* spp. zeigten kaum Aktivitäten hinsichtlich von Verderbnisvorgängen, wie Proteolyse oder H₂S-Bildung (GENNARI et al., 1989).

Von den anfänglich auftretenden *Enterobacteriaceae* wurden die "coliformen" Anteile der Darmflora der Tiere von den saprophytären Anteilen der *Enterobacter*- und *Hafnia*-Spezies aus der Umgebungsflora der Tierkörper oder des Verarbeitungsbetriebes abgelöst (REUTER und ÜLGEN, 1977). In früheren Arbeiten wurden als psychrotrophe Vertreter dieser Familie auf und in Fleisch folgende Spezies genannt: *Serratia* (*S.*) *liquefaciens*, *S. marcescens*, *Hafnia* (*H.*) *alvei*, *Enterobacter* (*Eb.*) *aerogenes*, *Eb. agglomerans* (jetzt *Pantoea agglomerans*), *Eb. cloacae*, *Klebsiella* (*Kl.*) *pneumoniae*, *Kl. oxytoca* (HECHELMANN et al., 1974; KLEEGER, 1979). RIDELL und KORKEALA (1997) fanden auf Schlachttierkörpern und in Hackfleisch sowie vakuumverpacktem Fleisch weitere *Enterobacteriaceae*-Spezies, die in einem Temperatur-Gradienten-Inkubator unterhalb von 5°C wachsen konnten: *Buttiauxella agrestis*, *Cedeceae davisae*, *Eb. amnigenus*, *Eb. intermedius*, *Escherichia vulneris*, *Kl. pneumoniae* sp. *ozaenae* und *S. fonticola*. Sie ermittelten als dominant auftretenden Spezies *H. alvei* und *S. liquefaciens*. Bei Temperaturen <4°C können sich die *Enterobacteriaceae* unter aeroben Bedingungen gegenüber den Pseudomonaden jedoch nicht behaupten. Steigen die Temperaturen an (auf 6 bis 10°C), d.h. bei einer Unterbrechung der Kühlkette, nimmt ihre Zahl wieder zu (GARDNER, 1965; DAINTY und MACKEY, 1992; ABD EL-RHMAN et al., 1998).

Flavobakterien, *Aeromonas*, *Alcaligenes* und *Shewanella* waren weitere von Schlachttieroberflächen in geringerer Mengen zu isolierende psychrotrophe Bakterien (INGRAM und DAINTY, 1971; NORTJE et al., 1990b; GILL und BRYANT, 1992; GILL und MCGINNIS, 1993). Flavobakterien und *Alcaligenes* spp. konnten sich rasch auf Schweineschlachttierkörpern vermehren, welche bei 5°C und hoher Luftfeuchtigkeit (90 und 100%) gekühlt wurden (WOLTERING, 1990). Bei Fleisch mit höherem pH-Wert, z.B. DFD-Fleisch, waren verstärkt *Shewanella putrefaciens*, welche sich nicht unterhalb von pH 6,0 vermehren können, anzutreffen (GILL, 1983; JACKSON et al., 1997). Quantitative Angaben zum Vorkommen dieser Spezies in Hackfleisch existieren nicht, nur zu Aeromonaden finden sich Keimzahlen.

HILDEBRAND et al. (2001) konnten in einer von 66 Proben "industriell" hergestellten Hackfleisch vom Schwein Aeromonaden mit einer Keimzahl von 2,48 lg KbE/g nachweisen.

Angaben zur **quantitativen Verteilung verschiedener psychrotropher Mikroflora-anteile in Hackfleisch** finden sich in der Literatur wenig. Eine Zusammenstellung der Anteile der bisher als üblich betrachteten Bakteriengruppen gibt Tab. 3 wieder.

Tab. 3: Quantitative Angaben zu Mikrofloraanteilen (Bakteriengruppen) in Hackfleisch laut Literatur (logarithmische Mittelwerte in lg KbE/g)

logarithmische Mittelwerte in lg KbE/g		Aerobe Gesamt-keimzahl (30°C)	Pseudomonaden	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Enterobakteriazeen	Milchsäurebakterien
NORTJE et al. (1990a) ²	RG	6,3*	5,8	5,6	5,4	n.u.
KÖPKE und REUTER (1995) ¹	RG	4,7	4,1	3,7	3,1	1,6
	SF	5,6	4,4	4,5	2,6	3,8
	SG	5,3	4,8	4,7	2,7	2,6
	RS	5,4	5,1	4,8	3,7	2,5
LOUWERS et al. (1997) ^{1a} (Produktionstag/nach 7d Lagerung bei +2°C)	RG	5,3/6,0	3,7/2,9	4,0/5,1	3,1/2,9	4,2/5,2
	SG	4,5/6,1	2,6/5,3	4,1/6,1	2,9/2,8	2,4/5,2
HILDEBRAND et al. (2001)	¹ SG	4,73	3,69	n.u.	2,78	2,97
	² SG	6,09	5,43	n.u.	3,77	4,43
	³ SG	6,64	6,08	n.u.	4,60	5,04

¹ : "industriell" hergestelltes Hackfleisch; ² : Fleischereien; ³ : Fleischabteilungen von Supermärkten

^a : modified atmosphere packaging (MAP); * : psychrotrophe Gesamtkeimzahl (5°C, 7 Tage)

RG: Rindergehacktes, SF: Schabefleisch, SG: Schweinegehacktes, RS: Gemischtes Hackfleisch (Rind und Schwein)

n.u.: nicht untersucht

Trocknet die Oberfläche des frischen Fleisches ab, so kann das Bakterienwachstum eingeschränkt sein, und das Wachstum von Hefen und Pilzen kommt hinzu (JACKSON et al., 1997). Schimmelpilze und Hefen wachsen langsam und sind reduzierter Wasseraktivität gegenüber sehr tolerant. Sie wachsen daher erst nach einer Lagerung von 4 bis 6 Wochen (NOTTINGHAM, 1982). Die am häufigsten vertretenen Hefen sind *Torulopsis*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, bei den Schimmelpilzen sind es *Penicillium*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus* und *Sporotrichum* (AYRES, 1960; REUTER, 1972a; NOTTINGHAM, 1982)

Änderungen in der Zusammensetzung der Fleischmikroflora unter anaeroben Bedingungen

Wird Fleisch unter Vakuum verpackt und gekühlt gelagert, so kommt es durch den Metabolismus der sich unter diesen Bedingungen vermehrenden Bakterien zum Verbrauch des restlichen Sauerstoffs und zur Anreicherung von Kohlendioxid. Die Änderung der Gasatmosphäre führt zu einer weiteren Umschichtung der Mikroflora, bei der sich besonders Laktobazillen und andere Milchsäurebakterien vermehren (REUTER, 1972a; GARDNER et al., 1976; GIBBS et al., 1982; SMULDERS und VAN LAACK, 1992; DAINTY et al., 1996; JACKSON et al., 1997; NYCHAS und DROSINOS, 2000). Das betrifft auch Pediokokken, *Leuconostoc* spp. und *Carnobacterium* spp. (REUTER, 1981). Das Wachstum von Pseudomonaden wird aufgrund des auftretenden CO₂ durch die Verlängerung der "lag-Phase" (Anpassungsphase) gehemmt und ebenso durch antimikrobielle Stoffwechselprodukte der Laktobazillen (SMULDERS und VAN LAACK, 1992; MOJE, 1999). Dadurch spielen auch *Enterobacteriaceae* nur eine Nebenrolle.

Bei höheren pH-Werten und niedrigen Milchsäuremengen können *Brochothrix thermosphacta* und *Enterobacteriaceae* höhere Keimzahlen erreichen (LÜCKE, 1995). Innerhalb des Genus *Clostridium* (*Cl.*) sind unter den Lagerungsbedingungen (Vakuum, 4°C) neben reinen Verderbniserregern wie *Cl. estertheticum*, *Cl. laramie* und *Cl. algidicarnis* (KALCHAYANAND et al., 1993; LAWSON et al., 1994; NYCHAS und DROSINOS, 2000) sowie *Cl. frigidicarnis* und *Cl. gasigenes* (BRODA et al., 1999, 2000) auch pathogene oder toxinogene Spezies vermehrungsfähig, welche

eine gesundheitliche Gefährdung für den Menschen bedeuten können. Hierzu zählen *Cl. botulinum* Typ E sowie nicht-proteolytische Stämme der Typen B und F (REUTER, 1972a). *Cl. perfringens*, ein wichtiger Erreger von Lebensmittelvergiftungen, kann neben anderen Verderbniserregern in der Tiefe der Muskulatur von Schlachttieren gefunden und in Fleisch und Fleischprodukten nachgewiesen werden (EISGRUBER und STOLLE, 1996). *Cl. perfringens* stellt keinen echten psychrotrophen Keim dar, weil eine Vermehrung bei 6°C nur bedingt und erschwert möglich ist (BEERENS et al., 1965). Nach anderen Angaben sind die Stämme dieser Spezies nicht in der Lage, unterhalb von 15°C zu wachsen (EISGRUBER, 1996).

Änderungen in der Zusammensetzung der Fleischmikroflora durch Schutzgasgemische ("Modified atmosphere packaging", MAP)

Auch die Anwendung von Schutzgasgemischen in Frischfleischverpackungen nach dem Prinzip der "modified atmosphere packaging (MAP)" führen zu einer Umschichtung der Mikroflora im Fleisch. Liegt Sauerstoff in relativ hoher Konzentration vor (z.B. 80% O₂ und 20% CO₂), um die Rotfärbung des Fleisches zu erhalten, so sind neben hohen Anteilen von Milchsäurebakterien, *Brochothrix thermosphacta* und *Enterobacteriaceae* z.T. auch Pseudomonaden zum Wachstum befähigt und können einen schnelleren Verderb des Fleisches verursachen (BORCH et al., 1996). Eine Erhöhung der Kohlendioxidkonzentration sowie eine Senkung der Lagerungstemperatur und ein niedriger pH-Wert des Fleisches haben einen verstärkt hemmenden Einfluß auf die Gram-negative Verderbnis- sowie die pathogene Flora (z.B. *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*) (BORCH et al., 1996; GARCIA DE FERNANDO et al., 1996; HOLZAPFEL, 1996; MANO et al., 2000). So wird z.B. bei einem normalen Fleisch-pH-Wert (5,5) und niedriger Temperatur (1°C) die Vermehrung psychrotropher "Pathogener" bei einer CO₂-Konzentration von 40% vollständig gehemmt (GARCIA DE FERNANDO et al., 1996).