

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH)

Bakterienflora in pilzhaltigen Convenienceprodukten in Abhängigkeit von der
Lagertemperatur und -zeit und weiterführende Literaturrecherche zu
Verderbnismechanismen von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae* bei
pflanzlichen Lebensmitteln und Speisepilzen

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Kristina Schmidhofer

Wien, im Juni 2020

Betreuerin: Dr. med. vet. Martina Ludewig, Dipl. ECVPH

Gutachter: Dr. rer. nat. Tom Grunert

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung und Produktspezifikation	1
2	Typische Mikroorganismen und Höhe der Keimbelastung	2
2.1	Vermehrungsverhalten von Mikroorganismen in Lebensmitteln	2
2.2	Sporenbildner	4
2.3	Gramnegative Bakterien	6
2.3.1	<i>Enterobacteriaceae</i> in pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen	7
2.3.2	<i>Pseudomonadaceae</i> in pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen	11
2.3.3	Milchsäurebakterien.....	14
2.4	Biochemische Nachweisreaktionen zur Differenzierung von Bakterien	15
2.4.1	Katalase-Reaktion	15
2.4.2	KOH-Reaktion	15
2.4.3	Oxidase-Reaktion.....	16
2.5	Nachweis der Verderbnisaktivität von Bakterien.....	17
3	Aufbau der Studie und Proben	18
4	Methoden	20
4.1	Bestimmung der Gesamtkeimzahl	20
4.2	Gewinnung der Isolate	21
5	Ergebnisse	23
5.1	Gesamtkeimzahl.....	23
5.2	Isolatergebnisse	24
6	Diskussion	30
7	Zusammenfassung	32
8	Abstract	34
9	Funding information	36

10	Abkürzungsverzeichnis	37
11	Literaturverzeichnis.....	38
12	Abbildungsverzeichnis.....	45
13	Tabellenverzeichnis.....	46
14	Anhang	47

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Produktspezifikation

Ein österreichisches Lebensmittelunternehmen produziert auf der Grundlage von Pilzen (*Pleurotus eryngii* (Kräuterseitling)), Reis, Pflanzenöl und Hühnerei, vegetarische Bratwürstchen, Faschiertes, Bratstreifen und Schnitzel. Im europäischen Lebensmittelrecht ist festgeschrieben, dass jeder Lebensmittelunternehmer die Sicherheit seiner Produkte gewährleisten muss. Die Produkte dürfen keine potentiell pathogenen Mikroorganismen enthalten und müssen bis zum angegebenen Mindesthaltbarkeitsdatum eine gute Qualität aufweisen. Die Qualität der Produkte wird während der Lagerung von verschiedenen Faktoren, wie Temperatur, Verpackung, aber auch den vorhandenen Mikroorganismen beeinflusst. Die im Betrieb produzierten Produktgruppen werden vor der Verpackung erhitzt, sodass sich im Endprodukt nur noch sporenbildende Bakterien befinden sollten. Diese können sich unter Umständen auch während der Kühllagerung vermehren und so die Qualität der Produkte bis hin zum Verderb verändern. Weiterhin ist es möglich, dass es während des Handlings, nach der Erhitzung zur Rekontamination der Produkte mit diversen Bakterienarten, Hefen oder Schimmelpilzen kommen kann. Diese Keimgruppen können auch Qualitätsverluste und Verderb noch vor Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums verursachen.

Ziel der Arbeit war es deshalb, diese Erzeugnisse bei 7,0 °C und 12,0 °C zu lagern und nach 10 und 20 Tagen die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl zu bestimmen und die vorherrschenden Bakteriengruppen anhand der Koloniemorphologie und mittels biochemischer Tests zu selektieren.

Ursprünglich war geplant, die in den Proben hauptsächlich vorkommenden Bakteriengruppen mittels 16S-rDNA Analyse zu sequenzieren und daraus Erkenntnisse, über die vorherrschenden Spezies in den Produkten zu gewinnen. Aufgrund der gesetzlichen Vorgaben in Zusammenhang mit der Coronavirus-Pandemie mussten die praktischen Untersuchungen im Labor zum 16. März 2020 beendet werden. Aus diesem Grund wurde im Literaturteil ein weiterer Schwerpunkt gesetzt. Dabei sollte die Bedeutung von *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonas spp.*, die im Zusammenhang mit dem Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln und Speisepilzen stehen, herausgearbeitet werden. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf alle Daten, die bis Ende März 2020 erhoben wurden.

2 Typische Mikroorganismen und Höhe der Keimbelastung

2.1 Vermehrungsverhalten von Mikroorganismen in Lebensmitteln

Allgemein kann das Wachstum und die Vermehrung von Bakterien in vier Phasen eingeteilt werden: die Anlaufphase, die exponentielle Wachstumsphase, die stationäre Phase und die Absterbephase (siehe Abbildung 1).

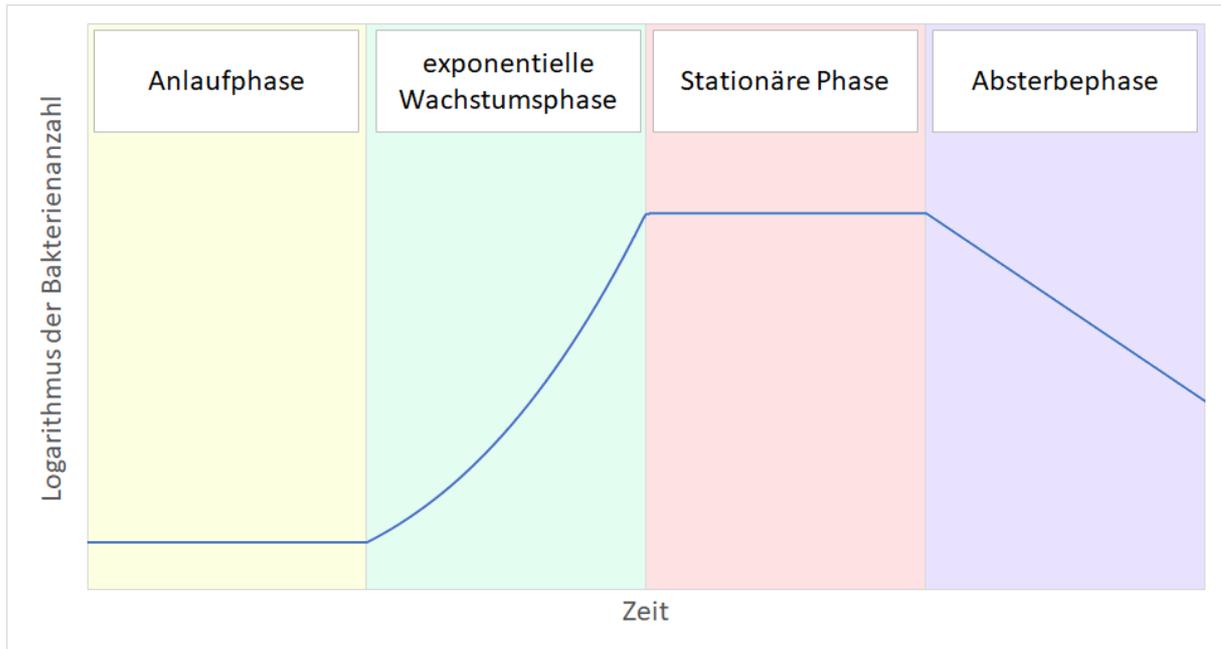


Abbildung 1: Stadien des Bakterienwachstums

In der Anlaufphase erfolgt die Anpassung der Bakterien an neue Nährstoffe und Umweltfaktoren. Die Produktion von Enzymen, die nun nicht mehr benötigt werden, wird eingestellt, dafür müssen notwendige Enzyme noch hergestellt werden. Das Wachstum der Bakterien verläuft in dieser Phase langsam bzw. verzögert.

In der exponentiellen Phase vermehren sich die Keime rasant und die Individuenzahl steigt exponentiell an. Die Verdopplungsdauer ist dabei von Faktoren wie Nährstoffverfügbarkeit, Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen, Temperatur, pH-Wert, Nährmedium und den Bakterien selbst abhängig.

In der stationären Phase stagniert das Wachstum der Keime. Durch immer weniger Nährstoffe, vermehrte Bildung von Toxinen und Platzmangel sterben Keime ab oder wachsen nur sehr schlecht. [1]

In der Absterbephase vermindert sich die Zahl der lebenden Zellen drastisch. Die Umstände sind so schlecht, dass der Großteil der Zellen stirbt oder, wenn möglich, Sporen bildet, um unter besseren Bedingungen wieder auszukeimen.

Diese vier Phasen gelten sowohl im Labor in Reinkulturen als auch auf Lebensmitteln, bei denen Mischpopulationen vorherrschen. Das Wachstum kann aus verschiedenen Gründen zum Erliegen kommen. Einer der Gründe kann der Mangel an Nährstoffen sein. Für die Teilung und Vermehrung werden Substrate, zum Beispiel Zucker oder Aminosäuren, benötigt. Stehen diese nicht mehr zur Verfügung, können sich die Zellen nicht mehr vermehren und sterben ab. Für aerobe Bakterien kann auch Sauerstoffmangel zum Absterben der Bakterien führen. Diese Gegebenheit nutzt man bei der Verpackung von Lebensmitteln mittels Vakuums aus, um so das Wachstum von aeroben Bakterien zu hemmen. [1]

Ein weiterer Grund für das verminderte Wachstum kann auch die Konkurrenz der Keime untereinander sein. Da in Mischpopulationen verschiedenste Keime aufeinandertreffen und diese unterschiedlichste Stoffwechselprodukte an die Umgebung abgeben, kann die Säure des einen Keims zum Absterben des anderen führen. Die Lebensmittel „versauern“ beim Verderben durch organische Säuren oder Kohlendioxid. Vor allem Milchsäurebakterien sind an niedrige pH-Werte gut angepasst und können sich bis zu einem pH-Wert von 3,8 gut vermehren. Pseudomonaden hingegen sind nicht säuretolerant und können nur bis zu einem pH-Wert von 5,6 wachsen. Aber auch Alkohol, wie das von Hefen produzierte Ethanol, kann die Zellmembran von Bakterien zerstören oder zur Proteingerinnung führen. Neben organischen Säuren und Alkoholen können Mikroorganismen auch in geringen Maßen Bakterizide bilden. Beispielsweise bilden Milchsäurebakterien das Bakterizid Nisin, welches das Wachstum von Listerien hemmt. Weiters wird von aeroben, fettabbauenden Keimen Wasserstoffperoxid gebildet, welches auch zu Zellwandschäden führen kann. [1]

Um die Keimzahlen in Lebensmitteln zu vermindern und somit die Dauer der Haltbarkeit zu erhöhen, werden viele Produkte auf entsprechend hohen Temperaturen erhitzt. Meist werden Temperaturen über 65,0 °C angewendet. Die Effektivität der Erhitzung wird als D-Wert angegeben und beschreibt die Zeit in Minuten, die bei einer bestimmten Temperatur notwendig ist, um die Keimzahl auf 10% des Ausgangswertes zu reduzieren. [1] Salmonellen haben zum Beispiel bei 65,6 °C einen D-Wert von 0,2-0,25 Minuten (12-15 Sekunden). Verderbniserreger und Pilze wie Hefen und Schimmelpilze haben im Allgemeinen bei 65,0 °C einen D-Wert von

0,5-3,0 Minuten. *Bacillus cereus* kann erst bei 121,1 °C für 0,007 Minuten (0,42 Sekunden) dezimiert werden. Pseudomonaden können beispielsweise unter Temperaturen von 65,0 °C nur um drei log-Stufen vermindern. Über 65,0 °C konnte nachgewiesen werden, dass kein überlebender Keim mehr vorhanden ist. [2], [3]

Allerdings können die Produkte unter gegebenen Umständen sehr leicht rekontaminiert werden. Die größte Quelle für Rekontaminationen ist der Mensch. Bereits durch Husten, Niesen oder auch Sprechen können erneut Keime, die an Aerosole oder Staubpartikel gebunden sind, auf die bereits erhitzten Produkte gelangen. [1] Zur Vermeidung von unerwünschter Kontamination ist daher auf äußerste Hygiene in allen Verarbeitungsstufen der Produktion und Verpackung zu achten.

2.2 Sporenbildner

Sporenbildner, auch Endosporen genannt, sind ubiquitär vorkommend und bilden ihre Sporen im Inneren der Zelle. Die Sporen werden erst durch die Autolyse der Mutterzelle freigesetzt. Bakteriensporen sind ruhende Zellen. Dabei dienen die Sporen als Dauerform, die Nährstoffmängel, physikalische und chemische Einwirkungen überstehen. In dieser Dauerform können Jahre überstehen. [4]

Ein wichtiger Faktor bei dieser Resistenz ist dabei die Zusammensetzung der unterschiedlichen Schichten, die die Spore nach außen hin schützen (siehe Abbildung 2). Die äußerste Schicht der Spore ist das Exosporium und besteht aus Proteinen und Glykoproteinen. Das Exosporium ist für die Interaktion mit Zielorganismen verantwortlich. Bei *Bacillus subtilis* folgt der „Coat“, auch Mantel genannt, auf das Exosporium. Der „Coat“ besteht aus mehr als 50 Proteinen und schützt die darunter liegenden Schichten vor Chemikalien und lytischen Enzymen, trägt aber nicht zum Schutz vor Hitze oder Strahlung bei. Die nächste Schicht, die äußere Membran, ist eine essentielle Struktur bei der Sporenbildung. Weiter innen befindet sich der Kortex. Dieser besteht überwiegend aus Peptidoglykanen. Der Kortex spielt eine wesentliche Rolle bei der Resistenz gegen Hitze und Strahlung. Um diese Hitzeresistenz zu erlangen, wirkt der Kortex bei der Reduktion des Wassergehaltes mit. Je niedriger der Wassergehalt in der Spore ist, umso resistenter ist sie auch gegen Hitze. Aus der darunterliegenden „germ cell wall“ wird beim Auskeimen der vegetativen Zelle deren Außenmembran. Auf die „germ cell wall“ folgt die innere Membran, die eine starke Barriere gegen Chemikalien, die DNA-Schäden hervorrufen,

darstellt. Im Zentrum der Spore befindet sich der Kern. Darin befinden sich die Enzyme der Spore sowie deren DNA, Ribosomen und tRNAs. [5]

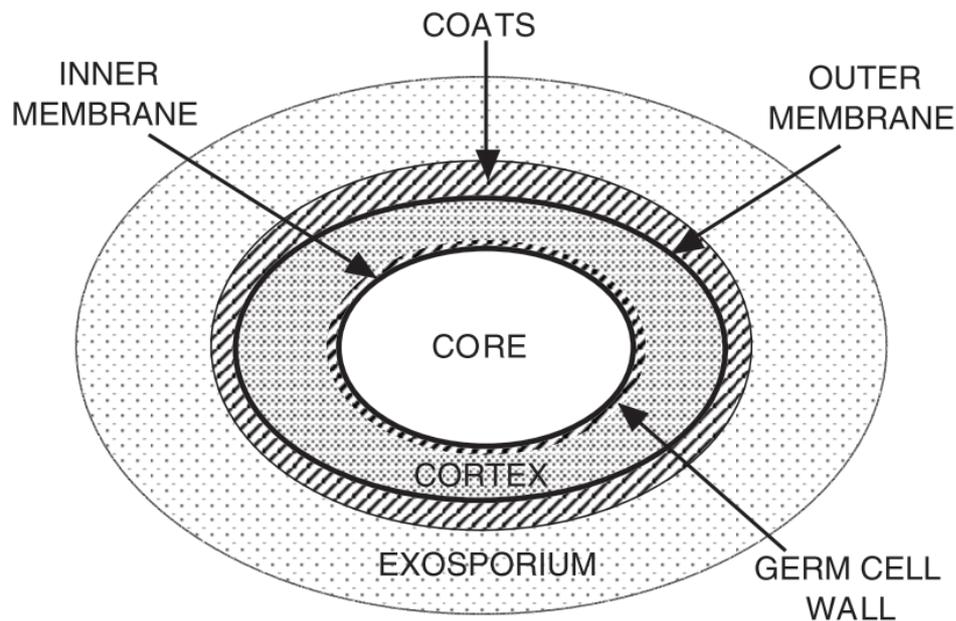


Abbildung 2: Skizze einer Spore,[5]

Unter günstigeren Bedingungen keimen diese Sporen wieder aus, indem sie Wasser aufnehmen und die schützende Hülle enzymatisch abbauen. Aus den Sporen werden wieder vegetative Zellen, die sich durch Teilung vermehren, Toxine bilden können und so zum Verderb von Lebensmitteln führen. [4]

Im Falle einer Kontamination eines Lebensmittels mit Endosporen können diese bereits in der Erde, in der Produkte angebaut werden, vorhanden sein und so in die verarbeiteten Lebensmittel gelangen. Sie können aber auch während des Verarbeitungsprozesses eingebracht werden. Durch die Fähigkeit mancher Sporenbildner stark anhaftende Biofilme zu bilden, sind sie auch durch gründliches Reinigen der verwendeten Geräte nur schwer zu beseitigen. In jedem Fall sind Sporenbildner für die Qualität der Lebensmittel und die Sicherheit der Konsumenten ein wesentlicher Faktor. [6]

Die wichtigsten Sporenbildner, die für den Verderb von Lebensmitteln verantwortlich sind, sind die Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe. Einige Arten können Toxine bilden. Es ist bekannt, dass *Bacillus cereus spp.* zwei Arten von Toxinen bildet. Das erste Toxin, ist das Erbrechen verursachende Cereulid. Dieses Toxin wurde vor allem in Reis nachgewiesen. [7] Das zweite Toxin, das von *Bacillus cereus spp.* gebildet wird, ist ein Exotoxin. Es wird während

der exponentiellen Phase des Wachstums gebildet. Dieses Exotoxin ist hitzelabil und kann durch niedrige pH-Werte und Proteasen inaktiviert werden. Das Toxin wird im Dünndarm des Menschen resorbiert und verursacht abdominale Schmerzen und Durchfall. [8], [9] *Bacillus cereus spp.* ist fakultativ anaerob und grampositiv. Sein Wachstumsspektrum liegt zwischen 5,0 °C – 55,0 °C, weshalb das Bakterium sich auch bei Kühlschranktemperaturen langsam vermehren kann. [1]

2.3 Gramnegative Bakterien

Die große Klasse der Gammaproteobakterien umfasst 20 Ordnungen, die von unterschiedlichster Bedeutung für den Menschen sind. Sie ist mit mehr als 250 Genera eine der größten Gruppen in der Taxonomie der Bakterien. Diese Einteilung wurde anhand 16S-rDNA Analysen durchgeführt. [10] Bakterien dieser Klasse bevorzugen sehr unterschiedliche Temperaturoptima, verfügen über aerobe und anaerobe Atmungswege und verfügen über verschiedenste Metabolisierungsstrategien wie chemoorganotrophe, phototrophe oder chemolithotrophe Mechanismen. Morphologisch sind sie meist Stäbchen zum Teil auch Kokken. [11], [12]

Alle Bakterien der Klasse Gammaproteobakterien verfügen über den gleichen Zellwandaufbau. Dieser besteht aus einer einzigen Mureinschicht, die von einer äußeren Membran umschlossen wird. Außerdem finden sich an der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien auch noch Lipopolysaccharide (LPS), die eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese menschlicher Infektionen spielen. [13] Gramnegative Bakterien besitzen im Vergleich zu grampositiven Bakterien keine Teichonsäure. Diese ist bei der Gramfärbung von Bedeutung, da das Kristallviolett an diesen Strukturen auskristallisieren kann. [14] Bei der Gramfärbung wird deshalb der Farbstoff Kristallviolett bei den Gramnegativen mit Ethanol wieder herausgewaschen, so dass die Bakterienzellen im Mikroskop rötlich erscheinen. Grampositive Bakterien besitzen eine mehrschichtige Mureinschicht in die Teichonsäure eingebaut ist, so dass bei der Färbung ein stabiler Komplex entsteht. Die Bakterien erscheinen im Mikroskop blau. [15]

2.3.1 *Enterobacteriaceae* in pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen

Die *Enterobacteriaceae* sind fakultativ anaerobe, katalasepositive und oxidasenegative, nicht sporenbildende Bakterien. Viele *Enterobacteriaceae* sind als Verursacher von Verderb in Lebensmitteln beschrieben. *Enterobacteriaceae* sind wie die Sporenbildner ubiquitär vorhanden und finden sich sowohl in der Erde, in und auf Pflanzen, sowie im Darm von warmblütigen Tieren. [1], [16]

Allgemein führen *Enterobacteriaceae* zur Gärung von Nitraten, die beispielsweise durch Sauerstoffmangel ausgelöst werden kann. Das Ergebnis dieser Gärung kann unterschiedlich sein. Manche Bakterien bilden dabei Essigsäure, Milchsäure oder Ameisensäure. Dabei kommt es zu Erniedrigungen des pH-Wertes, was zur Hemmung des Wachstums mancher nicht säuretoleranten Bakterien führt. Zu den Keimen mit hoher Säuretoleranz gehören unter anderem auch *Escherichia coli* und Salmonellen. Diese Bakterien haben durch die hohe Säuretoleranz den Vorteil, dass andere Keime schon zugrunde gegangen sind, und sie selbst nun mehr Nährstoffe und Platz zur Vermehrung haben. Neben den Säuren können noch Gase wie Wasserstoff, Kohlendioxid oder Substanzen wie Alkohole gebildet werden, wodurch Lebensmittel verderben und ungenießbar werden können. [1]

Um die *Enterobacteriaceae* am Wachsen zu hindern, sind Faktoren wie das Ändern des pH-Wertes, der Salzkonzentration oder der Temperatur ausreichend. Grundsätzlich wird durch das Vermindern der Temperatur das Wachstum der Bakterien gehemmt. Jedoch gibt es psychrotrophe Stämme, die sich auch noch bei Temperaturen um 5,0 °C – 10,0 °C vermehren. Sie stellen in der Lebensmittelindustrie ein Problem dar, da sie allein durch Kühlung nicht in ihrer Vermehrung gehemmt werden können was zum Verderb der Produkte führt. [16] *Enterobacteriaceae* sind hitzelabil und können daher beim Erhitzen der Produkte abgetötet werden. [17]

Verschiedene Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* kommen in pflanzlichen Lebensmitteln und Speisepilzen häufig vor und sind in diesen Lebensmittelgruppen als Pflanzen-pathogene und als Verursacher von Verderb beschrieben.

Pectobacterium carotovorum gehört zur Familie der *Pectobacteriaceae* (ehemals *Erwinia carotovorum*). Diese Änderung ergab sich infolge der genaueren Untersuchungen der 16S rDNA-Sequenzierung. [18] Das Wachstumsmaximum liegt bei 34,0 °C. [19] Das

Pectobacterium carotovorum ist katalasepositiv und oxidasenegativ. Die Generationszeit von *Pectobacterium carotovorum* beträgt bei 28,0 °C ungefähr 75 Minuten. [20]

Pectobacterium carotovorum kommt vor allem im Erdboden vor, wodurch die Bakterien auf Pflanzen gelangen und zur „Blackleg“ Krankheit, auch Weichfäule genannt, bei Kartoffeln, Chicorée, Lauch, und Zuckerrüben führen. [21], [22]

Die Bakterien kommen dabei durch Läsionen an den obersten Schichten der Pflanzen in diese hinein. Im Inneren der Pflanze angekommen, bleiben sie im Interzellularraum oder im weichen, dünnwandigen Parenchymgewebe. Bei optimalen Umweltfaktoren, abhängig von Wasser, Sauerstoffverfügbarkeit und Temperatur, wird die gesamte Pflanze geschädigt und es kommt zum Ausbruch der Krankheit. Die drei Hauptklassen der vorhandenen Enzyme sind Pektinasen, Zellulasen und Proteasen. Alle drei Enzyme führen dazu, dass die Zellwände abgebaut werden und die in den Zellen vorhandenen Nährstoffe zum Bakterienwachstum beitragen. Die Proteasen degradieren Proteine, welche wichtig für die Abwehr in der Pflanze sind. Die wichtigsten der drei Enzyme sind die Pektinasen. Diese bauen Pektin ab, wodurch es zum Gewebekollaps der Pflanzen und somit zum Austritt von Flüssigkeiten aus den Zellen kommt. [23] Da *Pectobacterium carotovorum* auch in Pflanzenresten auf dem Feld und in der Erde gut überlebt, stellt es eine Gefahr für eine Infektion bei erneut gepflanztem Gemüse dar. Da die chemische Inaktivierung auf dem Feld nur sehr limitiert ist, wird dieses Bakterium durch Aussaat von Hülsenfrüchten reduziert. Hülsenfrüchte können nicht von der Weichfäule angegriffen werden, wodurch das Bakterium keine Pflanzen als Nährboden zur Verfügung hat und ausgerottet wird. [23]

Serratia spp. sind unbewegliche, biofilm- und prodigiosinpigmentbildende und proteolytisch aktive, anaerobe Stäbchen. [24] *Serratia* sind katalasepositiv und oxidasenegativ. [25] Die Vermehrungstemperatur liegt, je nach Spezies, zwischen 4,0 °C – 40,0 °C. [26] Unter den *Serratia spp.* ist *Serratia plymuthica* ein wichtiger Verderbniserreger der Pflanzen. [27] *Serratia plymuthica* konnte bereits in der Erde, in der Luft und im Wasser nachgewiesen werden. Diese Spezies ist auch an kühlere Temperaturen angepasst. [27]

Serratia benötigen Schutz gegenüber für die Bakterien schlechte Umweltbedingungen. Durch die Bildung eines Biofilms ist dieser Schutz gewährleistet. Um diesen Biofilm aufzubauen und zu erhalten ist Quorum sensing notwendig. Ein unter anderem dabei verwendeter Autoinducer ist das N-acyl-L-Homoserin Lacton (kurz AHL). [24]

Serratia plymuthica produziert extrazelluläre Pektinasen, Proteasen und Nukleasen, welche auch durch Quorum sensing reguliert werden. Auf Gemüse bildet das Bakterium nach wenigen Tagen eine schleimige Schicht und braune Flecken. [28], [29]

Zu Beginn ihres Wachstums fermentieren *Serratia plymuthica* Zucker. Durch Quorum sensing wird ein Wechsel ausgelöst, der die Bakterien Butandiol fermentieren lässt. Dieser Wechsel ist wichtig, da es durch zu lange Zuckerfermentation zu einer starken Versauerung kommen würde und *Serratia plymuthica* unter solchen Bedingungen nicht mehr wächst. Der pH-Wert, bei dem diese Bakterien sich gut vermehren können, liegt zwischen 6,0 und 7,0. [28]

Der Genus *Dickeya* (ehemals *Erwinia chrysanthemi*) ist für Weichfäule mit einem großen Wirtsspektrum verantwortlich. *Dickeya chrysanthemi* gehört wie die Pektobakterien zu jenen Arten, die das Gemüse eher selten am Feld, sondern erst nach der Ernte verderben lassen. Wie auch Pseudomonaden oder Pektobakterien führen auch die *Dickeya chrysanthemi* zum Weichwerden und Verrotten der Produkte. Der Verfall beginnt entweder an der Wurzel oder am oberen Ende des Gemüses und lässt dieses braun, weich und übelriechend werden.

Das Ausmaß des Verderbs des Gemüses durch *Dickeya chrysanthemi* hängt von der Umgebungstemperatur ab. Bei Raumtemperatur konnten massive Verluste bereits nach 24 Stunden verzeichnet werden, wohingegen bei 15,0 °C keine Reduktionen des Gewebes erkannt werden konnten. [30]

In der Gattung der *Erwinia* gibt es viele phytopathogene Bakterien. Eines der bekanntesten ist *Erwinia persicina*. Dieses Bakterium wurde bereits auf verschiedensten Gemüsearten wie Zwiebel, Bohnen, Erbsen, Petersilie und Knoblauch nachgewiesen. *Erwinia persicina* ist ein fakultativ anaerobes, oxidasenegatives Bakterium. Es kann bis zu Temperaturen von 36,0 °C wachsen und bezieht seine Energie größtenteils aus Saccharose. Das Bakterium kann bereits im Samen der Pflanzen oder in der Anbauerde vorkommen, in der das Erbsen angebaut werden, befinden. [31]

Am markantesten sind die Folgen des Bakteriums aber vor allem auf Zwiebeln und Knoblauch, da es auf diesen Gemüsen zu rosafarbenen Verfärbungen und Weichfäule kommt. Die Wurzel des Gemüses wird dabei sehr weich und hat verschiedenste Verfärbungen, die von braun bis zur charakteristischen rosa Farbe reichen. [32], [31]

Erwinia persicina wurde im Frühjahr 2016 in Kühllhäusern in Japan auf sechs Monate alten Zwiebeln gefunden, was darauf hinweist, dass diese Bakterien psychrotroph oder zumindest

psychrotolerant sind. [32] Gefunden wurden die Bakterien im Kompost und in der Deckerde, in der die Produkte gezüchtet werden. [33] Da *Erwinia persicina* noch nicht allzu lange bekannt ist, wird vermutet, dass weitere Erkrankungen von Gemüsearten, Blumen und Früchten auf dieses Bakterium zurückgehen. Die am häufigsten vorkommenden Enzyme bei *Erwinia* sind Pektinasen, die das Pektin in den Zellwänden abbauen und somit zum Verfaulen der Pflanze beitragen. [34]

Die Tabelle 1 gibt einen Überblick zu den wichtigen *Enterobacteriaceae spp.*, zu deren Vorkommen, Verderbnisbild und Enzymaktivität.

Tabelle 1: Ausgewählte *Enterobacteriaceae*, die zum Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen führen

Spezies	Vorkommen	Verderbnisbild	Enzymaktivität
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	Erdboden	Weichfäule	Pektinasen, Zellulasen, Proteasen
<i>Serratia plymuthica</i>	Erdboden, Luft, Wasser	Weichfäule	Pektinasen, Proteasen, Nukleasen
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Erdboden	Weichfäule, Verrotten	Pektinasen, Zellulasen, Proteasen
<i>Erwinia persicina</i>	Erdboden, Samen des Gemüses	Weichfäule, Verfärbungen	Pektinasen
<i>Ewingella americana</i>	Kompost, Deckerde	Verderb im Pilzstiel	Endochitinasen

Ewingella americana ist der bedeutendste Vertreter der *Enterobacteriaceae*, der im Zusammenhang mit dem Verderb von Speisepilzen beschrieben wurde. [35] Dieses Bakterium verursacht braune Verfärbungen und nekrotische Veränderungen bei Speisepilzen. Die Veränderungen beginnen dabei im Stiel und wandern innen nach oben bis in den Hut. [36] Ein großer Bestandteil der Zellwand in Pilzen ist das Chitin. Daher wird angenommen, dass diese Endochitinase eines der Hauptenzyme von *Ewingella americana*, für den Abbau des Pilzes verantwortlich ist. Das pH-Optimum liegt bei 6,5. [37]

2.3.2 *Pseudomonadaceae* in pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen

Pseudomonaden sind gramnegative, aerobe, polar begeißelt, bewegliche, nicht-fermentative, psychrotolerante oftmals sogar psychrotrophe, nicht-sporenbildende Stäbchen. Sie sind nur gering säuretolerant, daher stellen sie ihr Wachstum ein, wenn der pH-Wert unter 5,6 fällt. [1] Dieser Genus ist an verschiedenste Bedingungen gewöhnt und kann daher auch im Wasser, auf Pflanzen oder im Erdboden vorkommen. [38] Da Pseudomonaden gramnegativ sind, ist die

KOH-Reaktion positiv. [39] Die Katalasereaktion und die Oxidasereaktion sind bei den Pseudomonaden positiv. [40] Da Pseudomonaden hitzelabil sind ist die Inaktivierung bereits bei 53,0 °C mit einer Dauer von 1,16 Minuten erfolgreich. [18]

Pseudomonas fluorescens ist einer der bedeutendsten Pseudomonaden für den Verderb von Lebensmitteln wie Gemüse, Milchprodukten und auch Speisepilzen. [39] Dabei werden von den Pseudomonaden die in den Lebensmitteln verarbeiteten Kohlenhydrate abgebaut und verstoffwechselt. Der größte Anteil der Endprodukte sind Laktate, Acetate, und Kohlendioxid, wodurch die Produkte ungenießbar werden. Für den Abbau von Nährstoffen werden proteolytische Enzyme wie Proteasen verwendet. Eine Besonderheit der Pseudomonaden ist, dass diese eine hitzestabile Protease produzieren können, die auch durch Erhitzen und Pasteurisieren der Produkte nicht inaktiviert werden kann. [41] Diese Protease kann Temperaturen bis 140,0 °C standhalten. [42] Das benötigte Substrat der Protease ist Casein, welches in Milchprodukten wie Rohmilch, Käse, Joghurt und Milchpulver vorhanden ist. [43] In Milch führt die von *Pseudomonas fluorescens* produzierte Lipase zum Versauern. Da diese Lipase aber nicht hitzestabil ist, wird sie durch das Pasteurisieren inaktiviert. [44] Die Lipase wird aber auch im Gemüse, wie Karotten und Salat gefunden, wo sie ein wichtiger Bestandteil des Verderbs ist. Der optimale pH-Wert für die Lipase liegt bei 8,0-9,0. Das Temperaturoptimum für die Lipase liegt unter 25,0 °C, weshalb sie auch bei gekühlter Umgebungstemperatur aktiv ist. [45], [46]

Neben den proteolytischen Enzymen sind die Pseudomonaden auch für die Bildung von Biofilmen bekannt. Diese Biofilme werden ab ungefähr 10^7 Keimen pro cm^2 optisch für den Menschen erkennbar. Die Produkte werden schmierig und ungenießbar. [1]

Pseudomonaden sind nicht säurestabil, weswegen sie Amine und Nitrite produzieren. Durch diese Produkte wird der möglicherweise durch Milchsäurebakterien sehr niedrige pH-Wert wieder angehoben. [41]

Im Erdboden ist die Anwesenheit von psychrotrophen, aeroben Bakterien sehr hoch. Daher kann es schon beim Pflanzen oder Ernten zur Kontamination kommen.

Pseudomonas tolaasii ist ein Erreger der Braunfleckenkrankheit. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer leichten braunen Verfärbung und zum Gewebeskollaps der Pilze. [47] Um diese Krankheit auszulösen, verwendet das Bakterium das Toxin Tolaasin. Tolaasin ist ein Lipodepsipeptid, das in der Lage ist die Membran der Zellen zu durchlöchern, wodurch es zum

Kollaps der Zelle kommt. [48] Entscheidend ist, dass das Bakterium bereits in den jungen Fruchtkörpern zu finden ist und während des Wachstums nie vom Pilz ablässt. [49] Dieses Bakterium konnte in Kompost und in der Deckerde, in der die Pilze angebaut werden, nachgewiesen werden. [50] *Pseudomonas tolaasii* bevorzugt Temperaturen um 20,0 °C und feuchte Bedingungen. [49]

Um das Bakterium zu bekämpfen wird derzeit sterilisiertes Wasser zum Bewässern der Pilze verwendet. Dennoch kann auch mit dieser Methode das Ausbrechen der Krankheit nicht zur Gänze verhindert werden. Außerdem sollte sichergestellt werden, dass die Bakterien feuchte Bedingungen bevorzugen, dass die Pilze nach zwei bis drei Stunden nach der Bewässerung wieder trocken sind. Es gibt verschiedene neue Ansätze das Bakterium auszurotten, wie zum Beispiel Bakteriophagen, die das Bakterium lysieren und somit der Ausbruch der Krankheit verhindert werden kann. [52]

Pseudomonas agarici ist ein weiteres für den Verfall von Pilzen bedeutsames Bakterium. Dieses Bakterium befällt die Lamellen der Pilze und behindert deren Wachstum. [50] Dabei bilden sich an der Unterseite der Lamellen der Pilze kleine graue cremige Bakterientropfen („Drippy gill“) und der Stiel ist mit braunen vertikalen Läsionen gezeichnet. [53] In extremen Fällen laufen diese Bakterientropfen den Stiel hinab und kommen durch Läsionen in den Stiel hinein. Dort führen sie zu weiteren Verderbnisprozessen. [54] Außerdem steht dieser Keim im Verdacht für eine weitere Erkrankung bei Pilzen verantwortlich zu sein, die zu braunen Verfärbungen der Pilze führt. Diese Verfärbungen bleiben, im Gegensatz zu den Verfärbungen von *Ewingella americana*, an der äußeren Oberfläche des Pilzes. [50] *Pseudomonas agarici* kommt wie so viele andere Verderbniserreger bereits im Kompost und der Deckerde, in der die Pilze angebaut werden, vor. [55]

Um diesen Keim zu bekämpfen, wird in Pilzhäusern regelmäßig die Deckerde, in der die Pilze wachsen, desinfiziert und versucht die Oberfläche der Pilze möglichst trocken zu halten. [53] In der Tabelle 2 sind die wichtigsten Merkmale und Unterschiede der einzelnen Bakterien übersichtlich aufgelistet.

Tabelle 2: Ausgewählte *Pseudomonadaceae*, die zum Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen führen

Keim	Vorkommen	Verderb	Enzyme
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Erdboden	lytischer Abbau	Protease Lipase
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	Kompost, Deckerde	Braunfleckenkrankheit	Lipodepsipeptid
<i>Pseudomonas agarici</i>	Kompost, Deckerde	„Drippy gill“ Verfärbungen	Pektinasen Zellulasen Proteasen

2.3.3 Milchsäurebakterien

Milchsäurebakterien sind grampositive, nicht sporenbildende Stäbchen. Sie können aerotolerant oder auch anaerob sein. Milchsäurebakterien sind auf Nährstoffe wie Kohlenhydrate, Aminosäure, Peptide, Fettsäuren, Salze und Vitamine angewiesen, da sie diese nicht selbst synthetisieren können. [56] Milchsäurebakterien sind ubiquitär vorkommend. Sie kommen nicht nur bei Menschen und Tieren in der Mundhöhle und im Darm vor, sondern auch auf Pflanzen, wo sie Verderb verursachen können. [57]

Bei den Milchsäurebakterien gibt es zwei Arten der Fermentation. Homofermentative Arten bilden ausschließlich Milchsäure als Gärprodukt. Heterofermentative Milchsäurebakterien produzieren als Gärprodukte Milchsäure, Kohlendioxid, Ethanol und Säuren. Das Substrat für die Gärung sind Kohlenhydrate. Durch die Gärung sinkt auch der pH-Wert ab. Dieser Prozess wird auch bei der Herstellung von Lebensmitteln wie Sauermilchprodukten, Joghurt oder Sauerkraut zu Nutze gemacht und dient dabei der biologischen Konservierung. Durch die Milchsäuregärung werden diese Produkte hergestellt und haltbar gemacht. [1] Die Milchsäuregärung führt zu einem sehr niedrigen pH-Wert von ca. 3,8. Somit werden nicht säuretolerante Bakterien und auch potentielle Krankheitserreger oder Toxinbildner, an der Vermehrung gehindert.

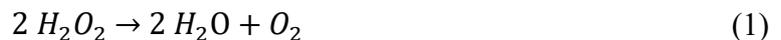
Je nach Art können Milchsäurebakterien bei Temperaturen zwischen 60,0 °C – 72,0 °C abgetötet werden. Dafür reicht eine Dauer der Erhitzung von 40,0 Sekunden aus. [1]

2.4 Biochemische Nachweisreaktionen zur Differenzierung von Bakterien

Um Bakterien zu unterscheiden, werden oftmals ihre Zwischenprodukte des Stoffwechsels oder Gärungsprodukte herangezogen. Durch die Ergebnisse, die bei den unterschiedlichen Reaktionen erzielt werden, kann die Art der Bakterien bestimmt werden. [58]

2.4.1 Katalase-Reaktion

Die Katalase verhindert Schäden an der Zellmembran durch die eigene Oxidation, indem es Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umwandelt (siehe Reaktion 1). [59] Wasserstoffperoxid fällt unter natürlichen Umständen als Nebenprodukt beim Sauerstoffmetabolismus an und ist für Bakterien toxisch. [60] Bei dieser Oxidation werden zwei Reaktionen durchgeführt. Für die erste Reaktion wird die Katalase in den Compound I oxidiert. Im zweiten Schritt wird dieser Compound I wieder zurück zur Katalase reduziert. Bei beiden Schritten ist jeweils Wasserstoffperoxid das Substrat. [59]



Die Bindung zwischen dem Wasserstoffperoxid Molekül und der Katalase beruht dabei größtenteils auf Wasserstoffbrückenbindungen. [59]

Für die Katalasereaktion wird 3,0%iges Wasserstoffperoxid verwendet. Bei der Testung wird Material von der Platte genommen und in einen Tropfen H_2O_2 gehalten. Da das Enzym H_2O_2 in H_2O und O_2 umwandelt, entstehen Blasen, die auf eine positive Reaktion schließen lassen. [61]

Katalasepositiv sind unter anderem Sporenbildner wie *Bacillus*, Staphylokokken, Salmonellen, Shigellen, Vibrionen, Campylobacter und viele mehr. [18]

2.4.2 KOH-Reaktion

Die KOH-Reaktion wird durchgeführt, um das Gramverhalten von Bakterien zu untersuchen. Dieser Test ist schnell und es wird nur Kaliumhydroxid (KOH) als Reagenz benötigt.

Bei der Durchführung des KOH-Tests wird ähnlich wie bei der Katalasereaktion ein Tropfen einer 3,0%igen Kalilauge auf einen Objektträger gegeben. Dann wird eine 2,0 mm Öse mit Bakterienmaterial in diesen Tropfen gegeben und in kreisförmigen Bewegungen durch den

Tropfen gezogen. Wenn das Tropfen-Material-Gemisch sehr viskos wird und beim langsamen Herausziehen der Öse Fäden zustande kommen, ist die Reaktion positiv. [62] Bei einer positiven KOH-Reaktion handelt es sich um gramnegative Bakterien.

Durch Kaliumhydroxid wird bei gramnegativen Bakterien die Zellwand so stark beschädigt, dass Zellorganellen und Zellbestandteile aus der Zelle heraustreten, was die Viskosität der Lösung erhöht. Es dauert nur wenige Sekunden bis die Viskositätserhöhung des Kaliumhydroxid-Bakterien-Gemisches eintritt. Im Gegensatz dazu wird die Zellwand bei grampositiven Bakterien nicht zerstört und die Reaktion bleibt aus. [63]

Die Methode ist sehr beliebt, da sie sehr schnell durchgeführt werden kann und die Kosten gering sind. Dennoch kann es zu falsch-positiven Reaktionen durch Kolonien kommen, die in ihrer Physiologie schon sehr viskos und schleimig sind. Durch zu kurze Reaktionszeiten oder auch falsches Wachstumsmedium kann es zu falsch-negativen Reaktionen kommen. [63]

2.4.3 Oxidase-Reaktion

Bei der Oxidasereaktion wird getestet, ob die Bakterienkolonie Cytochromoxidase aufweist. Die Cytochromoxidase ist ein in der Membran eingebautes Enzym, welches eine wesentliche Rolle bei der Zellatmung spielt. Dieses Enzym wird bei Bakterien an der zytoplasmatischen Membran lokalisiert und es unterstützt die Wasserbildung aus Wasserstoff und Sauerstoff. Bei dieser Umwandlung wird Energie frei, welche kontrolliert abgebaut und als Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert wird. [64]

Dieser Mechanismus wird auch bei der Nachweisreaktion verwendet. Es gibt unterschiedlichste Reagenzien, welche durch die Cytochromoxidase oxidiert werden. Die Reagenzien sind dabei vor der Reaktion farblos und werden erst durch die Cytochromoxidase dunkelblau bis violett. Wenn dieser Farbumschlag auftritt, ist die Reaktion positiv. [65]

Oxidasepositiv sind unter anderem Pseudomonaden, manche Vibrionenarten und *Campylobacter*. Zu den oxidasenegativen Bakterien gehören unter anderem Enterobakterien, *Erwinia* oder auch Staphylokokken. [18]

2.5 Nachweis der Verderbnisaktivität von Bakterien

Um den Verderb von Lebensmitteln nachzuweisen, wurden verschiedenste Arten von Untersuchungen herangezogen. Dabei werden Methoden wie enzymatische Aktivitätsbestimmungen mit angereicherten Agar, Absorbionsmessungen mittels Photometer und Trübungsreaktionen verwendet.

Um die chitinolytische Aktivität von *Serratia spp.* zu untersuchen, kann Chitin in den Überstand einer Bakterienkultur geben werden, worin sich die extrazellulären lytischen Enzyme des Bakteriums befinden. Wenn die Enzyme und das Chitin miteinander reagieren, wird die Trübung des Überstandes während der Reaktion immer weniger. Diese immer stärker werdende Transparenz kann optisch bestimmt werden. [29]

Die enzymatische Aktivität von Exoenzymen wie Pektinasen, Zellulasen und Proteasen wird mit einem Photometer gemessen. Dabei wird das Enzym mit einem geeigneten Substrat inkubiert und die Bildung von ungesättigten Oligomeren durch Absorption des Lichts bei einer Wellenlänge von 230,0 nm gemessen. [66]

Die proteolytische und lipolytische Aktivität von *Pseudomonas viridiflava* kann durch fettarmen Milch-Agar, auf den die Pseudomonaden aufgetragen und getestet werden. Wenn sie in Milch proteolytische Aktivität aufweisen wird nach dreitägiger Inkubation auf 22,0 °C eine klare Zone rund um die Beimpfungsstelle gebildet. Um die lipolytische Aktivität zu testen, wird Tributyrin-Agar verwendet. [43] Tributyrin ist ein kurzkettiges Neutralfett, welches durch die Lipase der Pseudomonaden abgebaut wird. [67] Die lipolytische Aktivität ist positiv, wenn sich eine klare Zone um die Beimpfungsstelle bildet. [43]

Beim Gelatinasetest wird die Gelatinaseaktivität eines Bakteriums geprüft. Die Gelatinase baut dabei die Gelatine zu Aminosäuren ab, die dann vom Bakterium aufgenommen werden. Bei der Testung wird das Gelatineagar mit Bakterien beimpft. Die Reaktion gilt als positiv, wenn sich die Gelatine verflüssigt. [68]

Um die Beweglichkeit von Bakterien zu überprüfen, werden Motilitätstest durchgeführt. Dabei wird ein semi-solider Agar mit den zu untersuchenden Bakterien beimpft. Wenn die Bakterien beweglich sind, kommt es zur Trübung des Agars durch die ausschwärmenden Bakterien. Wenn Bakterien nicht mobil sind, bleibt der Agar klar.

3 Aufbau der Studie und Proben

Ziel der Studie ist es, die Gesamtkeimzahl der drei verschiedenen vegetarischen Convenienceprodukten (Rostbratwürstchen, Bratstreifen und Faschiertes) unmittelbar nach der Herstellung und Verpackung sowie nach Lagerung zu untersuchen. Zudem sollten die in den Proben dominierenden Bakterien auf Basis der Kulturmorphologie isoliert und mittels Nigrosin-Färbung, KOH-, Katalase- und Oxidase-Test gruppiert werden. (Abbildung 3). Die Hauptbestandteile der Produkte sind Kräuterseitlinge (*Pleurotus eryngii*), Reis, Pflanzenöl und Hühnerei. Die Kräuterseitlinge werden in der firmeneigenen Zucht kultiviert. Der Anteil des verwendeten Kräuterseitlings liegt bei den drei getesteten Produkten zwischen 68 % und 76 %. In allen Produkten wird Hühnereiweiß in getrockneter Form verwendet. Zum Würzen werden beim Faschierten Rapsöl, Salz, Gewürze, Senfsaat und getrocknete Zitronenschale verwendet. Die Bratstreifen werden mit Salz, Gewürzen und Rapsöl verfeinert und bei den Rostbratwürstchen werden Salz, Karamell, getrocknetes Hühnereigelb, Gewürze, Senfsaat, Honig, Knoblauch und gemahlene Zitronen zugegeben. [69] Alle drei Produkte werden bei ausgewählten Supermärkten wie Spar, Billa und Merkur österreichweit verkauft. Die Produkte werden in einem recyclebaren Foodtainer aus Plastik angeboten.

Die drei Produktgruppen wurden am Tag der Verpackung bzw. in einem Fall drei Tage danach an die Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität versandt. Der Versand erfolgte gekühlt, beim Öffnen der Pakete wurde die Eingangstemperatur gemessen und dokumentiert. Um einen guten Überblick über die Belastung der Proben mit verschiedensten Bakterien zu erhalten, wurden die Proben am Tag der Ankunft (IS) und 10 bzw. 20 Tage und im Einzelfall 30 Tage nach der Verpackung untersucht. Die 43 Proben wurden bei 7,0 °C und 12,0 °C im Klimaschrank (Climacell MMM Group, München, Deutschland) gelagert.



Abbildung 3: v.l.n.r.: Rostbratwürstchen, Bratstreifen, Faschiertes

4 Methoden

4.1 Bestimmung der Gesamtkeimzahl

Die Analyse der Gesamtkeimzahl erfolgte mittels Spatelverfahren nach den Vorgaben der ISO 4833-2:2014. Für die Analysen wurden 25,0 g des Produktes in einen Stomacherbeutel[®] (Seward, Worthing, Vereinigtes Königreich) geschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass möglichst verschiedene Produktstellen getestet wurden, um alle darin vorkommenden Keime aufzunehmen. Zur Zerkleinerung der Proben wurden sie in einem Stomacherbeutel[®] gefüllt mit 225,0 ml gepufferten Peptonwasser (Biokar, Allonne, Frankreich) in einem Stomacher[®] 400 Lab Blender (Seward, Worthing, Vereinigtes Königreich) 30 Sekunden lang homogenisiert. Diese Suspension wurde als V1 festgelegt. Für die Herstellung von weiteren Verdünnungen wurde arithmetisch verdünnt. Dazu wurden jeweils 9,0 mL Ringer-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) vorgelegt und 1 mL der Suspension der vorhergehenden Verdünnungsstufe hinzugegeben. (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Verdünnungsstufen

Verdünnungsstufe	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7
Verdünnungsfaktor	1:10	1:100	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶	1:10 ⁷

Danach wurden aus der V1 300 µL mit einer 1000 µL Pipette (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf drei TSA-Platten verteilt und ausgespatelt und dann aus V1 bis V3 100 µL mit einer 100 µL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf jeweils zwei TSA-Platten. Mit zunehmender Lagerdauer wurden die Verdünnungen bis V7 erweitert. Die TSA-Agar-Platten wurden für 24 – 72 h bei 30,0 °C inkubiert (Incucell, MMM Group, München, Deutschland). Für die Berechnung der Keimzahl wurden die Verdünnungsstufen ausgewählt, bei denen 10 bis maximal 300 Kolonien gut abgetrennt auf den Platten gewachsen waren. Danach wurde die Keimzahl mit der in der Abbildung 4 veranschaulichten Formel berechnet. [43] Zudem wurden die bewachsenen Platten auf die am häufigsten vorkommenden Kolonien untersucht, deren Morphologie beschrieben und diese ausgezählt (siehe Tabelle 8 im Anhang).

$$KZ = \bar{c} * v * \frac{1}{10^{-n}}$$

$$\bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 * 1 + n_2 * 0,1}$$

\bar{c} =gewichteter Mittelwert der gezählten Kolonien (mindestens 10 auf der niedrigsten Verdünnungsstufe)

Σc = Summe der Kolonien aller ausgezählten Platten

n_1 = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 = Anzahl der Platten der nächsthöchsten auswertbaren Verdünnungsstufe

10^{-n} = niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe

v = Verdünnungsfaktor

Abbildung 4: Errechnung der Gesamtkeimzahl [18]

4.2 Gewinnung der Isolate

Für die Gewinnung der Isolate wurden Platten herangezogen, die zur Berechnung der Keimzahl verwendet wurden. Die Auswahl der Kolonien erfolgte auf Basis der Kulturmorphologie. Es wurden Koloniemorphologien berücksichtigt, die auf den Platten der jeweiligen Verdünnungsstufe vorherrschend waren. Von diesen wurden für weitere Differenzierungen Subkulturen angelegt. Dazu wurde von den möglichst einzeln liegenden Kolonien mithilfe einer 1,0 µL Öse (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vorsichtig Material abgenommen und wie in Abbildung 5 dargestellt auf einer ½ TSA-Agarplatte verdünnt ausgestrichen. Zunächst wurde das Koloniematerial direkt, in zwei Parallelen am Rand der Platte aufgetragen (blau), danach wurde diese Öse um 90 Grad gedreht (roter Ausstrich), und der grüne Ausstrich mit einer gewechselten Öse fortgesetzt. Die TSA-Platten wurden bei 30,0 °C für 24 h inkubiert (Incucell, MMM Group, München, Deutschland). Am nächsten Tag wurden die Subkulturen auf Reinheit geprüft. Kontaminierte Kulturen wurden erneut subkultiviert bis sie in Reinform vorlagen. Die reinen Subkulturen wurden unmittelbar nach der Inkubation mittels KOH (3% Kaliumhydroxidlösung Merck, Darmstadt, Deutschland) Katalase- (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Oxidasetest (Bactident® Oxidase, Merck, Darmstadt, Deutschland) weiter differenziert. Zusätzlich wurde eine Nigrosin-Färbung (Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und im Mikroskop (Nikon Alphaphot, Tokio, Japan) mit Ölimmersion und dem 100x-Objektiv die Bakterienmorphologie bestimmt.

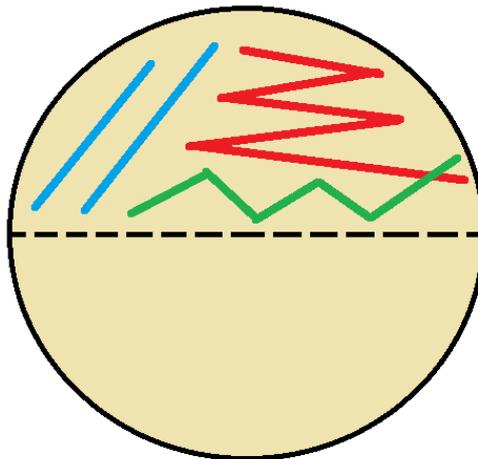


Abbildung 5: Skizze des Verdünnens der Kolonien auf der Subkulturplatte

Anhand dieser Reaktionen wurden die Bakterien gruppiert und mindestens ein Vertreter pro Gruppe und Probe für weitere Differenzierungen kryokonserviert.

Für das Einfrieren der Isolate wurden 1,5 mL Kryogefäße (Biologic Group Limited Shandong, China) mit 700 μ L BHI und 300 μ L Glycerol befüllt (siehe Tabelle 4). Für die Konservierung wurde eine 0,1 mL Öse mit Koloniematerial befüllt und in dem Kryomedium verquirlt und nach dem Verschließen des Tubes auf dem Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) kräftig gemischt.

Tabelle 4: Zusammensetzung Kryomedium

Brain Hearth Broth (Biokar Diagnostics)	70%
Glycerol (Sigma-Aldrich)	30%

Danach wurden die Isolate unverzüglich bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Gefrierschrank (Sanyo, Ultra low, Osaka, Japan) bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

5 Ergebnisse

5.1 Gesamtkeimzahl

In der Tabelle 5 ist zu erkennen, dass die mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl der Produkte über die Dauer der Lagerung bei den drei Produkten zunimmt. Alle drei Produkte weisen am ersten Tag der Untersuchung (Tag 0, IS) eine mittlere Gesamtkeimzahl von $\leq \log 2,0$ bis $\log 2,5$ KbE/g auf (Kontaminationslevel „niedrig“). Diese Keimzahl entwickelt sich mit der Dauer der Lagerung unterschiedlich. Die höchsten Werte finden sich beim Faschierten nach 20 Tagen Lagerung bei $12,0\text{ °C}$, mit einem Wert von $\log 8,2$ KbE/g. Bei den Bratstreifen und den Rostbratwürstchen liegt der Wert im Vergleich dazu nur bei $\log 5,5$ bis $\log 6,0$ KbE/g (Kontaminationslevel „mittel“). Auffällig ist auch, dass die Keimzahlen bei $12,0\text{ °C}$ nicht immer höher sind als zum gleichen Tag bei $7,0\text{ °C}$. Wie in der Tabelle 5 ersichtlich, gibt es teilweise starke Schwankungen der Standardabweichung bei allen drei Produkten und in jeder Produktgruppe weisen einzelne Proben nach der Lagerung mikrobiologische Kontaminationen $\geq \log 6,0$ KbE/g auf (Kontaminationslevel „hoch“).

Tabelle 5: Zusammenstellung der mittleren aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl und Kontaminationslevel

Produktgruppe/ Probenzahl	log GKZ (cfu/g)	Anzahl der Proben im Kontaminationslevel/dominante Bakteriengruppe (BG)					
		NIEDRIG	BG	MITTEL	BG	HOCH	BG
		$\leq \log 3.0$ cfu/g		$> \log 3.0 - \leq$ $\log 6 \text{ cfu/g}$		$> \log$ 6.0 cfu/g	
BS/15							
IS/4	$2,07 \pm 0,56^a$ (1,30-2,53) ^b	4	A, C, D	0	/	0	/
10 d, $7,0\text{ °C}/3$	$2,86 \pm 2,70^a$ (0,70-5,89) ^b	2	A, D	1	B, C, D	0	/
10 d, $12,0\text{ °C}/3$	$6,05 \pm 2,83^a$ (4,04-8,05) ^b	1	C	1	A, C	1	A, B, C, D
20 d, $7,0\text{ °C}/3$	$5,59 \pm 3,36^a$ (3,61-9,47) ^b	0	/	2	C, D	1	C
20 d, $12,0\text{ °C}/2$	$5,96 \pm 1,29^a$ (5,05-6,87) ^b	0	/	1	C, D	1	D
RB/12							

IS/3	1,88±0,26^a (1,70-2,18) ^b	3	A, C	0	/	0	/
10 d, 7,0 °C/2	4,53±3,33^a (1,00-7,62) ^b	1	A	1	D	0	/
10 d, 12,0 °C/2	8,08±0,76^a (7,54-8,62) ^b	0	/	0	/	2	C, D
20 d, 7,0 °C/3	6,74±3,22^a (3,17-9,43) ^b	0	/	1	E	2	C
20 d, 12,0 °C/2	5,50±5,94^a (1,30-9,69) ^b	1	A	0	/	1	C
F/16							
IS/4	2,27±0,20^a (2,00-2,43) ^b	4	A	0	/	0	/
10 d, 7,0 °C/3	6,73±1,59^a (4,93-7,95) ^b	0	/	1	A, C, D	2	C, D, E
10 d, 12,0 °C/3	8,04±1,01^a (6,89-8,78) ^b	0	/	0	/	3	A, C, D
20 d, 7,0 °C/3	7,41±2,51^a (4,53-9,06)	0	/	1	A, C	2	A, C, D, E
20 d, 12,0 °C/3	8,20±2,07^a (5,81-9,52) ^b	0	/	1	A, D	2	C, E

Abkürzungen: BS - Bratstreifen; RB - Rostbratwürstchen; F - Faschiertes; IS - IS, log GKZ (cfu/g) - mittlere aerobe Gesamtkeimzahl +Standardabweichung ^a, Minimum – Maximum ^b; BG - Bakteriengruppe; A - aerobe Sporenbildner; B - gramnegative Oxidase-positive Stäbchen; C - gramnegative Oxidase-negative Stäbchen; D - Kokken; E - Milchsäurebakterien

5.2 Isolatergebnisse

Die aus allen Produkten isolierten Bakteriengruppen (n = 108 Isolate) sind überwiegend gramnegative Bakterien, Kokken und Sporenbildner sowie vereinzelt Milchsäurebakterien (siehe Abbildung 6). In der Abbildung 10 sind alle Kulturmorphologieformen fotografisch dargestellt, die als Ergebnis der Keimzählung auf TSA-Agar angezüchtet wurden. Die weitere Gruppierung erfolgte mittels Mikroskopie, KOH-, Katalase-, und Oxidase-Test. Die Beschreibung der Koloniemorphologie und die Ergebnisse der KOH-, Katalase- und Oxidase-Tests findet sich im Anhang, Tabelle 8.

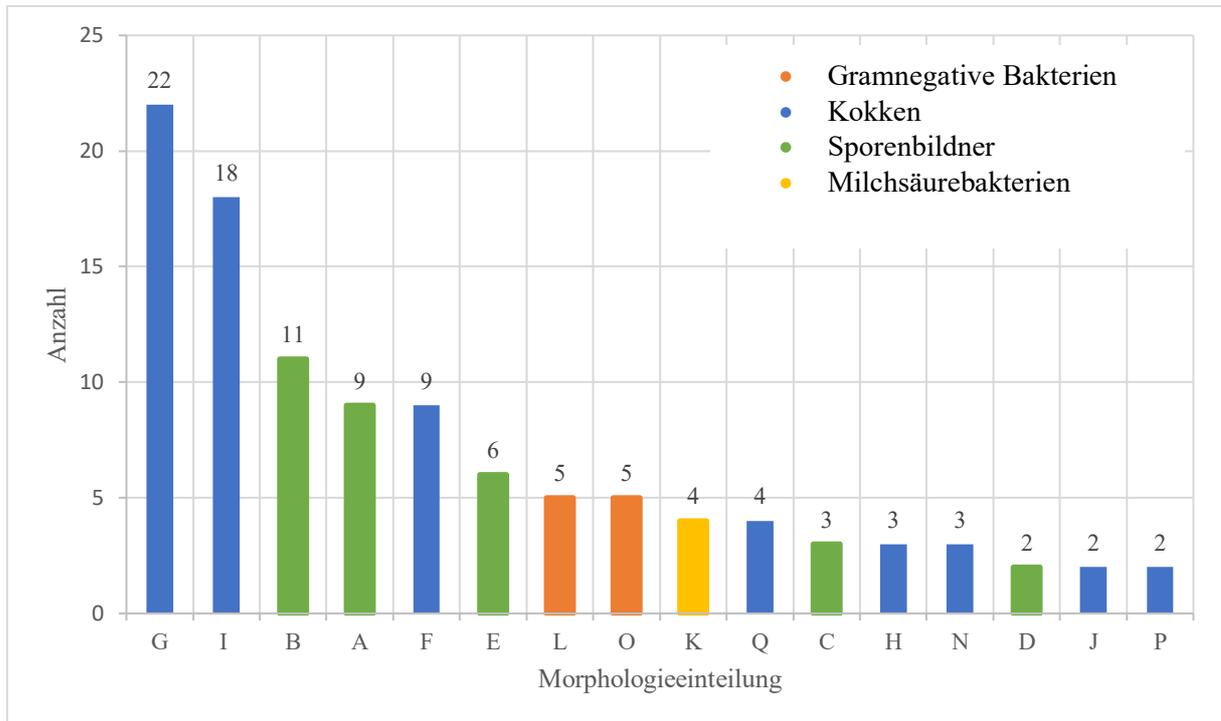


Abbildung 6: Verteilung der in den Proben nachgewiesenen Bakteriengruppen gruppiert nach Bakterienmorphologie, gramnegative Bakterien, Kokken, Sporenbildner und Milchsäurebakterien

Vor der Lagerung (IS – IS, Tag 0) wird in keinem der drei Produkte (Bratstreifen, Rostbratwürstchen, Faschiertes) das Kontaminationslevel „Mittel“ und „Hoch“ erreicht (siehe Tabelle 5, Abbildungen 7, 8, 9). Zu diesem Zeitpunkt werden in den Produkten regelmäßig verschiedene aerobe Sporenbildner, z. Teil auch gramnegative, Oxidase-negative Stäbchen und Kokken nachgewiesen. Wie in Tabelle 5 und in den Abbildungen 7, 8, 9 weiterhin ersichtlich, nimmt die Anzahl der Proben im mittleren und höheren Kontaminationslevel mit der Dauer der Lagerung zu und im Kontaminationslevel „hoch“ wird die Flora von gramnegativen Bakterien beherrscht.

Bratstreifen, Rostbratwürstchen und Faschiertes erreichen bei unterschiedlicher Lagerdauer und Temperatur verschiedene Kontaminationslevel (siehe Abbildungen 7, 8, 9). Bratstreifen und Rostbratwürstchen verhalten sich sehr ähnlich. Beim Faschiertes wird das höhere Kontaminationslevel schneller erreicht. Auffällig ist, dass manche Keimgruppen bei ein und derselben Produktcharge nachweisbar waren und im Laufe der Lagerung dann nicht mehr isoliert wurden. Bei allen Produkten fällt auf, dass von allen möglichen Keimgruppen (Sporenbildner, gramnegative Oxidase-positive Stäbchen, gramnegative Oxidase-negative

Stäbchen, Kokken, Milchsäurebakterien) nur gramnegative oxidasenegative Bakterien und Kokken übrigbleiben am Tag 20 nachgewiesen werden konnten.

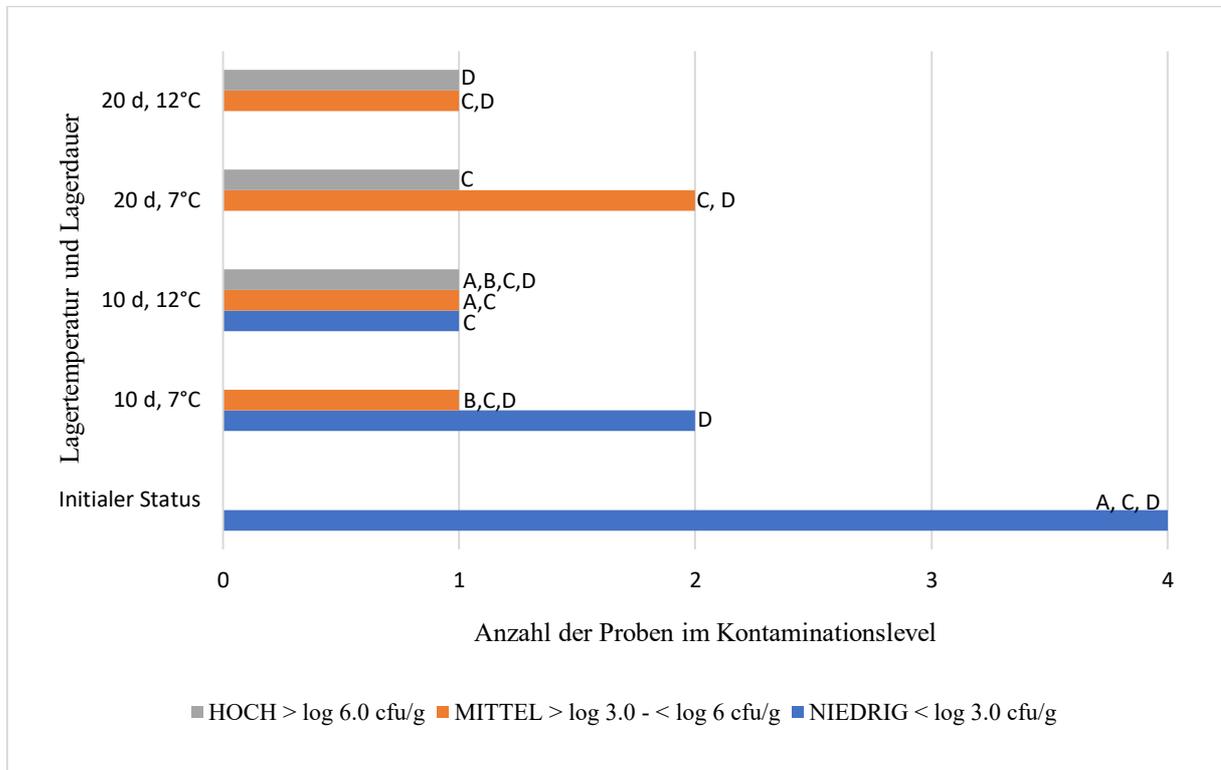


Abbildung 7: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Bratstreifen (BS) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C)

Abkürzungen: A - aerobe Sporenbildner; B - gramnegative Oxidase-positive Stäbchen; C - gramnegative Oxidase-negative Stäbchen; D - Kokken; E - Milchsäurebakterien

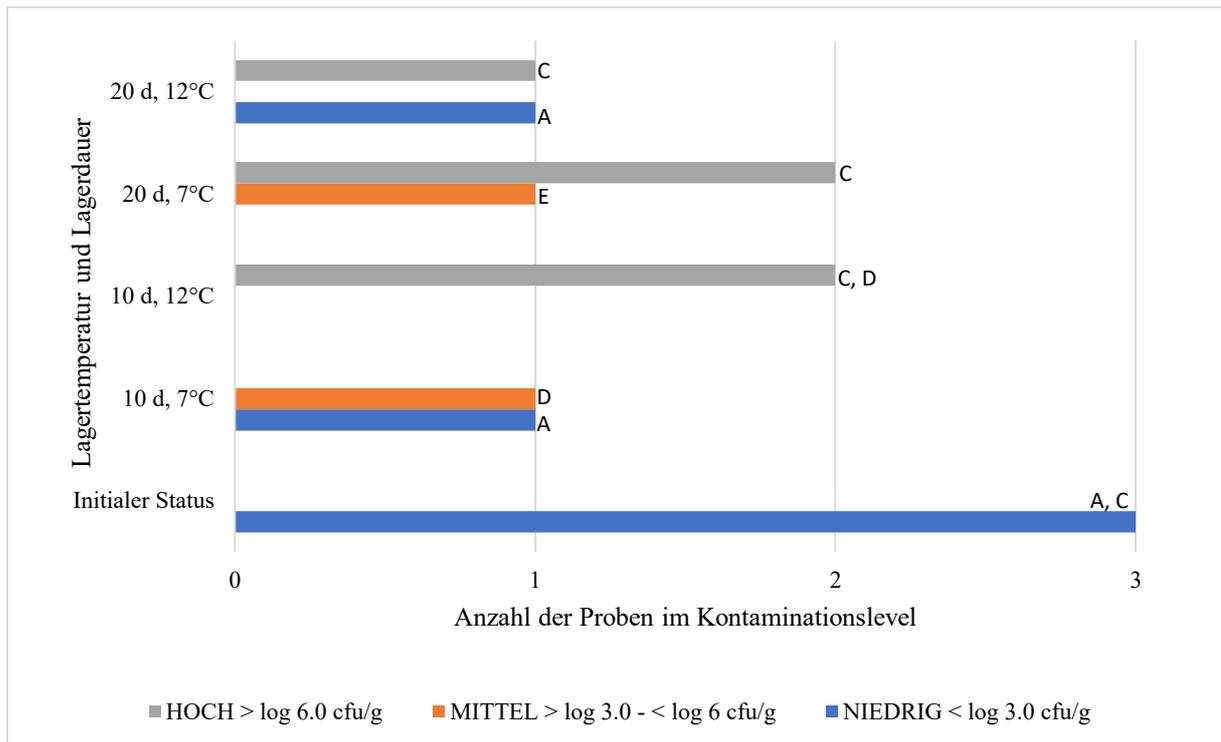


Abbildung 8: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Rostbratwürstchen (RS) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C)

Abkürzungen: A - aerobe Sporenbildner; B - gramnegative Oxidase-positive Stäbchen; C - gramnegative Oxidase-negative Stäbchen; D - Kokken; E - Milchsäurebakterien

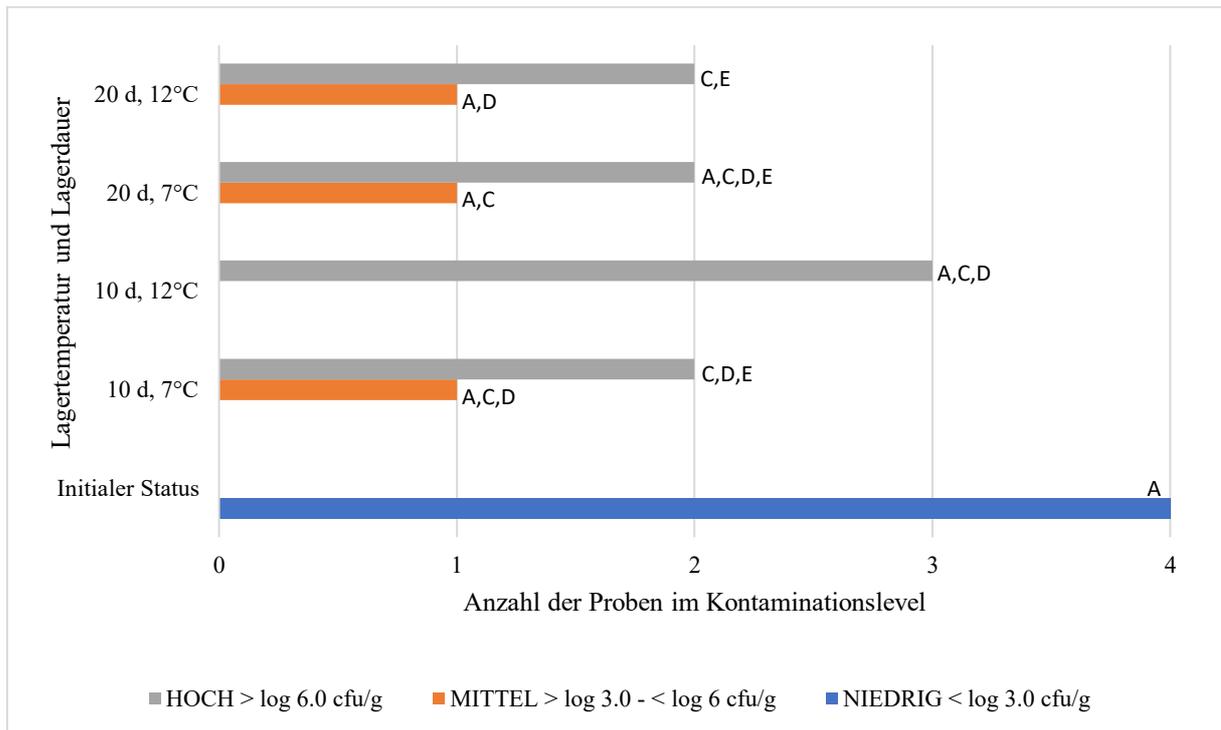


Abbildung 9: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Faschiertem (F) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C)

Abkürzungen: A - aerobe Sporenbildner; B - gramnegative Oxidase-positive Stäbchen; C - gramnegative Oxidase-negative Stäbchen; D - Kokken; E - Milchsäurebakterien

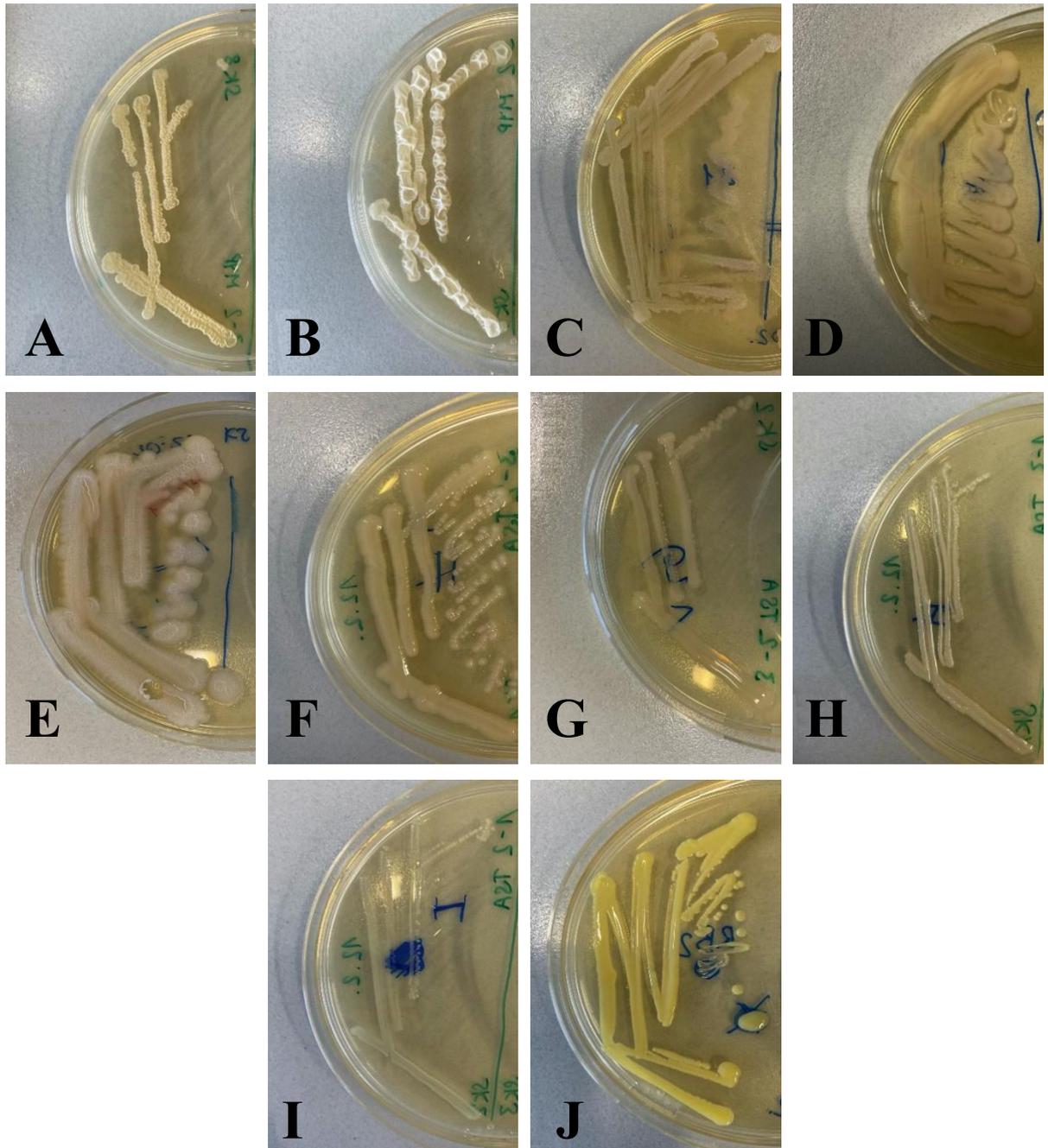


Abbildung 10: In den Proben nachgewiesene Kulturmorphologieformen, anzüchtbar auf TSA-Agar (Kristina Schmidhofer).

6 Diskussion

Unmittelbar nach der Herstellung und Verpackung (IS) ist die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl bei allen Produktgruppen niedrig (Kontaminationslevel „niedrig“). Mit zunehmender Lagerungszeit steigen die Keimzahlen an, wobei hohe Kontaminationslevel vor allem durch gramnegative, oxidasenegative Stäbchen verursacht werden. Es werden nach 20 Lagertagen bei 7,0 °C vereinzelt Keimzahlen von bis $\log 9,5$ KbE/g erreicht. Das zeigt, dass diese Vertreter zu den psychrotrophen Mikroorganismen zählen. Es zeigt sich außerdem, dass eine höhere Lagertemperatur erwartungsgemäß zu einem höheren Anstieg der Gesamtkeimzahlen führt. Bei dieser Lagertemperatur vermehren sich Kokken deutlich besser, als bei 7,0 °C.

Die Standardabweichung ist teilweise sehr groß, das heißt, dass die Werte der Keimzahlen in denselben Probentypen sehr stark variieren. Grundsätzlich benötigen Bakterien bei Kühltemperaturen einige Zeit, um sich zu vermehren (Anlaufphase). Generell sind zum initialen Untersuchungszeitpunkt, sowohl in Proben, welche später hohe Keimzahlen aufweisen, als auch jene Proben, die auch später noch niedrige Keimzahlen haben, nur niedrige Keimzahlen (niedriges Kontaminationslevel) beobachtet worden. Die Entwicklung mittlerer und hoher Kontaminationslevel in den Produkten ist entscheidend von der Bakterienart abhängig. In der vorliegenden Studie waren in den Produkten immer gramnegative Oxidase-negative Stäbchen, selten aerobe Sporenbildner und Kokken beteiligt.

Insgesamt wurden 108 Isolate aus den Proben gewonnen und mittels KOH-, Katalase- und Oxidase-Test differenziert und gruppiert. Dabei fällt auf, dass 27,78 % der Isolate zu den gramnegativen, Oxidase-negativen Stäbchen gehörten und in 46,67 % der mittleren und 60 % hoch kontaminierten Proben nach Lagerung zu finden sind. 4,62 % der gramnegativen Oxidase-positiven Isolate kommen in 6,67 % der mittleren und 0,00% der hoch kontaminierten Proben nach Lagerung vor. 28,70 % der Proben waren Sporenbildner. Im mittleren Kontaminationslevel machten sie 26,67 % und im hohen Kontaminationslevel 20,00 % der Isolate aus. Die Kokken machen 26,85 % der Proben aus. Im mittleren Kontaminationslevel als auch im hohen Kontaminationslevel machten sie 40,00 % der gefundenen Bakterien aus. Milchsäurebakterien machen 3,70 % der Isolate aus und wurden in nur 6,67 % der mittel- und 20,00 % der hochkontaminierten Proben nachgewiesen.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen dem Betrieb auf, dass die Verarbeitungshygiene nicht kontinuierlich umgesetzt wird. Die schwankenden Keimzahlen und die unterschiedlichen Keimzusammensetzungen in den gelagerten Produkten, zeigen, dass die Hygiene in der Verarbeitung und im Handling mit den Produkten unterschiedlich gut angewendet wird. Besonderes Augenmerk muss auf den Umgang mit den Produkten nach der Erhitzung gelegt werden. Neben einer guten Personalhygiene, zählt die Reinigung und Desinfektion von lebensmittelberührenden Kontaktflächen und Maschinen, wie der Wolf zum Herstellen des Faschierten oder die Wurstschälmaschine, unbedingt dazu. Über die Herkunft der gramnegativen Bakterien kann aufgrund der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. So könnten diese auch aus der Rohware (Pilz) stammen. Weiterführende Untersuchungen zur Charakterisierung der Isolate (16s rDNA-Sequenzierung), Nachweis von Enzymaktivitäten (z. B. Proteasen, Lipasen), die Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und die Anwendung geeigneter Fingerprintmethoden, können helfen im Produktionsbetrieb gezielte Maßnahmen zu setzen und somit die Lagerstabilität der Produkte langfristig und kontinuierlich zu gewährleisten.

7 Zusammenfassung

Ein österreichisches Lebensmittelunternehmen produziert auf Grundlage des Kräuterseitlings (*Pleurotus eryngii*) Bratstreifen, Rostbratwürstchen und Faschiertes. Diese werden in ausgewählten österreichischen Supermarktketten verkauft. Da im europäischen Lebensmittelrecht festgehalten ist, dass Sauberkeit und Hygiene der Produkte bis zum Mindesthaltbarkeitsdatum gewährleistet sein müssen, ist es notwendig, dass die Produkte bis zu diesem Zeitpunkt eine gute Qualität aufweisen.

Im Projekt wurden 43 Produktproben einen Tag nach der Verpackung (IS) und nach 10 und 20 tägiger Lagerung bei 7,0 und 12,0 °C auf ihre mikrobiologische Qualität geprüft. In den erhitzten Produkten wurden aerobe Sporenbildner erwartet, da deren Sporen den Erhitzungsprozess überleben. Gramnegative Bakterien, wie *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae*, Kokken sowie Milchsäurebakterien sollten in den Produkten nicht mehr nachweisbar sein.

Enterobacteriaceae und *Pseudomonadaceae* kommen in der Hauptzutat Pilz vor und einige wie *Ewingella americana*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas tolaasii* und *Pseudomonas fluorescens*, sind wichtige Verderbniserreger. Sie verursachen bei den Pilzen unterschiedlichste Erkrankungen wie die Braunfleckenkrankheit, lytischen Abbau und Verderbnisprozesse im Inneren des Pilzes oder auch an dessen Außenseite.

Zum Untersuchungszeitpunkt wurde bei den Proben die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl auf TSA-Agar (ISO 4833-2:2013) bestimmt. Anschließend wurde die dominierende Bakterienflora auf TSA-Agar anhand der Kulturmorphologie für die weitere Charakterisierung subkultiviert. 108 Isolate wurden für eine genauere Unterscheidung mit biochemischen Nachweisverfahren wie KOH-, Katalase-, und Oxidase-Tests gruppiert und in einer Kryokultur abgelegt.

Unmittelbar nach der Herstellung wurden in den Produkten meist Sporenbildner, aber zum Teil auch gramnegative Stäbchen und Kokken nachgewiesen. Während der Lagerung bei 7 und 12,0 °C wurde oft eine Zunahme der gramnegativen Stäbchen beobachtet, bei 12,0 °C konnten sich auch Kokken in den Produkten vermehren. Insgesamt waren Produkte, die keine Kontaminationen mit gramnegativen Stäbchen aufwiesen bis zum 20. Tag auch in der Qualität stabil. Waren die Produkte mit gramnegativen Bakterien kontaminiert, wurden auch Abweichungen in der Produktqualität festgestellt. Grundsätzlich gilt es in der Produktion nach der Erhitzung der Produkte die Rekontamination bis zur Verpackung zu vermeiden. Dabei ist

besonders auf eine gute Personalhygiene, auf eine erfolgreiche Reinigung und Desinfektion und die Vermeidung von Biofilmen zu achten. Für die genaue Ursachenanalyse sind weiterführende Untersuchungen, wie mikrobiologische Stufenkontrollen in der gesamten Produktionskette notwendig.

8 Abstract

An Austrian food company produces roast strips, sausages and minced meat on the basis of the king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). These are sold in selected Austrian supermarket chains. As European food law stipulates that cleanliness and hygiene of the products must be guaranteed until the best-before date, it is necessary that the products are of good quality until that date.

In the project, 43 product samples were tested for their microbiological quality one day after packaging (initial status) and after 10 and 20 days of storage at 7.0 °C and 12.0 °C. Aerobic spore formers were expected in the heated products, as their spores survive the heating process. Gram-negative bacteria such as *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*, cocci and lactic acid bacteria should no longer be detectable in the products.

Enterobacteriaceae and *Pseudomonadaceae* occur in the main ingredient mushroom and some such as *Ewingella americana*, *Pseudomonas agarici*, *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas fluorescens* are important spoilage organisms. They cause a wide variety of diseases in mushrooms, such as brown spot disease, lytic decomposition and spoilage processes inside the mushroom or on its outside.

At the time of investigation, the aerobic mesophilic total bacterial count was determined on TSA agar (ISO 4833-2:2013). Subsequently, the dominant bacterial flora was subcultivated on TSA-agar for further characterization based on the culture morphology. 108 isolates were grouped for more precise differentiation using biochemical detection methods such as KOH, catalase and oxidase tests and placed in cryoculture.

Immediately after production, the products mostly contained spore formers, but sometimes also gram-negative rods and cocci were detected. During storage at 7.0 °C and 12.0 °C, an increase in gram-negative rods was often observed; at 12.0 °C, coccus was also able to multiply in the products. In total, products that were not contaminated with gram-negative rods were stable in quality until the 20th day. If the products were contaminated with gram-negative bacteria, deviations in product quality were also detected. As a matter of principle, it is important to avoid recontamination in production after the products have been heated until they are packaged. Particular attention must be paid to good personal hygiene, successful cleaning and disinfection and the prevention of biofilms. Further investigations, such as microbiological

step-by-step controls in the entire production chain, are necessary for a precise analysis of the causes.

9 Funding information

The COMET-K1 competence centre FFoQSI is funded by the Austrian ministries BMVIT, BMDW and the Austrian provinces Lower Austria, Upper Austria and Vienna within the scope of COMET - Competence Centers for Excellent Technologies. The programme COMET is handled by the Austrian Research Promotion Agency FFG.

The strategic objectives of COMET are: developing new expertise by initiating and supporting long-term research co-operations between science and industry in top-level research, and establishing and securing the technological leadership of companies. By advancing and bundling existing strengths and by integrating international research expertise Austria is to be strengthened as a research location for the long term.



 Federal Ministry
Republic of Austria
Digital and
Economic Affairs

 Federal Ministry
Republic of Austria
Transport, Innovation
and Technology



10 Abkürzungsverzeichnis

BS	Bratstreifen
F	Faschiertes
GN	Gramnegative oxidasenegative Stäbchen
GNOX	Gramnegative oxidasepositive Stäbchen
GZK	Mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl
IS	Initialer Status
KG	Keimzahl
KOK	Kokken
LAB	Milchsäurebakterien
Log GKZ [(cfu/g)]	Mittlere aerobe Gesamtkeimzahl \pm Standardabweichung
Max	Maximum
Min	Minimum
RB	Rostbratwürstchen
SPB	Aerobe Sporenbildner
16S rDNA	Ribosomale DNA

11 Literaturverzeichnis

- [1] H. Keweloh, *Mikroorganismen in Lebensmitteln*, 6. Fachbuchverlag Pfanneberg, 2016 .
- [2] G. Hartwig, H. Von der Linden, and H. P. Skrobisch, *Thermische Konservierung in der Lebensmittelindustrie*, 2. Hamburg: Behr's Verlag, 2014.
- [3] M. Jahn *et al.*, "Life Sciences and Engineering Einflussfaktoren auf die Effektivität von Pasteurisations- und Sterilisationsverfahren," no. 4, pp. 470–475, 2004, doi: 10.1002/cite (accessed 07.03.2020).
- [4] H. G. . SCHLEGEL, "Allgemeine Mikrobiologie," *Stuttgart:Thieme*, vol. 7. Auflage, 1992.
- [5] P. Setlow, "Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 101, no. 3, pp. 514–525, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x. (accessed 12.04.2020).
- [6] F. Carlin, "Origin of bacterial spores contaminating foods," *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 177–182, 2011, doi: 10.1016/j.fm.2010.07.008 (accessed 02.03.2020).
- [7] N. Agata, M. Ohta, and K. Yokoyama, "Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 73, no. ISSN: 0168-1605, p. 27, 2002, doi: 10.1016/S0168-1605(01)00692-4 (accessed 07.03.2020)..
- [8] S. Ceuppens *et al.*, "Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications," *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 37, no. 3, pp. 188–213, 2011, doi: 10.3109/1040841X.2011.558832(accessed 09.03.2020).
- [9] A. Ultee and E. J. Smid, "Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 64, no. 3, pp. 373–378, 2001, doi: 10.1016/S0168-1605(00)00480-3(accessed 14.03.2020).
- [10] A. C. P. Euzéby, "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net)." <https://lpsn.dsmz.de/class/gammaproteobacteria> (accessed 06.05.2020).
- [11] K. P. Williams *et al.*, "Phylogeny of gammaproteobacteria," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 9, pp. 2305–2314, 2010, doi: 10.1128/JB.01480-09 (accessed 16.04.2020).
- [12] B. Gao, R. Mohan, and R. S. Gupta, "Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 59, no. 2, pp. 234–247, 2009, doi: 10.1099/ijs.0.002741-0 (accessed 30.03.2020).

- [13] R. F. Maldonado, I. Sá-Correia, and M. A. Valvano, “Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 480–493, 2016, doi: 10.1093/femsre/fuw007 (accessed 14.05.2020).
- [14] W. Vollmer and J. V. Höltje, “The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: Vertical scaffold or horizontal layer(s)?,” *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 18, pp. 5978–5987, 2004, doi: 10.1128/JB.186.18.5978-5987.2004 (accessed 20.03.2020).
- [15] R. P. Gabapentin and A. Hplc, *GABA R-Antikörper* . 2019 (accessed 28.03.2020).
- [16] C. de W. Blackburn, *Food Spoilage Microorganisms*, 1. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, 2006.
- [17] E. Jakob, H. Winkler, and J. Haldemann, “Mikrobiologische Kriterien in der Käsefabrikation,” *ALP Forum der Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP*, no. 77, 2010.
- [18] J. Baumgart, B. Becker, and R. Stephan, *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln: Ein Leitfanden für das Studium*. Behr’s Verlag, 2015.
- [19] I. K. Toth, K. S. Bell, M. C. Holeva, and P. R. J. Birch, “Soft rot erwiniae: From genes to genomes,” *Mol. Plant Pathol.*, vol. 4, no. 1, pp. 17–30, 2003, doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00149.x (accessed 21.04.2020).
- [20] W. Sledz *et al.*, “Antibacterial activity of caffeine against plant pathogenic bacteria,” *Acta Biochim. Pol.*, vol. 62, no. 3, pp. 605–612, 2015, doi: 10.18388/abp.2015_1092 (accessed 11.05.2020).
- [21] E. G. De Haan, T. C. E. M. Dekker-Nooren, G. W. Van Den Bovenkamp, A. G. C. L. Speksnijder, P. S. Van Der Zouwen, and J. M. Van Der Wolf, “Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum can cause potato blackleg in temperate climates,” *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 122, no. 4, pp. 561–569, 2008, doi: 10.1007/s10658-008-9325-y (accessed 12.05.2020).
- [22] M. Waleron, K. Waleron, and E. Lojkowska, “Characterization of Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum causing soft rot of stored vegetables,” *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 139, no. 3, pp. 457–469, 2014, doi: 10.1007/s10658-014-0403-z (accessed 23.04.2020).
- [23] K. Gasic *et al.*, “Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum - the causal agent of

- broccoli soft rot in Serbia,” *Pestic. i fitomedicina*, vol. 29, no. 4, pp. 249–255, 2014, doi: 10.2298/pif1404249g (accessed 13.05.2020).
- [24] R. Van Houdt, P. Moons, A. Jansen, K. Vanoirbeek, and C. W. Michiels, “Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 246, no. 2, pp. 265–272, 2005, doi: 10.1016/j.femsle.2005.04.016 (accessed 06.05.2020).
- [25] M. Madigan, J. Martinko, and J. Parker, *Brock Mikrobiologie.*, 1. Heidelberg/Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2000.
- [26] S. Neupane *et al.*, “Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* strain AS12,” *Stand. Genomic Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 165–173, 2012, doi: 10.4056/sigs.2705996 (accessed 18.04.2020).
- [27] R. Van Hout *et al.*, “Genome Sequence of *Serratia plymuthica* RVH1, Isolated from a Raw Vegetable-Processing Line,” 2014, doi: 10.1128/genomeA.00021-14 (accessed 17.05.2020).
- [28] E. Wevers, P. Moons, R. Van Houdt, I. Lurquin, A. Aertsen, and C. W. Michiels, “Quorum sensing and butanediol fermentation affect colonization and spoilage of carrot slices by *Serratia plymuthica*,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 63–69, 2009, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.017 (accessed 03.05.2020).
- [29] J. Frankowski, M. Lorito, F. Scala, R. Schmid, G. Berg, and H. Bahl, “Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48,” *Arch. Microbiol.*, vol. 176, no. 6, pp. 421–426, 2001, doi: 10.1007/s002030100347 (accessed 22.05.2020).
- [30] M. Kahala, L. Blasco, and V. Joutsjoki, “Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot,” *J. Food Prot.*, vol. 75, no. 3, pp. 523–532, 2012, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185. (accessed 04.04.2020).
- [31] J. Nechwatal and S. Theil, “*Erwinia persicina* associated with a pink rot of parsley root in Germany,” *J. Plant Dis. Prot.*, vol. 126, no. 2, pp. 161–167, 2019, doi: 10.1007/s41348-018-0200-6 (accessed 13.03.2020).
- [32] H. Cho *et al.*, “Whole-Genome Sequence of *Erwinia persicina* B64, Which Causes Pink Soft Rot in Onions,” no. September 2018, pp. 21–23, 2019, doi: 10.1128/MRA.01302-18 (accessed 29.03.2020).

- [33] P. W. Inglis, J. L. Burden, and J. F. Peberdy, "Evidence for the association of the enteric bacterium *Ewingella americana* with internal stipe necrosis of *Agaricus bisporus*," *Microbiology*, vol. 142, no. 11, pp. 3253–3260, 1996, doi: 10.1099/13500872-142-11-3253 (accessed 15.04.2020).
- [34] K. A. Bhat *et al.*, "Current Status of Post Harvest Soft Rot in Vegetables: A Review," *Asian J. Plant Sci.*, vol. 9, pp. 200–208, 2010, doi: 10.3923/ajps.2010.200.208 (accessed 16.04.2020).
- [35] M. E. Venturini, J. E. Reyes, C. S. Rivera, R. Oria, and D. Blanco, "Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain," *Food Microbiol.*, vol. 28, no. 8, pp. 1492–1498, 2011, doi: 10.1016/j.fm.2011.08.007 (accessed 19.03.2020).
- [36] A. J. González, F. J. Gea, M. J. Navarro, and A. M. Fernández, "Identification and RAPD-typing of *Ewingella americana* on cultivated mushrooms in Castilla-La Mancha, Spain," *Eur. J. Plant Pathol.*, vol. 133, no. 3, pp. 517–522, 2012, doi: 10.1007/s10658-012-9952-1 (accessed 09.03.2020).
- [37] P. W. Inglis and J. F. Peberdy, "Production and purification of a chitinase from *Ewingella americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 157, no. 1, pp. 189–194, 1997, doi: 10.1016/S0378-1097(97)00475-8 (accessed 19.04.2020).
- [38] L. Caldera *et al.*, "Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods," *Food Microbiol.*, vol. 54, pp. 142–153, 2016, doi: 10.1016/j.fm.2015.10.004 (accessed 07.05.2020).
- [39] Y. Masson, P. Ainsworth, D. Fuller, H. Bozkurt, and Ş. Ibanoglu, "Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere," *J. Food Eng.*, vol. 54, no. 2, pp. 125–131, 2002, doi: 10.1016/S0260-8774(01)00193-5 (accessed 23.03.2020).
- [40] M. R. Brown and J. H. Foster, "A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Clin. Pathol.*, vol. 23, no. 2, pp. 172–177, 1970, doi: 10.1136/jcp.23.2.172 (accessed 07.05.2020).
- [41] R. Bibek, *Fundamental Food Microbiology*, 3. CRC Press, 2004.

- [42] T. R. Patel, D. M. Jackman, G. J. Williams, and F. M. Bartlett, "Physicochemical properties of heat-stable proteases from psychrotrophic pseudomonads," *J. Food Prot.*, vol. 49, no. 3, pp. 183–188, 1986, doi: 10.4315/0362-028X-49.3.183 (accessed 23.05.2020).
- [43] S. Rajmohan, C. E. R. Dodd, and W. M. Waites, "Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 93, no. 2, pp. 205–213, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01674.x (accessed 06.05.2020).
- [44] S. Bendicho, C. Estela, J. Giner, G. V. Barbosa-Cánovas, and O. Martín, "Effects of high intensity pulsed electric field and thermal treatments on a lipase from *Pseudomonas fluorescens*," *J. Dairy Sci.*, vol. 85, no. 1, pp. 19–27, 2002, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74048-4 (accessed 23.04.2020).
- [45] C. H. Liao, J. Sullivan, J. Grady, and L. J. C. Wong, "Biochemical characterization of pectate lyases produced by fluorescent pseudomonads associated with spoilage of fresh fruits and vegetables," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 83, no. 1, pp. 10–16, 1997, doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00158.x (accessed 17.05.2020).
- [46] J. M. T. Hamilton-Miller and S. Shah, "Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 18, no. 1, pp. 81–83, 2001, doi: 10.1016/S0924-8579(01)00353-3 (accessed 27.04.2020).
- [47] P. Munsch, T. Alatossava, N. Marttinen, J. M. Meyer, R. Christen, and L. Gardan, "*Pseudomonas constantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 52, no. 6, pp. 1973–1983, 2002, doi: 10.1099/ijs.0.02090-0 (accessed 08.04.2020).
- [48] H. I. Lee, K. S. Jeong, and J. S. Cha, "PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 35, no. 4, pp. 276–280, 2002, doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01178.x (accessed 17.05.2020).
- [49] R. As and Q. Pests, "Oepp Eppo," vol. 2, no. September, pp. 1–9, 2013, [Online]. Available: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMTL/documents> (accessed 18.04.2020).
- [50] P. Lo Cantore, A. Giorgio, and N. S. Iacobellis, "Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. OCT, pp.

- 1–14, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.01082 (accessed 30.04.2020).
- [51] R. As and Q. Pests, “Oepp Eppo,” vol. 2, no. September, pp. 1–9, 2013, [Online]. Available: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMTL/documents> (accessed 18.04.2020).
- [52] H. T. D. Nguyen *et al.*, “Characterization of bacteriophage ϕ Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 91, no. 3, pp. 514–519, 2012, doi: 10.1016/j.mimet.2012.09.032 (accessed 19.04.2020).
- [53] “*Pseudomonas agarici*.” <https://www.plantwise.org/knowledgebank/datasheet/44929#HostPlantsSection> (accessed 30.05.2020).
- [54] G. Warwick and C. Tony, “Aspects of the pathology and etiology of ‘drippy gill’ disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*,” vol. 258, pp. 246–258, 2000, [Online]. Available: <https://doi.org/10.1139/w99-133> (accessed 21.03.2020)..
- [55] J. M. Young, “Drippy gill: A bacterial disease of cultivated mushrooms caused by *Pseudomonas agarici* n.sp.,” *New Zeal. J. Agric. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 977–990, 1970, doi: 10.1080/00288233.1970.10430530 (accessed 21.05.2020).
- [56] W. H. . Holzapfel and B. Wood, *The genus Lactobacillus*, 1st ed. Springer US, 1995.
- [57] M. Bernardeau, J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet, and M. Guéguen, “Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 126, no. 3, pp. 278–285, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015 (accessed 23.04.2020).
- [58] P. Studium, M. Grundpraktikum, and E. Farbatlas, “Biochemische Tests zur Identifizierung von Bakterien,” 2006 .
- [59] M. Alfonso-Prieto, X. Biarnés, P. Vidossich, and C. Rovira, “The molecular mechanism of the catalase reaction,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 33, pp. 11751–11761, 2009, doi: 10.1021/ja9018572 (accessed 27.05.2020)..
- [60] I. Yumoto *et al.*, “Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1(T) exhibiting high catalase activity,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 7, pp. 1903–1909, 2000, doi: 10.1128/JB.182.7.1903-1909.2000 (accessed 24.03.2020).
- [61] K. Reiner, “Catalase-Test-Protocol.pdf,” no. November 2010, pp. 1–9, 2010, doi:

- 66.208.62.130 (accessed 13.04.2020).
- [62] A. M. Bourgault and F. Lamothe, "Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 26, no. 10, pp. 2144–2146, 1988, doi: 10.1128/jcm.26.10.2144-2146.1988 (accessed 25.04.2020).
- [63] E. M. Powers, "Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 10, pp. 3756–3758, 1995, doi: 10.1128/aem.61.10.3756-3758.1995 (accessed 21.04.2020).
- [64] B. Alberts *et al.*, *Molecular Biology of the cell*, 6. New York: Garland Science, 2015.
- [65] P. Shields and L. Cathcart, "Oxidase Test Protocol - Library," *ASM Conf. Undergrad. Educ.*, no. November 2010, pp. 1–5, 2010, [Online]. Available: <https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf> (accessed 12.04.2020)..
- [66] G. Condemine and A. Ghazi, "Differential regulation of two oligogalacturonate outer membrane channels, KdgN and KdgM, of *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi*)," *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 16, pp. 5955–5962, 2007, doi: 10.1128/JB.00218-07 (accessed 24.04.2020).
- [67] T. Gaschott, D. Steinhilber, V. Milovic, and J. Stein, "Tributyryn, a Stable and Rapidly Absorbed Prodrug of Butyric Acid, Enhances Antiproliferative Effects of Dihydroxycholecalciferol in Human Colon Cancer Cells," *J. Nutr.*, vol. 131, no. 6, pp. 1839–1843, 2001, doi: 10.1093/jn/131.6.1839 (accessed 26.04.2020).
- [68] "Gelatin Hydrolysis Test- Principle, Uses, Media, Procedure and Result." <https://microbiologynotes.com/gelatin-hydrolysis-test-principle-uses-media-procedure-and-result/> (accessed 30.05.2020).
- [69] Hermann Fleischlos GmbH, "Hermann Bio Website." <https://hermann.bio/produkte/>(accessed 07.03.2020).

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien des Bakterienwachstums	2
Abbildung 2: Skizze einer Spore,[5]	5
Abbildung 3: v.l.n.r.: Rostbratwürstchen, Bratstreifen, Faschiertes.....	19
Abbildung 4: Errechnung der Gesamtkeimzahl [18].....	21
Abbildung 5: Skizze des Verdünnens der Kolonien auf der Subkulturplatte.....	22
Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der in den Proben gefundenen Morphologien	25
Abbildung 7: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Bratstreifen (BS) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C).....	26
Abbildung 8: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Rostbratwürstchen (RS) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C).....	27
Abbildung 9: Kategorisierung der mikrobiologischen Kontamination von Faschiertem (F) (Anzahl der Proben im Kontaminationslevel bezogen auf die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ) zum initialen Status und nach 10 und 20 d Lagerung, bei 7,0 °C, 12,0 °C).....	28
Abbildung 10: Morphologiegruppen	29

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Enterobacteriaceae, die zum Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen führen.....	11
Tabelle 2: Ausgewählte Pseudomonadaceae, die zum Verderb von pflanzlichen Lebensmitteln und Pilzen führen.....	14
Tabelle 3: Verdünnungsstufen.....	20
Tabelle 4: Zusammensetzung Kryomedium.....	22
Tabelle 5: Zusammenstellung mittleren aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl und Kontaminationslevel.....	23
Tabelle 6: Produkt-ID Bratstreifen und Faschiertes	47
Tabelle 7: Rostbratwürstchen Produkt-ID.....	48
Tabelle 8: Morphologieeinteilung	49

14 Anhang

Tabelle 6: Produkt-ID Bratstreifen und Faschiertes

Bratstreifen			Faschiertes		
Produkt-ID	Lagerdauer (Tage)	Lagertemperatur (°C)	Produkt-ID	Lagerdauer (Tage)	Lagertemperatur (°C)
1-1	0	frisch	3-1	0	frisch
1-2	10	7	3-2	10	7
1-3	10	12	3-3	10	12
1-4	20	7	3-4	20	7
1-5	20	12	3-5	20	12
1-6	30	7	6-1	0	frisch
1-7	30	12	6-2	10	7
4-1	0	frisch	6-3	10	12
4-2	10	7	6-4	20	7
4-3	10	12	6-5	20	12
4-4	20	7	9-1	0	frisch
4-5	20	12	9-2	10	7
4-6	30	7	9-3	10	12
4-7	30	12	9-4	20	7
7-1	0	frisch	9-5	20	12
7-2	10	7	15-1	0	frisch
7-3	10	12			
7-4	20	7			
7-5	20	12			
10-1	0	frisch			
10-2	12	7			
10-3	12	12			
10-4	20	7			
10-5	20	12			

16-1	0	frisch
16-2	12	7
16-3	12	12
16-4	20	7
16-5	20	12

Tabelle 7: Rostbratwürstchen Produkt-ID

Rostbratwürstchen		
Produkt-ID	Lagerdauer (Tage)	Lagertemperatur (°C)
2-1	0	frisch
2-2	10	7
2-3	10	12
2-4	20	7
2-5	20	12
5-1	0	frisch
5-2	10	7
5-3	10	12
5-4	20	7
5-5	20	12
8-1	0	frisch
8-2	10	7
8-3	10	12
8-4	20	7
8-5	20	12
11-1	0	frisch
11-2	12	7
11-3	12	12
11-4	20	7
11-5	20	12

Tabelle 8: Morphologieeinteilung

Einteilung	Morphologie	KOH	Katalase	Oxidase	Art der Kolonie
A	Weißlich, Rädchen, mit Faden, grau	-	+	k.A.	Sporenbildner
B	Turmbildend, weiß, innen schleimig	-	+	+	Sporenbildner
C	Glatt, stumpf, beige, flach wachsend	-	+	-	Sporenbildner
D	Leicht glänzend, flach	-	k.A.	k.A.	Sporenbildner
E	Ähnlich Bacillus cereus	-	+	+	Sporenbildner
F	Erhaben, konvex, glänzend, cremig	-	+	+	Kokken
G	Transparent, glänzend, leicht gelblich	+	+	-	Kokkoide Stäbchen
H	Kugelig, weiß, erhoben	+	+	-	Kokken
I	Glänzend, feucht, weiß	-	-	-	Diplokokken
J	Gelb, erhoben	-	+	-	Kokken
K	Sehr klein, weißlich, rund, Mitte gelblich, „Zygotenartig“	-	-	-	Kurze plumpe Stäbchen
L	Gleiche Morphologie wie F	+	+	-	

M	Gleiche Morphologie wie I	+	+	+	
N	Gleiche Morphologie wie G	-	+	-	
O	Gleiche Morphologie wie G	+	+	+	