

Aus dem Department für Nutztiere,
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

Enzymaktivitäten und Vermehrungsverhalten in Abhängigkeit von der Temperatur von aus pilzhaltigen Convenienceprodukten isolierten Bakterien

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von

Barbara Bachheimer

Wien, im September 2021

Betreuerin:

Dr. med. vet. Martina Ludewig Dipl. ECVPH

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Abteilung Lebensmittelmikrobiologie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bakterienvermehrung und mikrobieller Verderb von Lebensmitteln	1
1.1.1 Grundlagen der Vermehrung	1
1.1.2 Mikrobieller Verderb und Grundlagen der Enzymaktivität	3
1.2 Verderbnis-assoziierte Bakteriengruppen	6
1.2.1 Vorkommen	6
1.2.2 Vermehrung in Abhängigkeit von der Temperatur	8
1.2.3 Enzymaktivitäten	11
1.3 Ziel der Untersuchungen und Hypothesen	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte und Materialien	15
2.1.2 Untersuchte Bakterienisolate	15
2.2 Methoden	18
2.2.1 Anzucht der Bakterienisolate	18
2.2.2 Durchführung der Versuche	18
2.2.2.1 Vermehrungsverhalten in Abhängigkeit von der Lagertemperatur	18
2.2.2.2 Nachweis von Enzymen	19
2.2.2.2.1 Nachweis der Gelatinaseaktivität	19
2.2.2.2.2 Nachweis der Lipaseaktivität	20
2.2.2.2.3 Nachweis der Mannitfermentation und Lezithinaseaktivität	21
2.2.3 Auswertung der Ergebnisse	22
3. Ergebnisse	24
3.1 Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur	24
3.1.1 Wachstumsverhalten von gramnegativen und grampositiven Isolaten	24
3.1.2 Wachstumsverhalten ausgewählter Spezies, Genera bzw. Gruppen	25
3.2 Enzymaktivität	26
3.2.1 Fähigkeit gramnegativer und grampositiver Isolate Gelatine bei 25 und 30 °C abzubauen	26
3.2.2 Fähigkeit gramnegativer und grampositiver Isolate Mannit abzubauen, sowie Lipase und Lezithinase bei 30 °C zu exprimieren	27
3.2.3 Fähigkeit von Isolaten ausgewählter Spezies, Genera bzw. Gruppen Gelatine, Lipide, Lezithin und Mannitol abzubauen	28

3.3	Zusammenhang zwischen Keimzahl und Wachstumsverhalten bzw. Enzymaktivität von einzelnen Bakterienspezies in den Endprodukten am Ende des MHD	29
3.4	Im Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine) vorkommende Bakterienisolate	31
3.5	In der Rohware (Pilz und rohem Zwischenprodukt) sowie in den Gewürzen vorkommenden Bakterienisolate	32
4.	Diskussion	34
4.1.	Wachstumsverhalten und Enzymaktivität der Bakterienisolate im Vergleich mit der Literatur	34
4.2	Zusammenhang zwischen dem Kontaminationslevel und dem Wachstumsverhalten von, aus den Endprodukten am Ende des MHD, isolierten Bakteriengruppen	37
4.3.	Mögliche Kontamination der Endprodukte über das Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine).....	37
4.4	Mögliche Kontamination der Endprodukte durch Bakterien aus dem Rohstoff (Kräuterseitling), den Gewürzen und dem gewolfen, rohen Zwischenprodukt ...	38
4.5	Schlussfolgerung	38
5.	Zusammenfassung	40
6.	Summary	41
7.	Abkürzungsverzeichnis	42
8.	Literaturverzeichnis	43
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	54
10.	Anhang	56

1. Einleitung

Lebensmittel werden heute zunehmend als küchenfertige Produkte in den Lebensmittelverkehr gebracht. Je nach dem Grad der Bearbeitung werden insgesamt fünf Convenience-stufen unterschieden. Produkte, die lediglich erhitzt bzw. regeneriert oder direkt zum Verzehr hergestellt werden, sind bei den KonsumentInnen besonders beliebt. Der Umsatz mit Convenience Lebensmitteln stieg in Österreich in den vergangenen Jahren beträchtlich von einer Milliarde Euro im Jahr 2011 auf 1,4 Milliarden Euro im Jahr 2018 (Statista. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/782192/umfrage/umsatz-mit-fertiggerichten-im-lebensmitteleinzelhandel-in-oesterreich/> (Zugriff 11.2.21)). In dem Projekt wird ein Teilaspekt einer komplexen Fragestellung zur mikrobiologischen Qualität von vegetarischen Convenienceprodukten bearbeitet. Grundsätzlich müssen Lebensmittelunternehmer nach der Verordnung (EG) Nr. 178/2002 die Sicherheit aller an den Handel abgegebenen Produkte mindestens bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums [Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD)] gewährleisten. Im Fokus stehen die gesundheitliche Unbedenklichkeit (kein Nachweis von pathogenen Mikroorganismen), sowie die produktspezifische Qualität, die u. a. von unerwünschten Mikroorganismen negativ beeinflusst werden kann. Um diese Anforderungen erfüllen zu können, müssen bei der Verarbeitung die in der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 allgemeinen und spezifischen Hygienevorschriften eingehalten werden. Das umfasst u. a. die Einhaltung von mikrobiologischen Kriterien (Lebensmittelsicherheitskriterien und Prozesshygienekriterien) für die spezifische Produktgruppe. Nach der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 muss in allen Lebensmitteln das Sicherheitskriterium *Listeria monocytogenes* eingehalten werden. Für verarbeitete vegetarische Erzeugnisse wurden keine weiteren mikrobiologischen Kriterien festgelegt. In diesem Fall muss das Lebensmittelunternehmen intern Kriterien für die jeweilige Produktgruppe festlegen.

1.1 Bakterienvermehrung und mikrobieller Verderb von Lebensmitteln

1.1.1 Grundlagen der Vermehrung

Der Lebensraum der Bakterien ist äußerst facettenreich und ebenso deren Wachstumsansprüche. Gedeihen manche – aufgrund ihrer hohen Ansprüche – nur auf bestimmten Substraten, wachsen andere fast überall. Einige Bakterien bilden unter Stressbedingungen (z. B. Hitze, Kälte, Trockenheit, Nährstoffmangel, chemische Einflüsse) Endosporen, die das Überleben sichern und über lange Zeiträume stabil bleiben. Verbessern sich die Umwelt-

verhältnisse bzw. die Nährstoffangebote entwickeln sich wieder vegetative Zellen aus den Sporen (POSTOLLEC ET AL. 2012).

Bakterielles Wachstum läuft immer in vier Phasen ab, wobei in der ersten Phase (lag-Phase) noch keine Vermehrung stattfindet, da sich die Bakterien zunächst an ihre Umgebung anpassen müssen, um die zur Verwertung vorhandener Nährstoffe benötigten Enzyme zu bilden. In dieser Phase besteht auch für geschädigte Bakterien die Chance sich zu regenerieren. Die Länge der lag-Phase wird durch verschiedene Faktoren, wie Anzahl der Bakterienzellen im Substrat, die physiologischen Eigenschaften der Bakterien (z. B. Ursprungswirt, erworbene Adaptionsmechanismen) und die physikalisch-chemischen Verhältnisse im Substrat (z. B. a_w -, pH-Wert) beeinflusst (SWINNEN ET AL. 2004). Der Anpassungsphase folgt eine Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) (BERTRAND 2019). Die Verdoppelungszeit von Bakterien ist sehr kurz und liegt unter optimalen Kulturbedingungen bei *Enterobacteriaceae* zwischen 20 und 24 Minuten, bei *Pseudomonas (P.) fluorescens* bei 52 Minuten (LUDEWIG & FEHLHABER 2009). Aufgrund der raschen Vermehrung kommt es zur Abnahme des Nährstoffangebotes und zum Anstieg bakterieller Stoffwechselprodukte, wodurch das Wachstum allmählich zum Erliegen kommt (stationäre Phase) (BERTRAND 2019). Dies führt auch zu Veränderungen an der Bakterienzelle (z. B. Zunahme der Peptidoglykanschicht und des periplasmatischen Raumes, Herunterfahren der ribosomalen Aktivitäten), welche die Stresstoleranz gegenüber den veränderten Bedingungen erhöhen und das Überleben der Zelle sichern (JAISHANKAR & SRIVASTAVA 2017). Andererseits werden in dieser Phase u. a. Enzyme und Toxine exprimiert. Zudem benötigen Bakterien für die Vermehrung ein Mindestangebot an Nährstoffen, z. B. Kohlenstoffquellen, Kohlenhydrate und Salze. Die Wertigkeit der Stoffe beeinflusst auch die Geschwindigkeit in der Vermehrungsphase. *Escherichia coli* vermehrt sich in einem mit Glukose angereicherten Medium dreimal schneller als in einem Minimalmedium (EHRENBERG ET AL. 2013).

Das Vermehrungsverhalten von Bakterien in Lebensmitteln wird weiterhin v. a. von der Temperatur, vom pH-Wert, Wasser- und Salzgehalt (a_w -Wert), den Verpackungsbedingungen oder auch Zusatzstoffen beeinflusst (ODEYEMI ET AL. 2020).

Bakterien werden auf Grund ihrer optimalen Vermehrungstemperaturbereiche in psychrophile, psychrotrophe, mesophile und thermophile Arten gruppiert (Tab. 1). Lebensmittel-assoziierte Bakterien kommen in allen vier Gruppen vor. Die überwiegende Anzahl der Mikroorganismen weisen ein sehr gutes Wachstum im Bereich zwischen 15 und 40 °C auf. Vor allem Bakterien, die ihr Temperaturoptimum im mesophilen Bereich haben, besitzen die Eigenschaft Lebensmittel zu verderben, wie z. B. viele Vertreter der Familien *Enterobacteriaceae* und

Bacillaceae (KRÄMER & PRANGE 2017, WALLHÄUSER 2013). Typische Verderbnisorganismen, u. a. *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* spp. und einige *Enterobacteriaceae* können sich auch bei Kühltemperaturen (4 °C) vermehren. Die Vermehrungszeiten sind auf Grund der verlängerten lag-Phase entsprechend länger (ZHANG ET AL. 2019). Im thermophilen Bereich wachsen v. a. sporenbildende Bakterien der Gattungen *Bacillus* und *Clostridium* (ANDRÉ ET AL. 2013, DETTLING ET AL. 2020).

Tab. 1 Einteilung der Bakterien bezogen auf minimale, optimale und maximale Vermehrungstemperaturen¹

Bakteriengruppe	Vermehrungstemperatur in °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophil	-5-5	12-15	15-20
Psychrotroph	-5-5	25-30	30-35
Mesophil	5-5	30-40	35-47
Thermophil	40-45	55-75	60-70

¹ KRÄMER & PRANGE (2017)

1.1.2 Mikrobieller Verderb und Grundlagen der Enzymaktivität

Mikrobieller Verderb liegt vor, wenn Mikroorganismen durch ihr Wachstum und ihre Stoffwechselaktivitäten ein Lebensmittel so verändern, dass es für den menschlichen Verzehr nicht mehr geeignet ist (TECHER ET AL. 2020). Verderbniserreger haben ihren natürlichen Lebensraum meist im Boden und im Wasser, weshalb die Kontamination von Lebensmittel leicht über Wasser oder Insekten erfolgen kann (RAWAT 2015). Die Geschwindigkeit, mit welcher Lebensmittel verderben, hängt zum einem von der Anfangskeimbelastung und der Zusammensetzung des Produktes (Nährstoffe, pH-Wert, a_w -Wert) und zum anderen von den Lagerbedingungen (Temperatur, Redoxpotential) ab (ODEYEMI ET AL. 2020, BAUMGART ET AL. 2015).

In Abhängigkeit davon, ob ein Produkt vor dem Verzehr noch erhitzt werden muss oder bereits verzehrsfertig ist, werden für Convenienceprodukte Richtwerte für die Gesamtkeimzahl von 4.0 log bis 6.0 log KBE/g empfohlen (DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2017. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fertiggerichte-und-zubereitete-speisen> (Zugriff 15.4.2021)). Für Brühwürste, wie z. B. Bratwurst oder Frankfurter soll die Gesamtkeimzahl bis zum Ende des Mindesthaltbarkeitsdatum nicht über 4.7 log KBE/g liegen (DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2018. <https://www.dghm->

richt-warnwerte.de/de/dokumente/fleischerzeugnisse (Zugriff 15.4.2021)). Verderbniserreger nutzen zunächst die im Lebensmittel vorhandenen niedermolekularen Stoffe als Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Sind diese Nährstoffe verbraucht, werden Enzyme (Eiweißstoffe) gebildet, die den Um- bzw. Abbau höhermolekularer Stoffe, wie Proteine, Lipide oder Polysaccharide, bewirken. (Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt. https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/lebensmittelsicherheit/publikationen/verderb_lebensmittel.pdf (Zugriff 14.1.21)). Der Verderbnisprozess kann nach dem Absterben oder Abtöten der Bakterien durch die von ihnen freigesetzten Exoenzyme weiterlaufen (HEISS & EICHNER 2018). Bakterien besitzen durch ihre Enzymaktivitäten (Tab. 2) die Fähigkeit Fette, Zucker, Stärke und Eiweiß abzubauen bzw. aufzuspalten. Die damit verbundene Säure-, Alkohol-, Gas- oder Schleimbildung führt zum Verderb der besiedelten Lebensmittel (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr Wupper. <https://www.cvua-rrw.de/themen/untersuchungen/bakteriologie.html> (Zugriff 14.1.21), MACK. <http://www.agfdt.de/loads/ds10/mack.pdf> (Zugriff 5.1.21)).

Tab. 2 Wichtige bakterielle Enzymaktivitäten und deren Wirkungen in Lebensmitteln^{1, 2}

Enzymgruppen	Enzyme	Wirkung	Arten
Hydrolasen ¹	Lipasen	Fettspaltung (Glycerin und Fettsäuren)	Unspezifischen 1,3 spezifischen Fettsäurespezifischen
	Phospholipasen	Spaltung der Phosphatgruppe von Fettsäuren	Lezithinase Phospholipase C
	Proteasen	Eiweißspaltung (Proteine zu Aminosäuren)	Endopeptidasen Exopeptidasen
Oxidoreduktasen ²	Dehydrogenasen	Kohlenhydratabbau (Umwandlung von Glukose und Fruktose in Mannit)	Mannitoldehydrogenase
	Nitratreduktase (Denitrifikation)	Stickstoffzyklus (Umwandlung von Nitrat zu Nitrit und weiter zu elementarem Stickstoff)	

¹ spektrum.de. https://www.spektrum.de/lexika/showpopup.php?lexikon_id=9&art_id=33079&nummer=12110 (Zugriff 15.2.21)

² chemie.de. <https://www.chemie.de/lexikon/Oxidoreduktasen.html> (Zugriff 15.2.21)

Hydrolasen benötigen für die Aufspaltung von chemischen Verbindungen nur die Hilfe von Wasser (Medlexi.de. <https://medlexi.de/Hydrolase> (Zugriff 20.2.21)). Beispiele für Hydrolasen sind: i) Enzyme wie Lipasen (Fettabbau), ii) Proteasen (Eiweißabbau) und iii) Phospholipasen

(z. B. Lezithinasen) (spektrum.de. https://www.spektrum.de/lexika/showpopup.php?lexikon_id=9&art_id=33079&nummer=12110 (Zugriff 15.2.21)). Hydrolasen können Co-Faktoren verwenden (metallische oder organische) bei gleicher katalytischer Effizienz (ΔG). Hydrolasen, die keine Co-Faktoren verwenden, zeigen eine höhere freie Aktivierungsenergie aber eine niedrigere freie Bindungsenergie (SOUSA ET AL. 2015).

Das Enzym Lipase spaltet Triglyceride in die Bestandteile Glycerin und freie Fettsäuren. Man unterscheidet: i) nicht spezifische Lipasen (Spaltung an jeder Bindungsstelle möglich), ii) 1,3-spezifische Lipasen (kein Abbau an der zweiten Bindungsstelle) oder iii) spezifische Lipasen (Aufspaltung langkettiger ungesättigter Esterbindungen) (JAVED ET AL. 2018).

Bei den Phospholipasen werden vier Hauptgruppen unterschieden (Phospholipase A, B, C oder D). Diese Unterteilung gibt Auskunft darüber an welcher Bindungsstelle die Fettsäuren von den Phospholipiden abgespalten werden. (dr. Gumpert. <https://www.dr-gumpert.de/html/phospholipase.html> (Zugriff 16.2.2021)). Phospholipase C entspricht dem Enzym Lezithinase (eine chemische Verbindung von Phospholipiden und Cholin), welches von einer Vielzahl von Mikroorganismen freigesetzt wird. Die Enzymspaltung erfolgt zwischen dem Glycerin und der Phosphatgruppe. (spektrum.de. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/phospholipasen/51244> (Zugriff 16.2.2021)). Durch das Enzym Lezithinase wird diese Verbindung in Phosphatidylcholin und unlösliche Diglyceride gespalten (microbiologie Info.com. <https://microbiologyinfo.com/lecithinase-test/> (Zugriff 14.1.21)).

Aus Peptidverbindungen werden Proteasen und Aminosäuren mit Hilfe des Enzyms Protease hydrolysiert. Exopeptidasen spalten Aminosäuren entweder am: i) Stickstoffendpunkt (Amino-peptidasen) oder am ii) Kohlenstoffendpunkt (Carboxypeptidasen). Nicht terminale Aminosäuren werden von Endopeptidasen gespalten (GURUMALLESH ET AL 2019).

Die Gelatinase ist eine Protease, die Gelatine zu Polypeptiden und weiter zu Aminosäuren unter Bindung eines Metallions (meist Zink) umbaut. Dieser Prozess bewirkt, dass Gelatine irreversibel verflüssigt wird (DELA CRUZ & TORRES 2012, CAMPBELL ET AL 2019).

Bakterien sind in der Lage Stoffwechselprodukte mit Hilfe einer Redoxreaktion und eines Co-Faktors umzubauen (Oxidoreduktion). Beispiele dafür sind die Mannitoldehydrogenase und die Nitratreduktase (chemie.de. <https://www.chemie.de/lexikon/Oxidoreduktasen.html> (Zugriff 15.2.2021)).

Wird vom Bakterium Mannit (ein Zuckeralkohol) als Kohlenstoffquelle genutzt, muss es in der Lage sein das Enzym Mannitoldehydrogenase freizusetzen. Mit Hilfe dieses Enzyms kann Fruktose und Glukose fermentiert und zu Mannit umgewandelt werden. Damit dieser Prozess

ablaufen kann, wird das Co-Enzym Nicotinamidadenindinukleotid benötigt (EGGLESTON ET AL. 2007).

Stickstoff kann ebenfalls als Energiequelle genutzt werden. Damit ein Bakterium Stickstoff als Energiequelle nutzen kann, werden die Enzyme Nitratreduktase (reduziert Nitrat zu Nitrit), Nitritreduktase (reduziert Nitrit zu Stickstoffmonoxid), Stickstoffmonoxidreduktase (Abbau von Stickstoffmonoxid zu Distickstoffmonoxid) und Distickstoffmonoxidreduktase (Abbau von Distickstoffmonoxid zu elementarem Stickstoff) benötigt (STEINER 2019). Für diese Reduktionsprozesse wird Energie benötigt, welche die Bakterien hauptsächlich aus organischen Substraten (manchmal auch aus Wasserstoff oder Schwefelverbindungen) gewinnen. Endprodukte dieser Energiegewinnung sind Kohlendioxid, Wasser und molekularer Stickstoff (spectrum.de. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/denitrifikation/17321> (Zugriff 15.2.21)).

Zusammenfassend ergibt sich für den Verderb, dass eiweißreiche Lebensmittel umso schneller verderben, je höher die Anteile an Aminosäuren, Peptiden, sowie löslichen Stickstoffverbindungen sind. Fettreiche Lebensmittel verderben, wenn sie von Bakterien besiedelt werden, die die Fähigkeit besitzen extrazelluläre Lipasen zu bilden. Bei kohlehydratreichen Lebensmitteln wird der Verderb durch Exoenzyme bewirkt, die Zucker zu Säure vergären können (z. B. *Enterobacteriaceae* und *Bacillaceae*), wobei der Eiweiß- und Kohlenhydratabbau wesentlich schneller voranschreitet als der Fettabbau (KRÄMER & PRANGE 2017, SINELL 2004).

Verderbniserreger, die Lebensmittel besiedeln, stellen meist keine Gefahr für den Menschen dar (Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper. <https://www.cvua-rw.de/themen/untersuchungen/bakteriologie.html> (Zugriff 14.1.21)).

1.2 Verderbnis-assoziierte Bakteriengruppen

1.2.1 Vorkommen

Zu den wichtigen Gruppen zählen Vertreter der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* und *Bacillaceae*. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Moraxellaceae* umfassen gramnegative, stäbchenförmige, aerobe, nicht sporenbildende Bakterien. Im Unterschied zu den *Pseudomonadaceae* und *Moraxellaceae* können *Enterobacteriaceae* auch unter anaeroben Bedingungen wachsen (YAZICI ET AL. 2018, KRÄMER & PRANGE 2017, CALDERA ET AL. 2016, CARVALHEIRA ET AL. 2020).

Die Familie der *Bacillaceae* umfasst alle Bakterien, die der Gattung *Bacillus* angehören und bezeichnen grampositive, stäbchenförmige Bakterien, welche überwiegend unter aeroben bzw. fakultativ anaeroben Bedingungen wachsen (ZIGANSHINA ET AL. 2018).

Enterobacteriaceae, *Pseudomonadaceae* und *Bacillaceae* sind in der Natur weit verbreitet und haben ihren natürlichen Lebensraum im Wasser, im Boden, in Tieren (tierisches Gewebe) und Pflanzen. Spezies der *Bacillaceae* finden sich darüber hinaus im Kot, Tierfutter und in Lebensmittelzutaten (z. B. Gewürzen). (YAZICI ET AL. 2018, CALDERA ET AL. 2016, CARLIN 2011, THANH ET AL. 2018). Die zur Familie *Moraxellaceae* gehörenden *Acinetobacter* spp. sind Organismen, die ebenfalls häufig in der Umwelt, Tieren und Menschen vorkommen. (CARVALHEIRA ET AL 2020).

Enterobacteriaceae gelten in der Lebensmittelverarbeitung als Hygieneindikator. Für ausgewählte Lebensmittel liegen Richtwerte bzw. Prozesshygiene-kriterien in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 vor. Der Nachweis weist daher häufig auf eine schlechte Produktionshygiene auf verschiedenen Stufen der Prozesskette hin. Der Nachweis auf Lebensmittelkontaktflächen stellt ein Problem für die Produktsicherheit von Lebensmitteln dar (TAKAHASHI ET AL. 2017).

Die umweltresistenten *Pseudomonadaceae* stellen in der Lebensmittelindustrie ein großes Problem dar, da sie sowohl im Wachstumsverhalten, als auch bezüglich ihrer Enzymaktivitäten eine große Vielseitigkeit aufweisen (CALDERA ET AL. 2016). Sie gelten deshalb als bedeutende Verderber zahlreicher tierischer und pflanzlicher Lebensmittel (RADOVANOVIC ET AL. 2020). *Pseudomonadaceae* besiedeln Oberflächen in der Produktionsumgebung (z. B. Wände, Fußböden) und Bereiche, die mit dem Lebensmittel in Kontakt kommen (z. B. Förderbänder, Schneide- und Melkmaschinen). Werden diese Ansiedelungen nicht restlos beseitigt, kommt es zur Bildung von Biofilmen. Biofilme schützen das Bakterium und ermöglichen ihm die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zu überleben. Ein Nachweis von *Pseudomonadaceae* (z. B. in Schlagsahne oder in Mineralwasser) stellt einen Nachweis für mangelnde Reinigung und Desinfektion der Produktionsanlagen dar (KRÄMER & PRANGE 2017, MØRETRØ & LANGSRUD 2017). Durch die ubiquitäre Verbreitung diverser Bakterienarten können diese bereits im oder auf den Lebensmitteln vorhanden sein (z. B. zufällige Verunreinigung durch Staub, kontaminiertes Wasser, Insekten, etc.), oder durch den Verarbeitungsprozess (z. B. Kontakt mit Verarbeitungsgeräten) in das Lebensmittel gelangen (SARANRAJ ET AL. 2012).

In zahlreichen Studien ist das Vorkommen dieser Bakteriengruppen in diversen Lebensmitteln und dem Produktionsumfeld beschrieben. Im Anhang (Tab. 1) sind die Ergebnisse aus aktuell publizierten Untersuchungen zusammengefasst.

1.2.2 Vermehrung in Abhängigkeit von der Temperatur

Enterobacteriaceae zählen zu den mesophilen Bakterien mit einem Temperaturoptimum von 25-30 °C, jedoch gibt es unter ihnen psychrotolerante Arten, die in der Lage sind bei Kühltemperaturen (5 °C) zu wachsen (KRÄMER & PRANGE 2017). Dazu gehört beispielsweise *Ewingella (E.) americana*, welches bei 25 °C besser als bei 36 °C wächst und sich auch bei Kühltemperaturen (4 °C) noch vermehren kann (O' HARA & FARMER III 2015, TEJEDOR-CALVO ET AL. 2020). *Yersinia (Y.) enterocolitica* zählt zu den psychrotrophen Spezies, deren optimale Vermehrungstemperatur zwischen 25 und 30 °C liegt und das sich in einem Temperaturbereich von -2-45 °C vermehren kann (MURROS 2017, KRÄMER & PRANGE 2017).

Die Familie der *Pseudomonadaceae* umfasst Bakterien, welche ihr optimales Wachstum im mesophilen Bereich haben. Allerdings sind einige Spezies psychrotolerant (Wachstum bei 4 °C), so dass eine Vermehrung in einem großen Temperaturbereich (bis 45 °C) stattfinden kann. Generell verfügen *Pseudomonadaceae* über ein schnelles Wachstum, da sie keine hohen Ansprüche an ihre Nährstoffe haben (CALDERA ET AL. 2016, RADOVANOVIC ET AL. 2020). *P. fluorescens*, einer der bedeutenden Verderbniserreger, kann sich im Bereich von 4-37 °C gut vermehren, allerdings nicht mehr bei 41 °C (CALDERA ET AL. 2016, VAN DEN BELD ET AL. 2016).

Innerhalb einer Spezies kann das Vermehrungsverhalten auch unterschiedlich sein. *P. fragi* zeigt generell ein Wachstum bei 4 °C. Während in der Studie von CALDERA ET AL. (2016) ein überwiegendes Wachstum bis 45 °C beobachtet wurde, beobachteten MORALES ET AL. (2016) bereits bei 37 °C eine verzögerte Vermehrung.

Acinetobacter spp. gehören ebenfalls zu den mesophilen Bakterien. Ihr Temperaturoptimum liegt zwischen 32 und 35 °C, jedoch ist ein Wachstum bei Kühltemperaturen ab 2 °C möglich (OSARENOTOR 2012, VITHANAGE ET AL. 2016).

Bacillaceae wachsen sowohl unter psychrotrophen, mesophilen und thermophilen Bedingungen (OLIVEIRA ET AL. 2016). Das Wachstumsverhalten von *B. cereus* variiert sehr stark. Mesophile Stämme weisen ein gutes Wachstum bei Temperaturen von 37 °C auf. Diese mesophilen Stämme zeigen kein Wachstum bei Temperaturen unter 10 °C. Psychrotrophe Arten der *B. cereus*-Gruppe wachsen bei Kühltemperaturen (4 °C), zeigen allerdings kein

Wachstum bei Temperaturen ab 37 °C (Foodstandards. <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf> (Zugriff 10.2.21)).

Im Gegensatz dazu zählt *B. licheniformis* zu den fakultativ thermophilen Vertretern, die sich in einem Bereich von 15-55 °C vermehren können (DIOMANDE ET AL. 2015, WANG ET AL. 2020).

In der Tab. 3 sind weitere Ergebnisse zum temperaturabhängigen Vermehrungsverhalten Lebensmittel-assoziiertes Bakteriengruppen zusammengestellt.

Tab. 3 Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Temperatur ausgewählter Lebensmittel-assoziiierter Bakterien (Zusammenstellung der Literatur)

Familie	Gruppe	psychrotroph	mesophil	thermophil	Wachstumsbereich (°C)	Literatur
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i> spp.	X			4	SALGADO ET AL. 2021
	<i>Y. enterocolitica</i>	X	X		-2-45	KRÄMER & PRANGE 2017, MURROS 2017
	<i>Ewingella</i> spp.	X	X		4-36	O'HARA & FARMER III 2015, TEJEDOR-CALVO ET AL. 2020
	<i>Kluyvera</i> spp.				37 (optimal) 30-37	OSARENOTOR 2012, PAVAN ET AL. 2005
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. fluorescens</i> -Gruppe	X	X		4-37	CALDERA ET AL. 2016, VAN DEN BELD ET AL. 2016
	<i>P. fragi</i> -Gruppe	X	X		4-45	CALDERA ET AL. 2016, MORALES ET AL. 2016
	<i>P. gessardii</i> -Gruppe	X			4-30	CALDERA ET AL. 2016, VAN DEN BELD ET AL. 2016
	<i>P. jessenii</i> -Gruppe	X	X		4-45	CALDERA 2016 ET AL.
	<i>P. koreensis</i> -Gruppe	X	X		4-45	
	<i>P. putida</i> -Gruppe	X	X		4-45	
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	X	X		2-12 20-35	OSARENOTOR 2012, VITHANAGE ET AL. 2016
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> spp.		X	X	5-50	DIOMANDE ET AL. 2015
	<i>B. cereus</i> -Gruppe	X	X	X	4-55	FOODSTANDARDS ¹
	<i>B. licheniformis</i> -Gruppe		X	X	15-55	DIOMANDE ET AL. 2015, WANG ET AL. 2020
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	X	X	X	5-45	DIOMANDE ET AL. 2015
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe		X	X	5-50	DIOMANDE ET AL. 2015

¹ <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf>

B: *Bacillus*, P: *Pseudomonas*, Y: *Yersinia*

1.2.3 Enzymaktivitäten

Die Vertreter der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* und *Bacillaceae* können sehr unterschiedliche Enzyme, z. B. Lipasen und Proteasen, exprimieren. Zudem sind einige Bakterien dieser Gruppen in der Lage Nitrat zu Nitrit zu reduzieren.

Alle Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* können Glukose fermentieren (KNOOP 2014), während Enzyme wie Lipase, Protease, Lezithinase und Mannitolfermentation nur von bestimmten Spezies exprimiert werden können (Tab. 4).

Die Spezies *E. americana* ist in der Lage Kohlehydrate - v. a. Glukose und Mannitol - unter Säureproduktion zu fermentieren. Gelatinase und Lipase werden nicht gebildet (O' HARA & FARMER III 2015).

Kluyvera (K.) intermedia zeigt generell eine hohe proteolytische Aktivität (YUAN ET AL. 2018). Der Abbau von Kohlehydraten erfolgt unter Säure- und Gasbildung, während Glukose (z. B. Mannitol) nur unter Säurebildung fermentiert wird. *K. intermedia* kann weder das Enzym Gelatinase noch das Enzym Lipase freisetzen (ABO AMER ET AL. 2018, LIU ET AL. 2020).

Serratia (S) liquefaciens nutzt Zucker, u. a. Mannit und Aminosäuren als Kohlenstoffquelle. Kohlenhydrate werden unter Säurebildung abgebaut (BIRBIR & ULUSOY 2015). Von *S. liquefaciens* werden hitzestabile Proteasen und hitzestabile Lipasen, sowie Phospholipasen gebildet. Lipase kann im Temperaturbereich von 4-55 °C freigesetzt werden, wobei das Temperaturoptimum bei 30 °C liegt (YUAN ET AL. 2018, SALGADO ET AL. 2021). EKPENYONG ET AL. (2016) konnten den Nachweis erbringen, dass *S. liquefaciens* bei 30 °C Gelatine abbaut. *Y. enterocolitica* fermentiert im Wesentlichen Glukose und Mannitol unter Bildung von Säure. Ein Nachweis für eine Lipase- oder Proteaseaktivität konnte von BIRBIR & ULUSOY (2015) nicht erbracht werden.

Viele Spezies der Familie *Pseudomonadaceae* können sowohl unter optimalen Temperatur- als auch unter Kühlbedingungen (7 °C) hitzestabile Lipasen und Proteasen exprimieren. Dadurch besitzen sie grundsätzlich ein hohes Verderbnispotential (YUAN ET AL. 2018). Zwischen den einzelnen Spezies, aber auch innerhalb einer Spezies sind diese Enzymaktivitäten sehr unterschiedlich ausgeprägt. *P. fluorescens* kann in der Regel Proteasen, Lipasen und Phospholipasen freisetzen und Mannit als Energiequelle nutzen (YUAN ET AL. 2018, MEI ET AL. 2016). *P. fragi* zählt ebenfalls zu den enzymatisch aktiven *Pseudomonas* spp. Die meisten Isolate des *P. fragi* sind proteolytisch aktiv, jedoch nicht in der Lage das Enzym Lezithinase freizusetzen. Andere *P. fragi*-Isolate können sowohl Proteasen als auch Lezithinasen bilden und es gibt *P. fragi*-Isolate, die keines der Enzyme freisetzen

können (MORALES ET AL. 2016). YUAN ET AL. (2018) stellten in ihrer Studie eine hohe lipolytische Aktivität bei *P. fragi* fest, während laut CALDERA ET AL. (2016) nur wenige Vertreter dieser Spezies in der Lage waren Proteasen, Lipasen und Lezithinasen zu bilden. *P. gessardii* kann Mannitol fermentieren und die Enzyme Lezithinase und Protease freisetzen (VAN DEN BELD ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018). Die Lipasefähigkeit der *P. gessardii*-Gruppe ist allerdings sehr variabel, während JAVED ET AL. (2018) eine solche Aktivität nachweisen konnten, gelangen VAN DEN BELD ET AL. (2016) ein derartiger Nachweis nicht. *P. jessenii* und *P. koreensis* sind sowohl lipolytisch, phospholipolytisch, als auch proteolytisch aktiv. *P. putida* (*P. plecoglossicida*) zeigt eine lipolytische Aktivität und ist in der Lage Lezithinasen zu bilden. Ein Eiweißabbau erfolgt durch diese Gruppe der *Pseudomonadaceae* nicht (CALDERA ET AL. 2016).

Acinetobacter spp. aus der Familie der *Moraxellaceae* weisen eine hohe lipolytische, aber eine schwache proteolytische und phospholipolytische Aktivität auf (YUAN ET AL. 2018). Sie können zudem kälteaktive Lipasen (Mindesttemperatur 15 °C) bilden (JAVED ET AL. 2018).

Spezies der *B. cereus*-Gruppe können Exoenzyme, wie Lipasen, Lezithinasen und Proteasen freisetzen. Eine Mannitolfermentation ist nicht möglich (HEYDARZADEH ET AL. 2020). Laut einer Studie von MILLER ET AL. (2016) können diese Mikroorganismen Gelatine abbauen. Die Fermentation von z. B. Glukose, Fruktose, Maltose und Sacharose erfolgt laut dieser Studie unter Säurebildung. Die *B. subtilis*-Gruppe nutzt bevorzugt Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle, kann Mannitol fermentieren, sowie hitzestabile Lipasen exprimieren. Lezithinasen können von dieser *Bacillus*-Gruppe nicht freigesetzt werden (FRANZEN 2017, FEMI-OLA ET AL. 2018, PARK ET AL. 2020, ZSCHIEDRICH & HOLLEBEN 2015). *B. licheniformis* und *B. pumilus* besitzen eine Lipase- und Proteaseaktivität. Lezithinasen werden von dieser Gruppe nicht gebildet. *B. circulans* weist keine Lipase-, Protease- und Lezithinaseaktivität auf (PARK ET AL. 2020, SADIQ ET AL. 2016). In Tab. 4 sind weitere Ergebnisse zum Enzymverhalten Lebensmittel-assoziiertes Bakteriengruppen zusammengestellt.

Tab. 4 Enzymaktivitäten ausgewählter Verderbnis-assoziiierter Bakteriengruppen (Zusammenstellung der Literatur)

Familie	Gruppe	Proteasen	Lipasen	Mannitol-fermentation	Phospho-lipasen	Nitratreduktion	Literatur
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i> spp.	X	X	X	X		BIRBIR & ULUSOY 2015, EKPENYONG ET AL. 2016, SALGADO ET AL. 2021, YUAN ET AL. 2018
	<i>Yersinia</i> spp.			X			BIRBIR & ULUSOY 2015
	<i>Ewingella</i> spp.			X		X	O' HARA & FARMER III 2015
	<i>Kluyvera</i> spp.	X		X		X	ABO-AMER ET AL. 2018, LIU ET AL. 2020, YUAN ET AL. 2018
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. fluorescens</i> -Gruppe	X	X	X	X	X	MEI ET AL. 2016, VAN DEN BELD ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018
	<i>P. fragi</i> -Gruppe	X	X		X		CALDERA ET AL. 2016, MORALES ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018
	<i>P. gessardii</i> -Gruppe	X	X	X	X	X	JAVED ET AL. 2018, VAN DEN BELD ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018
	<i>P. jessenii</i> -Gruppe	X	X		X		CALDERA ET AL. 2016
	<i>P. koreensis</i> -Gruppe	X	X		X		
	<i>P. putida</i> -Gruppe		X		X		
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	X	X		X		JAVED ET AL. 2018, YUAN ET AL. 2018
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> spp.						SADIQ ET AL. 2016
	<i>B. cereus</i> -Gruppe	X	X		X	X	HEYDARZADEH ET AL. 2020, MILLER ET AL. 2016, SADIQ ET AL. 2016
	<i>B. licheniformis</i> -Gruppe	X	X			X	PARK ET AL. 2020
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	X	X	X		X	FEMI-OLA ET AL. 2018, FRANZEN 2017, PARK ET AL. 2020 ZSCHIEDRICH & HOLLEBEN 2015
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe	X	X				SADIQ ET AL. 2016

B: *Bacillus*, P: *Pseudomonas*

1.3 Ziel der Untersuchungen und Hypothesen

Ziel dieser Studie ist es, die aus den pilzhaltigen Convenienceprodukten, Gewürzen, rohen Zwischenprodukten und dem Umfeld isolierten Bakterienspezies, in Bezug auf die Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Kühltemperaturen und im thermophilen Bereich zu testen. Zur Überprüfung des Verderbnispotentials sollte getestet werden, ob diese Isolate die Fähigkeit besitzen relevante Enzyme freizusetzen. Diese Informationen erlauben dem Unternehmen, das durch diese Bakterien verursachte Verderbnisrisiko vom Rohstoff (Kräuterseitling), nicht erhitzter Rohware und fertig verpackten Produkten, abzuschätzen. Schlussfolgernd können durch diese Erkenntnisse gezielte Hygienemaßnahmen gegen diese Risikokeime veranlasst werden, um diese effektiver im Produktionsprozess zu reduzieren.

Im Einzelnen sollen im Ergebnis der Untersuchungen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Welche der untersuchten Bakterienspezies können sich bei Kühltemperaturen (5, 7 und 12 °C) vermehren?
2. Gibt es Spezies oder Gruppen, die bei 12, 42 und 55 °C ein Wachstum zeigen?
3. Welche der untersuchten Spezies können Gelatine und Mannit abbauen, sowie Lezithinase und Lipase unter optimalen Vermehrungsbedingungen (30 °C) exprimieren?
4. Kann in den Endprodukten ein Zusammenhang zwischen dem mikrobiologischen Kontaminationslevel (am Ende des MHD) und der Vermehrungsfähigkeit einzelner geprüfter Spezies bei Kühltemperaturen und in Bezug auf die spezifische Enzymaktivität hergestellt werden?

Im Ergebnis der Literaturlauswertung können die folgenden Hypothesen angenommen werden:

1. Gramnegative Bakterienisolate der Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Moraxellaceae* vermehren sich im Bereich der Kühltemperaturen (5-12 °C) und sind dadurch vor allem diese Keimgruppen in Endprodukten mit hoher Keimbelastung zu finden.
2. Die sporenbildenden *Bacillus*-Isolate sind bei Kühltemperaturen nicht mehr in der Lage zu wachsen, aber bei 55 °C ist eine Vermehrung möglich.
3. Es ist davon auszugehen, dass sowohl gramnegative als auch grampositive Isolate die Verderbnis-relevanten Enzyme, Gelatinase, Lezithinase und Lipase exprimieren können.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Materialien

In der Tab. 5 sind alle Geräte und Materialien, die für die Untersuchungen benutzt wurden, gelistet.

Tab. 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung		Hersteller/Händler
A) Geräte und Verbrauchsmaterialien		
Inkubator 30 °C		Ehret, Emmendingen, Deutschland
Inkubator 12 °C/55 °C		MMM Group, München, Deutschland
Inkubator 5 °C		MMM Group, München, Deutschland
Inkubator 42 °C		MMM Group, München, Deutschland
Inkubator 7 °C		MMM Group, München, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C		Sanyo/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipette 100-1000 µl		Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, USA
Einmalpipetten 10 ml		Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Einmalpipetten 25 ml		Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1250 µl		Beglab, Erlangen, Deutschland
Impfeschlingen/-ösen		Sarstadt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorfertubes 2 ml		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
B) Nährmedien und Testreagenzien		
Trypton-Soja-Agar mit 0,6 % Hefeextrakt (TSAYE)		Biokar diagnostics, Oise, Frankreich
Tributylin-Agar (TBA)		Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Mannitol-Eigelb-Polymyxin, (MYP), modifiziert (Herstellung ohne Polymyxin)		Oxoid, Hampshire, UK
Gelatinelösung ad. 1 l Aqua. dest.:	3 g Brain Heart Broth	Biokar diagnostics, Oise, Frankreich
	5 g Bacto Pepton	Becton Dickinson & Co, Sparks, USA
	120 g Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Untersuchte Bakterienisolate

Für die Untersuchungen wurden aus 70 Proben insgesamt 162 – mittels 16 S-rRNA-Sequenzierung – charakterisierte Bakterienisolate zur Verfügung gestellt (Abb. 1). Diese Isolate wurden im Rahmen eines Projektes aus pilzhaltigen Convenienceprodukten (Untersuchung am Ende des MHD), gewolfter, gewürzter Rohware (Untersuchung am Tag der

Herstellung), sowie der Hauptzutut Pilz (Untersuchung zwei bis zehn Tage nach der Ernte) isoliert. Bis zum Beginn der Untersuchungen erfolgte die Lagerung der Bakterienisolate in 30%igen Glycerinkulturen bei -80 °C im Gefrierschrank. Alle Isolate gehören hauptsächlich zu den Familien der *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* und *Bacillaceae*. Die Tab. 6 gibt einen Überblick zu den Isolationsquellen der getesteten Isolate und enthält eine Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen.

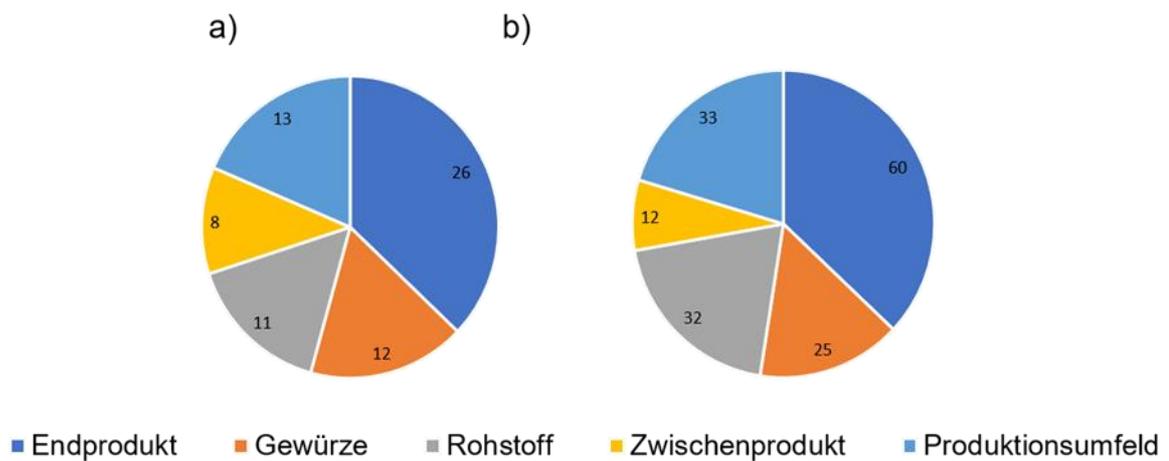


Abb. 1 Anzahl (n) der untersuchten Proben, n=70 (a) und die Anzahl der daraus differenzierten Isolate, n=162 (b) in Bezug zu den Probenahmepunkten

Tab. 6 Isolationsquellen der Isolate (Anzahl) und Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen

Familie	Gruppe ¹	Anzahl der Isolate					Prüfung des Wachstumsverhalten in verschiedenen Temperaturbereichen	Geprüfte Reaktionen
		Gewürz	Rohstoff ²	Produkt ³	Zwischenprodukt ⁴	Produktionsumfeld ⁵		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Serratia</i> spp.			11		1	5, 7, 12 °C für 10 Tage 42 °C für 4 Tage 55 °C für 4 Tage ⁶	Gelatinaseaktivität Lipaseaktivität Lezithinaseaktivität Mannitfermentation
	<i>Yersinia</i> spp.			5				
	<i>Ewingella</i> spp.		5		3	1		
	<i>Kluyvera</i> spp.				1			
	<i>Atlantibacter</i> spp.	1						
	<i>Curtobacterium</i> spp.	2						
	<i>Lelliottia</i> spp.			4				
	<i>Mixta</i> spp.	1				2		
	<i>Pantoea</i> spp.	1		1	1	6		
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. fluorescens</i> -Gruppe		14	2	7	6		
	<i>P. fragi</i> -Gruppe		2	2				
	<i>P. gessardii</i> -Gruppe		2					
	<i>P. jessenii</i> -Gruppe		1					
	<i>P. koreensis</i> -Gruppe		1					
	<i>P. putida</i> -Gruppe	2	3					
	<i>P. corrugata</i> -Gruppe					1		
	<i>P. mandelii</i> -Gruppe		2	3				
<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.		1	1		12		
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> spp.	3	1					
	<i>B. cereus</i> -Gruppe	6						
	<i>B. licheniformis</i> -Gruppe			4				
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	6		22		1		
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe	3		1		1		
Sonstige Bakterien	<i>Micrococcaceae</i>							
	<i>Oxalobacteraceae</i>					2		
	<i>Sphingobacteriaceae</i>			2				
	<i>Shewanella</i>			2				

B: *Bacillus*, P: *Pseudomonas*

¹: zugehörige Bakterienisolate siehe Tab. 2 im Anhang

²: Kräuterseitling (*Pleurotus eryngii*)

³: Gyros, Käsebratwurst, Rostbratwurst, Bratstreifen am Ende des MHD

⁴: Rohware: nicht erhitztes, gewolfes Brät

⁵: Verpackungs- und Wurstschälmaschine

⁶: Bei dieser Temperatur wurden nur Isolate geprüft, die bei 42 °C ein Wachstum zeigten

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht der Bakterienisolate

Die zur Verfügung gestellten Bakterienisolate wurden aus den Glycerinkulturen für die weiteren Untersuchungen reaktiviert. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen eine volle Impföse (10 µl) Zellmaterial aus dem Kryogefäß entnommen und mittels Verdünnungsausstrich auf einer halben Platte Trypton-Soja-Hefeextrakt (0,6 %) - Agar (TSAYE) ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte bei 30 °C für 24 Stunden. Nach der Bebrütung wurden die auf TSAYE angezüchteten Arbeitskulturen auf Reinheit geprüft. Waren Isolate verunreinigt, wurden diese erneut auf TSAYE bis zum Erreichen einer Reinkultur des Zielkeimes subkultiviert. Für jede Untersuchung wurden die Isolate erneut auf TSAYE kultiviert. Nach vier Passagen erfolgte eine erneute Anzucht aus der Kryokultur. Somit war eine gute Qualität der Arbeitsisolate gewährleistet.

2.2.2 Durchführung der Versuche

2.2.2.1 Vermehrungsverhalten in Abhängigkeit von der Lagertemperatur

Für die Untersuchung der Isolate im Temperaturbereich von 5-55 °C wurden diese auf TSAYE mittels Verdünnungsausstrich aufgetragen. Unmittelbar danach wurden die Platten entsprechend der vorgegebenen Temperatur gelagert bzw. inkubiert. Alle untersuchten Isolate wurden bei 5, 7 und 12 °C für maximal zehn Tage bzw. 42 °C (maximal vier Tage) getestet. Isolate, die bei 42 °C ein Wachstum zeigten, wurden zusätzlich bei 55 °C (maximal vier Tage) untersucht. Bei Kühltemperaturen (5-12 °C) wurden die Agar-Platten in eine feuchte Kammer gestellt, um eine Austrocknung des Agars während der Lagerung zu verhindern.

Die Agarplatten wurden erstmals nach 24 Stunden und weiterhin nach jeweils einem Tag bis zum Erreichen der maximalen Untersuchungszeit beurteilt. An allen Prüftagen wurde das Wachstum der Isolate fotografisch dokumentiert. Die Abb. 2 gibt ein Beispiel für das Wachstum bei unterschiedlichen Lagertemperaturen. Bei nicht eindeutigen oder zweifelhaften Ergebnissen wurde eine zweite Testung durchgeführt.

Die Beurteilung des Vermehrungsverhaltens in Abhängigkeit von der Bebrütungstemperatur erfolgte nach folgenden Kriterien:

- 0 kein Wachstum
- 1 schwaches Wachstum
- 2 gutes bis sehr gutes Wachstum



Abb. 2 Auswirkung der Temperatur auf das Wachstum einer Bakterienkultur nach vier Tagen Bebrütung

Von links nach rechts (Beurteilung im Uhrzeigersinn) 5 °C (1,2,2,2), 7 °C (2,2,2,2), 12 °C (2,2,2,2) und 42 °C (2,0,0,0), [0 = kein Wachstum, 1 = schwaches Wachstum, 2 = gutes bis sehr gutes Wachstum]

2.2.2.2 Nachweis von Enzymen

2.2.2.2.1 Nachweis der Gelatinaseaktivität

Für den Nachweis der Gelatinaseaktivität wurden 1,5 ml des aus Brain Heart Broth, Pepton und Gelatine zusammengesetzten Agars nach dem Autoklaviervorgang steril in Eppendorfertubes abgefüllt. Bis zur Verwendung wurde der Agar bei 7 °C für maximal 14 Tage im Kühlraum gelagert. Für die Testdurchführung wurde mit einer 10 µl Öse Koloniematerial entnommen und der Gelatinaseagar bis in das untere Drittel des Röhrchens beimpft (DELA CRUZ & TORRES 2012). Die Tubes wurden zunächst für 24 Stunden bei 25 und 30 °C inkubiert und danach das Ergebnis erstmals beurteilt.

Da sich der Gelatinaseagar im Inkubator verflüssigt, wurden die Tubes für die Ergebnisablesung nach den Empfehlungen von DELA CRUZ & TORRES (2012) jeweils acht bis maximal 15 Minuten in Crasheis gestellt. Der Grad der Verflüssigung spiegelte die Gelatinaseaktivität der Isolate wider. Entsprechend dem Anteil des verflüssigten Gelatinaseagars wurde das Ergebnis den folgenden Aktivitätsgraden zugeordnet (Abb. 3):

- | | | |
|---|-----------------|--|
| 0 | negativ | keine Verflüssigung feststellbar. |
| 1 | schwach positiv | der obere Anteil ist verflüssigt. |
| 2 | positiv | der überwiegende Anteil ist verflüssigt. |

Proben mit negativem bis positivem Ergebnis wurden am folgenden Tag (Tag 2) und weiter am Tag 5, 7, 9, 12, 14 und entsprechend der Empfehlung von DELA CRUZ & TORRES (2012) maximal am 15. Tag abschließend beurteilt. Für alle Experimente wurde ein nicht beimpftes Gelatinaseröhrchen als Negativkontrolle mitgeführt.



Abb. 3 Bewertung der Gelatinaseaktivität

Von links nach rechts: negativ (0): keine Verflüssigung; schwach positiv (1): oberer Gelatineanteil verflüssigt; positiv (2): Gelatine überwiegend oder vollständig verflüssigt

2.2.2.2 Nachweis der Lipaseaktivität

Um den Nachweis einer Lipaseaktivität zu erbringen, wurden die frisch angezogenen Isolatkulturen mit Hilfe einer sterilen Impföse aufgenommen und auf je einer halben Tributyrin-Agar (TBA)-Platte mittels Verdünnungsausstrich aufgetragen. Der nichtselektive Nähragar enthält Tributyrinöl und ist im nativen Zustand leicht milchig trüb. Lipase aktive Bakterienisolate zeigen um die angewachsene Kolonie eine mehr oder wenig deutliche klare, durchscheinende Zone. (microbenotes. <https://microbenotes.com/lipase-test-objectives-principle-procedures-and-results/> (Zugriff 27.10.2020)). Die Inkubation der Agarplatten erfolgte zunächst für 24 Stunden bei 30 °C. Anschließend wurden die Ergebnisse nach Ausprägung der klaren Zone im Agar (Abb. 4) nach folgendem Schema ausgewertet:

- | | | |
|---|-----------------|---|
| 0 | negativ | keine Aufhellungszone sichtbar. |
| 1 | schwach positiv | klare Aufhellungszone war < 2 mm breit. |
| 2 | positiv | klare Aufhellungszone war > 2 mm breit. |

Isolate, die nach 24 Stunden negativ bzw. schwach positiv bewertet wurden, wurden für weitere vier Tage (maximal bis Tag 5) bei 30 °C bebrütet und danach abschließend beurteilt. Nicht eindeutige Ergebnisse wurden wiederholt getestet.



Abb. 4 Ausprägung der Lipaseaktivität auf Tributyrin-Agar

von links nach rechts: schwach positiv (1): Aufhellungszone < 2mm; positiv (2): Aufhellungszone > 2mm	von links nach rechts positiv (2): Aufhellungszone > 2mm negativ (0): keine Aufhellungszone
---	---

2.2.2.2.3 Nachweis der Mannitfermentation und Lezithinaseaktivität

Zum Nachweis der Mannitfermentation, sowie der Lezithinaseaktivität, kam eine modifizierte Mannitol-Eigelb-Polymyxin (MYP)-Agarplatte ohne Zusatz von Polymyxin zur Anwendung. Da der Nährboden für die Testung von Reinkulturen genutzt wurde, konnte auf den üblichen Zusatz von Polymyxin verzichtet werden. Zudem war dadurch gewährleistet, dass auch die gramnegativen Isolate gut anwachsen konnten. Die frisch kultivierten Isolate wurde mit einer Öse jeweils auf eine halbe MYP-Agarplatte verdünnt ausgestrichen und für 24 Stunden bei 30 °C bebrütet. Für die Bewertung der Mannitfermentation wurde die Farbe des Nährbodens und die Koloniefarbe nach 24 bzw. 48 Stunden herangezogen. Isolate, die Mannitol abbauen können, sind an einer gelben Kolonie- und Nährbodenfarbe zu erkennen (Firma Carlroth. <https://www.carlroth.com/medias/B-A-5765-DE.pdf?context=bWFzdGVyfGluc3RydWN0aW9uc3wyMjMzNjF8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGluc3RydWN0aW9ucy9oOTEvDqxLzkwMzc3MTMwMTQ4MTQucGRmfGJjOGYwZTkWYTU3YWU0MmQwYmM2MGQ2NjEwYzVjNDQ1MjUxY2ZhZTgzODdhZDdlOTkNWNIMDMwMTlyZThjMGM> (Zugriff: 14.12.2020)). Mannitol wird nicht verstoffwechselt, wenn die Farbe der Kolonien bzw. des Nährbodens nach pink umgeschlagen ist. Danach wurde die Auswertung (Abb. 5) wie folgt vorgenommen:

- 0 negativ der Nähragar und die Kolonien sind pink-rot.
- 1 positiv der Nähragar und die Kolonien sind gelb.

Bakterien, die das Enzym Lezithinase exprimieren, bilden auf dem MYP-Agar um die Kolonien eine Trübungszone. Entstehen auf den MYP-Agarplatten diffuse, die Kolonien umgebende Trübungszone, ist dies der Nachweis, dass das Bakterium fähig ist Lezithin zu spalten (Firma Carlroth. <https://www.carlroth.com/medias/BA-5765-DE.pdf?context=bWFzdGVyfGluc3RydWN0aW9uc3wyMjMzNjF8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGluc3RydWN0aW9ucy9oOTEvaDgxLzkwMzc3MTMwMTQ4MTQucGRmfGJjOGYwZTkwYTU3YWU0MmQwYmM2MGQ2NjEwYzVjNDQ1MjUxY2ZhZTgzODdhZDdlOTkNWNIMDMwMTlyZThjMGM> (Zugriff: 14.12.2020)). Die Platten wurden nach 24 Stunden Inkubation erstmals abgelesen. Die Bebrütung der Platten erfolgte maximal bis zum fünften Tag.

Die Lezithinaseaktivität (Abb. 6) wurde nach folgenden Kriterien beurteilt:

- 0 negativ keine Trübungszone erkennbar.
- 1 schwach positiv Trübungszone war < 2 mm breit.
- 2 positiv Trübungszone war > 2 mm breit.

Sowohl bei dem Nachweis der Lezithinase-, als auch der Mannitfermentation wurden nicht eindeutige Ergebnisse ein zweites Mal überprüft.



Abb. 5 Verstoffwechslung von Mannitol auf MYP-Agar

Links positiv (1): Gelbfärbung von Nährboden & Kolonien
Rechts negativ (0): Pinkfärbung von Nährboden & Kolonien



Abb. 6 Nachweis von Lezithinase auf MYP-Agar

Links negativ (0): keine Trübungszone,
rechts positiv (1): Trübungszone > 2mm

2.2.3 Auswertung der Ergebnisse

Für eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse wurden alle geprüften Isolate zunächst in die zugehörige Bakterienfamilie (*Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Micrococcaceae*) gruppiert. Einzelne gramnegative Vertreter der Familien *Oxalobacteraceae* und *Sphingobacteriaceae*,

sowie zwei *Shewanella*-Isolate wurden unter „sonstige gramnegative Isolate“ zusammengefasst. Bei der detaillierten Auswertung der Ergebnisse wurden die diversen *Pseudomonadaceae*-Spezies entsprechend ihrer Zugehörigkeit dem *P. fluorescens*-Complex (*P. corrugata*-; *P. fluorescens*-; *P. fragi*-; *P. gessardii*-; *P. jessenii*-; *P. koreensis*-; *P. mandelii*-Gruppe) bzw. der *P. putida*-Gruppe zugeordnet (Anhang Tab. 2) (MULET ET AL. 2012).

Die isolierten *Bacillus* spp. wurden ebenfalls entsprechend der in der Literatur üblichen Einteilung in den folgenden Gruppen zusammengefasst: *B. cereus* (*B. wiedmannii*, *B. paramycoides*), *B. pumilus* (*B. safensis*, *B. pumilus*, *B. xiamenensis*), *B. subtilis* (*B. zhangzhouensis*, *B. nakamurai*, *B. halotolerans*, *B. subtilis* subsp. *Inaquosorum*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. velezensis*, *B. tequilensis*) und *B. licheniformis* (*B. piscis*) (Anhang Tab. 2) (EHLING-SCHULZ ET AL. 2019, FAN ET AL. 2017).

Häufig isolierte gramnegative Bakterien (*S. liquefaciens*, *E. americana* und *Acinetobacter* (*A.*) *johnsonii*) wurden auf Spezies- (*S. liquefaciens*, *E. americana* und *A. johnsonii*) oder Gattungsebene (*Yersinia* spp. und *Pantoea* spp.) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur

3.1.1 Wachstumsverhalten von gramnegativen und grampositiven Isolaten

Nahezu alle gramnegativen Isolate (99,1 %, n=111/112) zeigten bei Kühltemperaturen von 12, 7 sowie 5 °C auf TSAYE ein deutliches Wachstum. Dagegen zeigten nur 76 % (n=38/50) der grampositiven Isolate bei 12 °C und 16 % (n=8) und 14 % (n=7) bei 7 bzw. 5 °C ein Wachstum. Bei höheren Inkubationstemperaturen konnten bei 42 °C 27,7 % (n=31/112) der gramnegativen und 94 % (n=47/50) der grampositiven Isolate und bei 55 °C keines der gramnegativen aber 66 % (n=33/50) der grampositiven Isolate anwachsen. Eine detaillierte Ergebnisdarstellung findet sich in Abb. 7. Es fiel auf, dass nahezu alle Isolate der Familien, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* und *Moraxellaceae* bei 5-12 °C sehr gut bis gut auf TSAYE wuchsen (Abb. 7). Lediglich das *A. lactucaae*-Isolat wuchs bei 5 °C nur schwach. Im Vergleich dazu wuchsen nur einzelne *Bacillus*-Isolate bei 5 bzw. 7 °C (n=5/48) bzw. (n=6/48), bei 42 °C dagegen fast alle Isolate (97,9 %, n=47/48).

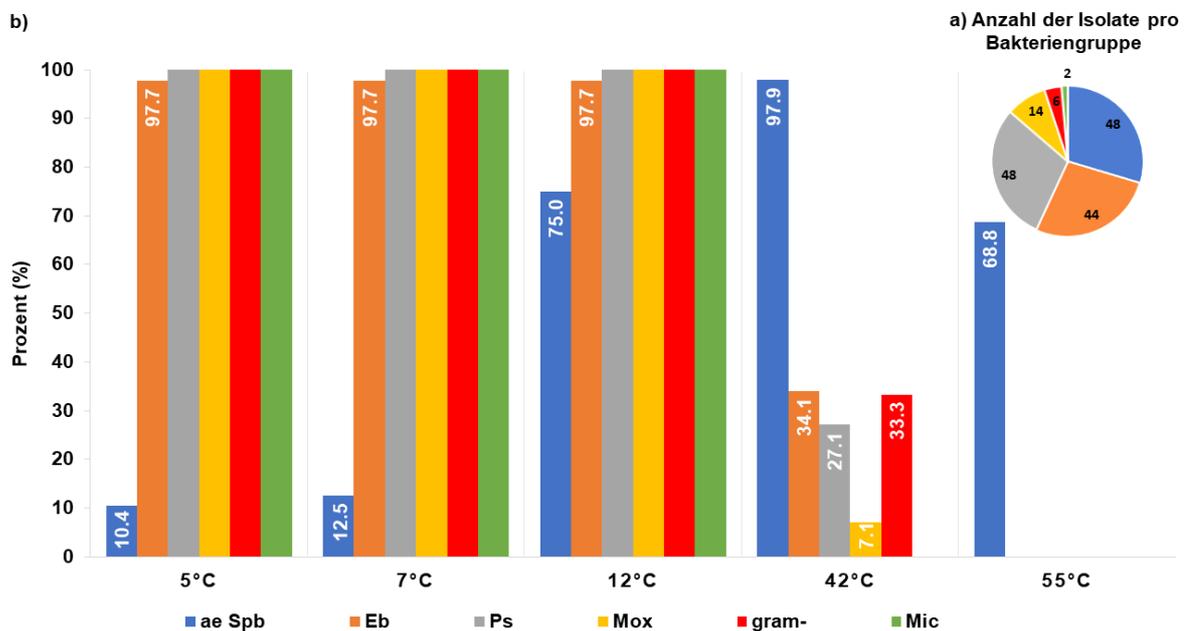


Abb. 7 Wachstum der Isolate auf TSAYE bei den untersuchten Temperaturen

a) Anzahl der getesteten Isolate/Gruppe, b) Anteil/Gruppe

ae Spb: aerobe Sporenbildner (*Bacillaceae*), Eb: *Enterobacteriaceae*, Ps: *Pseudomonadaceae*, Mox: *Moraxellaceae*, gram-:sonstige gramnegative Bakterien (*Oxalobacteraceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Shewanella*), Mic: *Micrococcaceae*

3.1.2 Wachstumsverhalten ausgewählter Spezies, Genera bzw. Gruppen

Von den ausgewählten Spezies, Genera oder Gruppen zeigten vor allem Isolate, die den Familien *Enterobacteriaceae* [*E. americana* (n=9), *S. liquefaciens* (n=12), *Pantoea* spp. (n=8/9), *Yersinia* spp. (n=5)], *Pseudomonadaceae* [*P. fluorescens*-Complex (n=43), *P. putida* (n=5)] und *Moraxellaceae* [*A. johnsonii* (n=10)] angehörten, bei Kühltemperaturen (5-12 °C) ein sehr gutes Wachstum auf TSAYE (Tab. 7). Alle Isolate der *B. cereus*-Gruppe wuchsen ebenfalls bei 12 °C schwach bis sehr gut. Innerhalb der *B. pumilus*-, *B. subtilis*- und *B. licheniformis*-Gruppe konnten nicht alle Isolate (n=3/5), (n=24/29) und (n=2/4) bei dieser Temperatur anwachsen. Bei 5 und 7 °C zeigten nur einzelne *Bacillus*-Isolate Wachstum: [*B. cereus*- (n=2/6), *B. subtilis*- (n=1/29), *B. pumilus*-Gruppe (n=1/5 bzw. 2/5)] (Tab. 7). Bei 42 °C wuchsen alle Isolate der *Bacillus*-Gruppen auf TSAYE sehr gut. Bei den gramnegativen Isolaten wurde bei dieser Temperatur ein differenzierteres Bild beobachtet: *E. americana* (n=4/9), *S. liquefaciens* (n=2/12), *P. fluorescens*-Complex (n=7/43). Im thermophilen Bereich (55 °C) war das Wachstumsverhalten der Isolatgruppen insgesamt sehr unterschiedlich und nur wenige Gruppen oder Spezies wuchsen bei dieser Temperatur (Anhang Tab. 3). Ein sehr gutes Wachstum wurde bei allen Isolaten der *B. licheniformis*-Gruppe (n=4) festgestellt. Innerhalb der anderen *Bacillus*-Gruppen war das Verhalten unterschiedlich: *B. cereus* (n=1/6), *B. pumilus* (n=2/5), *B. subtilis* (n=25/29) (Tab. 7).

Es gab Isolate die sowohl im Kühlbereich (12 °C) als auch im mesophilen bis thermophilen Bereich (42 und 55 °C) wuchsen. Dies waren: *B. cereus* (n=1/6), *B. licheniformis* (n=2/4), *B. pumilus* (n=1/5) und *B. subtilis* (n=21/29).

Auffällig war, dass alle Isolate der *P. putida*-Gruppe bei 5-42 °C wuchsen, allerdings konnte bei 42 °C bei drei Isolaten nur ein schwaches Wachstum festgestellt werden.

Ein besonderes Wachstumsverhalten zeigte *Pantoea dispersa* (n=1), welches nur bei 42 °C ein schwaches Wachstum zeigte.

Tab. 7: Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur und Heatmap der Top 11 Spezies, Gattungen oder Gruppen. Die Intensität der Farbe korrespondiert mit der Höhe des Anteils (von dunkelgrün (100 %) bis weiß (0 %)).

Bakterienspezies/Bakteriengruppe	Anzahl Isolate	Wachstum in °C und Anteil in Prozent				
		5	7	12	42	55
<i>E. americana</i>	9				44,4	
<i>S. liquefaciens</i>	12				16,7	
<i>Pantoea</i> spp.	9	88,9	88,9	88,9	11,1	
<i>Yersinia</i> spp.	5					
<i>P. fluorescens</i> -Complex	43				18,6	
<i>P. putida</i> -Gruppe	5					
<i>A. johnsonii</i>	10					
<i>B. cereus</i> -Gruppe	6	33,3	33,3			16,7
<i>B. licheniformis</i> -Gruppe	4			50,0		
<i>B. subtilis</i> -Gruppe	29	3,4	3,4	82,8		86,2
<i>B. pumilus</i> -Gruppe	5	20,0	40,0	60,0		40,0

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*, Y: *Yersinia*

P. fluorescens-Complex: dazu gehören folgende Gruppen: *P. corrugata*; *P. fluorescens*; *P. fragi*; *P. gessardii*; *P. jessenii*; *P. koreensis*; *P. mandelii*

3.2 Enzymaktivität

3.2.1 Fähigkeit gramnegativer und grampositiver Isolate Gelatine bei 25 und 30 °C abzubauen

Bei 25 °C waren 48,2 % (n=54/112) der gramnegativen und 82 % (n=41/50) der grampositiven Bakterienisolate in der Lage Gelatine abzubauen. Bei 30 °C zeigten 43,8 % (n=49/112) der gramnegativen und 86 % (n=43/50) der grampositiven Isolate eine positive Gelatinasereaktion.

Die einzelnen Ergebnisse der Bakterienfamilien (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* und „sonstige gramnegative Isolate“) sind in Abb. 8 dargestellt.

Auffallend war, dass mehr Isolate der *Pseudomonadaceae* bei 25 °C (n=29/48) als bei 30 °C (n=17/48) eine Gelatinaseaktivität zeigten, während bei den *Enterobacteriaceae* und *Bacillaceae* eine höhere Gelatinaseaktivität bei 30 °C (n=29/44) und (n=43/48) im Vergleich zu 25 °C (n=25/44) und (n=41/48) zu beobachten war. Zwei Isolate, gruppiert in „sonstige gramnegative“ Bakterien (n=6), und ein *Moraxellaceae*-Isolat (n=14) konnten nur bei 30 °C Gelatinase abbauen (Anhang Tab. 4).

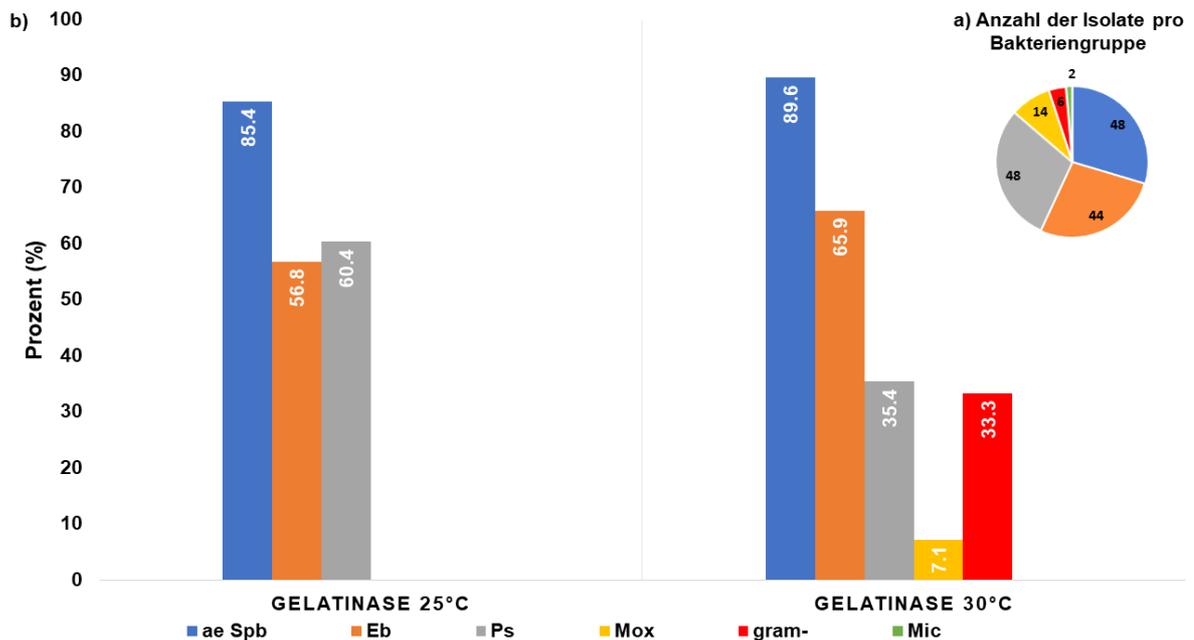


Abb. 8 Gelatinaseaktivität der Isolate (Anteil/Gruppe) in Abhängigkeit von der Temperatur

a) Anzahl der getesteten Isolate/Gruppe, b) Anteil/Gruppe

ae. Spb: aerobe Sporenbildner (*Bacillaceae*), Eb: *Enterobacteriaceae*,

Ps: *Pseudomonadaceae*, Mox: *Moraxellaceae*, gram-: sonstige gramnegative Bakterien (*Oxalobacteraceae*; *Sphingobacteriaceae*; *Shewanella*), Mic: *Micrococcaceae*

3.2.2 Fähigkeit gramnegativer und grampositiver Isolate Mannit abzubauen, sowie Lipase und Lezithinase bei 30 °C zu exprimieren

69,6 % (n=78/112) der gramnegativen und 98 % (n=49/50) der grampositiven Isolate waren in der Lage das Enzym Lipase zu exprimieren. 52,7 % (n=59/112) der gramnegativen und 78 % (n=39/50) der grampositiven Bakterien konnten das Enzym Lezithinase freisetzen. Mannit konnte von 74,1 % (n=83/112) der gramnegativen und 72 % (n=36/50) der grampositiven Isolate fermentiert werden. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse zeigt Abb. 9.

Alle Isolate der Familie der *Moraxellaceae* (n=14) und *Pseudomonadaceae* (n=48), sowie fast alle *Bacillaceae*-Isolate (n=47/48), waren in der Lage Lipasen zu exprimieren, während von den *Enterobacteriaceae*-Isolaten nur 27,3 % (n=12/44) diese Fähigkeit besaßen.

Das Enzym Lezithinase exprimierten 81,2 % (n=39/48) *Bacillaceae*-, 92,9 % (n=13/14) *Moraxellaceae*- und 68,8 % (n=33/48) *Pseudomonadaceae*-Isolate. Innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* waren nur 29,5 % der Isolate (n=13/44) fähig Lezithinase zu exprimieren. Mannitol konnte von fast allen *Enterobacteriaceae*- (95,5 %, n=42/44), *Pseudomonadaceae*- (81,3 %, n=39/48), aeroben Sporenbildner- (70,8 %, n=34/48) aber nicht von den *Moraxellaceae*-Isolaten abgebaut werden. (Anhang Tab. 4).

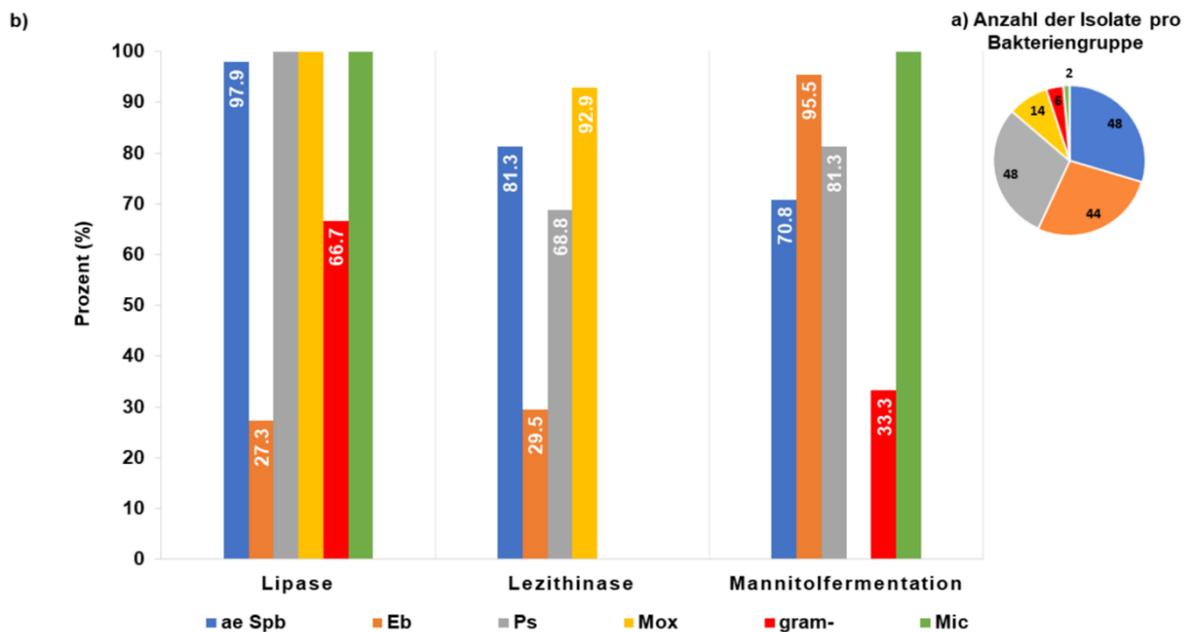


Abb. 9 Fähigkeit der Isolate (Anteil/Gruppe) unter optimalen Wachstumsbedingungen (30 °C) die Enzyme Lipase, Lezithinase zu exprimieren sowie Mannit zu fermentieren

a) Anzahl der getesteten Isolate/Gruppe, b) Anteil/Gruppe

ae. Spb: aerobe Sporenbildner (*Bacillaceae*), Eb: *Enterobacteriaceae*, Ps: *Pseudomonadaceae*, Mox: *Moraxellaceae*, gram-: sonstige gramnegative Bakterien (*Oxalobacteraceae*, *Shewanella*), Mic: *Micrococcaceae*

3.2.3 Fähigkeit von Isolatn ausgewählter Spezies, Genera bzw. Gruppen Gelatine, Lipide, Lezithin und Mannitol abzubauen

Alle Isolate der Top 11 Spezies, Gattungen oder Gruppen der Familien *Enterobacteriaceae* (*E. americana*, *S. liquefaciens*, *Pantoea* spp., *Yersinia* spp.), *Pseudomonadaceae* (*P. putida*-Gruppe, *P. fluorescens*-Complex), *Moraxellaceae* (*A. johnsonii*) und *Bacillaceae* (*B. cereus*-, *B. licheniformis*-, *B. subtilis*- und *B. pumilus*-Gruppe) waren in der Lage, zumindest eines der Enzyme (Lipase, Lezithinase oder Gelatinase) zu exprimieren bzw. Mannitol zu fermentieren. Alle *S. liquefaciens*- (n=12), *B. cereus*- (n=6) und *B. pumilus*-Isolate (n=5) konnten die Enzyme Lipase, Gelatinase und Lezithinase exprimieren (Tab. 8).

Zum Abbau von Gelatine, sowohl bei 25 °C als auch bei 30 °C waren *E. americana* (n=7/9), (n=8/9), *Pantoea* spp. (n=3/9), (n=5/9), *P. fluorescens*-Complex (n=29/43), (n=17/43), *B. licheniformis* (n=1/4), (n=3/4) und *B. subtilis* (n=28/29), (n=28/29) fähig.

Neben dem Enzym Gelatinase konnte ein *E. americana*-Isolat (n=9) auch das Enzym Lezithinase exprimieren (Tab. 8).

Eine Lipaseaktivität zeigten alle Isolate des *P. fluorescens*-Complexes (n=43), *P. putida* (n=5), *A. johnsonii* (n=10), der *B. licheniformis*- (n=4) und der *B. subtilis*-Gruppe (n=29) (Tab. 8).

Zum Abbau von Lezithin waren alle Isolate *A. johnsonii* (n=10), fast alle Isolate des *P. fluorescens*-Complexes (n=33/43), der *B. licheniformis*- (n=3/4) und der *B. subtilis*-Gruppe (n=24/29) in der Lage (Tab. 8).

82,8 % (n=106/128) der Isolate waren in der Lage Mannitol zu fermentieren.

Alle *Enterobacteriaceae*-Spezies [*E. americana* (n=9), *S. liquefaciens* (n=12), *Pantoea* spp. (n=9) und *Yersinia* spp. (n=5)] konnten den Zucker Mannitol abbauen. 81,3 % (n=39/48) der *Pseudomonadaceae* [(*P. fluorescens*-Complex (n=34/43 und *P. putida* (n=5))] sowie 72,7 % (n=32/44) der *Bacillaceae* [*B. licheniformis*- (n=4), *B. subtilis*- (n=27/29) und ein Isolat der *B. pumilus*-Gruppe (n=5)] zeigten die Fähigkeit Mannit zu fermentieren (Tab. 8).

Tab. 8 Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und Heatmap der Top 11 Spezies, Gattungen oder Gruppen. Die Intensität der Farbe korrespondiert mit der Höhe des Anteils (von dunkelgrün (100 %) bis weiß (0 %)).

Bakterienspezies/Bakteriengruppen	Anzahl Isolate	Bebrütung in °C und Auswertung in Prozent				
		GEL 25	GEL 30	LIP 30	LEZ 30	MAN 30
<i>E. americana</i>	9	77,8	88,9		11,1	
<i>S. liquefaciens</i>	12					
<i>Pantoea</i> spp.	9	33,3	55,6			
<i>Yersinia</i> spp.	5					
<i>P. fluorescens</i> -Complex	43	67,4	39,5		76,7	79,1
<i>P. putida</i> -Gruppe	5					
<i>A. johnsonii</i>	10					
<i>B. cereus</i> -Gruppe	6					
<i>B. licheniformis</i> -Gruppe	4	25,0	75,0		75,0	
<i>B. subtilis</i> -Gruppe	29	96,6	96,6		82,8	93,1
<i>B. pumilus</i> -Gruppe	5					20,0

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*

P. fluorescens-Complex: dazu gehören folgende Gruppen: *P. corrugata*; *P. fluorescens*; *P. fragi*;

P. gessardii; *P. jessenii*; *P. koreensis*; *P. mandelii*

GEL: Gelatinase, LIP: Lipase, LEZ: Lezithinase, MAN: Mannitolfermentation

3.3 Zusammenhang zwischen Keimzahl und Wachstumsverhalten bzw. Enzymaktivität von einzelnen Bakterienspezies in den Endprodukten am Ende des MHD

Mit einer hohen Keimbelastung ($\geq 6.1 \log$ KBE/g) konnten in den Endprodukten am Ende des MHD nur Spezies nachgewiesen werden, die bei 5 und 7 °C ein Wachstum zeigten. Auffallend war, dass entweder alle Isolate oder keines der Isolate ein entsprechendes Wachstum bzw. eine entsprechende Enzymaktivität aufwiesen. Alle aus den Endprodukten isolierten Bakterien

[*Sphingobacterium* spp. (n=1, Bratstreifen), *Shewanella* spp. (n=2, Bratstreifen), *Lelliottia* spp. (n=2, Rostbratwurst geschält) und *S. liquefaciens* (n=8, Bratstreifen und Rostbratwurst geschält)] und des *P. fluorescens*-Complexes [(*P. synxantha* (n=2, Bratstreifen) und *P. prosekii* (n=1, Rostbratwurst geschält)], wuchsen bei 5 und 7 °C. Gelatine abbauen, Lipase und Lezithinase exprimieren konnten ebenfalls alle *S. liquefaciens* (n=8) und alle Isolate des *P. fluorescens*-Complexes (n=3). *Sphingobacterium* spp. (n=1) und *Shewanella* spp. (n=2) exprimierten nur Lipase, während *Lelliottia* spp. (n=2) keine Enzymaktivitäten zeigten (Abb. 10). In Produkten mit einer niedrigen Keimbelastung am Ende des MHD ($\leq 4 \log$ KBE/g) wurden vor allem grampositive Bakterienisolate [*B. subtilis* (n=13) und *B. licheniformis* (n=3)] nachgewiesen. Gramnegative Bakterienisolate [*Yersinia* spp. (n=1), *P. fluorescens*-Complex (2 Isolate *P. prosekii*) und *S. liquefaciens* (n=3)] wurden in diesem Keimzahlbereich nur selten in den Produkten gefunden. *P. prosekii* und *S. liquefaciens* waren in diesem Fall in Rostbratwurst mit Hülle (ungeschält) nachweisbar. Alle gramnegativen Bakterienisolate [*Yersinia* spp. (n=1), *P. fluorescens*-Complex (2 Isolate *P. prosekii*) und *S. liquefaciens* (n=3)] konnten bei 5 und 7 °C wachsen, jedoch waren nur *S. liquefaciens* in der Lage Gelatine abzubauen und die Enzyme Lipase und Lezithinase zu exprimieren. Isolate des *P. fluorescens*-Complexes zeigten nur eine Lipaseaktivität und *Yersinia* spp. (n=1) konnte keine Enzyme exprimieren. *B. subtilis* und *B. licheniformis* konnten zwar alle relevanten Enzyme exprimieren, ein Wachstum unter Kühlbedingungen (5-7 °C) konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 10).

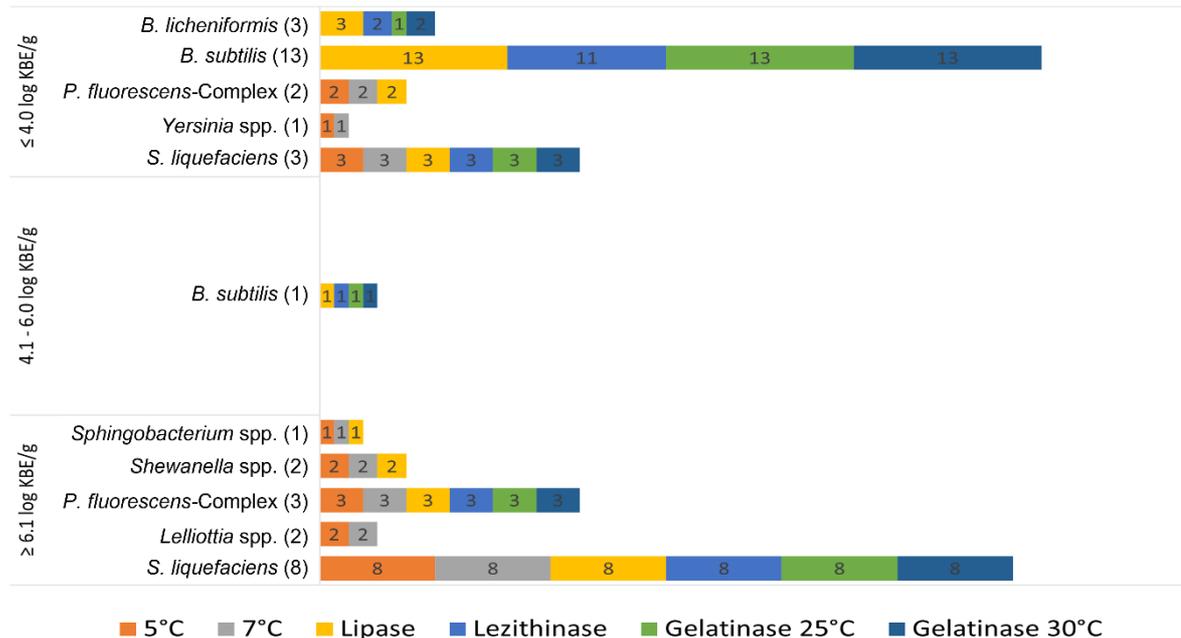


Abb. 10 Wachstums- und Enzymverhalten der überprüften Bakterienisolate (aus den Endprodukten) unter Berücksichtigung der Kontamination am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums

B: *Bacillus*, *P*: *Pseudomonas*, *S*: *Serratia*, log: logarithmisch, KBE: koloniebildende Einheit, g: Gramm
niedrige Keimbelastung: $\leq 4.0 \log \text{ KBE/g}$
mittlere Keimbelastung: $4.1-6.0 \log \text{ KBE/g}$
hohe Keimbelastung: $\geq 6.1 \log \text{ KBE/g}$
Werte in Klammer entsprechen der Gesamtzahl der Bakterienisolate

3.4 Im Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine) vorkommende Bakterienisolate

Von den aus dem produktberührenden Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine) isolierten Bakterien waren 24,2 % ($n=8/33$) der Familie der *Enterobacteriaceae* [*E. americana* ($n=1$), *S. liquefaciens* ($n=1$), *Pantoea brenneri* ($n=6$)], 21,2 % ($n=7/33$) der Familie der *Pseudomonadaceae* [*P. fluorescens*-Complex ($n=7$)], 36,3 % ($n=12/33$) der Familie der *Moraxellaceae* [*A. johnsonii* ($n=10$), *A. gyllenbergii* ($n=2$)], 6 % ($n=2/33$) der Familie der *Bacillaceae* [*B. subtilis*- ($n=1$), *B. pumilus*-Gruppe ($n=1$)], 6 % ($n=2/33$) der Familie der *Micrococcaceae* [*Pseudarthrobacter polychromogenes* ($n=1$), *Arthrobacter halodurans* ($n=1$)] und 6 % ($n=2/33$) der Familie der *Oxalobacteraceae* [*Collimonas fungivorans* ($n=2$)] zuzuordnen. Auffallend war, dass aus den insgesamt 33 – aus dem Produktionsumfeld isolierten – Bakterien 87,9 % ($n=29$) gramnegative waren, während der Anteil an grampositiven Isolaten nur 12,1 % ($n=4$) betrug. Im Produktionsumfeld dominant

waren *A. johnsonii* [30,3 % (n=10)], *P. fluorescens*-Complex [21,2 % (n=7)] und *Pantoea brenneri* [18,1 % (n=6)] (Tab. 9).

Tab. 9 Aus Verpackungs- und Wurstschälmaschine isolierte Bakterien. Die Intensität der Farbe korrespondiert mit der Höhe des Anteils (von dunkelgrün (100 %) bis weiß (0 %)).

Familie	Gruppe/Spezies	Anzahl Isolate	Produktionsumfeld	
			Verpackungsmaschine	Wurstschälmaschine
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. americana</i>	1		(1)
	<i>S. liquefaciens</i>	1	(1)	
	<i>Pantoea brenneri</i>	6	(6)	
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. fluorescens</i> -Complex	7	71,4 (5)	28,6 (2)
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. johnsonii</i>	10	90,0 (9)	10,0 (1)
	<i>A. gyllenbergii</i>	2		(2)
<i>Bacillaceae</i>	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	1	(1)	
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe	1	(1)	
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	1	(1)	
	<i>Arthrobacter halodurans</i>	1	(1)	
<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Collimonas fungivorans</i>	2	(2)	

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*

P. fluorescens-Complex: dazu gehören folgende Gruppen: *P. corrugata*; *P. fluorescens*; *P. fragi*;

P. gessardii; *P. jessenii*; *P. koreensis*; *P. mandelii*

Werte in Klammer entsprechen der Anzahl der Bakterienisolate

3.5 In der Rohware (Pilz und rohem Zwischenprodukt) sowie in den Gewürzen vorkommenden Bakterienisolate

Aus der Rohware (Pilz und rohem Zwischenprodukt) wurden überwiegend gramnegative Bakterien (97,7 %, n=43/44) isoliert. Lediglich ein Isolat war grampositiv (*Bacillus* spp. (2,3 %). Im Gegensatz dazu wurden aus den Gewürzen überwiegend grampositive Bakterien (72 %, n=18/25) isoliert und nur 28 % (n=7/25) gehörten zu den gramnegativen Bakterien.

In der Rohware (Pilz und rohes Zwischenprodukt) dominierten Isolate des *P. fluorescens*-Complexes (42 %, n=29) und des *Enterobacteriaceae*-Vertreterers *E. americana* (11,6 %, n=8). In den Gewürzen waren vor allem die *Bacillus*-Gruppen – *B. cereus* (8,7 %, n=6) und *B. subtilis* (8,7 %, n=6) – vorherrschend (Tab. 10).

Tab. 10 Aus der Rohware (Pilz und rohes Zwischenprodukt) sowie den Gewürzen isolierte Bakterien. Die Intensität der Farbe korrespondiert mit der Höhe des Anteils (von dunkelgrün (100 %) bis weiß (0 %)).

Familie	Gruppe/Spezies	Anzahl Isolate	Rohware		
			Gewürze	Zwischenprodukt (roh) ¹	Pilz ²
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea</i> spp.	2	50 (1)	50 (1)	
	<i>Curtobacterium plantarum</i>	2	(2)		
	<i>Atlantibacter hermannii</i>	1	(1)		
	<i>E. americana</i>	8		37,5 (3)	62,5 (5)
	<i>K. intermedia</i>	1		(1)	
	<i>Mixta</i> spp.	1	(1)		
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>P. fluorescens</i> -Complex	29		24,1 (7)	75,9 (22)
	<i>P. putida</i> -Gruppe	5	40 (2)		60 (3)
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. guillouiae</i>	1			(1)
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> spp.	4	75 (3)		25 (1)
	<i>B. cereus</i> -Gruppe	6	(6)		
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	6	(6)		
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe	3	(3)		

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, K: *Kluyvera*, P: *Pseudomonas*

P. fluorescens-Complex: dazu gehören folgende Gruppen: *P. corrugata*; *P. fluorescens*; *P. fragi*; *P. gessardii*; *P. jessenii*; *P. koreensis*; *P. mandelii*

¹ nicht erhitztes, gewolfenes Brät,

² Kräuterseitling

Werte in Klammer entsprechen der Anzahl der Bakterienisolate

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die mikrobiologische Qualität pilzhaltiger Convenienceprodukte zu überprüfen. Die, aus dem Rohstoff (Kräuterseitling), den Gewürzen, den rohen Zwischenprodukten, dem Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine) und den fertig verpackten Produkten (Gyros, Bratstreifen, Rostbratwurst und Käsebratwurst), isolierten Bakterien wurden auf ihre Vermehrungsfähigkeit bei Temperaturen von 5-55 °C, sowie ihrer Fähigkeit Lebensmittel-assoziierte Enzyme (Lipase, Lecithinase und Gelatinase), unter optimalen Wachstumsbedingungen (30 °C) zu exprimieren, untersucht. Ihre Fähigkeit Mannitol zu fermentieren wurde ebenfalls überprüft. Die Ergebnisse sollten Informationen über das Verderbnispotential dieser unerwünschten Mikroorganismen liefern.

Bei der Diskussion der Ergebnisse war zu beachten, dass in anderen Studien zum Teil abweichende Nachweisverfahren für die Bestätigung des Wachstums bei unterschiedlichen Temperaturen und der Enzymreaktion verwendet wurden. In fast allen Publikationen zum Vermehrungsverhalten der untersuchten Bakterien war es Ziel, Wachstumskurven unter den gegebenen Bedingungen zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit sollte lediglich geprüft werden, ob die ausgewählten Bakterien-Isolate unter den gegebenen Temperaturbedingungen auf TSAYE anwachsen konnten. Limitierend war bei dieser Methode, dass Nähragar bei längeren Testzeiten austrocknen konnten. Um dies zu vermeiden, wurden diese Tests in einer feuchten Kammer durchgeführt.

4.1. Wachstumsverhalten und Enzymaktivität der Bakterienisolate im Vergleich mit der Literatur

Betrachtet man die elf am häufigsten isolierten Bakterien, zeigte sich, dass nahezu alle *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* in der Lage waren unter Kühlbedingungen zu wachsen (Tab. 7 bzw. Anhang Tab. 3). Die Fähigkeit dieser Bakterienfamilien psychrotroph zu wachsen, beschrieben auch KRÄMER & PRANGE (2017) sowie KÖPKE (2002). Sowohl die eigenen Ergebnisse, als auch jene von WU & BIRCH (2005) zeigten, dass *Pantoea dispersa* unfähig war unter Kühlbedingungen zu wachsen. Mit Erhöhung der Bebrütungstemperatur auf 42 °C nahm die Wachstumsbereitschaft der gramnegativen Bakterienisolate deutlich ab. Bei 55 °C war kein Wachstum mehr feststellbar. Bei 42° C wuchsen alle *Yersinia* spp. [vgl. MURROS (2017), dieser wies Wachstum bei *Y. enterocolitica* bei -2-45 °C nach] und alle *P. putida* [vgl. CALDERA ET AL. (2016), sie wiesen Wachstum bei 4-45 °C nach].

Eigene Untersuchungen ergaben bei 11,1 % der *Pantoea*-, 44,4 % der *E. americana* und 16,7 % der *S. liquefaciens*-Isolate ein Wachstum bei 42 °C. Ein Vergleich mit vorangegangenen Studien gestaltete sich bei diesen Vertretern der *Enterobacteriaceae* sehr schwierig, da entweder keine entsprechenden Studien vorlagen (*Pantoea* spp. und *E. americana*), oder niedrigere Maximaltemperaturen gewählt wurden. SALGADO ET AL. (2021) wiesen bei *S. liquefaciens* ein Wachstum bei 37 °C (gewählte Maximaltemperatur) nach.

Nur ein geringer Teil (18,6 %) der Isolate des *P. fluorescens*-Complexes wuchsen bei 42 °C. CALDERA ET AL. (2016) bestätigten die Wachstumsbereitschaft von *Pseudomonadaceae* bei Temperaturen von über 40 °C. Danach konnten sich 67 % der Isolate bei 40 °C und 38 % bei 45 °C vermehren. *A. johnsonii* wuchs bei 5 °C, aber bei 42 °C nicht mehr, was Angaben aus der Literatur bestätigen. In diesen Studien sind Wachstumsbereiche von 2-28 °C untersucht worden (VITHANAGE ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018).

Die Fähigkeit Lebensmittel-assoziierte Enzyme zu exprimieren war bei den gramnegativen Bakterienisolaten sehr unterschiedlich ausgeprägt. Wie in einer Studie von YUAN ET AL. (2018) beschrieben, ergaben die Untersuchungen für diese Arbeit, dass alle *S. liquefaciens*, alle Verderbnis-relevanten Enzyme (Gelatinase, Lipase, Lecithinase) exprimieren konnten (Tab. 8). Zwei *E. americana*-Isolate konnten Gelatine nach 8-15 Tagen abbauen, eines Lecithinase exprimieren. Über eine Lipaseaktivität verfügten diese Isolate nicht. BIRBIR & ULUSOY (2015) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Einige *Pantoea*-Isolate zeigten eine Gelatinaseaktivität, eine Lipase- und Lecithinaseaktivität war generell nicht nachweisbar. *Yersinia* spp. konnten generell keine Lebensmittel-assoziierten Enzyme freisetzen, was die Ergebnisse von BIRBIR & ULUSOY (2015) bestätigen. Alle Bakterien des *P. fluorescens*-Complexes (Anhang Tab. 4) zeigten eine Lipaseaktivität. In vergleichbaren Studien war das Bild nicht so eindeutig. Danach konnten 26,3-58,2 % der getesteten Isolate das Enzym freisetzen (CALDERA ET AL. 2016, YUAN ET AL. 2018, MORALES ET AL. 2016). Die Lecithinaseaktivität war innerhalb des *P. fluorescens*-Complexes sehr unterschiedlich ausgeprägt. Alle Isolate der *P. fragi*- und *P. jessenii*-Gruppe waren generell Lecithinase-negativ. Innerhalb der *P. fluorescens*- und der *P. mandelii*-Gruppe war das Bild differenziert. 96,6 % bzw. 20 % konnten Lecithinase exprimieren (Anhang Tab. 3). Nach Literaturangaben zeigten sowohl *P. jessenii*, *P. fluorescens* als auch *P. fragi* eine Lecithinaseaktivität (CALDERA ET AL. 2016). Nur ein Teil der Isolate des *P. fluorescens*-Complexes (25 °C: 67,4 %, 30 °C: 39,5 %) konnten Gelatine abbauen. Untersuchungen von CALDERA ET AL. (2016) ergaben für die Proteaseaktivität von *P. fluorescens* ebenfalls ein sehr differenziertes Bild, wobei eine Gelatinaseaktivität explizit nicht untersucht wurde. Wie in der Literatur beschrieben, zeigten

alle *P. putida* eine Lipaseaktivität (YUAN ET AL. 2018). Weitere Enzymaktivitäten konnten in dieser Gruppe nicht festgestellt werden (Tab. 8). Im Gegensatz dazu exprimierten bei CALDERA ET AL. (2016) 83,3 % Lipase und 33,3 % Lecithinase.

B. cereus ist, nach Literaturangaben, generell bei 5-55 °C wachstumsfähig, wobei mesophilen Stämmen kein Wachstum unter 10 °C und psychrotrophen Stämmen bei 37 °C nur schwaches Wachstum bescheinigt wird (vgl. Publikation auf Foodstandards. <https://www.food-standards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf>, (Zugriff 10.02.2021)). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse meiner Studie bei einem *B. wiedmannii*- und einem *B. paramycooides*-Isolat einen breiteren Temperaturbereich (5-55 °C bzw. 5-42 °C), in dem Wachstum nachweisbar war. Alle Isolate der *B. cereus*-Gruppe konnten bei 42 °C wachsen (Tab. 7 bzw. Anhang Tab. 3). DIOMANDE ET AL. (2015) definierten in ihrer Studie die Wachstumsgrenzen für *Bacillus*-Gruppen. Für *B. amyloliquefaciens* (*B. subtilis*-Gruppe) und *B. subtilis* waren es 15-50 °C bzw. 5-45 °C, *B. licheniformis* 15-55 °C und für *B. pumilus* 5-50 °C. In Übereinstimmung mit dieser Studie wuchsen alle Isolate der *B. licheniformis*-Gruppe bei 42 und 55 °C. Lediglich die zwei *B. piscis*-Isolate (*B. licheniformis*-Gruppe) vermehrten sich bereits ab 12 °C (Tab. 7 bzw. Anhang Tab. 3). Alle Isolate der *B. subtilis*-Gruppe und der *B. pumilus*-Gruppe wuchsen bei 42 °C. Bei den Grenztemperaturen im niedrigen und höheren Temperaturbereich war das Bild innerhalb der Gruppen differenzierter. Ausnahmen waren ein *B. velezensis*- (*B. subtilis*-Gruppe), jeweils ein *B. safensis*- und ein *B. xiamenensis*-Isolat (*B. pumilus*-Gruppe), welche bei 5-55 °C, 5-42 °C und 7-55 °C ein Wachstum zeigten (Tab. 7 bzw. Anhang Tab. 3). In Übereinstimmung mit einer Studie von SADIQ ET AL. (2016) zeigten alle Isolate der *B. cereus*-Gruppe eine positive Lipase-, Lecithinase- und Gelatinaseaktivität, wobei SADIQ ET AL. (2016) die Proteaseaktivität an Stelle der Gelatinaseaktivität untersuchten. Differenzierter war die Enzymaktivität der Isolate der *B. pumilus*-, *B. licheniformis*- und *B. subtilis*-Gruppe. Die Untersuchungen ergaben, dass alle Isolate der *B. pumilus*-, einzelne Isolate der *B. licheniformis*- und *B. subtilis*-Gruppe Lipase, Lecithinase und Gelatinase exprimieren konnten (Tab. 8 und Anhang Tab. 4). Sowohl für *B. pumilus* (SADIQ ET AL. 2016) als auch *B. licheniformis* und *B. subtilis* (PARK ET AL. 2020) wurde eine Lipase- und Proteaseaktivität beschrieben. *B. licheniformis* und *B. subtilis* konnten in der Studie von PARK ET AL. (2020) aber kein Lecithin abbauen.

Mannit als Kohlenstoffquelle nutzten alle *Enterobacteriaceae*, ein Großteil (83,0 %) der *Pseudomonadaceae* und 72,7 % der *Bacillaceae* (Tab. 9). Studien von BIRBIR & ULUSOY (2015) (*E. americana*, *Y. enterocolitica* und *S. liquefaciens*), MEI ET AL (2016) (*P. fluorescens*-

Gruppe) und VAN DEN BELD ET AL. (2016) (*P. fluorescens*-Gruppe und *P. gessardii*-Gruppe) beschreiben ebenfalls die Fähigkeit dieser Bakterien Mannitol zu fermentieren.

4.2 Zusammenhang zwischen dem Kontaminationslevel und dem Wachstumsverhalten von, aus den Endprodukten am Ende des MHD, isolierten Bakteriengruppen

Je nach Verarbeitungsgrad und Produktart liegt der Richtwert von Convenienceprodukten nach Angaben der DGHM (2017) zwischen 4.0 log KBE/g und 6.0 log KBE/g. In meiner Studie wurden 41 % der Isolate (n=16/39) aus Endprodukten mit einer Keimbelastung ≥ 6.1 log KBE/g als dominierende Flora isoliert. Alle diese Bakterienarten (z.B. *S. liquefaciens*, *Shewanella* spp.) konnten unter Kühlbedingungen sehr gut wachsen und mit Ausnahme von *Lelliottia* spp. mindestens ein Verderbnis-relevantes Enzym exprimieren (Abb. 10). Mit einer niedrigen Keimzahl (≤ 4.0 log KBE/g) wurden 56,4 % (n=22/39) Bakterien isoliert. Davon zeigten nur 27,3 % (n=6/22) ein Wachstum unter Kühlbedingungen, 72,7 % (n= 16/22) waren dazu nicht in der Lage (Abb. 10).

4.3. Mögliche Kontamination der Endprodukte über das Produktionsumfeld (Verpackungs- und Wurstschälmaschine)

Insgesamt wurden 20,4 % aller Bakterienisolate aus dem Produktionsumfeld isoliert. Dominant waren *A. johnsonii*-, *Pantoea brenneri*-Isolate und Isolate des *P. fluorescens*-Complexes. Die überwiegende Mehrheit der Bakterienisolate wurde aus der Verpackungsmaschine isoliert (Tab. 9). TAKAHASHI ET AL. (2017) zeigten auf, dass eine Kontamination von Lebensmitteln durch den Kontakt mit Arbeitsflächen erfolgen kann. MØRETRØ & LANGSRUD (2017) beschrieben die Fähigkeit von Bakterien schwer zu beseitigende Biofilme zu bilden. Kritisch zu betrachten waren deshalb vor allem jene Bakterienisolate, die unter üblichen Kühlbedingungen (5 und 7 °C) wachsen konnten, eine entsprechende Enzymaktivität aufwiesen und darüber hinaus auch in den Endprodukten nachgewiesen werden konnten. Diese Voraussetzungen erfüllten alle *S. liquefaciens* und ein *Pantoea brenneri*, wobei *S. liquefaciens* alle Verderbnis-relevanten Enzyme und *Pantoea brenneri* nur Gelatinase exprimieren konnten (Anhang Tab. 4).

4.4 Mögliche Kontamination der Endprodukte durch Bakterien aus dem Rohstoff (Kräuterseitling), den Gewürzen und dem gewolften, rohen Zwischenprodukt

Es wurden 19,8 % (n=32/162) der Bakterienisolate aus dem Rohstoff Pilz, 15,4 % (n=25/162) aus den Gewürzen und 7,4 % (n=12/162) aus dem rohen Zwischenprodukt isoliert (Tab. 10). Bakterien können lt. THANH ET AL. (2018) bzw. SARANRAJ ET AL. (2012) über Lebensmittelzutaten oder durch ihre ubiquitäre Verbreitung bereits im Lebensmittel vorhanden sein. Sowohl aus den Endprodukten, als auch aus dem Rohstoff Pilz, wurden Bakterien des *P. fluorescens*-Complexes (*P. deceptionensis*, *P. prosekii*) isoliert, welche unter Kühltemperaturen (5 und 7 °C) wachstumsfähig waren und das Enzyme Lipase exprimieren konnten. Bakterien der *B. subtilis*-Gruppe (*B. halotolerans*, *B. nakamurai*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*) wurden sowohl aus den Endprodukten als auch aus den Gewürzen isoliert. Diese Bakterienisolate konnten zwar nicht unter Kühlbedingungen wachsen, jedoch alle Verderbnis-relevanten Enzyme exprimieren. Kein Bakterienisolat aus dem rohen Zwischenprodukt wurde in den Endprodukten nachgewiesen.

4.5 Schlussfolgerung

1. Alle gramnegativen Bakterienisolate der Familien der *Enterobacteriaceae* (mit Ausnahme eines *Pantoea dispersa*-Isolates), *Pseudomonadaceae* und *Moraxellaceae* zeigten unter Kühltemperaturen (5-12 °C) ein sehr gutes Wachstum. Es fanden sich nur diese Keimgruppen mit einer hohen Keimbelastung ($\geq 6.1 \log \text{KBE/g}$) in den Endprodukten, woraus sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Vermehrungsfähigkeit bei Kühltemperaturen und dem Kontaminationslevel im gelagerten Endprodukt ableiten lässt.
2. Im Gegensatz dazu waren die sporenbildenden *Bacillaceae*-Isolate nur vereinzelt unter Kühlbedingungen wachstumsfähig. Sie zeigten aber bei 42 °C ein sehr gutes Wachstum und waren überwiegend auch bei 55 °C in der Lage sich zu vermehren.
3. Sowohl gramnegative als auch grampositive Bakterienisolate exprimierten Verderbnis-relevante Enzyme, wie Lipase, Lezithinase oder Gelatinase.
4. Das Verderbnispotential von gramnegativen Bakterien musste, aufgrund ihrer Wachstumsfähigkeit bei Kühltemperaturen (5 und 7 °C), höher eingestuft werden als jenes der grampositiven Bakterienisolate, welche bei Kühltemperaturen nur vereinzelt ein Wachstum zeigten.
5. Die Gefahr von *Bacillaceae* für den Lebensmittelverderb sollte dennoch nicht unterschätzt werden, da sie die Fähigkeit besitzen Endosporen auszubilden und eine Wachstums-

bereitschaft ab ca. 12 °C zeigen. Falsche Lagerbedingungen oder eine Unterbrechung der Kühlkette können dazu führen, dass die Sporen wieder auskeimen und der Verderbnisprozess aktiviert wird.

6. Eine Einschleppung von Keimen durch Rohstoffe (z. B. Pilze, Gewürze) in den Betrieb lässt sich kaum vermeiden. Daher muss bei der Produktion darauf geachtet werden, dass diese Keime weitestgehend inaktiviert werden (z. B. durch entsprechende Erhitzung). Dies dürfte dem Unternehmen weitestgehend gelungen sein, da nur wenige Bakterien aus den Rohstoffen in den Endprodukten nachgewiesen werden konnten.
7. Im Besonderen ist auf eine gründliche Reinigung und Desinfektion aller Kontaktflächen zu achten, damit die Qualität der erzeugten Produkte nicht durch Rekontamination, infolge von schwer zu beseitigenden Biofilmen, beeinträchtigt wird. Im Hinblick auf die mit hoher Keimzahl isolierten Keimgruppen (v. a. *S. liquefaciens*- und *P. fluorescens*-Complex-Isolate) in den Endprodukten sollten im Unternehmen die Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen regelmäßig auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Besondere Aufmerksamkeit sollte auch auf schwer zugängliche Bereiche, z. B. in der Verpackungsmaschine, gerichtet werden. So können Defizite schneller erkannt und rechtzeitig Gegenmaßnahmen ergriffen werden.
8. Die vorliegenden Ergebnisse spiegeln die Bakterienflora der verschiedenen Ebenen (Rohstoffe, Kontaktflächen, Endprodukt) in einem bestimmten Untersuchungszeitraum wider. Für eine kontinuierliche Beurteilung des Hygienestandards des Unternehmens sind regelmäßige, systematisch angelegte mikrobiologische Analysen in diesen Bereichen notwendig.

5. Zusammenfassung

Für diese Arbeit wurden 162 Bakterienisolate [aus dem Rohstoff (Kräuterseitling), den Gewürzen, dem rohen Zwischenprodukt, den Endprodukten und dem Produktionsumfeld] isoliert und auf ihre Vermehrungsfähigkeit bei Temperaturen von 5-55 °C, auf ihre Fähigkeit Lebensmittel-assoziierte Enzyme (Lipase, Lecithinase, Gelatinase) zu exprimieren sowie Mannit zu fermentieren, untersucht.

99,1 % der Bakterienisolate aus den Familien der *Enterobacteriaceae*, der *Pseudomonadaceae* und der *Moraxellaceae* waren bei Temperaturen von 5-12 °C vermehrungsfähig. Mit Erhöhung der Bebrütungstemperatur nahm die Bereitschaft der Vermehrung deutlich ab. Bei 42 °C wuchsen 27,4 % (n=29/106) dieser Isolate und bei 55 °C kam das Wachstum vollständig zum Erliegen. Nur *Pantoea dispersa* zeigte ein untypisches Wachstumsverhalten und wuchs nur bei 42 °C.

Im Gegensatz dazu zeigten Isolate aus der Familie der *Bacillaceae* (aerobe Sporenbildner) unter Kühlbedingungen (5-7 °C) nur vereinzelt ein Wachstum. 10,4 % (n=5/48) dieser Isolate wuchsen unter diesen Bedingungen. Mit Erhöhung der Bebrütungstemperatur nahm bei diesen Bakterienisolaten die Wachstumsbereitschaft deutlich zu. Nahezu alle Bakterienisolate ließen sich bei 42 °C sehr gut vermehren. 68,8 % (n=33/48) der *Bacillaceae*-Isolate waren bei 55 °C wachstumsfähig.

Grundsätzlich konnten sowohl gramnegative, als auch grampositive Bakterienisolate, Lebensmittel-assoziierte Enzyme exprimieren und Mannitol fermentieren. 91,6 % (n=141/154) der Bakterienisolate waren in der Lage zumindest ein Verderbnis-relevantes Enzym zu exprimieren. 74,7 % (n=115/154) nutzten Mannit als Kohlenstoffquelle.

Mit einer hohen Keimbelastung ($\geq 6.1 \log$ KBE/g) in den Endprodukten fanden sich ausschließlich Bakterienisolate, die unter Kühlbedingungen wachstumsfähig waren und eine entsprechende Enzymaktivität aufwiesen. Aus diesem Grund muss das Verderbnispotential von gramnegativen Bakterienisolaten unter diesen Bedingungen höher eingestuft werden. Deshalb ist es notwendig Rekontaminationen, durch gramnegative Bakterien, zu vermeiden und die Reinigung und Desinfektion von lebensmittelberührenden Flächen und Maschinenteile besonders auf diese Zielgruppe zu richten.

6. Summary

In this study 162 bacteria, isolated from king oyster mushrooms (raw material), spices, raw intermediate product, end products and the production environment, were tested for their ability to reproduce at temperatures from 5 to 55 °C. They were examined for their ability to produce food-associated enzymes, like lipase, lecithinase, gelatinase and fermenting mannitol, too.

99,1 % of the *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Moraxellaceae* bacterial isolates were able to reproduce at temperatures from 5 to 12 °C. By increasing the incubation temperature, the reproduction decreased significantly. 27,4 % (n=29/106) of these isolates grew at a temperature of 42 °C. At a temperature of 55 °C growth stopped completely. Only *Pantoea dispersa* showed an atypical growth behaviour and grew only at 42 °C.

Bacillaceae (aerobic spore formers) showed only sporadic growth under cooling conditions (5 to 7 °C). Only 10,4 % of these isolates grew under these conditions. By increasing the incubation temperature, the growth propensity of these bacterial isolates increased significantly. Almost all isolates could be reproduced very well at a temperature of 42 °C. 68.8 % (n=33/48) of the *Bacillaceae* isolates were able to grow at 55 °C.

Both gram-negative and gram-positive bacterial isolates could express food-associated enzymes and ferment mannitol. 91.6 % (n=141/154) of the bacterial isolates were able to express at least one spoilage-related enzyme. 74.7 % (n=115/154) used mannitol as a carbon source. Only bacterial isolates with a high bacterial load (≥ 6.1 log CFU/g) which were able to grow under refrigeration conditions and had appropriate enzyme activity were detected in the end products. Under these conditions the spoilage potential of gram-negative bacterial isolates must be classified higher. Therefore, it is necessary to avoid recontamination by gram-negative bacteria and to focus cleaning and disinfection of food-contact surfaces and machine parts especially on this target group.

7. Abkürzungsverzeichnis

-	gramnegativ
+	grampositiv
µl	Mikroliter
A.	<i>Acinetobacter</i>
ABl.	<i>Amtsblatt</i>
AP	Verpackung ohne Behandlung
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
B.	<i>Bacillus</i>
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
E.	<i>Ewingella</i>
et al.	und andere (et alii/aliae)
g	Gramm
GEL	Gelatinase
H	Wasserstoff
K.	<i>Kluyvera</i>
KBE	Koloniebildende Einheiten
LEZ	Lezithinase
LIP	Lipase
MAN	Mannitolfermentation
MAP	Verpackung mit modifizierter Atmosphäre
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
mm	Millimeter
MYP	Mannitol Egg Yolk Polymyxin (Mannitol-Eigelb-Polymyxin)
n	Gesamtanzahl Isolate
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
P.	<i>Pseudomonas</i>
S.	<i>Serratia</i>
spp.	Spezies
TBA	Tributyrim-Agar
TSAYE	Tryptone-Soya Yeast-Extract-Agar (Trypton-Soja-Agar mit 0,6 % Hefeextrakt)
UHT	Ultrahocherhitzt
Y.	<i>Yersinia</i>

8. Literaturverzeichnis

Bücher & Publikationen

- Abo-Amer, A. E., Shobrak, M. Y., & Altalhi, A. D. (2018). Isolation, antimicrobial resistance profile and molecular characterization of bacteria from broiler. *BIOSCIENCE RESEARCH*, 15(2), 900-912.
- André, S., Zuber, F., & Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International journal of food microbiology*, 165(2), 134-143.
- Baumgart, J., Becker, B., & Stephan, R. (2015). *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. Behr's Verlag, 200.
- van den Beld, M. J., Reinders, E., Notermans, D. W., & Reubsaet, F. A. (2016). Possible misidentification of species in the *Pseudomonas fluorescens* lineage as *Burkholderia pseudomallei* and *Francisella tularensis*, and emended descriptions of *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas gessardii* and *Pseudomonas proteolytica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(9), 3420-3425.
- Bertrand, R. L. (2019). Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of bacteriology*, 201(7).
- Birbir, M., & Ulusoy, K. (2015). Identification and metabolic activities of bacterial species belonging to the Enterobacteriaceae on salted cattle hides and sheep skins.
- Brightwell G, Boerema J, Mills J, Mowat E, Pulford D. 2006. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 109:47-53.
- Calasso M, Ercolini D, Mancini L, Stellato G, Minervini F, Di Cagno R, De Angelis M, Gobbetti M. 2016. Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiol* 54:115-26.
- Caldera, L., Franzetti, L. V., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142-153.

- Campbell IV, W. A., Deshmukh, A., Blum, S., Todd, L., Mendonca, N., Weist, J., Zent, J., Hoang, T.V., Blackshaw, S., Leigt, J., & Fischer, A. J. (2019). Matrix-metalloproteinase expression and gelatinase activity in the avian retina and their influence on Müller glia proliferation. *Experimental neurology*, 320, 112984.
- Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28(2), 177-182.
- Carvalho, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2020). *Acinetobacter* spp. in food and drinking water—A review. *Food Microbiology*, 103675.
- dela Cruz, T. E. E., & Torres, J. M. O. (2012). Gelatin hydrolysis test protocol.
- Dettling, A., Wedel, C., Huptas, C., Hinrichs, J., Scherer, S., & Wenning, M. (2020). High counts of thermophilic spore formers in dairy powders originate from persisting strains in processing lines. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108888.
- Diomande, S. E., Ngoyen-The, C., Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in microbiology*, 6, 813.
- Eggleston, G., Basso, L. C., de Amorim, H. V., Paulillo, S. C. D., & Basso, T. O. (2007). Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. *Zuckerindustrie*, 132(1), 33.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Microbiology spectrum*, 7(3), 7-3.
- Ehrenberg, M., Bremer, H., & Dennis, P. P. (2013). Medium-dependent control of the bacterial growth rate. *Biochimie*, 95(4), 643-658.
- Ekpenyong, M., Asitok, A., Odey, A., & Antai, S. (2016). Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp. SLO3. *Nigerian Journal of Biopesticides*, 1, 70-82.
- Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22.
- Femi-Ola, T. O., Odeyemi, A. T., Olaiya, B. S., & Ojo, O. O. (2018). Characterization of lipase from *Bacillus subtilis* Isolated from oil contaminated soil. *J. Appl. Environ. Microbiol*, 6, 10-17.

- Franzen, R. (2017). Transformation von *B. subtilis* 168: Optimierung und Regulation des Transkriptionsfaktors ComK.
- Guðbjörnsdóttir B, Einarsson H, Thorkelsson G. 2005. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: Influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technol Biotechnol* 43:55-61.
- Gurumallesh, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254-267.
- Hahne, J., Isele, D., Berning, J., & Lipski, A. (2019). The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. *Food microbiology*, 79, 11-19.
- Heiss, R., & Eichner, K. (2018). *Haltbarmachen von Lebensmitteln: Chemische, physikalische und mikrobiologische Grundlagen der Qualitätserhaltung*. Springer-Verlag, 81.
- Heydarzadeh, M., Javadi, A., & Rad, M. G. (2020). Detection of emetic toxin (*ces*) gene and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* isolates from Iranian traditional dairy products.
- Hultman J, Rahkila R, Ali J, Rousu J, Björkroth KJ. 2015. Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Appl Environ Microbiol* 81:7088-97.
- Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in microbiology*, 8, 2000.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Knoop, N. (2014). Identifizierung von Enterobacteriaceae und Nonfermentern mittels MALDI-TOF MS unter besonderer Berücksichtigung von multiresistenten und darmpathogenen Erregern.

- Köpke, U. (2002). Zusammensetzung der psychrotrophen Hackfleischmikroflora (Doctoral dissertation, Freie Universität Berlin, Universitätsbibliothek).
- Krämer, J., & Prange, A. (2017). Lebensmittel-mikrobiologie (Vol. 1421). UTB, 55; 75-78; 91; 131-137; 144-146.
- Langsrud S, Moen B, Møretrø T, Løype M, Heir E. 2016. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *J Appl Microbiol* 120:366-78.
- Langsrud S, Seifert L, Møretrø T. 2006. Characterization of the microbial flora in disinfecting footbaths with hypochlorite. *J Food Prot* 69: 2193-8.
- Liu NT, Lefcourt AM, Nou X, Shelton DR, Zhang G, Lo YM. 2013. Native microflora in fresh-cut produce processing plants and their potentials for biofilm formation. *J Food Prot* 76:827-32.
- Liu, L., Feng, Y., Wei, L., Qiao, F., & Zong, Z. (2020). Precise Species Identification and Taxonomy Update for the Genus *Kluyvera* With Reporting *Kluyvera sichuanensis* sp. nov. *Frontiers in microbiology*, 11, 2288.
- Ludewig, M., & Fehlhaber, K. (2009). Investigations on the generation time of selected gramnegative bacteria species. *Archiv für lebensmittelhygiene*, 60(2), 56-60.
- Marouani-Gadri N, Augier G, Carpentier B. 2009. Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection - Influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol* 133:62-7.
- Mei, Y. Z., Huang, P. W., Liu, Y., He, W., & Fang, W. W. (2016). Cold stress promoting a psychrotolerant bacterium *Pseudomonas fragi* P121 producing trehaloase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 1-9.
- Mertz AW, Koo OK, O'Bryan CA, Morawicki R, Sirsat SA, Neal JA, Crandall PG, Ricke SC. 2014. Microbial ecology of meat slicers as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Contr* 42:242-7.
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4744.

- Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Celano G, Gobbetti M. 2015. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiol* 52:66-76.
- Morales, P. A., Aguirre, J. S., Troncoso, M. R., & Figueroa, G. O. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. present in spoiled poultry fillets sold in retail settings. *LWT*, 73, 609-614.
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022-1041.
- Møretrø T, Langsrud S, Heir E. 2013. Bacteria on meat abattoir meat production process surfaces after sanitation: characterisation of survival properties of *Listeria monocytogenes* and the commensal bacterial flora. *Adv Microbiol* 3:255-64.
- Møretrø T, Sonerud T, Mangelrød E, Langsrud S. 2006. Evaluation of the antimicrobial effect of a triclosan-containing industrial floor used in the food industry. *J Food Prot* 69:627–33.
- Mulet, M., Gomila, M., Scotta, C., Sánchez, D., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2012). Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Systematic and applied microbiology*, 35(7), 455-464.).
- Murros, A. (2017). Identification and Characterization of *Yersinia* from Food and Environmental Sources.
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 311-331.
- O'Hara, C. M., & Farmer III, J. J. (2015). *Ewingella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-13.
- Oliveira, R. B., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E., Portela, J. B., Cruz, A. G., & Sant'Ana, A. S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 11-19.

- Osarenotor, o. (2012) bacteriological quality of indoor air environment in private and government owned abattoirs in benin city, nigeria (doctoral dissertation, department of microbiology submitted to the post-graduate school in partial fulfillment of the requirements for the award of a master of science (m. Sc) degree in environmental and public health microbiology, university of benin).
- Park, H., Lee, M., Jeong, D., Park, S., Ji, Y., Todorov, S. D., & Holzapfel, W. H. (2020). Safety Evaluation and In vivo Strain-Specific Functionality of Bacillus Strains Isolated from Korean Traditional Fermented Foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-12.
- Pavan, M. E., Franco, R. J., Rodriguez, J. M., Gadaleta, P., Abbott, S. L., Janda, J. M., & Zorzópulos, J. (2005). Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard et al. 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera cochleae* as a later synonym of *K. intermedia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 437-442.
- Peng, H., Ford, V., Frampton, E. W., Restaino, L., Shelef, L. A., & Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiology*, 18(3), 231-238.
- Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S., & Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *International journal of food microbiology*, 158(1), 1-8.
- Pothakos V, Stellato G, Ercolini D, Devlieghere F. 2015. Processing environment and ingredients are both sources of *Leuconostoc gelidum*, which emerges as a major spoiler in ready-to-eat meals. *Appl Environ Microbiol* 81:3529-41.
- Radovanovic, R. S., Savic, N. R., Ranin, L., Smitran, A., Opavski, N. V., Tepavcevic, A. M., Ranin, J., & Gajic, I. (2020). Biofilm Production and Antimicrobial Resistance of Clinical and Food Isolates of *Pseudomonas* spp. *Current Microbiology*, 77(12), 4045-4052.
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47-56.
- Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pei, Z., & He, G. (2016). The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *International journal of food microbiology*, 238, 193-201.

- Salgado, C. A., de Almeida, F. A., Barros, E., Baracat-Pereira, M. C., Baglinière, F., & Vanetti, M. C. D. (2021). Identification and characterization of a polyurethanase with lipase activity from *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw cow's milk. *Food Chemistry*, 337, 127954.
- Saranraj, P., Stella, D., & Reetha, D. (2012). Microbial spoilage of vegetables and its control measures: a review. *Int. J. Nat. Prod. Sci*, 2(2), 1-12.
- Sharma M, Anand SK. 2002. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiol* 19:627-36.
- Sinell, H. J. (Ed.). (2004). Einführung in die Lebensmittelhygiene. Georg Thieme Verlag, 110.
- Sousa, S. F., Ramos, M. J., Lim, C., & Fernandes, P. A. (2015). Relationship between enzyme/substrate properties and enzyme efficiency in hydrolases. *ACS Catalysis*, 5(10), 5877-5887.
- Steiner, C. (2019). Entwicklung einer halbtechnischen Deponiesickerwasserreinigungsanlage und Analyse des Metaproteoms in Belebtschlamm (Doctoral dissertation, Universität Duisburg-Essen).
- Stellato G, De Filippis F, La Stora A, Ercolini D. 2015. Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl Environ Microbiol* 81:7893-904.
- Stellato G, La Stora A, De Filippis F, Borriello G, Villani F, Ercolini D. 2016. Overlap of spoilage-associated microbiota between meat and the meat processing environment in small-scale and large-scale retail distributions. *Appl Environ Microbiol* 82:4045-54.
- Swinnen, I. A. M., Bernaerts, K., Dens, E. J., Geeraerd, A. H., & Van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International journal of food microbiology*, 94(2), 137-159.
- Takahashi, H., Saito, R., Miya, S., Tanaka, Y., Miyamura, N., Kuda, T., & Kimura, B. (2017). Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae. *International journal of food microbiology*, 246, 92-97.
- Tang X, Flint SH, Brooks JD, Bennett RJ. 2009. Factors affecting the attachment of microorganisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants. *J Appl Microbiol* 107: 443-51.

- Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, M. B., Grosset, N., Galet, O., Breton, V., Gautier, M., & Baron, F. (2020). Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. *Food microbiology*, 86, 103317.
- Teixeira P, Lopes Z, Azeredo J, Oliveira R, Vieira MJ. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol* 22:247-51.
- Tejedor-Calvo, E., García-Barreda, S., Sánchez, S., & Marco, P. (2020). Effect of bacterial strains isolated from stored shiitake (*Lentinula edodes*) on mushroom biodeterioration and mycelial growth. *Agronomy*, 10(6), 898.
- Thanh, M. D., Frentzel, H., Fetsch, A., Krause, G., Appel, B., & Mader, A. (2018). Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. *Food Control*, 83, 75-84.
- Vithanage, N. R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E. A., Yeager, T. R., & Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, 80-90.
- Wallhäußer, K. H. (2013). *Lebensmittel und Mikroorganismen: Frischware—Konservierungsmethoden—Verderb*. Springer-Verlag, 34.
- Wang, N., Sadiq, F. A., Li, S., He, G., & Yuan, L. (2020). Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals the regulators in biofilm formation and biofilm control of *Bacillus licheniformis*. *Food Control*, 110, 107029.
- Wu, L., & Birch, R. G. (2005). Characterization of the highly efficient sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* UQ68J and cloning of the sucrose isomerase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1581-1590.
- Yazici, E., Birbir, M., & Caglayan, P. (2018). phenotypic characterization and antibiotic susceptibilities of *ewingella americana* and *kluveria intermedia* isolated from soaked hides and skins. In *International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS)* (pp. 371-376). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCDTP.

- Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T. J., Li, Y., Gu, J. S., Yang, H. Y., & He, G. Q. (2018). Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 19(8), 630-642.
- Zhang, Y., Wei, J., Yuan, Y., & Yue, T. (2019). Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain. *International journal of food microbiology*, 290, 86-95.
- Ziganshina, E. E., Mohammed, W. S., Shagimardanova, E. I., Shigapova, L. H., & Ziganshin, A. M. (2018). Draft genome sequence of *Bacillus pumilus* strain EZ-C07 isolated from digested agricultural wastes. *BMC research notes*, 11(1), 1-3.
- Zschiechrich, C. P., & Holleben, O. S. (2015). Nebenwege des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis*: Regulation der Methylglyoxalsynthase und der Zitratsynthase CitA (Doctoral dissertation, Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen).

Verordnungen, Gesetze

- VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit, ABl. L 31
- VERORDNUNG (EG) Nr. 852/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene, ABl. L139/1
- VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, ABl. L338/1

Internetseiten:

Firma Carlroth. <https://www.carlroth.com/medias/BA-5765-DE.pdf?context=bWFzdGVyfGluc3RydWN0aW9uc3wyMjMzNjF8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfGluc3RydWN0aW9ucy9oOTEvDgxlZkwMzc3MTMwMTQ4MTQucGRmfGJjOGYwZTkwyTU3YWU0MmQwYmM2MGQ2NjEwYzVjNDQ1MjUxY2ZhZTgzODdhZDdiOTkxNWZlNjMwMTIyZThjMGM>.

chemie.de. Oxidoreduktasen. <https://www.chemie.de/lexikon/Oxidoreduktasen.html> (Zugriff 15.02.2021).

Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr Wupper. <https://www.cvua-rw.de/themen/untersuchungen/bakteriologie.html> (Zugriff 14.01.2021).

DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2017 Richt- und Warnwerte für hitzebehandelte, verzehrfertige Speisen/Gerichte z.B.: panierte Schnitzel, Frikadellen, Süßspeisen, Gemüsekomponenten, Sättigungsbeilagen, vegane und vegetarische Produkte. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fertiggerichte-und-zubereitete-speisen> (Zugriff 15.4.2021).

DGHM Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2018 Richt- und Warnwerte für Brühwurst, Kochwurst, Kochpökelware sowie Sülzen und Aspikwaren. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/dokumente/fleischerzeugnisse> (Zugriff 15.4.2021)

dr. Gumpert. Phospholipasen. <https://www.dr-gumpert.de/html/phospholipase.html> (Zugriff 16.02.2021).

foodstandards. Bacillus cereus.

<https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Bacillus%20cereus.pdf> (Zugriff 10.02.2021)

Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen- Anhalt. https://verbraucherschutz.sachsen-anhalt.de/fileadmin/Bibliothek/Politik_und_Verwaltung/MS/LAV_Verbraucherschutz/lebensmittelsicherheit/publikationen/verderb_lebensmittel.pdf (Zugriff 14.01.2021)

Mack. <http://www.agfdt.de/loads/ds10/mack.pdf> (Zugriff 05.01.2021).

Medlexi.de. Hydrolase. <https://medlexi.de/Hydrolase> (Zugriff 20.02.2021).

Microbenotes.com. Lipase-Test. <https://microbenotes.com/lipase-test-objectives-principle-procedures-and-results/> (Zugriff 27.10.2020).

Microbiologyinfo.com. Lecithinase-test. <https://microbiologyinfo.com/lecithinase-test/> (Zugriff 14.01.2021).

Spektrum.de: Denitrifikation. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/denitrifikation/17321> (Zugriff 15.02.2021).

Spektrum.de: Lexikon der Biologie Hydrolasen.

https://www.spektrum.de/lexika/showpopup.php?lexikon_id=9&art_id=33079&nummer=12110 (Zugriff 15.02.2021).

Spektrum.de: Phospholipasen.

<https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/phospholipasen/51244> (Zugriff 16.02.2021).

Statista: Umsatz mit Convenience-Produkten im Lebensmitteleinzelhandel in Österreich in den Jahren 2011-2018.

<https://de.statista.com/statistik/daten/studie/782192/umfrage/umsatz-mit-fertiggerichten-im-lebensmitteleinzelhandel-in-oesterreich/> (Zugriff 11.02.2021).

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

- Abb. 1 Anzahl (n) der untersuchten Proben, n=70 (a) und die Anzahl der daraus differenzierten Isolate, n=162 (b) in Bezug zu den Probenahmepunkten
- Abb. 2 Auswirkung der Temperatur auf das Wachstum einer Bakterienkultur nach vier Tagen Bebrütung
- Abb. 3 Bewertung der Gelatinaseaktivität
- Abb. 4 Ausprägung der Lipaseaktivität auf Tributyrin-Agar
- Abb. 5 Verstoffwechslung von Mannitol auf MYP-Agar
- Abb. 6 Nachweis von Lezithinase auf MYP-Agar
- Abb. 7 Wachstum der Isolate auf TSAYE bei den untersuchten Temperaturen
- Abb. 8 Gelatinaseaktivität der Isolate (Anteil/Gruppe) in Abhängigkeit von der Temperatur
- Abb. 9 Fähigkeit der Isolate (Anteil/Gruppe) unter optimalen Wachstumsbedingungen (30 °C) die Enzyme Lipase, Lezithinase zu exprimieren sowie Mannit zu fermentieren
- Abb. 10 Wachstums- und Enzymverhalten der überprüften Bakterienisolate (aus den Endprodukten) unter Berücksichtigung der Kontamination am Ende des Mindesthaltbarkeitsdatums

Tabellen

- Tab. 1 Einteilung der Bakterien bezogen auf minimale, optimale und maximale Vermehrungstemperaturen
- Tab. 2 Wichtige bakterielle Enzymaktivitäten und deren Wirkungen in Lebensmitteln
- Tab. 3 Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Temperatur ausgewählter Lebensmittel-assoziiertes Bakterien (Zusammenstellung der Literatur)
- Tab. 4 Enzymaktivitäten ausgewählter Verderbnis-assoziiertes Bakteriengruppen (Zusammenstellung der Literatur)
- Tab. 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien
- Tab. 6 Isolationsquellen der Isolate (Anzahl) und Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen
- Tab. 7 Wachstum in Abhängigkeit von der Temperatur und Heatmap der top 11 Spezies, Gattungen oder Gruppen.
- Tab. 8 Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur und Heatmap der top 11 Spezies, Gattungen oder Gruppen.

Tab. 9 Aus Verpackungs- und Wurstschälmaschine isolierte Bakterien.

Tab. 10 Aus der Rohware (Pilz und rohes Zwischenprodukt) sowie den Gewürzen isolierte Bakterien.

Tabellen im Anhang

Tab. 1 Nachweis von Verderbnis-assoziierten Bakterien im Lebensmittel und im Produktionsumfeld der Lebensmittelverarbeitung

Tab. 2 Untersuchte Bakterienisolate unterteilt in Familien und Gruppen sowie deren Isolationsquelle

Tab. 3 Positives Wachstumsverhalten der überprüften Bakterienisolate in Abhängigkeit von Temperatur und Bebrütungsdauer

Tab. 4 Positive Verderbnis-relevante Enzymaktivitäten der überprüften Bakterienisolate

10. Anhang

Tab. 1 Nachweis von Verderbnis-assoziierten Bakterien im Lebensmittel und im Produktionsumfeld der Lebensmittelverarbeitung

Familie	Bakteriengruppe	Vorkommen		Literatur
		Lebensmittel	Produktionsumfeld	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Fisch, Fleisch inkl. Geflügel, Eier, Milchprodukte, Brot		Lebensmittelkontaktflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung, Molkereien, Obst-, Gemüseverarbeitung, Bäckereien	BRIGHTWELL ET AL. 2006, CALASSO ET AL. 2016, GUÐBJÖRNSDÓTTIR: ET AL 2005, LANGSRUD ET AL. 2006, LANGSRUD ET AL. 2016, LIU ET AL. 2013, MAROUANI-GADRI ET AL. 2009, MERTZ ET AL. 2014, MINERVINI ET AL. 2015, MØRETRØ ET AL. 2006, MØRETRØ ET AL. 2013, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, SHARMA & ANAND 2002, STELLATO ET AL. 2015, TANG ET AL 2009
	<i>Ewingella</i> spp.	Shiitakepilze, frisches Gemüse, Sauerteig	Lebensmittelkontaktflächen und Wände ¹ : Bäckereien	MINERVINI ET AL. 2015, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, SARANRAJ ET AL 2012, TEJEDOR-CALVO ET AL. 2020
	<i>Kluyvera</i> spp.	Geflügelfleisch	Lebensmittelkontaktflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleischbetriebe	ABO-AMER 2018, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, OSARENATOR 2012
	<i>Serratia</i> spp.	Milch, Shiitake-Pilze, MAP ² -Geflügel	Lebensmittelkontaktflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung Molkereien Böden und Türen	BRIGHTWELL ET AL. 2006, GUÐBJÖRNSDÓTTIR: ET AL 2005, LANGSRUD ET AL. 2016, MERTZ ET AL. 2014, MØRETRØ ET AL. 2006, MØRETRØ ET AL. 2013, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, ODEYEMI ET AL 2020, OSARENATOR 2012, SALGADO ET AL. 2021, TEJEDOR-CALVO ET AL. 2020,
	<i>Yersinia</i> spp	Gemüse, Milch, MAP ² -Geflügelfleisch	Oberflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung	HULTMAN ET AL. 2015, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, ODEYEMI ET AL 2020, YUAN ET AL. 2018,

Fortsetzung Tab. 1 Nachweis von Verderbnis-assoziierten Bakterien im Lebensmittel und im Produktionsumfeld der Lebensmittelverarbeitung

Familie	Bakteriengruppe	Vorkommen		Literatur
		Lebensmittel	Produktionsumfeld	
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Fleisch inkl. Geflügel, Milch und Milchprodukte, Frischkäse, Shiitakepilze, Frisches Gemüse, Fisch, Eier Convenienceerzeugnisse	Oberflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung, Molkereien, Melkanlagen, Bäckereien Verpackungsbereich ¹ : Fleischverarbeitung; Böden, Abflüsse ¹ : Molkereien; Wände ¹ : Bäckereien	BRIGHTWELL ET AL. 2006, CALDERA ET AL 2016, GUÐBJÖRNSDÓTTIR: ET AL 2005, HAHNE ET AL 2019, LANGSRUD ET AL. 2006, LANGSRUD ET AL. 2016, LIU ET AL. 2013, MAROUANI-GADRI ET AL. 2009, MERTZ ET AL. 2014, MINERVINI ET AL. 2015, MØRETRØ ET AL. 2006, MØRETRØ ET AL. 2013, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, OSARENATOR 2012, POTHAKOS ET AL. 2015, STELLATO ET AL. 2015, STELLATO ET AL. 2016, TANG ET AL 2009, TEIXEIRA ET AL. 2005, TEJEDOR-CALVO ET AL. 2020, ZHANG ET AL 2019,
	<i>P. fluorescens</i> -Gruppe	Geflügelfleisch AP ³ (Salat, Karotten), MAP ² -Salat, Mozzarella, Rohmilch, Käse, UHT ⁴ -Milch		CALDERA ET AL. 2016, MORALES ET AL. 2016, ODEYEMI ET AL 2020, VAN DEN BELD ET AL. 2016,
	<i>P. fragi</i> -Gruppe	MAP ² -Salat, Pasteten, Weichkäse, Mozzarella, Rohmilch, Geflügelfleisch		CALDERA ET AL. 2016, MORALES ET AL. 2016
	<i>P. gessardii</i> -Gruppe	Wasser (Mineralwasser), AP ³ -Salat, MAP ² -Salat, Pasteten, Mozzarella, Rohmilch, Käse		CALDERA ET AL. 2016, ODEYEMI ET AL. 2020, VAN DEN BELD ET AL. 2016,

Fortsetzung Tab. 1 Nachweis von Verderbnis-assoziierten Bakterien im Lebensmittel und im Produktionsumfeld der Lebensmittelverarbeitung

Familie	Bakteriengruppe	Vorkommen		Literatur
		Lebensmittel	Produktionsumfeld	
	<i>P. jessenii</i> -Gruppe	MAP ² -Salat		CALDERA ET AL. 2016
	<i>P. putida</i> -Gruppe	AP ³ -Salat, Speck, Mozzarella, Geflügelfleisch, Milch, Käse		CALDERA ET AL. 2016, MORALES ET AL. 2016, ODEYEMI ET AL 2020, VITHANAGE ET AL. 2016,
<i>Moraxellaceae</i>				
	<i>Acinetobacter</i> spp.	Fisch, Fleisch (Rind, Geflügel), frisches Gemüse, Rohmilch	Oberflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung Molkereien (Sammeltank), Bäckereien; Wände ¹ : Bäckereien	CALASSO ET AL. 2016, CARVALHEIRA ET AL 2020, GUÐBJÖRNSDÓTTIR: ET AL. 2005, HAHNE ET AL 2019, LANGSRUD ET AL. 2006, LANGSRUD ET AL. 2016, LIU ET AL. 2013, MINERVINI ET AL. 2015, MØRETRØ ET AL. 2013, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, OSARENATOR 2012, SALGADO ET AL. 2021, STELLATO ET AL. 2015, STELLATO ET AL. 2016, VITHANAGE ET AL 2016,
<i>Bacillus</i> spp.		wärmebehandelte Milchprodukte, Milch, frisches Gemüse, Bäckereiprodukte Gewürze, Fertiggerichte, Schmelzkäse, Rindfleisch, Lebensmittel (Pasta, Reis, Fleisch, Reis, Eier)	Oberflächen ¹ : Fleisch-, Geflügelfleisch-, Fisch-, Meeresfrüchteverarbeitung Molkereien, Bäckereien; Wände ¹ : Bäckereien	ANDRÉ ET AL. 2013, CARLIN 2011, HULTMAN ET AL. 2015, LANGSRUD ET AL. 2006, LIU ET AL. 2013, MERTZ ET AL. 2014, MINERVINI ET AL. 2015, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, OLIVEIRA ET AL. 2016, OSARENATOR 2012, SADIQ ET AL. 2016, SHARMA & ANAND 2002, STELLATO ET AL. 2016, TANG ET AL 2009, THANH ET AL 2018,

Fortsetzung Tab. 1 Nachweis von Verderbnis-assoziierten Bakterien im Lebensmittel und im Produktionsumfeld der Lebensmittelverarbeitung

Familie	Bakteriengruppe	Vorkommen		Literatur
		Lebensmittel	Produktionsumfeld	
	<i>B. cereus</i> -Gruppe	Fleisch, Milch (Rohmilch, pasteurisiert), Milchprodukte (Käse, Schmelzkäse), Gemüse, Nudel, Reis,	Oberflächen ¹ : Fleischverarbeitung	HEYDARZADEH ET AL. 2020, MØRETRØ & LANGSRUD 2017, ODEYEMI ET AL 2020, OLIVEIRA ET AL. 2016, PENG ET AL. 2001, SADIQ ET AL. 2016,
	<i>B. licheniformis</i> -Gruppe	Gemüse, Fertiggerichte, Schmelzkäse, Milch		ANDRÉ ET AL. 2013, OLIVEIRA ET AL. 2016, SADIQ ET AL. 2016, WANG ET AL. 2020
	<i>B. subtilis</i> -Gruppe	Gemüse, Fertiggerichte, Schmelzkäse, Milch (UHT ⁴)		ANDRÉ ET AL. 2013, FRANZEN 2017, ODEYEMI ET AL 2020, OLIVEIRA ET AL. 2016, SADIQ ET AL. 2016,
	<i>B. pumilus</i> -Gruppe	Schmelzkäse, Milch		OLIVEIRA ET AL. 2016, SADIQ ET AL. 2016

¹ alle gereinigten und desinfizierten Oberflächen (inklusive Maschinen) die mit Lebensmittel und Rohwaren im Verarbeitungsprozess in Berührung kommen

² MAP- Verpackungsart mit modifizierter Atmosphäre (Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid)

³ AP- Verpackung ohne Behandlung

⁴ Ultrahocherhitzt (150 °C)

Tab. 2 Untersuchte Bakterienisolate unterteilt in Familien und Gruppen sowie deren Isolationsquelle

Gruppe	Bakterienisolat	Gewürze	Rohstoff (Kräuter- seitling)	Endprodukt				Um- welt	Roh- ware
				Gyros	Brat- streifen	Käsebrat- wurst	Rostbrat- wurst		
<i>Enterobacteriaceae</i>									
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Atlantibacter hermannii</i>	X							
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Curtobacterium plantarum</i>	X							
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>E. americana</i>		X					X	X
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>						X		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Mixta theicola</i>	X							
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>K. intermedia</i>								X
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea beijingensis</i>		X						
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea brenneri</i>						X		X
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	X							
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>S. liquefaciens</i>				X		X	X	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Y. enterocolitica</i>						X		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Y. nurmii</i>				X				
<i>Pseudomonadaceae</i>									
<i>P. corrugata</i>	<i>P. corrugata</i>							X	
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. azotoformans</i>		X					X	X
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. marginalis</i>		X						
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. synxantha</i>				X				
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. tolaasii</i>		X						X
<i>P. fluorescens</i>	<i>P. proteolytica</i>		X						
<i>P. fragi</i>	<i>P. deceptionensis</i>		X				X		
<i>P. fragi</i>	<i>P. helleri</i>		X						
<i>P. gessardii</i>	<i>P. brenneri</i>		X						

Fortsetzung Tab. 2 Untersuchte Bakterienisolate unterteilt in Familien und Gruppen sowie deren Isolationsquelle

Gruppe	Bakterienisolat	Gewürze	Rohstoff (Kräuter- seitling)	Endprodukt				Um- welt	Roh- ware
				Gyros	Brat- streifen	Käsebrat- wurst	Rostbrat- wurst		
<i>P. jessenii</i>	<i>P. umsongensis</i>		X						
<i>P. koreensis</i>	<i>P. koreensis</i>		X						
<i>P. mandelii</i>	<i>P. lini</i>		X						
<i>P. mandelii</i>	<i>P. prosekii</i>		X	X			X		
<i>P. putida</i>	<i>P. plecoglossicida</i>	X	X						
<i>Moraxellaceae</i>									
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. lactucae</i>				X				
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. guillouiae</i>		X						
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. johnsonii</i>							X	
<i>Moraxellaceae</i>	<i>A. gyllenbergii</i>							X	
sonstige gramnegative Bakterien									
<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Collimonas fungivorans</i>							X	
<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium faecium</i>				X				
<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>				X				
<i>Shewanella</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i>				X				
<i>Bacillaceae</i>									
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. endophyticus</i>	X							
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. filamentosus</i>	X							
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. circulans</i>		X						
<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. megaterium</i>	X							
<i>B. cereus</i>	<i>B. wiedmannii</i>	X							
<i>B. cereus</i>	<i>B. paramycoides</i>	X							
<i>B. pumilus</i>	<i>B. safensis</i>	X						X	

Fortsetzung Tab. 2 Untersuchte Bakterienisolate unterteilt in Familien und Gruppen sowie deren Isolationsquelle

Gruppe	Bakterienisolat	Gewürze	Rohstoff (Kräuter- seitling)	Endprodukt				Um- welt	Roh- ware
				Gyros	Brat- streifen	Käsebrat- wurst	Rostbrat- wurst		
<i>B. pumilus</i>	<i>B. pumilus</i>	X							
<i>B. pumilus</i>	<i>B. xiamenensis</i>						X		
<i>B. subtilis</i>	<i>B. zhangzhouensis</i>	X							
<i>B. subtilis</i>	<i>B. nakamurai</i> , <i>B. halotolerans</i>							X	
<i>B. subtilis</i>	<i>B. nakamurai</i>	X		X			X		
<i>B. subtilis</i>	<i>B. halotolerans</i>	X		X		X			
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i>	X				X	X		
<i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	X							
<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>						X		
<i>B. subtilis</i>	<i>B. velezensis</i>			X	X	X	X		
<i>B. subtilis</i>	<i>B. tequilensis</i>			X					
<i>B. licheniformis</i>	<i>B. piscis</i>			X	X	X			
<i>Micrococcaceae</i>									
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter halodurans</i>							X	
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>							X	

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, K: *Kluyvera*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*, Y: *Yersinia*

Tab. 3 Positives Wachstumsverhalten der überprüften Bakterienisolate in Abhängigkeit von Temperatur und Bebrütungsdauer

Spezies	Gram ¹ - verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positivem Wachstum auf TSAYE									
					Wachstumsbereich in °C									
					5	Tag ³	7	Tag ⁴	12	Tag ⁴	42	Tag ⁴	55 ⁵	Tag ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i>														
<i>Atlantibacter hermannii</i>	-	EB	G	1	1	3	1	3	1	2	1	3		
<i>Curtobacterium plantarum</i>	-	EB	G	2	2	6	2	6	2	2	0			
<i>E. americana</i>	-	EB	R/RW/U	9	9	4-7	9	1-4	9	1	4	1-4		
<i>K. intermedia</i>	-	EB	R	1	1	7	1	4	1	1	1	4		
<i>Lelliottia amnigena</i>	-	EB	EP	4	4	3-4	4	3	4	1-2	0			
<i>Mixta theicola</i>	-	EB	G	1	1	6	1	6	1	2	1	1		
<i>Pantoea beijingensis</i>	-	EB	RW	1	1	10	1	4	1	1	0			
<i>Pantoea brenneri</i>	-	EB	EP/U	7	7	4	7	4	7	1	0			
<i>Pantoea dispersa</i>	-	EB	G	1	0		0		0		1	5		
<i>S. liquefaciens</i>	-	EB	EP/U	12	12	1-4	12	1-4	12	1	2	4		
<i>Y. enterocolitica</i>	-	EB	EP	2	2	4	2	4	2	1	2	4		
<i>Y. nurmii</i>	-	EB	EP	3	3	4	3	1-4	3	1	3	1-4		
<i>Pseudomonadaceae</i>														
<i>P. corrugata</i>	-	CORR	U	1	1	4	1	4	1	1	0			
<i>P. azotoformans</i>	-	FLUO	R/RW/U	16	16	1-4	16	1-4	16	1-2	3	1-4		
<i>P. marginalis</i>	-	FLUO	R	1	1	4	1	1	1	1	1	1		
<i>P. proteolytica</i>	-	FLUO	R	2	2	1	2	1	2	1	1	1		
<i>P. synxantha</i>	-	FLUO	EP	2	2	3	2	3	2	2	0			
<i>P. tolaasii</i>	-	FLUO	R/RW	8	8	4	8	1-4	8	1	0			
<i>P. deceptionensis</i>	-	FRAGI	EP/R	3	3	1	3	1	3	1	0			
<i>P. helleri</i>	-	FRAGI	R	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>P. brenneri</i>	-	GES	R	2	2	1-4	2	1-4	2	1	1	4		
<i>P. umsongensis</i>	-	JES	R	1	1	4	1	1	1	1	0			

Fortsetzung Tab. 3 Positives Wachstumsverhalten der überprüften Bakterienisolate in Abhängigkeit von Temperatur und Bebrütungsdauer

Spezies	Gram ¹ - verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positivem Wachstum auf TSAYE									
					Wachstumsbereich in °C									
					5	Tag ³	7	Tag ⁴	12	Tag ⁴	42	Tag ⁴	55 ⁵	Tag ⁴
<i>P. koreensis</i>	-	KORR	R	1	1	4	1	4	1	4	0			
<i>P. lini</i>	-	MAND	R	1	1	4	1	4	1	1	1	1		
<i>P. prosekii</i>	-	MAND	EP/R	4	4	1-4	4	1-4	4	1	0			
<i>P. plecoglossicida</i>	-	PUT	G/R	5	5	1-4	5	1-4	5	1	5	1-3		
<i>Moraxellaceae</i>														
<i>A. guillouiae</i>	-	MOX	R	1	1	4	1	4	1	1	0			
<i>A. gyllenbergii</i>	-	MOX	U	2	2	4-6	2	4-6	2	1-4	0			
<i>A. johnsonii</i>	-	MOX	U	10	10	4	10	4	10	1	0			
<i>A. lactucae</i>	-	MOX	EP	1	1	5	1	4	1	1	1	1		
sonstige gramnegative Bakterien														
<i>Collimonas fungivorans</i>	-	OX	U	2	2	4	2	4	2	1	0			
<i>Sphingobacterium faecium</i>	-	SB	EP	1	1	4	1	4	1	4	1	4		
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	-	SB	EP	1	1	4	1	4	1	1	1	4		
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	SH	EP	2	2	4	2	1	2	4	0			
<i>Bacillaceae</i>														
<i>B. circulans</i>	+	BAC	R	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1
<i>B. endophyticus</i>	+	BAC	G	1	0		0		0		1	1		
<i>B. filamentosus</i>	+	BAC	G	1	0		0		0		0			
<i>B. megaterium</i>	+	BAC	G	1	0		0		0		1	1		
<i>B. wiedmannii</i>	+	BCER	G	4	1	10	1	10	4	2-10	4	1	1	1
<i>B. paramycoides</i>	+	BCER	G	2	1	6	1	6	2	2	2	1		
<i>B. piscis</i>	+	LICH	EP	4	0		0		2	4-7	4	1	4	1

Fortsetzung Tab. 3 Positives Wachstumsverhalten der überprüften Bakterienisolate in Abhängigkeit von Temperatur und Bebrütungsdauer

Spezies	Gram ¹ - verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positivem Wachstum auf TSAYE									
					Wachstumsbereich in °C									
					5	Tag ³	7	Tag ⁴	12	Tag ⁴	42	Tag ⁴	55 ⁵	Tag ⁴
<i>B. safensis</i>	+	PUM	G/U	2	1	4	1	4	2	4	2	1		
<i>B. pumilus</i>	+	PUM	G	1	0		0		0		1	1		
<i>B. xiamenensis</i>	+	PUM	EP	1	0		1	10	1	4	1	1	1	1
<i>B. zhangzhouensis</i>	+	PUM	G	1	0		0		0		1	1	1	1
<i>B. halotolerans</i>	+	SUBT	EP/G	5	0		0		3	4-7	5	1	5	1
<i>B. nakamurai</i>	+	SUBT	EP/G	4	0		0		4	6-7	4	1	4	1
<i>B. nakamurai</i> , <i>B. halotolerans</i>	+	SUBT	U	1	0		0		1	6	1	1		
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	+	SUBT	EP/G	6	0		0		6	1-10	6	1	4	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	SUBT	G	1	0		0		0		1	1		
<i>B. subtilis</i>	+	SUBT	EP	1	0		0		1	7	1	1	1	1
<i>B. tequilensis</i>	+	SUBT	EP	2	0		0		2	7	2	1	2	1
<i>B. velezensis</i>	+	SUBT	EP	9	1	7	1	4	7	1-7	9	1	9	1
<i>Micrococcaceae</i>														
<i>Arthrobacter halodurans</i>	+	MIC	U	1	1	4	1	4	1	1	0			
<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	+	MIC	U	1	1	4	1	4	1	1	0			

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, K: *Kluyvera*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*, Y: *Yersinia*

¹ +: grampositiv, -: gramnegativ

² EB: *Enterobacteriaceae*, CORR: *P. corrugata*, FLUO: *P. fluorescens*, FRAGI: *P. fragi*, GES: *P. gessardii*, JES: *P. jessenii*, KORR: *P. koreensis*, MAND: *P. mandelii*, PUT: *P. putida*, MOX: *Moraxellaceae*, OX: *Oxalobacteraceae*, SB: *Sphingobacteriaceae*, SH: *Shewanella*, BAC: *Bacillus* spp., BCER: *B. cereus*, LICH: *B. licheniformis*, PUM: *B. pumilus*, SUBT: *B. subtilis*, MIC: *Micrococcaceae*

³ EP: Endprodukt, G: Gewürz, R: Rohstoff (Kräuterseitling), RW: Rohware (nicht erhitztes, gewolfenes Brät), U: Umwelt (Verpackungs- und Wurstschälmaschine)

⁴ Tag (Zeitraum) der maximalen beobachteten Wachstumsintensität;

⁵ leeres Feld: es erfolgte keine Bebrütung

Tab. 4 Positive Verderbnis-relevante Enzymaktivitäten der überprüften Bakterienisolate

Spezies	Gram ¹ - verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positiver Enzymreaktion									
					Gelatinase				Lipase		Lezithinase		Mannitol	
					25°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴
<i>Enterobacteriaceae</i>														
<i>Atlantibacter hermannii</i>	-	EB	G	1	1	13	1	13	0		0		1	1
<i>Curtobacterium plantarum</i>	-	EB	G	2	2	13	2	10	0		0		0	
<i>E. americana</i>	-	EB	R/RW/U	9	7	8-15	8	8-15	0		1	5	9	1
<i>K. intermedia</i>	-	EB	R	1	0		0		0		0		1	1
<i>Lelliottia amnigena</i>	-	EB	EP	4	0		0		0		0		4	1
<i>Mixta theicola</i>	-	EB	G	1	0		1	15	0		0		1	1
<i>Pantoea beijingensis</i>	-	EB	RW	1	0		0		0		0		1	1
<i>Pantoea brenneri</i>	-	EB	EP/U	7	3	1-4	5	1-10	0		0		7	1
<i>Pantoea dispersa</i>	-	EB	G	1	0		0		0		0		1	1
<i>S. liquefaciens</i>	-	EB	EP/U	12	12	1-3	12	1-3	12	1-2	12	1-2	12	1
<i>Y. enterocolitica</i>	-	EB	EP	2	0		0		0		0		2	1
<i>Y. nurmii</i>	-	EB	EP	3	0		0		0		0		3	1
<i>Pseudomonadaceae</i>														
<i>P. corrugata</i>	-	CORR	U	1	1	4	1	4	1	1	1	5	1	1
<i>P. azotoformans</i>	-	FLUO	R/RW/U	16	13	2-12	10	4-12	16	1-5	15	1-5	15	1
<i>P. marginalis</i>	-	FLUO	R	1	1	5	0		1	1	1	1	1	1
<i>P. proteolytica</i>	-	FLUO	R	2	2	5-7	0		2	1	2	1	2	1
<i>P. synxantha</i>	-	FLUO	EP	2	2	2	2	11	2	5	2	3	2	1
<i>P. tolaasii</i>	-	FLUO	R/RW	8	6	5-9	2	7	8	1-2	8	1-2	8	1
<i>P. deceptionensis</i>	-	FRAGI	EP/R	3	0		0		3	1-2	0		1	1
<i>P. helleri</i>	-	FRAGI	R	1	0		0		1	5	0		0	
<i>P. brenneri</i>	-	GES	R	2	2	5	0		2	1-2	2	1	2	1
<i>P. umsongensis</i>	-	JES	R	1	0		0		1	5	0		0	

Fortsetzung Tab. 4 Positive Verderbnis-relevante Enzymaktivitäten der überprüften Bakterienisolate

Spezies	Gram ¹ -verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positiver Enzymreaktion									
					Gelatinase				Lipase		Lezithinase		Mannitol	
					25°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴
<i>P. koreensis</i>	-	KORR	R	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>P. lini</i>	-	MAND	R	1	0		0		1	5	0		0	
<i>P. prosekii</i>	-	MAND	EP/R	4	1	5	1	2	4	1-5	1	2	1	1
<i>P. plecoglossicida</i>	-	PUT	G/R	5	0		0		5	5	0		5	1
<i>Moraxellaceae</i>														
<i>A. guillouiae</i>	-	MOX	R	1	0		0		1	1	0		0	
<i>A. gyllenbergii</i>	-	MOX	U	2	0		1	15	2	1	2	4-5	0	
<i>A. johnsonii</i>	-	MOX	U	10	0		0		10	1	10	1-4	0	
<i>A. lactucae</i>	-	MOX	EP	1	0		0		1	1	1	5	0	
sonstige gramnegative Bakterien														
<i>Collimonas fungivorans</i>	-	OX	U	2	0		2	10	0		0		2	1
<i>Sphingobacterium faecium</i>	-	SB	EP	1	0		0		1	5	0		0	
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i>	-	SB	EP	1	0		0		1	5	0		0	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	SH	EP	2	0		0		2	5	0		0	
<i>Bacillaceae</i>														
<i>B. circulans</i>	+	BAC	R	1	0		0		0		0		0	
<i>B. endophyticus</i>	+	BAC	G	1	0		0		1	2	0		1	1
<i>B. filamentosus</i>	+	BAC	G	1	0		0		1	3	1	3	0	
<i>B. megaterium</i>	+	BAC	G	1	1	6	1	1	1	3	0		1	1
<i>B. wiedmannii</i>	+	BCER	G	4	4	3-15	4	3-4	4	1-3	4	3	0	
<i>B. paramycooides</i>	+	BCER	G	2	2	4-6	2	1-3	2	1	2	1-3	0	
<i>B. piscis</i>	+	LICH	EP	4	1	5	3	2-14	4	1-2	3	2-5	4	1
<i>B. safensis</i>	+	PUM	G/U	2	2	8	2	1	2	1	2	5	0	
<i>B. pumilus</i>	+	PUM	G	1	1	15	1	10	1	3	1	4	0	

Fortsetzung Tab. 4 Positive Verderbnis-relevante Enzymaktivitäten der überprüften Bakterienisolate

Spezies	Gram ¹ - verhalten	Gruppe ²	Isolations- quelle ³	Gesamtanzahl (n) der Isolate	Anzahl der Isolate mit positiver Enzymreaktion									
					Gelatinase				Lipase		Lezithinase		Mannitol	
					25°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴	30°C	Tag ⁴
<i>B. xiamenensis</i>	+	PUM	EP	1	1	5	1	12	1	1	1	2	1	1
<i>B. zhangzhouensis</i>	+	PUM	G	1	1	15	1	6	1	3	1	3	0	
<i>B. halotolerans</i>	+	SUBT	EP/G	5	5	2-5	5	1-3	5	1-3	5	2-5	4	1
<i>B. nakamurai</i>	+	SUBT	EP/G	4	4	2	4	2	4	2	4	3	4	1
<i>B. nakamurai, B. halotolerans</i>	+	SUBT	U	1	1	4	1	1	1	5	1	5	1	1
<i>B. subtilis subsp. inaquosorum</i>	+	SUBT	EP/G	6	6	2-5	6	2-3	6	1-2	4	2-3	6	1
<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	SUBT	G	1	1	3	1	3	1	1	1	3	0	
<i>B. subtilis</i>	+	SUBT	EP	1	1	5	1	2	1	5	1	2	1	1
<i>B. tequilensis</i>	+	SUBT	EP	2	2	5	2	1	2	1	2	2	2	1
<i>B. velezensis</i>	+	SUBT	EP	9	8	2-5	8	1-2	9	1-5	6	2	9	1
sonstige grampositive Bakterien														
<i>Arthrobacter halodurans</i>	+	MIC	U	1	0		0		1	5	0		1	1
<i>Pseudarthrobacter polychromogenes</i>	+	MIC	U	1	0		0		1	5	0		1	1

A: *Acinetobacter*, B: *Bacillus*, E: *Ewingella*, K: *Kluyvera*, P: *Pseudomonas*, S: *Serratia*, Y: *Yersinia*

¹+: grampositiv, -: gramnegativ

² EB: *Enterobacteriaceae*, CORR: *P. corrugata*, FLUO: *P. fluorescens*, FRAGI: *P. fragi*, GES: *P. gessardii*, JES: *P. jessenii*, KORR: *P. koreensis*, MAND: *P. mandelii*, PUT: *P. putida*, MOX: *Moraxellaceae*, OX: *Oxalobacteraceae*, SB: *Sphingobacteriaceae*, SH: *Shewanella*, BAC: *Bacillus* spp., BCER: *B. cereus*, LICH: *B. licheniformis*, PUM: *B. pumilus*, SUBT: *B. subtilis*, MIC: *Micrococcaceae*

³ EP: Endprodukt, G: Gewürz, R: Rohstoff (Kräuterseitling), RW: Rohware (nicht erhitztes, gewolfes Brät), U: Umwelt (Verpackungs- und Wurstschälmaschine)

⁴ Tag (Zeitraum) des Auftretens der positiven Reaktion

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Betreuerin Fr. Dr. med. vet. Martina Ludewig Dipl. ECVPH für die Bereitstellung des Themas, sowie für ihre geduldige Betreuung und Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern für die Ermöglichung dieses Studiums.

This work was created within a research project of the Austrian Competence Center for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI). The Comet-K1 competence centre FFoQSI is funded by the Austrian ministries BMVIT, BMDW and the Austrian provinces Niederoesterreich, 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 (grant no. QK1910121).