

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

**Mikrobiologische Sicherheit von Rohwurstprodukten
- Wirkung von Natriumnitrit auf Lebensmittelinfektionserreger -**

Jan Kabisch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis

(Ludwig-Maximilians-Universität München)

Die Dissertation wurde am 20.12.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.09.2014 angenommen.

Die Arbeiten wurden am Max Rubner-Institut im Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie durchgeführt.

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	4
2.1 Rohwurst	4
2.1.1 Bedeutung für den deutschen Markt	4
2.1.2 Rohwurstherstellung	5
2.1.3 Technologie der Herstellung	6
2.1.3.1 Hüllenkaliber	6
2.1.3.2 Zusatzstoffe	7
2.1.4 Reifung	9
2.1.4.1 Relative Luftfeuchte	9
2.1.4.2 Temperatur	9
2.1.4.3 Luftgeschwindigkeit	10
2.1.5 Konservierung	10
2.1.5.1 Zusatzstoffe	11
2.1.5.2 Redoxpotential	11
2.1.5.3 Starterkulturen	13
2.1.5.4 Wasseraktivität	14
2.1.6 Rohwurst-Typen	15
2.2 Vorkommen von Pathogenen in Rohwurstherzeugnissen	18
2.2.1 <i>Salmonella</i> spp.	19
2.2.2 Shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.3 Natriumnitrit	37
2.3.1 Bedeutung von Natriumnitrit	37
2.3.1.1 Umrötung	38
2.3.1.2 Pökelaroma	38

2.3.1.3 Oxidationsschutz	39
2.3.1.4 Konservierung und antimikrobielle Wirkung auf zellulärer Ebene	40
2.3.2 Gesundheitliche Betrachtungen	44
2.3.3 Rechtsnormen für konventionell gepökelte Rohwurstzeugnisse	45
2.3.4 Nitrathaltige Pflanzensäfte als Nitritersatzstoffe	46
2.3.4.1 Bedeutung	46
2.3.4.2 Technologie	47
2.3.4.3 Rechtsnormen für ökologisch gepökelte Rohwurstprodukte	48
2.4 Ziele der Arbeit	48
3. Material und Methoden	50
3.1 Nährmedien	50
3.2 Chemikalien	51
3.3 Geräte	52
3.4 Materialien für die Herstellung von Rohwürsten	53
3.5 Mikroorganismen	55
3.6 Stammhaltung	55
3.7 Kultivierung der Inokulationsstämme	56
3.7.1 Inkubationsansätze für die <i>in Vitro</i> Versuche	56
3.7.2 Inkubationsansätze für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen	56
3.7.3 Inkubationsansätze für die Challengeversuche	57
3.8 Messung der Wasseraktivität	57
3.9 Messung des Säuregrades	57
3.10 Nitrit- und Nitratbestimmung	57
3.11 Redoxpotentialmessung	58
3.12 Rohwurstherstellung	58
3.12.1 Kurzgereifte streichfähige Rohwurst (Typ-Teewurst)	59

3.12.2 Schnellgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-GDL gereifte Salami)	61
3.12.3 Langgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-Salami)	64
3.12.4 Schimmelpilzgereifte Rohwurst (Typ-Edelschimmelsalami)	66
3.12.5 Luftgetrocknete Mettwurst – Hausmacher Art	67
3.12.6 Luftgetrocknete Mettwurst – Hausmacher Art mit optimierter Starterkultur	69
3.12.7 Herstellung langgereifter schnittfester Rohwurst (Typ-Salami) unter Verwendung einer optimierten Temperaturführung	70
3.13 Mikrobiologische Untersuchungen	72
3.13.1 Aerobe mesophile Keimzahl, Pseudomonaden-, Enterobacteriaceae- und Milchsäurebakterienzahl	73
3.13.2 Nachweis von <i>Salmonella</i> spp.	73
3.13.3 Nachweis von shigatoxinbildenden <i>Escherichia coli</i>	75
3.13.4 Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	77
4. Ergebnisse	78
4.1 Wirkung von Natriumnitrit – in <i>Vitro</i> Untersuchungen	78
4.1.1 <i>Salmonella</i> spp.	78
4.1.1.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	78
4.1.1.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	82
4.1.1.3 Vergleich der Wachstumskinetik mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	85
4.1.2 Shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	86
4.1.2.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	86
4.1.2.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	89
4.1.2.3 Vergleich der Wachstumskinetik mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten	93

4.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	96
4.1.3.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	96
4.1.3.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	100
4.1.3.3 Vergleich der Wachstumskinetik mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a _w -Werten	104
4.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	106
4.2 Wirkung von Natriumnitrit – <i>in Situ</i> Untersuchungen	111
4.2.1 Kurzgereifte streichfähige Rohwurst (Typ-Teewurst)	111
4.2.2 Schnellgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-GdL gereifte Salami)	120
4.2.3 Langgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-Salami)	128
4.2.4 Schimmelpilzgereifte Rohwurst (Typ-Edelschimmelpilzgereifte Salami)	135
4.3 Nitritersatzstoffe auf pflanzlicher Basis	143
4.3.1 Konventionelle Starterkultur	143
4.3.1.1 <i>Salmonella</i> spp.	147
4.3.1.2 Shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	149
4.3.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	150
4.3.2 Optimierte Starterkultur	151
4.3.2.1 Verwendung der Starterkultur SM 181	155
4.3.2.2 Verwendung der Starterkultur Tradi 302 und B-LC-20 Safe Pro®	155
4.3.3 Verwendung eines alternativen Reifeprogramms für die Herstellung einer langgereiften schnittfesten Salami	156
5. Diskussion	162
5.1 <i>In-Vitro</i> Untersuchungen	162
5.2 <i>In-Situ</i> Untersuchungen	167
5.2.1 <i>Salmonella</i> spp.	167
5.2.2 Shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	169

5.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	171
5.3 Nitritersatzstoffe auf pflanzlicher Basis	173
5.3.1 Konventionelle Starterkultur	174
5.3.2 Optimierte Starterkultur	176
5.3.3 Verwendung eines alternativen Reifeprogramms für die Herstellung einer langgereiften schnittfesten Salami	178
6. Literaturverzeichnis	182
7. Anhang	217
8. Danksagung	286

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosin Monophosphat
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
a _w	Wasseraktivität
bp	Basenpaar
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAEC	diffus adhärente <i>Escherichia coli</i>
DHL	Desoxycholat-Hydrogen-Sulfid-Lactose-Agar
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
GdL	Glucono-delta-Lacton
GKZ	aerobe mesophile Keimzahl
h	Stunde
invA	sekretorisches Protein (Virulenzfaktor)
KbE	Kolonien bildende Einheiten
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I	Länge
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
mg/g	Milli-/gramm
mM	millimolar
m/s	Meter pro Sekunde
MRI	Max Rubner-Institut
mTSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
N	Stickstoff
NPS	Nitritpökelsalz
NTEC	nekrotoxische <i>Escherichia coli</i>
PCR	Polymerase-chain-reaction
qRT-PCR	qualitative Real time PCR
rpm	revolution per minute (Umdrehungen pro Minute)
SMAC	Sorbitol McConkey Agar
Tab.	Tabelle
stx	Shigatoxin
STEC	shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

1. Zusammenfassung

In Vitro Untersuchungen

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich, dass Nitrit bei einem pH-Wert von 7 keinen hemmenden Einfluss auf die Vermehrung von *Salmonella* spp., STEC/EHEC und *Listeria monocytogenes* hatte. Somit ist Nitrit per se nicht die antimikrobiologisch wirkende Verbindung, sondern vielmehr die Ausgangsverbindung, deren Derivate zu bakteriostatischen bzw. bakterioziden Wirkungen führen.

Eine antimikrobielle Wirkung konnte erst mit abnehmendem pH-Wert festgestellt werden. So wurden bei einem pH-Wert von 6 in den Ansätzen mit Nitrit bakteriostatische Bedingungen erreicht. Diese verstärkten sich bei einem pH-Wert von 5. Erst unter angesäuerten Millieu-Bedingungen katalysieren die Protonen der Säure die Umwandlung des Nitrits zur salpetrigen Säure (Säure-Base-Reaktion) und anschließend weiter zu NO^{*}-Radikalen (Disproportionierung). Diese NO^{*}-Radikale sind sehr zelltoxisch, führen zu Schäden an Proteinen, der DNA und der Zellwandumhüllung und verursachen damit eine Störung des Stoffwechsels der Organismen bis hin zum Absterben.

In Situ Untersuchungen

Kurzgereifte streichfähige Rohwürste gelten als Risikoprodukte, da sie auf Grund fehlender Abtrocknung oder anderweitiger stabilisierender Maßnahmen bei einer Kontamination mit *Salmonella* spp., STEC/EHEC und *Listeria monocytogenes* eine Vermehrung zulassen können. In allen Versuchsreihen mit Natriumnitrit wurde während der Reifung und Lagerung keine Vermehrung der eingepflichten Bakterien festgestellt. Mit den praxisüblichen Rezepturen (mit Natriumnitrit) und Reifetechnologien wurde innerhalb der ersten 14 Tage eine Reduktion der Keimzahl erzielt. So konnte in den Challengeversuchen mit *Salmonella* spp. eine Reduktion der Keimzahl von ca. 90 % über den Versuchszeitraum von 28 Tagen beobachtet werden. Durch die Verwendung einer höheren Kochsalzkonzentration von 3 % war im Vergleich zu 2,5 % NaCl eine verstärkte Abnahme der Keimzahlen zu beobachten. Ähnliche Keimzahlreduktionen wurden durch die Verwendung eines alternativen Reifeprogramms, mit einer kurzzeitigen Erhöhung der Temperatur auf 25 °C erreicht. Am sensibelsten reagierten STEC/EHEC und *Salmonella* spp. auf die geänderten Bedingungen, so dass eine Abnahme der Keimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden konnte. Für *Listeria monocytogenes* konnte keine wesentliche Reduktion der Keimzahl festgestellt werden. Der Einsatz von Natriumnitrit ist bei diesem Produkt unbedingt zu empfehlen, da in Abwesenheit von Nitrit vor allem für *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. eine deutliche Zunahme der Keimzahlen beobachtet wurde.

In den schnellgereiften Rohwürsten mit Glucono-delta-Lacton war in Folge der sehr schnellen Absenkung des pH-Wertes keine Vermehrung der pathogenen Infektionserreger möglich.

In den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Produkten wurde eine völlige Abwesenheit von STEC/EHEC und *Salmonella* spp. im Schnitt nach einer 42-tägigen Reifung erreicht. Obwohl die

Chargen ohne Nitrit vor allem in den ersten drei Reifetagen eine Vermehrung der eingepfropften Salmonellen zuließen, nahm die Keimzahl mit zunehmender Reifung in Folge der zunehmenden Abtrocknung ab. Im Vergleich dazu nahm die Zahl der Listerien nur langsam ab und diese waren auch nach 84 Tagen noch in den Produkten direkt nachweisbar.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass eine Zugabe von 100 mg/kg Natriumnitrit völlig ausreichend ist, um eine Vermehrung von *Salmonella* spp., STEC/EHEC und *Listeria monocytogenes* in den wichtigsten Rohwurstzeugnissen zu verhindern. Im Gegensatz zu den kurzgereiften streichfähigen, den langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwürsten kann in den mit Glucono-delta-Lacton hergestellten Produkten auf den Zusatz von Natriumnitrit komplett verzichtet werden. *Listeria monocytogenes* erwies sich als ein sehr widerstandsfähiger Keim, der in keinem der getesteten Produkte in der zugesetzten Inokulumhöhe vollständig eliminiert werden konnte. Weiterhin wurde festgestellt, dass die ersten Reifetage für das Produkt Rohwurst aus mikrobiologischer Sicht entscheidend sind, da hier die stabilisierenden Faktoren wie niedriger a_w - und pH-Wert noch nicht ausgeprägt sind. Hier verhinderte nur der Zusatz von Nitrit ein Wachstum der pathogenen Bakterien.

Nitritersatzstoffe auf pflanzlicher Basis

Bei den Versuchen handelt es sich um erste orientierende Arbeiten mit allerdings vielversprechenden Ergebnissen. Nach den Ergebnissen dieser ersten Versuche scheint eine sichere Produktion von Rohwürsten mit einem Nitritersatzstoff (Nitrat aus Pflanzen) durchaus möglich, jedoch sollten dabei folgende Parameter berücksichtigt werden. Die Reifetemperaturen sollten zwischen 18 °C und 20 °C liegen. Weiterhin wird der Einsatz von schnellansäuernden Starterkulturen und die Verwendung von Zuckern, die auf die jeweiligen Starterkulturen „zugeschnitten“ sind, empfohlen. Für die Produktion solcher Waren sollte nur Ausgangsmaterial von hoher hygienischer Qualität gewählt werden und die Rohwürste sollten mindestens 3 Wochen (besser 4 Wochen) reifen bevor diese an den Verbraucher abgegeben werden.

Summary

In Vitro studies

In this study we intend to report on the influence of the additive sodium nitrite on survival of *Salmonella* spp., shigatoxin-producing/enterohemorrhagic *E. coli* and *Listeria monocytogenes*. We investigated whether 0, 100, 150 or 200 mg/l nitrite concentrations leads to decreasing cell numbers. For the *in Vitro* studies the bouillon was inoculated with 1000 cfu/l of *Listeria monocytogenes*, shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.. The survival was examined microbiologically in regular intervals over a period of 7 days.

We found that sodium nitrite acts as an antimicrobial agent only in combination with a decreasing pH-value. Only when the pH-value was 6 or lower a decreasing cell number could be observed in the

in Vitro studies. At pH 7 sodium nitrite had no effect on the survival or growth rate of the tested microorganisms.

In Situ studies

The prevalence of pathogenic bacteria in raw fermented sausages generally increases from the farm to the manufacturing plants. This is mainly due to cross-contamination. In many cases, the pathogens are present in raw meat at low or moderate levels. In such cases, the microorganisms have been able to survive and/or to grow despite the hurdles encountered during the manufacturing and conservation processes.

Only a few studies have addressed the use of nitrite against pathogens associated with meat. The use of nitrite as a curing agent is beneficial to the sensory properties and to the microbial safety and stability of raw fermented meat products. However, nitrite and nitrate are synthetic chemicals of toxicological concern.

Beside the investigation of the dynamic processes (ripening programs, reduction of pH-value and water activity) during the production of the fermented raw sausages, in this study we intend to report on the influence of the additive sodium nitrite on the stability of these products. Therefore different batches of short fermented, long fermented and mould-ripened sausages were produced. The batches were inoculated with *Listeria monocytogenes*, shigatoxinogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp..

Our investigations showed that in first order dynamic effects and an attentive control of the ripening programs reduce the bacterial count. But they also clearly demonstrate the positive effect of sodium nitrite as antimicrobial additive in raw fermented sausages. Only with sodium nitrite a growth of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw fermented sausage was avoided.

Plant extract

Indirect curing is a process that utilizes ingredients with high amount of naturally occurring nitrate and a bacterial starter culture with a nitrate reductase activity to provide quality, sensory attributes and microbiological safety similar to conventionally cured meats. Therefore the antimicrobial activity of these additives in raw fermented sausages deserves consideration.

The aim of our study was to illustrate the influence of a commercial nitrate-containing plant extract on the decline or potential survival of food pathogens in raw fermented sausage. For this purpose, the sausage batter was artificially contaminated with *Salmonella* spp., shigatoxin-producing/enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. We found that the numbers of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* increased rapidly between 1 to 2 log₁₀ cfu g⁻¹ in sausages produced with the nitrate containing plant extract.

ZUSAMMENFASSUNG

Our results showed that the tested extract could not avoid the growth of the pathogens, hence leading to a microbiological hazard. The microbiological stability of the product and the dying off of the pathogens is enhanced by the exclusive combination of sodium nitrite and a sufficient decrease in water activity and pH-value.

2. Einleitung

2.1. Rohwurst

Rohwürste sind in der Regel umgerötete, ungekühlt (über + 10 °C) lagerfähige, in der Regel roh zum Verzehr gelangende Wurstwaren (Leistner, 1985), die streichfähig oder nach einer mit Austrocknung verbundenen Reifung schnittfest geworden sind (Deutsches Lebensmittelbuch, 2010). Sie bestehen aus rohem zerkleinerten Fleisch, Fett (zumeist kerniger Rückenspeck), wenigen Zusatzstoffen und enthalten je nach Art bzw. Tradition unterschiedliche Gewürze. Je nach Zerkleinerungsgrad der Fleisch- und Fettpartikel wird zwischen grob- und feinzerkleinerten bzw. zwischen streich- und schnittfähigen Produkten unterschieden. Rohwürste werden in Kunst- oder Naturdärme abgefüllt und anschließend bei unterschiedlichen Temperaturen und Luftfeuchten gereift.

Historisch gesehen sind Würste, vor allem Koch- und Blutwürste, seit langem bekannt und weltweit verbreitet. Die erste Erwähnung der Rohwurst (Typ Salami) dagegen ist erst ca. 250-300 Jahre alt und stammt aus dem heutigen Italien. Durch Metzgergesellen gelangten zwischen dem Ende des 18. und Anfang dem 19. Jahrhunderts die ersten Rezepte und Produkte auch in den deutschen Raum (Lissner, 1939). Neben der erwähnten Salami hat es auch schon vor 1750 haltbare Würste in den deutschen Kleinstaaten gegeben. So wurden bereits 1734 Göttinger und Braunschweiger Würste in Chroniken erwähnt. Auf Grund der schwierigen Überlieferungs-/Datenlage fällt es aus heutiger Sicht schwer, die Erfindung der Rohwurst exakt geographisch und zeitlich einzuordnen, so dass bis heute Italien als Ursprungsland angenommen wird (Lissner, 1939; Leistner, 1985).

2.1.1. Bedeutung für den deutschen Markt

Die Fleischwirtschaft ist in Deutschland mit einem Wertschöpfungsteil von rund 23,02 % der wichtigste Sektor der Ernährungswirtschaft und hat ihre Spitzenposition in den letzten Jahren gegenüber der Milchwirtschaft mit 15,09 % weiter ausgebaut (BVDF, 2011). Die Unternehmen der deutschen Fleischwarenindustrie produzierten im Jahr 2010 insgesamt 1.478.479 t Wurstwaren, dies entsprach einem Plus von 1,3 % im Vergleich zum Jahr 2009 (1.459.353 t). Besonders deutlich legten Rohwürste wie Salami, Cervelat- oder Teewurst zu. Hier konnte eine Steigerung um 3,4 % auf 443.983 t im Vergleich zu 2009 verzeichnet werden (VDF, 2011). Somit kaufte statistisch gesehen im Durchschnitt jeder private Haushalt in Deutschland im Jahr 2010/2011 30,7 Kilogramm Fleischwaren und gab dafür rund 240 Euro aus (AMI, 2012; DFV 2011). Fasst man den Verzehr von Fleischerzeugnissen in Hauptgruppen zusammen, so dominieren Brühwürste mit 7,4 Kilogramm pro Kopf Verbrauch

deutlich (siehe Abb. 1). Den zweithöchsten pro Kopf Verzehr machten mit 5,5 Kg Rohwürste aus (siehe Abb. 1). Innerhalb der Rohwürste nahm wie schon in den Jahren zuvor die Salami mit einem pro Kopf Verbrauch von 2,3 kg (AMI, 2012; DFV 2011) die Spitzenstellung ein. Diese Daten belegen den großen Stellenwert dieser Produktgruppe in Deutschland.

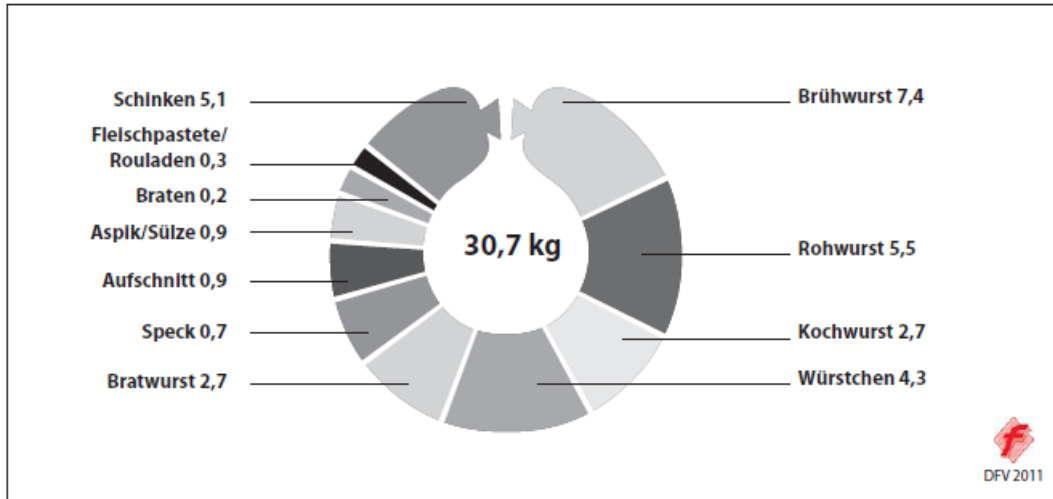


Abb. 1: Pro Kopf Verzehr von Fleisch und Fleischwaren 2010 in Deutschland (nach DFV, 2011)

2.1.2. Rohwurstherstellung

Die Herstellung fast aller Rohwurstarten hat sich durch die Entwicklung neuer Technologien seit Mitte des letzten Jahrhunderts stark gewandelt. Die Vorbehandlung des Rohmaterials wurde durch die Entwicklung von Tiefkühlhäusern vereinfacht. Somit konnte z.B. die Zerkleinerung des Fleisches vom Fleischwolf weitestgehend in den Kutter verlegt werden. Zu diesem Zweck wurden die heutigen Kutter seitens der Industrie in einer relativ kurzen Zeitspanne optimiert und an die geänderten Bedingungen angepasst. Des Weiteren konnte durch die Entwicklung/ Zusatz neuer Hilfsmittel die Herstellung und Reifung von Rohwürsten sicherer gestaltet werden. Durch den Zusatz definierter und optimierter Starterkulturen wurden die Rohwurstreifung verkürzt, die Produkte stabilisiert und Würste gleichbleibender Qualität erzeugt (Leistner, 1985; Rödel, 1985).

Durch die Entwicklung und Konstruktion von Reife-/Klimakammern wurde die zeitraubende Naturreifung standardisiert und ersetzt, die unter allen Herstellungsstufen das größte Risiko in sich birgt. Durch die automatisierten Klimakammern ist es nun auch möglich, während des ganzen Jahres und in jeder Region Rohwürste hoher Qualität herzustellen. Trotz dieser industriellen Entwicklung wird derzeit kaum eine Lebensmittelgruppe in Deutschland in solch einer Vielfalt angeboten wie die Wurstwaren (Hirschfelder, 2001; Leistner, 1985; Teuteberg, 1986).

2.1.3. Technologie der Herstellung

Zur Herstellung von Rohwurst wird im allgemeinen Rind- und/oder Schweinefleisch sowie Speck verwendet. Am geeignetsten ist dabei Fleisch älterer Tiere mit niedrigem pH-Wert und niedrigem Wassergehalt sowie fester, kerniger Rücken- oder Schulterspeck. Daneben werden noch je nach Produkttyp Zusatzstoffe wie Pökelsalz, Speisesalz, Zucker und Gewürze in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Im Vergleich zur Koch- oder Brühwurst dürfen bei der Herstellung laut den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnissen kein Fremdwasser und keine Innereien verwendet werden.

Zunächst einmal wird der Rohstoff Fleisch entweder im Fleischwolf oder im Kutter zerkleinert.

Dabei entscheidet der Grad der Zerkleinerung darüber, wie grob bzw. fein die Rohwurst ist. Nach dem Zerkleinerungsgrad, der so genannten Körnung unterscheidet man zwischen fein zerkleinerter Rohwurst (z.B. Teewurst) und grob zerkleinerter Rohwurst (Braunschweiger).

Eine weitere Unterscheidung bei der Rohwurst findet zwischen streichfähiger und schnittfester Rohwurst statt. Bei den streichfähigen Produkten wird die Streichfähigkeit durch die Beigabe höherer Mengen fein zerkleinerter Fetts erzielt. Dadurch kann das Fett die Fleischteilchen umschließen und verhindert neben einer starken Abtrocknung auch ein Verbinden der Fleischstücke miteinander. Durch diesen Effekt bleibt die Wurst streichfähig und wird nicht fest.

Die zerkleinerte Fleischmasse wird anschließend je nach Wursttyp in Kunst- oder Naturdärme unterschiedlichen Kalibers gefüllt und gereift bzw. geräuchert. Bei der Reifung wandeln die Starterkulturen das Glykogen des Fleisches und den zugesetzten Zucker in Milchsäure um. Gleichzeitig verbindet (bei schnittfester Rohwurst) das durch das Salz aus dem Fleisch gelöste Eiweiß die zerkleinerten Fleischteile untereinander, so dass die Rohwurst fest wird. Während der Reifung in automatisierten Klimakammern verliert die Wurst an Wasser und trocknet ab. Je nach Dauer der Reifung/Lagerung und der Art der Wurst kann eine Rohwurst bis zu 40-50 % ihres Wassergehaltes verlieren (z.B. Edelschimmelpilzgereifte Salami).

2.1.3.1 Hüllkaliber

Je nach Produkttyp variieren die Kaliber der Rohwürste zwischen 10 mm (z.B. Wattwurm) und 90 mm (z.B. Cervelatwurst). Durch die Wahl des jeweiligen Kalibers können neben dem Produkttyp auch die physikalischen Eigenheiten der Rohwurst beeinflusst werden. Gemeint ist dabei die Abhängigkeit der Absäuerung vom a_w -Wert und daraus folgend die Wasserabgabe und Festigkeit der Wurst. So konnten Rödel und Klettner (1981) zeigen, dass bei gleichen Ausgangsmaterialien und Reifebedingungen die größeren Kaliber zu

tiefere End-pH-Werten in der Rohwurst führten. Ursache für dieses Phänomen ist die verlangsamte Wasserabgabe bei größeren Kalibern, infolge der längeren Wegstrecke (siehe Abb. 2). Durch diese verzögerte a_w -Wert-Abnahme bleiben die eingesetzten Starterkulturen länger stoffwechselaktiv und bewirken eine höhere Milchsäureproduktion im Vergleich zu kleinkalibrigen Würsten.

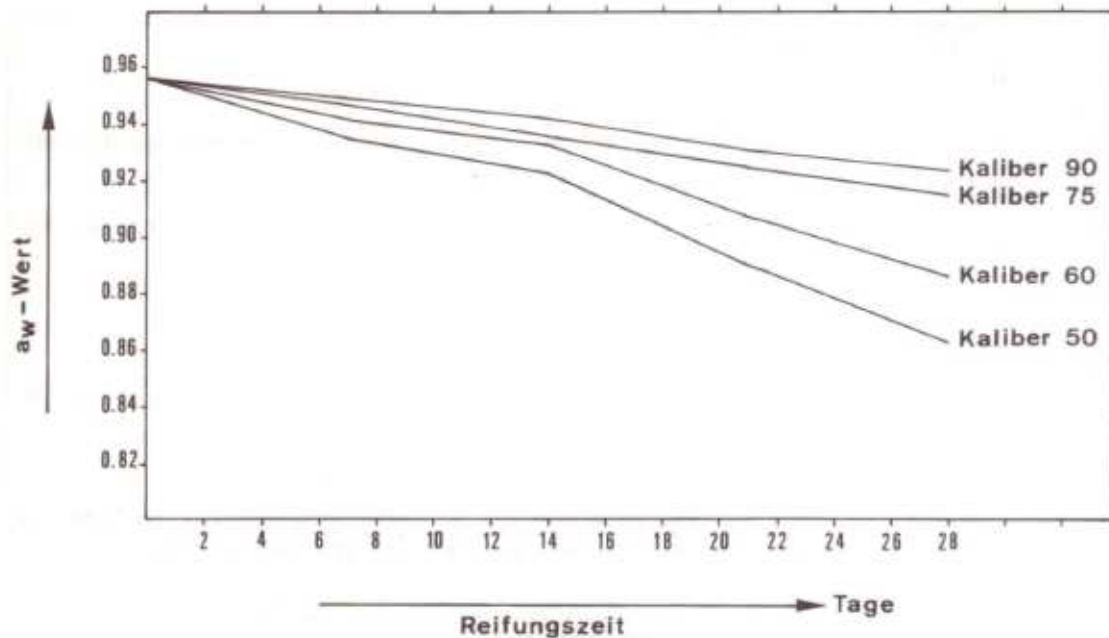


Abb. 2: Einfluss des Kaliberdurchmessers von Rohwurst auf den a_w -Wertverlauf in der Kernzone des Produktes in Abhängigkeit von der Reifezeit (nach Rödel und Klettner, 1981)

Auf Grund der starken Abtrocknung vor allem bei kleinkalibrigen Produkten werden solche bei denen eine Abtrocknung unerwünscht ist (z.B. Teewurst), in Wasserdampf- undurchlässigen Därmen abgefüllt.

2.1.3.2 Zusatzstoffe

Nach LFGB sind Lebensmittelzusatzstoffe Zusatzstoffe im Sinne des Artikels 3 Absatz 2 Buchstabe a in Verbindung mit Artikel 2 Absatz 2 der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe (ABl. L 354 vom 31.12.2008, S. 16), die durch die Verordnung (EU) Nr. 238/2010 (ABl. L 75 vom 23.3.2010, S. 17) geändert worden ist. Den Lebensmittelzusatzstoffen stehen gleich 1. Stoffe mit oder ohne Nährwert, die üblicherweise weder selbst als Lebensmittel verzehrt noch als charakteristische Zutat eines Lebensmittels verwendet werden und die einem Lebensmittel aus anderen als technologischen Gründen beim Herstellen oder Behandeln zugesetzt werden, wodurch sie selbst oder ihre Abbau- oder Reaktionsprodukte mittelbar oder unmittelbar zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden oder werden können; ausgenommen sind Stoffe, die natürlicher Herkunft oder den

natürlichen chemisch gleich sind und nach allgemeiner Verkehrsauffassung überwiegend wegen ihres Nähr-, Geruchs oder Geschmackswertes oder als Genussmittel verwendet werden. Im Folgenden sind die wichtigsten Zusatzstoffe für Rohwürste kurz aufgeführt.

Pökelfstoffe:

Die wirksame Substanz des Pökelsalzes ist das Nitrit. Dieses wird durch Reduktion zu Stickoxiden umgewandelt und katalysiert letztendlich die eigentlichen Wirkungen (vgl. Abb. 5 und 6).

Pökelfhilfsstoffe:

Pökelfhilfsstoffe tragen zur Umrötung bei, indem sie vermehrt Stickoxide aus dem Nitrit freisetzen bzw. durch Verschiebung des Redoxpotentials (Reduktionsmittel) die Bildung unansehnlicher Farbtöne (Metmyoglobin) verhindern (Linke, 1985). Von den Reduktionsmitteln sind nur die Salze der Ascorbinsäure zugelassen, wobei die Ascorbinsäure kein Zusatzstoff ist.

Neben den Reduktionsmitteln ist noch das Säuerungsmittel Glucono-delta-Lacton (GDL) erlaubt. GDL bewirkt ein sehr schnelles Absinken des pH-Wertes auf Werte unter 5,1 und führt somit zu einer mikrobiologischen Stabilisierung der Rohwurst.

Zuckerstoffe:

Die zugesetzten Zucker dienen vor allem den Starterkulturen als Nährstoff. Der Zucker (zumeist Glukose) wird dabei durch Gärung zu Milchsäure umgesetzt und vermittelt zum einen einen angenehm säuerlichen Geschmack und zum anderen trägt die gebildete Milchsäure zur pH-Wert-Absenkung bei. Durch diese Absenkung, die je nach Zuckerart und Menge sowie der ausgewählten Starterkultur unterschiedliche ausfallen kann, wird die Rohwurst mikrobiologisch stabilisiert. Generell gilt, dass Einfachzucker wie Glukose und Fruktose schneller abgebaut werden und damit ihre Wirkung schneller entfalten als Disacchride (Saccharose, Laktose) und Oligosaccharide.

Kaliumsorbat:

Gerade in Betrieben die neben üblichen Rohwurstprodukten wie Teewurst, Cervelatwurst und Salami auch Edelschimmelpilz-gereifte Erzeugnisse herstellen, kann es durch die Verbreitung von Schimmelpilzsporen zu einem ungewollten Wachstum von Schimmelpilzen auf der Wurtoberfläche kommen. Diese könnten zu Geschmacksveränderungen und Verfärbungen führen. Auch kann die Produktion von Toxinen gerade bei Fremdschimmel nicht ausgeschlossen werden. Zur Verhinderung eines ungewollten Wachstums von Schimmelpilzen dürfen die Produkte in eine 15 – 20 % -ige Kaliumsorbat-Lösung getaucht werden.

2.1.4. Reifung

Bei der Rohwurstreifung wird, abhängig von der Zeit, zwischen einer schnellen, mittleren und einer langsamen Reifung unterschieden (Leistner, 1985). Je nach Produkt können die Übergänge jedoch auch fließend sein (Klettner und Rödel, 1978; Rödel, 1985). Bei der schnellen Reifung wird vor allem das Schnellsäuerungsmittel Glucono-delta-lacton (GdL) eingesetzt. In Kombination mit einer relativ hohen Kammertemperatur zu Beginn der Reifung ($> 22 \text{ }^\circ\text{C}$) wird das Produkt durch die rasch einsetzende Absäuerung schnell schnittfest. Diese Produkte können bereits nach etwa 3 bis 10 Tagen, abhängig vom verwendeten Kaliber, in den Verkauf gelangen. Bei den länger gereiften Produkten läuft durch gemäßigte Anfangstemperaturen und eine natürliche Säuerung durch Starterkulturen die Reifung langsamer ab. Bei diesen Produkten ist die Aromabildung durch die kontinuierliche Trocknung und den Zusatz von Starterkulturen ausgeprägter (Buckenhüskes, 1991; Rödel, 1995). Die bei der Rohwurstreifung einwirkenden physikalischen/externen Einflüsse und deren Beziehung zu einander sollen im Folgenden am Beispiel einer schnittfesten Rohwurst näher dargestellt werden.

2.1.4.1 Relative Luftfeuchte

Die relative Luftfeuchte ist ein Maß für die Höhe der Sättigung der Luft mit Wasserdampf. Für die Steuerung der Luftfeuchte in automatisierten Klimakammern gibt es je nach Hersteller und Land unterschiedliche Vorschläge (Leistner, 1985). Zusammenfassend kann man sagen, dass nach einer Angleichzeit von 4 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur und Raumfeuchte in den ersten drei Reifetagen mit einer relativen Luftfeuchte von 95 – 90 % begonnen wird. Eine relative Luftfeuchte von 95 % zu Beginn ist jedoch relativ unzweckmäßig. Auf Grund der geringen Feuchtigkeitsdifferenz zwischen Brät (a_w -Wert: 0,96 – 0,95) und Kammer wird nur wenig bzw. kein Wasser nach Außen abgegeben. Ab dem 4 bis 10 Tag wird die Feuchtigkeit schrittweise auf 90 bis 80 % abgesenkt. Im Anschluss werden die Rohwürste je nach Produkt und dem zu erreichenden Abtrocknungsgrad in einen klimatisierten Nachreiferaum verbracht und es wird zumeist eine relative Luftfeuchte von 75 % eingestellt. Um die Bildung eines Trockenrandes und somit eines Fehlproduktes zu vermeiden, sollte das Wasserdampfpartialdruckgefälle zwischen Produkt und Kammern 5 % nicht übersteigen (Rödel et al., 1973; Stiebing und Rödel, 1985). So sollte zum Beispiel bei einem Wasseraktivitätswert von 0,96 die relative Feuchte nicht kleiner als 91 % sein.

2.1.4.2 Temperatur

Der physikalische Wärmezustand eines Körpers wird durch die Temperatur gekennzeichnet. Die Steuerung und Regelung der Temperatur ist eine sehr bedeutende Größe bei der

Reifung von Rohwürsten. Die Temperatur beeinflusst die Geschwindigkeit der pH-Wert-Absenkung, der Festigkeitszunahme und der Wasserabgabe. Bei der Absäuerung des Produktes durch Starterkulturen macht sich eine Temperatursteigerung um 5 °C in einer Verdopplung der Fermentationsgeschwindigkeit bemerkbar (Klettner und Rödel, 1979; Xu et al., 2010). Jedoch besteht bei höheren Reifetemperaturen von 24 °C die Gefahr einer Vermehrung unerwünschter Mikroorganismen und somit ein erhöhtes Risiko für eine Lebensmittelinfektion (Gareis et al., 2010; Klettner und Rödel, 1979). Im Allgemeinen wird je nach Produkttyp mit einer Temperatur von 24 - 22 °C begonnen. Anschließend fällt die Reifetemperatur schrittweise, meist parallel mit der Luftfeuchte, auf 18 °C zwischen dem 4. und 10. Tag. Während der Nachreifung übersteigen die Temperaturen selten den Wert von 13 °C – 15 °C.

2.1.4.3 Luftgeschwindigkeit

Neben der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur ist die Luftgeschwindigkeit eine weitere wichtige Größe bei der Reifung von Rohwürsten. So wird durch die Luftbewegung vor allem der Temperatenausgleich und eine angemessene Abtrocknung der Produkte in den Klimakammern gewährleistet. Dazu sollte die Luftbewegung, wie in modernen Anlagen gegeben, in allen Bereichen der Kammer weitgehend gleichmäßig sein. Zu Beginn der Reifung werden je nach Produkt und Typ Luftgeschwindigkeiten von 0,5 – 0,8 m/s gefahren. Durch den auf die Wurstwaren auftreffenden Luftstrom wird die Abfuhr des Wassers und somit die Abtrocknung und Stabilisierung der Produkte weiter unterstützt. Mit zunehmender Reifung bzw. Lagerung sollte die Luftgeschwindigkeit auf 0,1 bis 0,05 m/s gesenkt werden. Um Fehlprodukte (Trockenrand) zu vermeiden, sollte darauf geachtet werden, dass die Abtrocknung der Rohwürste vor allem im Randbereich weder zu einseitig noch zu schnell von Statten geht (Stiebing und Rödel, 1985).

2.1.5. Konservierung

Auf Grund der Art der Herstellung handelt es sich bei Rohwürsten zunächst einmal um ein sensibles Produkt. Rohes Fleisch und Fett werden in einen Darm gefüllt und bei moderaten Temperaturen (18 °C - 25 °C) gereift. Dass Rohwürste dennoch zu den stabilsten Erzeugnissen gehören, verdanken sie einer Abfolge bzw. Kombination unterschiedlicher mikrobiologisch wirksamer Hürden (Leistner, 1984 und 2000). Die wichtigsten Hürden, die bei der Rohwurstreifung eine Rolle spielen, sind der pH-Wert, die Wasseraktivität (a_w -Wert), das Redoxpotential, Zusatzstoffe und die Konkurrenzflora, vor allem in Form von Laktobazillen.

2.1.5.1 Zusatzstoffe

Am Anfang der Reifung sind die Hürden pH-, a_w -Wert und Redoxpotential noch nicht ausgeprägt (siehe Abb. 4) und das Produkt wird alleine durch den Zusatzstoff Natriumnitrit stabilisiert. Gerade in den ersten 48 bis 72 h der Reifung ist der Zusatz von Nitritpökelsalz von großer Bedeutung, da nur Natriumnitrit effektiv eine Vermehrung unerwünschter Keime verhindert (Leistner, 1985; Kabisch et al., 2008a).

2.1.5.2 Redoxpotential

Als nächste Hürde spielt das Redoxpotential eine Rolle. Durch den Zusatz von Natriumascorbat und die Vermehrung der Starterkulturen, mit dem dadurch verbundenen Sauerstoffverbrauch, sinkt das Redoxpotential stark ab. Durch den gesunkenen Redoxwert wird die Vermehrung der aeroben Bakterien z.B. der Familie der *Pseudomonadaceae* stark eingeschränkt (Hechelmann, 1985).

Messung des Redoxpotentials – in Vitro Versuche

Das Redoxpotential oder die Redoxspannung (E) sagt aus, wie stark reduzierend bzw. oxidierend ein Substrat ist und gilt als Maß für die Fähigkeit oder die Kraft eines Systems, Elektronen aufzunehmen (Rödel und Scheuer, 1998; Baysinger, 2012; Barnes et al., 1985).

Die Neigung eines Substrats, Elektronen aufzunehmen oder abzugeben, bestimmt das Potential der für die Messung eingesetzten Elektrode und damit die elektrische Spannung der Messkette. Je stärker die Fähigkeit des Systems zur Aufnahme von Elektronen, desto größer ist die Redoxspannung. Somit bedeuten negative Spannungswerte, dass das Substrat reduzierend gegenüber der Normalwasserstoff/Standardelektrode ist. Im Gegensatz zu anderen Messverfahren wie pH- oder a_w -Wertmessung sind Einzelpotentiale nicht bestimmbar, nur Potential-/ Spannungsdifferenzen. Auf Grund dieser Gegebenheit müssen sich alle gemessenen Redoxpotentiale auf eine gemeinsame Basis beziehen, um vergleichbar zu sein (Rödel und Scheuer, 1998, Baysinger, 2012).

Daher wird in allen Untersuchungsansätzen kurz nach der Beimpfung, unabhängig von der Fragestellung der Untersuchung, eine Nullstellung der Messwerte bei allen Elektroden durchgeführt. So werden die Differenzen des mikrobiologischen Geschehens an den Elektroden im Messverlauf deutlich und rein messtechnisch bedingte Elektrodenabweichungen ausgeglichen (Rödel und Scheuer, 1998 und 2003a). Dieser Wert wird im folgendem als „relatives Redoxpotential“ bezeichnet.

In Abb. 3 ist die graphische Direktaufzeichnung eines Redoxpotentials über mehrere Tage zu sehen. Der gemessene Millivolt-Wert des Redoxpotentials ist auf der y- und die Messzeit auf

der x-Achse aufgetragen. Durch die kontinuierliche Aufzeichnung der Potentialverläufe werden quasi in „Echtzeit“ die Signale aus dem direkten Umfeld der Elektrode aufgenommen. Durch das Wachstum der Mikroorganismen wandelt sich das umgebende Milieu in seiner Zusammensetzung und zwar in Abhängigkeit zur Menge und Art der gebildeten Stoffwechselprodukte (Rödel und Scheuer, 2003a; Balakireva et al., 1974).

Die Redoxpotential-Kurven verlaufen daher zunächst über einen gewissen Zeitraum annähernd waagrecht (siehe Abb. 3, Phase I), fallen dann bei einem Keimwachstum exponentiell ab (siehe Abb. 6, Phase II) und gehen bei geringeren Stoffwechselaktivitäten der Mikroorganismen (Absterbephase) wieder in einen waagerechten Teil über (siehe Abb. 3, Phase III). Eine Vermehrung der Organismen ist somit durch einen Abfall der relativen Redoxpotentiale gekennzeichnet. Alle begünstigenden und hemmenden Faktoren wie z.B. Natriumnitrit beeinflussen direkt die Stoffwechselaktivität und somit das Redoxpotential (Rödel und Scheuer, 2003a und 2003b). Der Zeitraum bis zum exponentiellen Abfall der Messkurve, die „elektronische Lag-Phase“, ist daher ein präzise bestimmbarer Maßstab für die Wirksamkeit einer Hürde (siehe Abb. 3, Phase I).

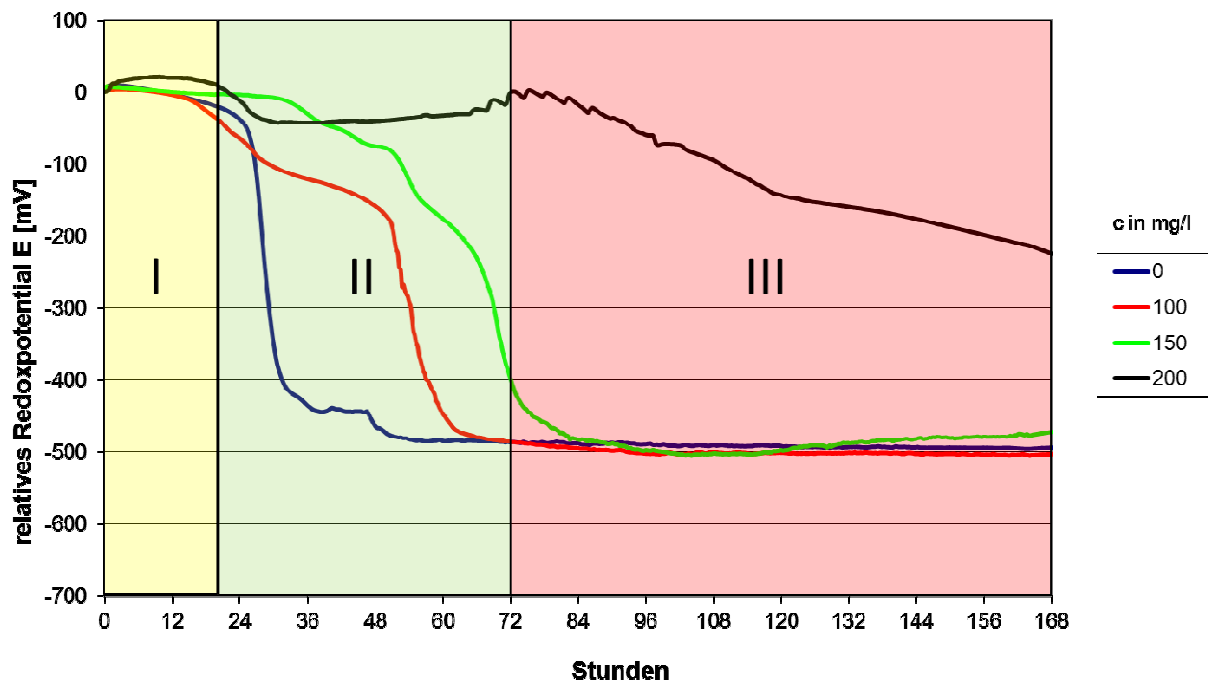


Abb. 3: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen auf die Redoxpotentialverläufe

Werden die Bakterien in ihrer Vermehrung durch Zusatzstoffe z.B. Natriumnitrit oder andere Faktoren negativ beeinflusst, ist eine Verlängerung der „elektronischen Lag-Phase“ zu beobachten (siehe Abb. 3). Des Weiteren ist der Abfall des relativen Redoxpotentials im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatzstoff geringer (siehe Abb. 3). An Hand der Länge bzw.

der Dauer der „elektronischen Lag-Phase“ und der Abnahme des relativen Redoxpotentials lassen sich somit verlässliche Aussagen über die Wirksamkeit einer lebensmittelrelevante Hürde (pH-, a_w -Wert oder Natriumnitrit) treffen.

Die Redoxpotential-Verlaufskurven haben daher den Charakter „umgedrehter“ Keimzahlkurven (siehe Abb. 3), dürfen jedoch nicht mit diesen gleichgesetzt werden, da die Redoxpotential-Kurven andere Eigenschaften reflektieren. Die Redoxpotentialverläufe reagieren auf Stoffwechselwechselprodukte der eingesetzten Bakterien, die in Wechselwirkung mit dem Nährmedium stehen (Rödel und Scheuer, 2003b; Balakireva et al., 1974).

2.1.5.3 Starterkulturen

Alle als Starterkulturen eingesetzten Milchsäurebakterien sind homofermentativ und bilden unter sauerstoffreduzierten Bedingungen aus Zuckerstoffen vor allem Milchsäure. Für die Qualität und mikrobiologische Stabilität ist es entscheidend, wie die Säuerung der Laktobazillen abläuft. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Säurebildung von der Konzentration der eingesetzten Milchsäurebakterien, der Reifetemperatur und der Art und Konzentration des verwendeten Zuckers ab (Klettner und Rödel, 1979; Rödel et al., 2006; Leroy et al., 2004; Kabisch et al., 2008a).

In den meisten Rohwurstprodukten werden die Starterkulturen in Konzentrationen von 10^6 - 10^7 KbE/g zugesetzt und vermehren sich innerhalb der ersten 72 h um ca. 2 Zehnerpotenzen auf Werte um 10^8 bis 10^9 KbE/g. In Folge der Zunahme der Laktobazillen und der damit verbundenen Milchsäureproduktion sinkt der pH-Wert kontinuierlich auf Werte unter 5,3 ab (siehe Abb. 4) und beginnt das Produkt zu stabilisieren (Buckenhüskes und Gehring, 2000).

Im weiteren Verlauf der Fermentation steigt der pH-Wert leicht an (siehe Abb. 4)(Gareis et al., 2010). Besonders bei Edelschimmelpilzgereiften Produkten kann dieses zu mikrobiellen Problemen führen (Gareis et al., 2010). Durch das Wachstum der Edelschimmelpilzkulturen kommt es zur Ausscheidung von basischen Stoffwechselprodukten und damit zu einer deutlichen Erhöhung des pH-Wertes zunächst vor allem im Randbereich. Im weiteren Verlauf wirken die basischen Produkte der Milchsäure immer mehr entgegen, so dass in schimmelpilzgereiften Erzeugnissen zum Ende der Reifung pH-Werte von 5,8 bis 6,4 erreicht werden (Wirth et al., 1975; Gareis et al., 2010; Kabisch et al., 2008a).

Neben der Säurebildung und der damit verbundenen mikrobiologischen Stabilität, verbessern die Starterkulturen die Pökelfarbe, das Aroma und verzögern die Ranzigkeit des Produktes (Talon et al., 2007; Gøtterup et al., 2008). Des Weiteren beschleunigen die

Starterkulturen durch die pH-Wert-Absenkung die Wasserabgabe und somit die Absenkung der Wasseraktivität.

2.1.5.4 Wasseraktivität

Im Verlauf der Reifung und Lagerung nimmt der pH-Wert wieder zu. Dieses aus mikrobiologischer Sicht ungünstige Entwicklung wird durch die gleichzeitig ablaufende Abtrocknung der Rohwurst kompensiert, da die Wurst mit zunehmender Reifung immer mehr Wasser verliert und der a_w -Wert in Folge sinkt (siehe Abb. 4). Die Wasseraktivität, ein Maß für das für Mikroorganismen frei verfügbare Wasser, ist ein wichtiges Kriterium für die Haltbarkeit und beeinflusst das Vorkommen und die Vermehrung von Mikroorganismen. Der a_w -Wert nimmt mit zunehmender Reife- und Lagerungszeit ab und ist damit die einzige Hürde in der Rohwurst, die sich nicht verkleinert, sondern stetig zunimmt (Rödel, 1985) (siehe Abb. 4). Der Verlauf der Abtrocknung kann ebenfalls wie der pH-Wert gesteuert werden: Über die anfängliche Kochsalzzugabe, wobei diese auf Grund von sensorischen Änderungen begrenzt ist (meist zwischen 2,7 - 3,4 % Kochsalz); über den pH-Wert, denn je schneller der pH-Wert unter 5,3 sinkt, desto zügiger nimmt das Wasserbindungsvermögen des Fleischeiweißes ab und das Produkt trocknet schneller ab (Klettner und List, 1980; Wirth, 1984); über die relative Luftfeuchte und die anliegende Luftgeschwindigkeit. Die Abnahme der Luftfeuchte und die Luftgeschwindigkeit werden in zumeist vollautomatischen Klimakammern (Reifekammern) je nach Produkt individuell gesteuert. Dabei kann zu Beginn der Reifung eine zu starke Absenkung des a_w -Wertes zu einem Fehlprodukt führen. Durch eine zu hohe Luftgeschwindigkeit und eine zu niedrige Luftfeuchte zu Beginn kann es an der Oberfläche des Produktes zu einem Trockenrand kommen. Dieser verhindert im weiteren Verlauf der Reifung den gewünschten Transport des Wassers, also die Absenkung des Wasseraktivitätswertes, aus der Rohwurst. In Folge kommt es zu einer gummiartigen Konsistenz des Produktes und in schweren Fällen zu einer sogenannten Kernfäulnis. Somit stellt die Absenkung des a_w -Wertes zu Beginn der Reifung eine Gratwanderung zwischen schnellstmöglicher Abtrocknung mit einer hohen mikrobiologischen Stabilität und einem Fehlprodukt von minderwertiger Qualität dar.

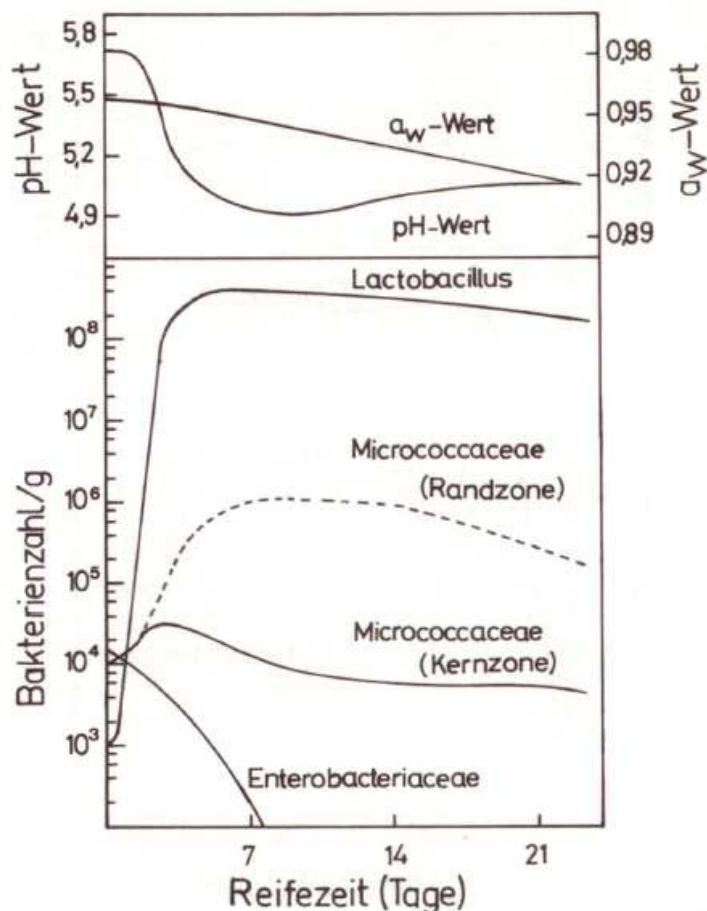


Abb. 4.: Schematische Darstellung der Reifung von Rohwurst (Salami – deutscher Art) in Anlehnung von Daten von Reuter (1967), Ambrosiadis (1981) und Wirth (1984).

2.1.6. Rohwurst-Typen

Rohwürste bestehen aus einem rohem Fleischgemenge, bei dem die Fleisch- und Fettbestandteile mit Muskeleiweiß in einem gelartigen Zustand miteinander verbunden werden (schnittfeste Produkte) oder bei dem, bedingt durch den höheren Fettanteil, Fett die Fleischpartikel aneinander vorbei gleiten lässt (streichfähige Produkte). In Deutschland sind etwa 300 Rohwurstsorten bekannt. Die sortenspezifischen Beschaffenheitsmerkmale einer Rohwurstsorte werden durch das Zusammenwirken verschiedener Komponenten gebildet. Dazu gehören hauptsächlich der Mengenanteil von Magerfleisch zu Speck, aber auch die anteiligen Mengen Rind- zu Schweinefleisch, des Weiteren die Verwendung von Natur- oder Kunstdärmen, die Geschmacks- und Aromabildung durch die Verwendung von Gewürzen und Zutaten, die Reifebehandlung, einschließlich des Räucherns oder der Lufttrocknung und nicht zuletzt das Schnittbild bzw. der Zerkleinerungsgrad der Rohwurst.

Auf Grund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten, die sich daraus ergeben, und der langjährigen traditionellen Herstellung hat fast jede Region in Deutschland ihre eigenen

speziellen Rohwurstprodukte. So stammen aus Schleswig-Holstein vor allem die Katenwurst, Aalrauchmettwurst und die geräucherte schnittfeste Mettwurst. In Niedersachsen werden die Schlackwurst und die Braunschweiger Mettwurst hergestellt. Dagegen sind in Westfalen die Plock-, Cervelat-, Katenwurst und die gereiften Mettenden heimisch. In Süddeutschland herrschen Land- und Bauernbratwürste, sowie Landjäger und Polnische vor.

Auf Grund der großen Vielfalt werden die Rohwürste zu größeren Gruppen zusammengefasst. So wird zum einem eine Unterteilung nach Haltbarkeit und zum anderen nach Streich- bzw. Schnittfähigkeit vorgenommen. Hinsichtlich der Haltbarkeit unterscheidet man zwischen frischen Rohwürsten wie z.B. Teewürsten, Halbdauerware wie Mettenden oder Polnische und Dauerware wie Salami und Edelschimmelpilzgereifte Erzeugnisse.

Bei der Unterscheidung nach schnittfest oder streichfähig erfolgt die Unterteilung zwischen streichfähiger Ware wie Teewürste oder auch Zwiebelmettwürste, schnittfesten Würsten wie Cervelatwurst und hart ausgereiften Rohwürsten wie Edelschimmelpilzgereifte Erzeugnisse. Zwischen diesen Produkten gibt es eine Vielzahl an Übergängen, die z.T. eine mehrfache Zuordnung möglich machen. In der Praxis hat sich jedoch diese Grobeinteilung bewährt und ermöglicht eine Differenzierung der Produkte untereinander (Leistner, 1985).

Im Folgenden sollen die in der Arbeit verwendeten Produkttypen kurz vorgestellt werden.

Streichfähige Rohwurst – Typ Teewurst

Die streichfähigen Rohwürste sind sortenabhängig gereifte, umgerötete, jedoch nur gering abgetrocknete, nicht zur längeren Lagerung bestimmte Fleischerzeugnisse. Aus zerkleinertem Fettgewebe freigesetztes Fett umhüllt die Fleischteilchen und bewirkt die Streichfähigkeit. In Abhängigkeit vom Zerkleinerungsgrad der Fleisch- und Fettpartikel unterscheidet man zwischen fein- und grobzerkleinerter Ware. Die streichfähige Rohwurst ist reich an Eiweiß und verfügbarem Wasser und stellt auf Grund der kleinen Körnung den idealen Nährboden für Mikroorganismen aller Art zur Verfügung. Auf Grund der geringen Bandbreite der zur Verfügung stehenden Hürden ist sie das sensibelste Produkt unter den streichfähigen Rohwürsten.

Kurzgereifte schnittfeste Rohwurst – Typ schnellgereifte Salmi mit Glucono-delta-Lacton

Der Zusatzstoff Glucono-delta-Lacton (GdL) ist ein Schnellreifungsmittel, das in Deutschland oft verwendet wird. GdL ist ein zyklischer Ester, der sich in Wasser rasch in Gluconsäure umwandelt und zu einer erwünschten pH-Wert-Senkung, einer schnellen Gelbildung und zu einer beschleunigten Umrötung im Produkt führt. Der Zusatz von GdL verkürzt zum einen die Reifezeit auf ein Drittel und reduziert den Gewichtsverlust auf rund fünfzehn Prozent (üblich sind 30 bis 50 Prozent). Andererseits entstehen durch die kürzere Reifezeit weniger

aromatische Proteinabbauprodukte. Die Haltbarkeit GdL-gereifter Produkte ist jedoch verkürzt, und die Farbe sowie das Aroma sind weniger intensiv. Die anfangs niedrigen Gewichtsverluste, die schnell erreichte Schnittfestigkeit und somit Verkaufsfähigkeit und die risikoarme Herstellung sind vorteilhaft, jedoch sind Geschmack, Farbe und auch Haltbarkeit dieser Würste begrenzt. Bei längerer Lagerung treten zudem ein beißig-saurer Geschmack und hohe Gewichtsverluste auf.

Langgereifte Rohwurst – Typ Salami

Der Vorteil der langgereiften Rohwurst gegenüber einer kurzgereiften ist ihre lange Haltbarkeit und der Verzicht auf den chemisch-synthetischen Zusatzstoff Glucono-delta-Lacton. Durch die verlängerte Reifezeit entsteht mehr attraktiver Eigengeschmack – analog zu Wein und Käse. Gemäß Böhler (2007) benötigt eine Qualitätssalami pro Millimeter Kaliber einen Tag Reifezeit bei moderater Temperatur. Ein genügend hoher Trocknungsgrad ist entsprechend der Erfahrung der Hauptfaktor für die Haltbarkeit. Die Wasseraktivität muss für alle Rohwürste auf unter 0,93 oder noch tiefer gesenkt werden. Ein weiterer Faktor der die Haltbarkeit der langgereiften Rohwurst bestimmt ist der pH-Wert. Dieser sollte während der Reifung mindestens pH 5,3 erreichen und bis zum Ende nicht über 5,7 steigen.

Schimmelpilzgereifte Rohwürste – Typ Edelschimmel Salami

Zur Herstellung bestimmter Rohwurstsorten (Salami ungarischer und italienischer Art) wird die Wurst direkt nach dem Füllen in ein Tauchbad mit Sporen eines nicht toxinogenen *Penicillium* Stammes getaucht. Bei der Reifung entwickelt sich auf der Wurstoberfläche ein weißes Schimmelpilzmycel. Die chemischen, physikalischen und mikrobiologischen Vorgänge bei der Reifung sind denen bei der Fleischpökellung sehr ähnlich (Umrötung, Säuerung und Aromabildung)(Leistner, 1985). Die Vorteile einer schimmelpilzgereiften Rohwurst sind vielfältig. So werden Geruch, Geschmack sowie die Konservierung des Produktes positiv beeinflusst. Durch das schnelle Wachstum des Edelschimmels wird das Wachstum unerwünschter Bakterien und Schimmelpilze auf der Oberfläche gemindert und der Schimmelbelag schützt vor einer ungünstigen Licht- und Sauerstoffeinwirkung, so dass ein Ranzigwerden verzögert wird. Jedoch besteht durch das schnelle Wachstum des Schimmelbelages und dem damit verbundenen Anstieg des pH-Wertes vor allem im Randbereich die Gefahr einer verminderten Abtötung der pathogenen Keime.

2.2. Vorkommen von Pathogenen in Rohwurstzeugnissen

Rohwurstzeugnisse stabilisieren sich ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess. Ablauf und Bedingungen dieses Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien entscheiden dabei letztlich über die Sicherheit des Endproduktes. Das Rohmaterial (Schweine- oder Rindfleisch) für die Herstellung von Rohwurstzeugnissen kann mit verschiedenen Krankheitserregern belastet sein. Schweine sind beispielsweise ein Reservoir für *Yersinia enterocolitica* (Bowman et al., 2007; Nesbakken et al., 2003; Terentjeva und Berzins, 2010) und Salmonellen (Lomonacco, 2009; Merle, 2011; Hauser, 2011; Much et al., 2007), während Wiederkäuer vor allem als Quelle für shigatoxinbildende/ enterohämorrhagische *E. coli* (STEC/EHEC) (Lee G., 2009; Albiñ et al., 2003; Chapman et al., 1997; Rasmussen et al., 1993) und auch *L. monocytogenes* (Esteban, 2009; Karakolev, 2009; Farber et al., 1989; Gobat and Jemmi, 1990) gelten. Weiterhin können *Clostridium perfringens* (Kamber et al., 2007; Singh et al., 2005), *Staphylococcus aureus* (Balaban and Rasooly, 2000; Wieneke et al., 1993; Lim et al., 2010) und *Campylobacter* spp. (Bohaychuk et al., 2011; Blasi, 2011) als Kontaminanten auf Fleisch vorkommen.

Auf Grund der Bedeutung als Krankheitserreger bzw. der z.T. hohen Mortalitätsraten (Goulet et al., 2012; Koch et al., 2011), sowie der Tatsache, dass EHEC's, Salmonellen und Listerien den Fermentationsprozess von Rohwürsten überstehen können (siehe Tabelle 1), wurden diese Bakterien für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

Tab. 1. Literaturübersicht über das Vorkommen von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* in fermentierten Rohwürsten

Mikroorganismus	Literatur
<i>Salmonella</i> spp.	Gareis et al., 2010; Hew, 2005; Escartin et al., 1999; Nissen und Holck, 1998; Holley et al., 1988
Shigatoxinbildende <i>Escherichia coli</i>	Holck et al., 2011; Gareis et al., 2010; Nissen und Holck, 1998; Glass et al., 1992; Timm et al., 1999
<i>Listeria monocytogenes</i>	Martin et al., 2011; Kabisch et al., 2011; Gareis et al., 2010; Karakolev, 2009; Gianfranceschi et al., 2006

Auf Grund der Art der Herstellung und der Verwendung rohen Fleisches werden Rohwürste wiederholt als Risikoprodukte genannt. Im Vergleich jedoch zu den häufigen Nachweisen auf dem Ausgangsmaterial konnten in den letzten 30 Jahren nur sporadisch EHEC-, Salmonellen- bzw. Listerien-Krankheitsausbrüche mittels Stammidentifizierung auf kontaminierte Rohwurstprodukte zurückgeführt werden (Alexander et al., 1995; Sartz et al.,

2008; Bremer et al., 2004; Nygard et al., 2007; Thevenot et al., 2006; Emberland et al., 2006).

Zum Teil wurden Rohwürste allerdings mit Ausbrüchen in Zusammenhang gebracht, bei denen kein entsprechendes Isolat aus dem Produkt erhalten werden konnte (Gareis et al., 2009; Ammon et al., 1999) bzw. bei denen Retrospektivstudien andere Ursachen ergaben (Huber et al., 1998). Der Nachweis von *Salmonella* spp., EHEC bzw. > 100 KbE *L. monocytogenes* pro g im Rohwurstprodukt führt zur Rücknahme der betroffenen Chargen. Die Verbraucher reagieren sehr sensibel auf "Lebensmittelskandale" und unterscheiden bei den betroffenen Produkten nicht die Hersteller. Dabei reagieren Discount-Ketten meist schnell auf entsprechende Pressemeldungen und entfernen betroffene bzw. in Verruf" geratene Produkte aus ihrem Sortiment, unabhängig davon, ob eine Rückrufaktion bzw. Pressemeldung gerechtfertigt war. Solche Krisen können gerade für kleine und mittlere rohwurstproduzierende Betriebe existenzbedrohend sein.

Auf Grund dieses Gefährdungspotentials wird in allen Lebensmitteln eine Nulltoleranz von *Salmonella* spp. gefordert. Somit bedingt ein positiver Salmonellen-Nachweis einen Rückruf der Ware (Verordnung (EG) Nr. 178/2002; Verordnung (EG) Nr. 2073/2005) und damit letztendlich einen wirtschaftlichen Verlust.

2.2.1. *Salmonella* spp.

Allgemeines

Salmonellen sind 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm große, Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien ohne Sporenbildung (Dedie et al., 1993), die, bis auf einige wenige Ausnahmen (z.B. *S. enterica* subsp. Gallinarum), über eine peritriche Begeißelung beweglich sind (Rolle and Mayr, 1993; Selbitz and Sinell, 1995; Fujii et al., 2008). Salmonellen gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und zurzeit existieren ca. 2500 Serovarietäten, die sich auf zwei Spezies aufteilen: *S. enterica* und *S. bongori* (Tschäpe und Bockemühl, 2002). Mit biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden können 70 % der Salmonellen taxonomisch der Spezies *enterica* zugeordnet werden (Brenner et al., 2000; Le Minor und Popoff, 1987). Innerhalb der Spezies *enterica* sind heute sechs Subspecies bekannt: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica* (Reeves et al., 1989; Brenner et al., 2000).

Zur weiteren Serotypisierung werden die für *Enterobacteriaceae* typischen hitzestabilen Lipopolysaccharide (O-Antigene), welche in der äußeren Membran verankert sind, die Geißel-Antigene (H-Antigene) und die Antigene der Schleimhülle (K-Antigene) genutzt.

Entsprechend den Eigenschaften der Antigene werden die Salmonellen-Stämme mit Hilfe des Kaufmann-White-Schemas typisiert (White, 1926; Kaufmann, 1966; Kaufmann, 1978).

Die für die Warmblüter bedeutsamsten Vertreter gehören der Subspezies *enterica* an, während bei wechselwarmen Tieren vor allem Salmonellen der Subspezies *arizonae* und *diarizonae* nachgewiesen werden (Scheelings et al., 2011; Schroeter et al., 2004; Briones et al., 2004). Die restlichen Vertreter der Spezies *enterica* und *bongori* werden nur sporadisch aus Patientenproben isoliert, häufiger jedoch aus Umweltproben (Franco et al., 2011; Quiroz-Santiago et al., 2009; Giammanco et al., 2002).

Krankheitsgeschehen

Die Salmonellose gehört nach der Campylobacteriose in Deutschland und der Europäischen Union zu den bedeutendsten bakteriellen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes (RKI, 2010; EFSA, 2011), die durch den Verzehr von Lebensmitteln ausgelöst werden (EFSA, 2011). Obwohl sehr viele Erregertypen der Spezies *S. enterica* bekannt sind, treten nur einige wenige klinisch und epidemiologisch in den Vordergrund. Für das Jahr 2009 wurden für Deutschland vom Robert Koch-Institut die folgenden Serovare als die häufigsten angegeben: *S. Enteritidis* (58 %), *S. Typhimurium* (33 %), *S. Infantis* (1,5 %), *Salmonella* Derby (0,5 %), *S. Newport* (0,4 %), *S. Virchow* (0,4 %) und *S. Brandenburg* (0,4 %) (RKI, 2010).

Die Salmonellose kann in sehr vielfältiger Form auftreten und unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen. Bei den meisten durch Lebensmittel übertragenen Salmonellosen handelt es sich um akute Gastroenteritiden.

Die Inkubationsdauer variiert je nach Infektionsdosis (10^3 - 10^6 KbE) und Lebensmittel zwischen wenigen Stunden und drei Tagen (RKI, 2009). So können z.B. in fettreichen Lebensmitteln wie Schokolade deutlich niedrigere Keimzahlen zu einer Infektion führen. Die Fette z.B. der Kakaobutter oder des Eigelbs wirken dann wie ein Schutzkolloid für die Salmonellen und schützen diese so vor dem säurehaltigen Milieu des Magensaftes.

In den meisten Fällen kommt es zu zahlreichen wässrigen, jedoch nicht blutigen Durchfällen. Ein kurzzeitiger Anstieg der Körpertemperatur auf 38-40 °C kennzeichnet den typischen Verlauf einer Salmonellose. Bei Resistenzgeschwächten bzw. Älteren, Neugeborenen und Säuglingen konnten jedoch z.T. schwerwiegende Komplikationen beobachtet werden (Papaevangelou et al., 2004; Amreeta und Fatt, 2009). So traten Salmonellen durch die Darmschleimhaut und gelangten anschließend in den Blutkreislauf. Dort führten die Erreger zu Entzündungen des Gehirns (Meningitis) (Mian et al., 2011; Choudhury et al., 2006) und zu einer Sepsis (OhAiseadha et al., 2010; Indarso et al., 2008). Bei älteren bzw. immungeschwächten Personen kann bereits der hohe Flüssigkeitsverlust zu einer starken

Belastung des Herzens und des Kreislaufs führen und so den Weg für weitere Folgeerkrankungen bereiten. Nach dem Abklingen der Erkrankung kann das Bakterium noch einige Tage bis zu einigen Wochen mit dem Stuhl ausgeschieden und somit weiter verbreitet werden. Sogenannte Dauerscheider, die in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben eine Gefahr darstellen könnten, sind jedoch sehr selten zu beobachten (Böttger und Kayser, 2010).

Virulenz-/ Pathogenitätsfaktoren

Für die Entstehung einer Infektion ist neben dem Immunstatus vor allem die Virulenz des Mikroorganismus von Bedeutung. Mittels molekularbiologischer Analysen und der Sequenzierung der Genome von *Salmonella* Typhimurium (McClelland et al., 2001), *Salmonella* Typhi (Parkhill et al., 2001), *Salmonella* Paratyphi (McClelland et al., 2004) und *Salmonella* Choleraesuis (Chiu et al., 2005) sind inzwischen eine Reihe von Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren identifiziert und charakterisiert wurden.

Nachdem die Zellen an den Epithelzellen bzw. den M-Zellen über den Peyer'schen Platten andockt haben, sorgen die Genprodukte des *inv*-Locus (Invasion) dafür, dass die Bakterien in die Zelle aufgenommen werden (Finlay, 1994). Eine besondere Rolle kommt dabei den Genprodukten SipA, SipB, SipC, SptP, SopE2 und SopB zu (Bruno et al., 2009; Collazo et al., 1995; Collazo und Galan, 1997; Gong et al., 2009). Diese Proteine bewirken in der Wirtszelle, dass sich die Komponenten des Cytoskeletts polymerisieren und die andockte *Salmonella* spp. Zelle vom Wirtsorganismus umschlossen und aufgenommen wird (Galan und Zhou, 2000; Ginocchio et al., 1992; Jones et al., 1993). Die so in die Zelle verbrachten Salmonellen aktivieren nun Gene des *phoP/phoQ*-Locus, um unter den toxischen Bedingungen innerhalb eines Phagosoms zu überleben (Bearson et al., 1998; Guina et al., 2000; Gunn und Miller, 1996). Neben den Genen des *inv*- und *phoP/phoQ*-Locus, welche für die Invasion und die Resistenz gegenüber einem sauren Milieu und toxischen Sauerstoffprodukten wichtig sind, existieren noch einige weitere Faktoren, die die Pathogenität von *Salmonella* spp. beeinflussen können. So konnte gezeigt werden, dass die an Eisenaufnahmesystemen beteiligten Gene einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenität der Salmonellen haben (D'Aoust, 2001; Wooldridge und Williams, 1993; Troxell et al., 2011). Der für die Symptomatik entscheidende Pathogenitätsfaktor ist ein hitzelabiles Enterotoxin. Dieses wird auch als *Salmonella* Toxin (*stx*) bezeichnet und besitzt eine Molekülmasse von 90 bis 110 kDa (D'Aoust, 1991). Wird das Toxin in das Cytoplasma freigesetzt, kommt es zu einer Aktivierung einer Adenylcyclase und somit zum Anstieg von zyklischem AMP. Damit einhergehend nimmt der Ausstrom von Chloridionen aus der Zelle zu, während der Einstrom von Natriumionen sinkt. Infolgedessen

kann eine starke Flüssigkeitsabsonderung in den Darm beobachtet werden (D'Aoust, 1991; Wallis et al., 1986).

Neben dem Enterotoxin können die Salmonellen ein weiteres thermolabiles cytotoxisches Protein produzieren, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist (Ashkenazi et al., 1988). In Folge der Freisetzung kommt es in den Zellen zur Hemmung der Proteinbiosynthese und folglich zum Tod und zur Lyse der Wirtszelle (Koo et al., 1984). Zwischenzeitlich wurden auf mobilen genetischen Elementen von *Salmonella enterica* mögliche neue Virulenzgene/Toxingene gefunden. Ihre Rolle in der Pathogenese ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Bacciu et al., 2004; Saitoh et al., 2005; Switt et al., 2012).

Übertragung über Lebensmittel

Eine Kontamination von Lebensmitteln kann trotz aller hygienischen Maßnahmen und guter Schlacht- und Zerlegehygiene nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Ein Überleben und eine Vermehrung von *Salmonella* spp. ist in vielen Lebensmitteln, unter anderem auch in Fleisch und Fleischprodukten möglich und durch eine Reihe von Ausbrüchen gut dokumentiert (Jansen et al., 2005; Dechet et al., 2006; Kivi et al., 2005). Weitere wichtige Infektionsquellen neben Fleisch (Anaraki et al., 2005; Kivi et al., 2005) sind Produkte, die Rohei (Keene et al., 2004; Camps et al., 2005), Fisch (David et al., 2009; Guerin et al., 2004; Ogawa et al., 1991) und Schokolade enthalten (Werber et al., 2005; Kapperud et al., 1990). Hauptreservoir für die Enteritis erregenden Salmonellen ist der Darmtrakt von Tieren. So werden die Keime nicht nur von gesunden Schlachttieren (Schweine) und verschiedenen Geflügelarten (Huhn, Pute), sondern auch von freilebenden Wasservögeln (Hoque et al., 2012; Hughes et al., 2008), Wild (Paulsen et al., 2012), Nagern (Nkogwe et al., 2011; Lapuz et al., 2008) und Reptilien (Hervas et al., 2012) ausgeschieden. Epidemiologisch gesehen ist der Mensch in dieser Infektkette nur das Endglied.

Stressantwort

Salmonella spp. verfügt über die Fähigkeit, unter widrigen Umweltbedingungen ihre Überlebensfähigkeit durch Aktivierung von Stressfaktoren zu erhöhen. Dies kann zu einer erhöhten Virulenz und somit letztendlich zu einem größeren Gefährdungspotential der Keime führen (Falkow et al., 1992; Garcia-del-Portillo und Finlay, 1994; Leyer und Johnson, 1993).

Salmonellen gehören zu den Mikroorganismen, die sich rasch an extreme Umweltbedingungen anpassen können. So sind einige Stämme in der Lage, bei Temperaturen von unter + 4 °C (Baker et al., 1986) und zum Teil bis zu 54 °C (Droffner and Yamamoto, 1992) zu wachsen.

Stressantwort - pH-Wert

Es konnte gezeigt werden, dass Salmonellen innerhalb eines pH-Wertbereiches von 4,5 bis 9,5 Vermehrung zeigen (Holley und Proulx, 1986; Chung and Goepfert, 1970; Asplund und Nurmi, 1991). Dabei haben anorganische Säuren eine stärkere bakteriozide Wirkung auf Salmonellen als organische Säuren (Bearson et al., 1998; King et al., 2010). Organische Säuren jedoch werden vor allem in fermentierten Erzeugnissen durch Bakterien der Gattung *Laktobazillus* produziert und tragen zur Konservierung bei. Aus humanpathogener Sicht kommt erschwerend hinzu, dass einige Arbeiten zeigen konnten, dass Salmonellen, die in einer schwach sauren Umgebung voradaptiert wurden, bei einer anschließenden Verbringung in ein stark saures Milieu eine deutlich höhere Überlebenswahrscheinlichkeit zeigten als Organismen, die nicht vorkonditioniert waren (Huhtanen, 1975; Foster und Hall, 1991). Dieses ist von Bedeutung, da Salmonellen in fermentierten Lebensmitteln wie z.B. Rohwürsten durch die Milchsäure der Starterkulturen eine gesteigerte Säuretoleranz erlangen und so bei der Passage durch den Magen (pH 2,5) eine höhere Überlebensrate aufweisen können (Leyer and Johnson, 1993; D'Aoust, 1991; Viala et al., 2011; Alvarez-Ordonez et al., 2010a/b).

Diese Reaktion auf saure Umweltbedingungen ist auf die Aktivierung der Säure-Stress-Antwort (ATR) zurückzuführen. Durch den absinkenden pH-Wert werden bis zu 43 Genprodukte aktiviert, vor allem Säure-Schockproteine und Proteine der äußeren Membran. Gleichzeitig werden die Wachstumsrate reduziert und Transportsysteme induziert, die den internen pH-Wert im Zytoplasma aufrechterhalten. Zu diesen Transportsystemen gehören zum Beispiel eine Magnesium-abhängige ATPase (*atp*), welche unter Energieverbrauch Protonen aus dem Zellinneren nach außen pumpt (Foster und Hall, 1991) und ein Antiporter, der Kalium- und Natriumionen im Gegenzug zu Protonen aufnimmt (Padan et al., 1989; Olson, 1993). Eine weitere Möglichkeit, einer Übersäuerung des Zellinnenmilieus vorzubeugen, ist die Aktivierung einer Aminosäure-Decarboxylase. So entstehen z.B. durch die Ornithin- (SpeF) und Lysin-Decarboxylase (CadA) aus den entsprechenden Aminosäuren die Produkte Cadaverin bzw. Putrescin (Viala et al., 2011). Diese reagieren anschließend mit freien Protonen im Zytoplasma, neutralisieren diese und werden anschließend durch die Zellen ausgeschleust. Das entstehende CO₂ kann wiederum von den Zellen für anaplerotische Reaktionen genutzt werden (Kusian et al., 2002). Dabei reagiert CO₂ in Form von Bicarbonat mit Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat. Oxalacetat kann anschließend z.B. im Tricarbonsäurezyklus verwendet werden (Baez et al., 2009).

Diese für Bakterien in der logarithmischen Phase typischen Reaktionsmechanismen werden im Fall von *Salmonella* spp. durch zwei weitere Mechanismen ergänzt, die Zellen in der

stationären Phase betreffen. Zum einem handelt es sich um eine pH-Wert unabhängige Reaktion, die durch den alternativen Sigma-Faktor S (*rpoS*) vermittelt wird und der allgemeinen Stressantwort zuzuordnen ist (Lee et al., 1995; Bang et al., 1995). Zum anderen handelt es sich um eine pH-Wert abhängige Antwort, in deren Folge bis zu 15 Gene induziert werden (Lee et al., 1994). Obwohl im Vergleich zu den logarithmisch wachsenden Zellen deutlich weniger Gene aktiviert werden, weisen die Salmonellen unter diesen Bedingungen eine deutlich bessere Überlebensrate auf (Lee et al., 1994).

Stressantwort - a_w -Wert

Neben dem absinkenden pH-Wert spielt in der Rohwurst vor allem die Abnahme des a_w -Wertes eine entscheidende Rolle bei der Konservierung der Produkte. Im Gegensatz zu den Gram-positiven Mikroorganismen *L. monocytogenes* und *Staphylococcus aureus* müssen bei den Gram-negativen Bakterien die Aufnahmesysteme für Osmoregulatoren erst gebildet werden. Zur kurzfristigen Aufrechterhaltung des Zellinnendrucks (Turgor) nehmen Salmonellen und auch *Escherichia coli* Kaliumionen auf. Durch die dadurch bedingte gleichzeitige Aufnahme des Gegenions Glutamat kommt es in der Zelle zur Anreicherung hoher Konzentrationen von Kaliumglutamat (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003). In Folge dieser Anreicherung kann es im Zytoplasma der Zelle zu Störungen bzw. Beeinträchtigungen der Enzymfunktionen kommen (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003; Wijnker et al., 2006).

Ein weiterer physiologischer Nachteil der Gram-negativen Bakterien besteht darin, dass in den Zellen im Vergleich zu den Gram-positiven ein vergleichsweise geringer Zellinnendruck herrscht. Dadurch wird bei osmotischem Stress die Plasmolyse zusätzlich verstärkt. In Kombination mit beeinträchtigten Enzymfunktionen kann dies bei *Salmonella* spp. und STEC/EHEC zu höheren Absterberaten unter osmotisch ungünstigen Bedingungen führen (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003; Wijnker et al., 2006).

Neben der eben erwähnten kurzfristigen und somit schnellen Anpassung an einen abfallenden a_w -Wert durch die Aufnahme von Kalium- und auch Natriumionen, beginnen die Zellen von *Salmonella* spp. in einer zweiten Anpassung sowohl verstärkt Prolin zu bilden, und falls vorhanden, Prolin aus dem umgebenden Medium aufzunehmen (Csonka, 1981; Csonka, 1989). Prolin unterstützt bei niedrigen Wasseraktivitätswerten in den Bakterien zum einen die Stabilität von Proteinen und sorgt weiterhin dafür, dass diese im Zytoplasma löslich und funktionstüchtig bleiben (Schobert und Tscheche, 1978). Des Weiteren werden bei der Aufnahme von Prolin aus der Umgebung Natrium- und zu einem deutlich geringeren Teil auch Kaliumionen (Symport-Transporter) aufgenommen. Diese wiederum unterstützen die Aufrechterhaltung des Zellinnendrucks und ermöglichen die Adaptation der Zellen bis zu Wasseraktivitätswerten von 0,93 bzw. Salzkonzentrationen von max. 3-4 %. So konnte

Campanini (1978) für einen Stamm von *Salmonella* Oranienburg, welcher aus einer Tütensuppe isoliert wurde, ein Wachstum bei a_w -Werten von 0,93 innerhalb von drei Tagen bei 30 °C dokumentieren.

Stressantwort - Natriumnitrit

Neben dem pH- und a_w -Wertstress wirkt sich in Rohwurstherzeugnissen noch ein weiterer Faktor auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen aus, der Zusatzstoff Natriumnitrit. Salmonellen sind wie *Escherichia coli* in der Lage, Nitrat bzw. Nitrit zu verstoffwechseln (Contreras et al., 1997; Reinhart et al., 2008). In Abwesenheit von Sauerstoff, also unter Bedingungen wie sie in einem Rohwurstherzeugnis vorliegen (Rödel und Scheuer, 1999; Honikel, 2008), kann Nitrit als terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette fungieren und somit an der Energiegewinnung beteiligt sein (Cole, 1996). Es kann deshalb angenommen werden, dass nicht Nitrit selbst der bakterizide Wirkstoff ist, sondern ein Abbauprodukt/Derivat. Häufig wird in der Literatur Stickstoffmonoxid (NO) als eigentlicher bakterizider Wirkstoff genannt (Fang, 1997; Katsurahara et al., 2009). Sowohl *Salmonella* spp. als auch *Escherichia coli* sind in ihrer natürlichen Umgebung NO ausgesetzt. Dieses entsteht endogen als Nebenprodukt bei der Nitrat- oder Nitritatmung (Corker und Poole, 2003; Gilberthorpe und Poole, 2008; Ji und Hollocher, 1988) oder durch aktivierte Makrophagen im Zuge der Immunabwehr des Wirts (Chakravorty und Hensel, 2003). Um den NO-Stress zu überleben, exprimieren sowohl *Salmonella* spp. als auch *Escherichia coli* ähnliche NO-detoxifizierende Systeme (Bang et al., 2006; Gardner und Gardner, 2002; Mills et al., 2005; Mills et al., 2008; van Wonderen et al., 2008). Die Expression der Proteine Hmp (Flavohämoglobin), NorV (Flavorubredoxin) und NrfA (Cytochrom c abhängige periplasmatische Nitrit Reduktase) wird durch mehrere Transkriptionsregulatoren strikt reguliert (Spiro, 2007). Die vorhandenen Daten über die Expressionsregulation dieser NO-detoxifizierenden Proteine beziehen sich jedoch auf die Überlebensfähigkeit dieser Erreger in Makrophagen und sind vor allem aus medizinischer Sicht interessant (Fang, 1997; Laver et al., 2010; Priyanka et al., 2009). Über den Mechanismus der Expression der Gene *hmp*, *norV* und *nrfA* liegen keine Informationen vor.

Laut den Arbeiten von Bourret et al., (2008) ist *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhimurium in Gegenwart von Nitrit bzw. NO nicht in der Lage, eine ATR (acid tolerance response) aufzubauen. In mit Nitritpökelsalz hergestellten Rohwürsten kann *Salmonella* daher vermutlich nicht effektiv auf eine Ansäuerung des pH-Wertes während der Produktreifung reagieren. Eine solche Inhibierung der ATR in *Escherichia coli* wurde noch nicht beschrieben, Kenntnisse darüber hätten aber große Bedeutung für die Rohwurstherstellung. So könnten wissenschaftlich abgesicherte Aussagen über die Effizienz

einer schnelleren pH-Wertsenkung auf die Erhöhung der mikrobiologischen Sicherheit der Produkte getroffen werden.

2.2.2. Shigatoxinbildende *Escherichia coli*

Allgemeines

Das vom Kinderarzt Theodor Escherich 1886 aus dem Stuhl von Säuglingen isolierte *Bacterium coli commune*, welches zu seinen Ehren 1919 *Escherichia coli* (*Escherichia coli*) genannt wurde, zählt heute zu den am besten untersuchten Mikroorganismen in der Forschung (Neidhardt, 1996). Phylogenetisch gehören die Gram-negativen, ca. 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm großen, fakultativ anaeroben, stäbchenförmigen Bakterien in die Familie der *Enterobacteriaceae*. *E. coli* ist meist peritrich begeißelt und von einer Kapsel umgeben. Nach Karch et al. (1996) kommen aber auch unbegeißelte und somit unbewegliche Stämme vor.

Auf Grund ihrer starken Empfänglichkeit für den horizontalen Gentransfer weisen die Bakterien der Art *Escherichia coli* eine starke Heterogenität in ihrem Geno- und Phänotyp auf (Köhler et al., 2001). Eine früher vorgenommene Art der Klassifizierung der verschiedenen *Escherichia coli* ist die Einteilung nach dem modifizierten Kauffmann-White-Schema. Hier erfolgt eine Typisierung der Stämme über die vorhandenen O-, K- und H-Antigene. Gegenwärtig kann man über 170 O-, ca. 100 K- und 56 H-Antigene differenzieren, was zu mehr als 10.000 Kombinationsmöglichkeiten führt (Bülte und Goll, 2006).

Durch die so vorgenommene Einteilung sollten die pathogenen und apathogenen Serovare leichter voneinander unterschieden werden können. Die Verteilung der Virulenzfaktoren ist jedoch innerhalb der einzelnen Serovare häufig so unterschiedlich, dass eine verlässliche Unterscheidung nicht immer sicher möglich ist. Aus diesem Grund erfolgt die Einteilung heutzutage in Abhängigkeit von den im Genom des Bakteriums enthaltenen plasmidkodierten Virulenzfaktoren, wie z.B. der Befähigung zur Hämolyisin- oder Enterotoxinbildung.

Aktuell wird zwischen den Enterotoxischen *Escherichia coli* (ETEC), Enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC), Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC), Enteroinvasiven *Escherichia coli* (EIEC), Enteroaggregativen *Escherichia coli* (EAEC), Diffus adhärennten *Escherichia coli* (DAEC) und Nekrotoxischen (NTEC) *Escherichia coli* unterschieden.

Krankheitsgeschehen

Aus humanpathogener Sicht haben vor allem die enteropathogenen *Escherichia coli* und die enterohämorrhagischen *Escherichia coli* die weitaus größte Bedeutung (RKI, 2000a).

Unter dem Begriff enterohämorrhagische *Escherichia coli* versteht man im engeren Sinne shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC), die zu einer Erkrankungen beim Menschen

führen können. Daher werden zurzeit alle aus dem Menschen gewonnenen Isolate als EHEC, alle bei Tieren gefundenen Isolate als STEC bezeichnet (Frank und Alpers, 2003; Lehmann et al., 2003). Die shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli* haben auf Grund der Schwere der hervorgerufenen Erkrankung in Kombination mit einer niedrigen Infektionsdosis von weniger als 50 Keimen (Tilden et al., 1996) eine besondere Bedeutung unter den darmpathogenen *Escherichia coli*. So zählen diese nach *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. zu den dritthäufigsten bakteriellen Enteritisserregern in Deutschland (RKI, 2011). Zu den Eigenschaften dieser Bakterien rechnet man die Fähigkeit, Shiga Toxin (auch als Shiga-like-Toxin oder Verotoxin bezeichnet) zu produzieren, was zur Bezeichnung shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC) oder auch verotoxinbildende *Escherichia coli* (VTEC) geführt hat. Die Symptome einer Infektion mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* können vielfältig sein und reichen von einer akuten Enteritis über eine hämorrhagische Colitis bis hin zu einem manchmal tödlich endenden hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS). Beim hämolytisch-urämischen Syndrom handelt es sich um ein postinfektiöses Krankheitsbild, das mit oder ohne zerebrale Begleiterscheinungen auftreten (Schmidt und Karch, 1996) und bei den Betroffenen z.T. lebenslange Schäden hinterlassen kann (Dialyse). In den meisten Fällen handelt es sich bei den Patienten um Kinder unter 5 Jahren (RKI, 2011) oder um immunsupprimierte Personen. Anfang Mai 2011 kam es in Deutschland zu einem gehäuften Auftreten von HUS. Ungewöhnlich für diesen EHEC-Ausbruch war jedoch der hohe Anteil an Erwachsenen (81 % über 20 Jahre), hier vor allem Frauen (77 %) und auch die große Zahl der schweren Krankheitsverläufe einschließlich zentralnervöser Symptome (RKI, 2011). Bei den Erkrankten konnte ein *Escherichia coli*-Stamm des bisher selten nachgewiesenen Serotyps O104:H4 isoliert werden, der unter anderem Eigenschaften eines EHEC (*stx2a*) und eines EAEC (*attA*, *aggR*, *aap*, *aggA* und *aggC*) aufwies (Frank et al., 2011).

Virulenz-/Pathogenitätsfaktoren

Die Einteilung der shigatoxinbildenden *Escherichia coli* Bakterien in Serovare erfolgt nach dem bereits oben beschriebenen Kaufmann-White-Schema. In vielen Fällen gibt bereits das ermittelte O-Antigen einen Hinweis auf die Virulenz des Isolates. Nach den Surveillancedaten des BfR (2013) führten 2010 die Serotypen O26 (16,8 %), O157 (13,9 %), O91 (12 %) und O103 (10,4 %) in der Mehrzahl zu Erkrankungen in Deutschland (BfR, 2013). Anders als in den USA sind somit in Deutschland Stämme des Serovars O157:H7 nicht dominierend (Beutin et al., 1998; CDC, 2011).

Wie zuvor bereits genannt, geht die Bezeichnung shigatoxinbildende *Escherichia coli* auf die Fähigkeit zur Bildung von Shigatoxinen zurück (Karch et al., 1996). Anfang der achtziger Jahre des vorherigen Jahrhunderts konnten O'Brien und LaVeck (1983) zeigen, dass die von

Escherichia coli gebildeten Toxine mit den Shigatoxinen von *Shigella* spp. strukturell nahezu identisch sind. Zurzeit sind von *Escherichia coli* zwei Shiga-Toxingruppen bekannt. Diese tragen die Namen Shigatoxin 1 (*stx1*) und Shigatoxin 2 (*stx2*). Als Varianten des Shigatoxin 1 existieren ein Shigatoxin 1c und 1d (Zhang et al., 2002; Bürk et al., 2003) und für das Shigatoxin 2 die Varianten 2c, 2d, 2e, 2f und 2g (Weinstein et al., 1988; Paton und Paton, 1998; Ishii et al., 2007; Kawano et al., 2008). Die Shigatoxine können zytotoxisch, enterotoxisch und neurotoxisch wirken und führen damit auch zu unterschiedlichen Krankheitsverläufen. So ist die Enterotoxizität zumeist für einen milderen Verlauf einer EHEC-Erkrankung verantwortlich, während die Zytotoxizität zu einer hämorrhagischen Colitis und später auch zum hämolytisch-urämischem Syndrom führen kann. In ihrer Wirkungsweise sind die Shigatoxine dem Cholera-Toxin ähnlich. So bestehen diese ebenfalls aus zwei Untereinheiten, wobei eine der beiden für die Bindung an den Rezeptor der Endothelzellen und die andere für die eigentliche Wirkung zuständig ist (Karmali, 1989). So binden z.B. die Shigatoxine 1, 2 und 2c an den Rezeptor Globotriaosylceramid 3 (Gb3) und werden anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im Zytoplasma wandelt eine membranständige Furinprotease das noch inaktive Toxin in seine aktive Form um. Infolge der Aktivierung kommt es zur Hemmung der Proteinbiosynthese in der Zelle (Karmali, 1989; Friedrich, 2002).

Hinsichtlich der Verbreitung und der unterschiedlichen Toxinbildung lassen sich zwischen den einzelnen shigatoxinbildenden *Escherichia coli* Unterschiede feststellen. Während z.B. die Toxine 1, 1c, 2, 2c und 2d vor allem aus *Escherichia coli* humaner Stuhlproben, Rinderkotproben (Cergole-Novella et al., 2006; Sasaki et al., 2011; Bielaszewska et al., 2009) und selten auch bei Schafen (Oses et al., 2010; Tasara et al., 2008) isoliert wurden, findet sich das Shigatoxin 2e fast ausschließlich bei Schweinen (Weinstein et al., 1988; Madoroba et al., 2009) und nur selten in humanen Isolaten. Dagegen wurde das Toxin 2f bisher ausschließlich nur in Tauben gefunden; humane Fälle mit *stx 2f* sind bis heute nicht dokumentiert (Friedrich, 2002; Sonntag et al., 2005).

Neben den Shigatoxinen werden auch noch weitere Pathogenitätsfaktoren zur Charakterisierung von shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli* genutzt. So wurden unter anderem das Hämolysin (*hly*), ein porenbildendes Zytotoxin (Schmidt et al., 1995; Aldick et al., 2007) und das Intimin (*eae*), ein Adhäsionsfaktor zum Anheften an die Darmmucosa (Phillips und Frankel, 2000; Iyoda et al., 2011) zur weiteren Unterscheidung bzw. Charakterisierung verwendet. Das *eae*-Gen befindet sich auf der verbreitetsten Pathogenitätsinsel der darmpathogenen *Escherichia coli*, dem LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Auf diesem befinden sich neben dem *eae*-Gen noch weitere Gene, die unter anderem für ein Typ III-Sekretionssystem kodieren und somit zur Ausbildung von Attaching-

and-Effacing-(AE-)-Läsionen am Darmepithel beitragen (Karch und Kohler, 1999; Perna et al., 2001; Kirsch et al., 2004; Bertin et al., 2004).

Übertragung über Lebensmittel

Eine Infektion mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* durch den Verzehr nicht durcherhitzter Hamburger konnte erstmals 1982 in den Vereinigten Staaten und kurze Zeit später auch in Kanada nachgewiesen werden (CDC, 1983; Olsvik et al., 1991). Die Übertragung von EHEC auf den Menschen erfolgt vor allem über kontaminierte Lebensmittel (Kiranmayi et al., 2010; Messelhäuser et al., 2007; Welinder-Olsson et al., 2004), verunreinigtes Trinkwasser (Halabi et al., 2008; Ram et al., 2008), durch Baden in kontaminierten Gewässern (Marucci et al., 2011), Kontaktinfektionen von Mensch zu Mensch und von Tier zu Mensch (Ferens und Hovde, 2011; RKI, 2001).

Als Hauptreservoir wurden Wiederkäuer, insbesondere Rinder, aber auch Schafe und Ziegen identifiziert. Über diese symptomlosen Ausscheider gelangen die shigatoxinbildenden *Escherichia coli* mit Faeces in die Umwelt (Bülte et al., 1990; Beutin et al., 1998; Baljer und Wieler, 1999; Barlow und Mellor, 2010; Tarawneh et al., 2009).

Stressantwort

Dieser Eintrag in die Umwelt stellt eine bedeutende Erregerquelle dar und dient gleichzeitig der Aufrechterhaltung des Infektionszyklus. In Faeces, auf der Weide und auf dem Erdboden zeigt *Escherichia coli* eine hohe Tenazität (Bolton et al., 2011). So konnten Bolton et al. (1999) den Keim bis zu 99 Tage und Ogden et al. (2002) bis zu 105 Tagen im/auf dem Erdboden nachweisen. Die shigatoxinbildenden *Escherichia coli* Bakterien sind in der Lage, zwischen Temperaturen von 7-8 °C und 50 °C zu wachsen (Massa et al., 1999; BfR, 2011), sofern im Substrat genügend Nährstoffe und Feuchtigkeit vorhanden sind und andere Einflüsse, wie Säure- und Salzgehalt, dem Wachstum nicht entgegen stehen. Gegenüber anderen Umwelteinflüssen wie beispielsweise einem sauren Milieu, Kälte, Austrocknung oder hoher Salzkonzentration, sind EHEC-Bakterien relativ unempfindlich.

Stressantwort - pH-Wert

So besitzen shigatoxinbildende/enterohämorrhagische *Escherichia coli* vier unterschiedliche Systeme, um in einer säurehaltigen Umgebung zu überleben. Die drei wichtigsten sind zum einen ein säureinduziertes Arginin-abhängiges, ein Glutamat-abhängiges und ein säureinduziertes oxidatives System (Lin et al., 1996; Coldewey et al., 2007; Conte et al., 2003). Die Wirkungsweise des oxidativen Systems ist zurzeit noch nicht vollkommen verstanden, jedoch ist bekannt, dass dieses System den Sigma-Faktor S (RpoS) benötigt. Ein viertes, jedoch nicht besonders effektives System beruht auf der Aminosäure Lysin und der dazugehörigen Decarboxylase (Iyer et al., 2003). Die Wirkungsweisen der Glutamat- und

Arginin-abhängigen Säure-Stress-Antwort sind ähnlich. Die Glutamat- bzw. Arginin-Decarboxylase (GadA, GadB, AdiA) katalysiert die Reaktion eines Protons aus dem Cytoplasma mit der jeweiligen Aminosäure unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid (Smith et al., 1992; De Biase et al., 1996; Castanie-Cornet et al., 1999). Durch die Reaktion entsteht im Fall von Arginin Agmatin und im Fall von Glutamat γ -Aminobuttersäure (GABA). Die entstandenen Produkte werden durch dazugehörige Antiport-Transportsysteme (GadC und AdiC) ausgeschleust, wobei im Gegenzug wieder die Aminosäuren Arginin und Glutamat aufgenommen werden. Durch die Verwendung bzw. das Verbrauchen von Protonen aus dem Cytoplasma kann der interne pH-Wert der Zelle konstant gehalten werden und so ein Überleben der EHEC auch unter sauren Millieubedingungen sichergestellt werden. Selbst bei einem äußeren pH-Wert von 2,5 sind die Zellen in der Lage, einen internen pH-Wert von 4,2 (Glutamat-System) bzw. 4,7 (Arginin-System) aufrechtzuerhalten (Richard und Foster, 2004). Dadurch können die Zellen von shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli* die kurze Passage durch den Magen zu überstehen. Für ein Wachstum dagegen benötigen Zellen von *Escherichia coli* O157:H7 einen minimalen pH-Wert von 4 bis 4,5.

Stressantwort - a_w -Wert

In den Rohwurstprodukten ist der abnehmende pH-Wert nicht die einzige mikrobiologische Hürde, die die shigatoxinbildenden/enterohämorrhagischen *Escherichia coli* überwinden müssen. Mit zunehmender Reifung sinkt in Folge der Abtrocknung auch die Wasseraktivität im Produkt. Um dem damit verbundenen osmotischen Stress entgegen zu wirken, nutzt *Escherichia coli* eine Reihe von Maßnahmen, um den Turgor im Cytoplasma aufrechtzuerhalten. Für eine kurzfristige und schnelle Anpassung an einen sinkenden a_w -Wert werden zum Schutz vor Austrocknung und Dehydrierung Kalium-Ionen aus dem umgebenden Millieu aufgenommen (Yancey et al., 1982). Wie schon zuvor bei den Salmonellen berichtet, kommt es gleichzeitig zur Aufnahme des Gegenions Glutamat. Dieses kann mit den Kaliumionen im Cytoplasma reagieren, sich anreichern und Enzymfunktionen stören.

Parallel zur Aufnahme von Kalium-Ionen werden Gene für Transportsysteme induziert, die weitere Osmoprotektanzen aufnehmen und so den Zellturgor stabilisieren. Zu diesen Genen gehören z.B. *proB* und *proU*, welche an der Aufnahme von Prolin beteiligt sind (Culham et al., 2001; Chung et al., 2006). Neben dem Osmolyt Prolin wird auch ein Derivat der Aminosäure Glycin, das Betain, in die Bakterienzelle aufgenommen (Csonka und Eppstein, 1996; Milner et al., 1988; Lucht und Bremer, 1994). Da diese Verbindungen nicht von *Escherichia coli* synthetisiert werden können, müssen diese wie die Kalium-Ionen aus dem umgebenden Medium aufgenommen werden. Sind diese Osmoprotektanzen nicht

vorhanden, beginnt die Zelle mit der Biosynthese zelleigener kompatibler Solute wie z.B. des Zuckers Trehalose (Ishida et al., 1996; Purvis et al., 2005; Joseph et al., 2010) bzw. der Schwefelverbindung Dimethylsulfiopropionat (Underwood et al., 2004). Für die Biosynthese des inerten Zuckers Trehalose werden vor allem die Gene *otsA* (Trehalose-6-phosphat Synthase), *otsB* (Trehalose-6-phosphat Phosphatase) und *treA* (Trehalase) aktiviert (Strom und Kaasen, 1993; Joseph et al., 2010). Infolge der Produktion des Zuckers Trehalose können die Zellen von *Escherichia coli* das ungleiche osmotische Gefälle zum äußeren Milieu ausgleichen und sind anschließend in der Lage, Wasser aufzunehmen.

Durch diese Anpassung können EHEC unter günstigen Umweltbedingungen ein Wachstum bis zu einem a_w -Wert von 0,95 zeigen (Buchanan und Bagi, 1997; Leistner und Gould, 2002). Ein Überleben der Keime ist jedoch auch unter niedrigeren Wasseraktivitätswerten möglich. So konnten mehrere Autoren zeigen, dass EHEC auch über einen längeren Zeitraum aus Produkten mit einem niedrigen a_w -Wert isoliert werden konnten (McClure et al., 2000; Weagant et al., 1994).

Stressantwort - Natriumnitrit

Die Stressantwort von *Escherichia coli* auf Natriumnitrit wurde bereits unter 2.2.1 zusammen mit *Salmonella* spp. behandelt.

2.2.3. *Listeria monocytogenes*

Allgemeines

Listerien (0,4-0,5 x 0,5-2 μm) sind kurze, bewegliche, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Gram-positive Stäbchenbakterien mit der Neigung, kokkoide Formen anzunehmen. Zur Gattung *Listeria* gehören 10 Species. Die bedeutendste ist die humanpathogene Art *Listeria monocytogenes*. Weitere Krankheitserreger, wenn auch nicht von der Bedeutung wie *L. monocytogenes*, sind *L. ivanovii* (Seeliger, 1984; Ammendolia et al., 2007; Guillet et al., 2010), *L. seeligeri* und *L. welshimeri* (Rocourt und Grimont, 1983). Dagegen gelten die Species *L. innocua* (Seeliger, 1984), *L. grayi* (Rocourt et al., 1992), *L. rocourtiae* (Leclercq et al., 2010), *L. marthii* (Graves et al., 2010), *L. weihenstephanensis* (Halter et al., 2013) und *L. fleischmannii* (Bertsch et al., 2013) als apathogen (Hof und Hefner, 1988).

Krankheitsgeschehen

Innerhalb der Gattung *Listeria* werden 4 Serogruppen, unterteilt in 19 Serovare, basierend auf H-Antigenen und O-Antigenen unterschieden. Die Art *L. monocytogenes* kann in 13

Serovare unterteilt werden, von denen jedoch für die Mehrzahl der humanen Erkrankungen die drei Serovare 1/2a, 1/2b und 4b von Bedeutung sind. Eine Erkrankung mit *L. monocytogenes* (Listeriose) ist vor allem bei sehr jungen, alten, schwangeren und immungeschwächten Personen zu beobachten (Lamont et al., 2011; Koch und Stark, 2006). Neben diesen prädestinierten Personengruppen gelten insbesondere auch Berufsgruppen, die Kontakt zu infizierten Tierbeständen haben (Landwirte und Tierärzte), als gefährdet (Cain und McCann, 1986; Owen et al., 1960). In Folge der Aufnahme zumeist über den Gastrointestinaltrakt gelangen die Erreger in den Dünndarm. Dort angekommen, dringen sie über die Epithelzellen ein und können zunächst eine leichte Diarrhöe verursachen. Auf Grund der ablaufenden Entzündungsreaktion kommt es unmittelbar nach einer Infektion zu einer Erhöhung der Mono- und Leukozyten im Blut (Shum und Galsworthy, 1982). Dieser Umstand wird von den Keimen genutzt, da spezielle Zellwandproteine (Monocytosis-producing-Agent) eine hohe Affinität für Monozyten aufweisen und die Aufnahme der Listerien in die Monozyten induzieren. Infolgedessen können die Erreger geschützt vor dem Immunsystem und der Wirkung von Antibiotika in den Mono- und Leukozyten persistieren und werden gleichzeitig über die Blutgefäße im ganzen Körper verteilt (Shelef, 1989; Farber und Peterkin, 1991).

Die Listeriose kann in sehr vielfältiger Form auftreten und unterschiedliche Krankheitsbilder verursachen (Seeliger und Potel, 1969). Neben schweren Verläufen wie der akut septischen Form (Neugeborenenlisteriose), der Listeriose des Zentralnervensystems (Enzephalitis, Meningitis), der lokalen Form (Konjunktivitis), und der chronisch septischen Form mit Organbefall (Endokarditis) gibt es auch inapparente (Antal et al., 2007) und milde Krankheitsverläufe, welche eher Gastroenteritiden ähneln (Galan et al., 2011; Pichler et al., 2009). Im Vergleich zu anderen Infektionskrankheiten wie Salmonellosen und Campylobacteriosen ist die Listeriose eine relativ seltene Erkrankung (RKI, 2010; EFSA, 2011), weist aber im Gegensatz zu den anderen eine hohe Mortalitätsrate auf (Cabellos et al., 2008; Koch und Stark, 2006).

Virulenz-/Pathogenitätsfaktoren

Für die Entstehung einer Infektion ist neben der Anzahl der aufgenommenen Erreger (Gellin und Broome, 1989) der Immunstatus des befallenen Organismus und vor allem die Virulenz des Keimes von Bedeutung. Mittels molekularbiologischer Analysen und der Sequenzierung des Genoms von *L. monocytogenes* sind inzwischen eine Reihe von Virulenzfaktoren identifiziert und charakterisiert wurden (Engelbrecht et al., 1996). Bereits 1988 wurde das wohl bekannteste Genprodukt, das Poren-bildende Hämolyse Listeriolysin (LLO), durch Mengaud (1991) beschrieben. Weitere für die Infektion wichtige Virulenzfaktoren sind die

Genprodukte von PlcA (Mengaud, 1991), PlcB (Portnoy, 1992), ActA (Domann, 1992), InIA (Gaillard, 1991), InIB (Gaillard, 1991), Mpl, Iap (Kuhn und Goebel, 1989), Sod (Haas und Goebel 1992; Farber und Peterkin, 1992), LmaA (Göhmann et al., 1990) und Kat (Haas et al., 1991).

Übertragung über Lebensmittel

Kontaminationsquelle einer Listeriose sind zumeist Lebensmittel tierischen und pflanzlichen Ursprungs (Jacquet et al., 1995; Salamina et al., 1996). Der Keim, dessen Reservoir vor allem der Erdboden ist (Weis und Seeliger, 1975), gelangt wahrscheinlich durch Spritzwasser, Staub und Aerosole auf Futter- und Gemüsepflanzen (Weis und Seeliger, 1975; Dijkstra, 1982; Al-Ghazali und Al-Azawi, 1990) und anschließend in die Nahrungsmittelkette. Entsprechend ihrer ubiquitären Verbreitung (Lianou und Sofos, 2007; Lyautey et al., 2007a; Lyautey et al., 2007b) kann in allen nicht hitzebehandelten oder anderweitig stabilisierten Erzeugnissen mit *L. monocytogenes* gerechnet werden (Lyytikäinen et al., 2000). Selbst bei guter Schlacht- und Betriebshygiene sind Rind- und Schweinefleisch zu 5,5 – 12,4 % bzw. zu 6,6 – 7,3 % mit Listerien belastet (BgVV, 2000; BfR, 2011). Auf Grund dieser Tatsachen werden Lebensmittel in Bezug auf das Gefährdungspotential von *L. monocytogenes* in drei Produktgruppen eingeteilt.

In der ersten Gruppe finden sich verzehrfertige Lebensmittel wieder, in denen eine Vermehrung von *L. monocytogenes* möglich ist (z.B. Weichkäse und Milchprodukte). Weiterhin gehören in diese Gruppe Lebensmittel, die von einem gefährdeten Personenkreis, wie z.B. Schwangere, Säuglinge und Kleinkinder, konsumiert werden. In diesen Produkten dürfen auf Grund der hohen Mortalität keine Listerien nachweisbar sein. In die zweite Kategorie fallen Produkte, die verzehrfertig sind und keine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* zulassen, wie z.B. länger gereifte Rohwürste, Konfitüren und Tiefkühlkost. In solchen Erzeugnissen darf ein Grenzwert von 100 KbE/g nicht überschritten werden. In die dritte und letzte Gruppe gehören vor allem Rohstoffe, die als Ausgangsmaterial dienen und vor dem Verzehr anderweitig bearbeitet werden. Zu nennen wären hier frisches Fleisch, Geflügel, Fisch und Gemüse, und auch hier wird wie für Produkte der Kategorie zwei ein Grenzwert von 100 KbE/g zu Grunde gelegt (Verordnung (EG) Nr. 2073/2005).

Stressantwort

Listerien sind primäre Erdbewohner und sehr häufig an der Oberfläche des Bodens bzw. an bodennahen Pflanzenteilen zu finden (Sauders et al., 2012). Auf Grund dieser Tatsache sind Listerien an unterschiedliche Umweltfaktoren wie Temperatur und Austrocknung gut angepasst. So ist ein Wachstum im Bereich von + 1 °C bis + 4 °C und bis zu 50 °C

dokumentiert (Thomas et al., 1999; Barbosa et al., 1994; Monfort et al., 2012). Auf die Faktoren pH-Wert, a_w -Wert und Natriumnitrit wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

Stressantwort - pH-Wert

Überleben und Vermehrung von *L. monocytogenes* innerhalb eines pH-Wertbereiches von 4,4 bis 9,4 sind dokumentiert (Miller, 1992; Koutsoumanis und Sofos, 2004; Cunningham et al., 2009). Neben dem eigentlichen pH-Wert spielt die Art der Säure eine große Bedeutung. So wirken allein die vor allem in der Lebensmittelindustrie eingesetzten Genuss säuren (organische Säuren) unterschiedlich stark auf eine Reduktion der Keimzahl von *L. monocytogenes* (Ahamad und Marth, 1989; Buchanan et al., 1993; Conner et al., 1990). Mit Essigsäure konnten in verschiedenen Arbeiten die deutlichsten Abnahmen im Medium beobachtet werden (Ita und Hutkins, 1991). Im Gegensatz zur Milch- und Zitronensäure handelt es sich bei der Essigsäure um eine sogenannte schwache Säure. Auf Grund ihrer niedrigeren Dissoziationskonstante (pK_a) kann diese im Gegensatz zu den starken Säuren bei näher am Neutralpunkt liegenden pH-Werten besser die Zellmembranen durchdringen, in das Cytosol der Zelle gelangen und dort zu Schädigungen führen (Ita und Hutkins, 1991). Um auch bei niedrigen pH-Werten, wie sie auch in der Rohwurst zu erwarten sind, zu überleben, benötigt *L. monocytogenes* ein effektives System, um Protonen aus dem Cytoplasma zu entfernen. Diese Aufgabe wird von einem Glutamat-Decarboxylase-System übernommen (Cotter et al., 2001a/b). Hierbei wird Glutamat unter Aufnahme eines Protons in γ -Aminobutyrat umgewandelt und mittels eines Antiporter-Systems gegen ein Molekül Glutamat nach außen geschleust. Das aufgenommene Glutamat kann dann erneut mit einem Proton reagieren (Cotter et al., 2001a/b; Cotter et al., 2005).

Neben der Art der verwendeten Säure ist auch die Temperatur von entscheidender Bedeutung. So konnten Ahamad und Marth (1989), Conner et al., (1990) und Sorrells et al., (1989) zeigen, dass Genuss säuren bei höheren Temperaturen deutlich toxischer auf die Zellen von *L. monocytogenes* wirken als bei niedrigen Temperaturen.

Stressantwort - a_w -Wert

Da die Rohwurst ein sehr dynamisches System ist, spielt neben der Temperatur und dem pH-Wert vor allem der a_w -Wert eine entscheidende Rolle. Im Vergleich zu *Salmonella* spp. und STEC/EHEC besitzen *L. monocytogenes* eine höhere Tenazität gegenüber osmotischem Stress (Notermans und Hoeij, 2008). Während Gram-negative Bakterien erst bei einsetzendem osmotischen Stress Transportsysteme zur Aufnahme von Osmoregulatoren bilden müssen, liegen diese bei Gram-positiven bereits konstitutiv vor (Gutierrez et al., 1995; Sleator et al., 2003). Somit kann *L. monocytogenes* (Sleator et al.,

2003) schnell auf sinkende a_w -Werte reagieren, indem aus dem umgebenden Medium die Osmolyte Betain und/oder L-Carnitin aufgenommen werden (Verheul et al., 1997; Bergholz et al., 2010). Die an der Aufnahme der Osmolyte beteiligten Gene sind *betL* ein Betain-Glycin-Transporter (Sleator et al., 1999), *gbuA* (Ko und Smith, 1999), *oppA* (Borezee et al., 2000) und *opuCA* (Fraser et al., 2000). In Anwesenheit der beiden Osmolyte nehmen die Zellen von *L. monocytogenes* jedoch bevorzugt Betain auf (Verheul et al., 1997), was darauf zurückzuführen ist, dass das aufgenommene Betain die ATP-abhängige Aufnahme (Verheul et al., 1995) von L-Carnitin negativ reguliert (Verheul et al., 1997). Ein weiterer Vorteil gegenüber schnell absinkenden Wasseraktivitätswerten im Vergleich zu Gram-negativen Keimen ist, dass bei *L. monocytogenes*, wie auch bei anderen Gram-positiven Bakterien, eine gewisse Konzentration an Osmoprotektanzien bereits in den Zellen akkumuliert vorliegt (Glaasker et al., 1996; Stimeling et al., 1994; Whatmore und Reed, 1990). Dies führt im Vergleich zu den Gram-negativen Bakterien zu einem deutlich höheren Turgor-Druck und ermöglicht den Zellen auch unter osmotisch ungünstigen Bedingungen, Wasser von außen aufzunehmen und zu wachsen (Glaasker et al., 1996).

Stressantwort - Natriumnitrit

Über die Wirkung von Nitrit bzw. Nitrat auf molekularer Ebene ist in *L. monocytogenes* bisher nur wenig bekannt. In einer Arbeit von Kaspar (persönliche Kommunikation) konnte unter sauren Bedingungen (pH 6) mittels Microarray-Analyse und qRT-PCR die Induktion von rund 200 Genen beobachtet werden. Unter den Genen, deren Transkription durch Nitrit unter sauren pH-Bedingungen induziert wird, befanden sich Gene, deren Produkte eine Rolle bei der oxidativen oder auch der allgemeinen Stressantwort spielen. Unter diesen wiederum kodieren viele Gene für Regulatoren, die an der oxidativen Stressantwort beteiligt sind, wie z.B. die bereits beschriebenen Gene *ohrR*, *perR* (Rea et al., 2004), *ctsR* (Derre et al., 1999) und *spxA*.

Bei den Genen, deren Produkte an der Stressresistenz beteiligt sind, wurde vor allem die Induktion von z.B. Clp-Proteasen, die für den ATP-abhängigen Abbau von fehlgefalteten Proteinen verantwortlich sind (Kress et al., 2009; Stanne et al., 2007; Zellmeier et al., 2006), beobachtet. Aber auch Proteine, die an der Aufrechterhaltung des Redox-Status in der Zelle eingebunden sind, wie z.B. eine Glutathion-Reduktase (Kazmierczak et al., 2003) und Gene, deren Produkte an der allgemeinen Stressantwort beteiligt sind, wie z.B. *ctc* (Duche et al., 2002), *Imo0515*, *Imo2673* (Gomes et al., 2011) und *Imo2748* (Abram et al., 2008).

Eine weitere Beobachtung ist auch die starke Induktion des Gens *raiA* (Kaspar persönliche Kommunikation), welches für den Ribosomen-assoziierten Inhibitor A RaiA codiert (Agafonov und Spirin, 2004). In *E. coli* Zellen inhibiert RaiA die Proteinbiosynthese, indem es die Bindung der Aminoacyl-tRNA an das Ribosom blockiert (Agafonov et al., 2001).

Insgesamt konnten mehr als 70 Gene der durch Nitrit induzierten Gene der allgemeinen Stressantwort, welche durch SigB reguliert wird (Raengradub et al., 2008, Abram et al., 2008) zugeordnet werden (Kaspar, persönliche Kommunikation).

Erstaunlicherweise konnte in Studien jedoch keine Veränderung der Aktivität der Transkription von SigB beobachtet werden (Kaspar, persönliche Kommunikation). Somit wurde vermutet, dass die Veränderungen im Transkriptionsprofil SigB regulierter Gene nicht auf Veränderungen der SigB Menge zurückzuführen sind, sondern vielmehr auf die Aktivität des SigB. Diese Aktivität von SigB wird in Gram-positiven Bakterien über sehr viele Faktoren beeinflusst (zusammengefasst in Hecker et al., 2007). Welcher Faktor letztendlich verantwortlich ist für die mögliche differentielle Aktivität von SigB bei pH 6 in Gegenwart von Natriumnitrit, ist bisher unklar.

Neben einer Induktion konnte in den Untersuchungen von Kaspar (persönliche Kommunikation) auch für ca. 150 Gene eine Reprimierung beobachtet werden. Unter diesen Genen befinden sich viele, deren Produkte an der Biosynthese zellulärer Makromoleküle beteiligt sind, wie z.B. an der Proteinbiosynthese. Weitere Gene, deren Transkription reprimiert wurde, kodieren für Proteine, die an der Synthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren oder Lipidbiosynthese beteiligt sind. Des Weiteren konnte eine Reduktion des mRNA-Levels fast aller Gene beobachtet werden, die für Schlüsselenzyme des Fettsäuremetabolismus kodieren (Kaspar, persönliche Kommunikation).

Daneben scheint auch die Synthese von Peptidoglykan vermindert, da eine Reduktion der Transkription der meisten Gene, deren Produkte an der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt sind, beobachtet werden konnte (Kaspar, persönliche Kommunikation). Neben dieser Verlangsamung des Zellwachstums konnte auch die Reprimierung von Genen beobachtet werden, deren Produkte an der Zellteilung beteiligt sind, (Kaspar, persönliche Kommunikation). Diese für die Zellteilung wichtigen Genprodukte wie z.B. *ftsW*, *ftsX*, *ftsE* wurden bereits schon von anderen Autoren identifiziert (Arends et al., 2009; Corbin et al., 2007; Schmidt et al., 2004).

In der Arbeit von Kaspar wurde auch der Frage nachgegangen, inwiefern Nitritstress zu einer erhöhten Virulenz von *L. monocytogenes* führen könnte. Eine solche verstärkte Expression von Virulenzfaktoren aufgrund von Stressbedingungen, wie bereits für Säure und NaCl-Stress gezeigt, könnte zu einer Zunahme der Infektiosität des Mikroorganismus führen (Olesen et al., 2009). Somit könnte eventuell schon das Vorliegen einer geringeren Menge des infektiösen Bakteriums zu einer erhöhten Infektionsrate führen.

In den Transkriptionsstudien konnte bei einem pH-Wert von 6 in Anwesenheit von Nitrit eine Zunahme der Transkription von Genen, deren Produkte am Virulenzzyklus von *Listeria monocytogenes* beteiligt sind (*hlyA* und *inlA*), beobachtet werden (Kaspar, persönliche

Kommunikation). Jedoch konnte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen gezeigt werden, dass sich die Zunahme der Transkription nicht in einer Erhöhung der Proteinmenge niederschlägt. Somit postuliert Kaspar (persönliche Kommunikation), dass diese Beobachtung auf die bereits beschriebene Repression der Transkription von Enzymen, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind, zurückzuführen ist. Findet keine Proteinbiosynthese statt, so kann eine Zunahme in der Transkriptmenge nicht in einer Zunahme der Proteinmenge resultieren. Da nicht die RNA-Transkriptmenge von *hly* sondern die Menge des LLO Proteins einen Einfluss auf die Virulenz der *L. monocytogenes* Zellen hat, ließ sich aus den erhaltenen Daten kein erhöhtes Risiko einer Infektion in Gegenwart von Natriumnitrit ableiten (Kaspar, persönliche Kommunikation).

2.3. Natriumnitrit

Die Verwendung von Natriumnitrit bzw. Kaliumnitrat (Salpeter) im Zusammenhang mit der Haltbarmachung von Fleischerzeugnissen hat eine lange Tradition. Natriumnitrit bzw. Salpeter (Nitrit-Reservoir) werden seit der Antike von Sumerern, Babyloniern, Phöniziern und Chinesen (Jensen, 1954; Batterson und Boddie, 1972; Binkerd und Kolari, 1975) zur Konservierung von Fleisch- und Fischerzeugnissen verwendet. Ursprünglich wurde vor allem mit Kaliumnitrat gearbeitet. Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannte man, dass zuerst aus dem Nitrat Nitrit gebildet werden musste (Lehmann, 1899; Haldane, 1901; Hoagland, 1908; Kisskalt, 1899). Mit dieser Erkenntnis begann man im industriellen Einsatz die Fleischerzeugnisse direkt mit Natriumnitrit zu behandeln (Glage, 1909; Doran, 1917). Seither hat Natriumnitrit Nitrat als Pökelsalz weitestgehend verdrängt. Mit den ersten wissenschaftlichen Ergebnissen zur Wirkung und zum Einsatz von Natriumnitrit (Kerr et al., 1926) erhielt der Zusatzstoff 1925 durch das „Bureau of Animal Industry of the United States Department of Agriculture“ erstmalig eine staatliche Freigabe für die Anwendung auf bzw. in Fleischerzeugnissen. In den erstellten Richtlinien wurde erstmals auch ein Wert von 200 ppm erwähnt, welcher im Endprodukt nicht überschritten werden sollte (Kerr et al., 1926). Seit diesen Tagen wurden viele chemische, technologische und mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt und der Einsatz, die Zugabemenge und die Deklaration z.T. kontrovers diskutiert.

2.3.1. Bedeutung von Natriumnitrit

Keine andere zurzeit bekannte chemische Verbindung vereinigt eine solche multifaktorielle Wirkung in Fleischerzeugnissen wie Natriumnitrit. Zu den positiven Effekten zählen Umrötung (Wirth, 1991), Aromabildung (Fischer, 2005), Konservierung (Albert et al., 2003;

Hechelmann, 1974, Kabisch et al., 2008a) und der Oxidationsschutz (Arneth, 2001; Rödel et al., 1992).

2.3.1.1. Umrötung

Bei der Produktion von Rohwurstzeugnissen wird dem Rohwurstbrät in der Regel Nitrit in Form von Nitritpökelsalz zugegeben, das meist zu etwa 99,5 % aus Kochsalz zu 0,4 bis 0,5 % aus Natriumnitrit besteht. Im Fleischerzeugnis wird Nitrit zum reaktiven Stickoxid (NO) umgesetzt (Wirth, 1991); dieses verbindet sich mit Häm- und Myoglobin zum relativ stabilen „Pökelfarbstoff“. Myoglobin ist ein Protein mit einem eisenhaltigen Porphyrinring und kommt in den Muskelzellen des Fleisches in hoher Konzentration vor. In der Muskelzelle übernimmt es die Funktion der Sauerstoffspeicherung und des Sauerstofftransportes, ähnlich dem Hämoglobin im Blut. Das Fe²⁺-enthaltende Myoglobin ist purpurrot. Diese Farbe ändert sich auch nicht, wenn das Myoglobin mit Sauerstoff beladen ist (Oxymyoglobin). Während des Herstellungsprozesses wird das Eisen(II)ion zum Fe³⁺ oxidiert, so dass sich die ursprüngliche Fleischfarbe nach grau bis braun (Metmyoglobin) ändert. An die Sauerstoffbindungsstelle wird zunächst H₂O angelagert. Durch die Einwirkung von Nitrit wird sowohl als auch das Eisen(III)ion wieder zu Fe²⁺ reduziert und anstelle des H₂O tritt Stickoxid als Ligand ein. Es bildet sich das für gepökelte Rohwurstzeugnisse typische purpurrote Stickoxidmyoglobin (=Nitrosomyoglobin). Die entstehende Verbindung Stickoxidmyoglobin ist relativ licht-, sauerstoff- und hitzestabil und erzeugt über einen langen Zeitraum eine angenehme rote Fleischfarbe (Wirth, 1991). Nach Klettner und Tröger (2000) werden dabei 30-50 mg Nitrit pro kg als minimal notwendige Menge zur Ausbildung einer ausreichenden Pökelfarbe angesehen.

2.3.1.2. Pökelaroma

Das Pökelaroma entsteht ähnlich der Pökelfarbe aus einer Reaktion von Stickoxiden mit Alkoholen, Aldehyden, Inosin, Hypoxanthin und vor allem aus Reaktionen mit schwefelhaltigen Verbindungen. Nach Ramarathnam (1998) sind in gepökelttem Schweinefleisch weniger flüchtige Verbindungen nachweisbar als in ungepökelttem. Insbesondere zeigte sich, dass viele flüchtige Verbindungen, welche aus ungepökelttem Fleisch extrahiert werden konnten, in gepökelttem Fleisch fehlten oder in deutlich geringeren Konzentrationen vorhanden waren (Ramarathnam 1998; Ramarathnam, 1991a/b). Das typische Pökelaroma wird also nicht durch einen einzigen Aromastoff hervorgerufen, sondern durch das Zusammenwirken mehrerer Aromastoffe (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Zusammensetzung flüchtiger Verbindungen aus gepökeltem und ungepökeltem Schweinefleisch

Verbindungsklassen	Schweinefleisch	
	ungepögelt [mg/kg]	gepögelt [mg/kg]
Aldehyde	35	29
Alkohole	24	9
Carbonsäuren	5	20
Ester	20	9
Furane	29	5
Ketone	38	12
Kohlenwasserstoffe	45	4
Pyrazine	36	1
Pyrrole	9	-
Thiazole/Thiazoline	5	-
Thiophene	11	-
Sonstige Stickstoffverbindungen	6	3
Sonstige Schwefelverbindungen	20	31

nach Ramarathnam, 1998

Die dabei ablaufenden Prozesse sind zurzeit noch nicht hinreichend geklärt, da anscheinend auch diverse Reaktionsprodukte des Nitrits mit Proteinen des Fleisches (z.B. 3-Nitrotyrosin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Alkylnitrate und Alkylnitrile verschiedener Kettenlängen) einen Beitrag zum Pökelaroma leisten (Jira, 2003). Zur Ausbildung des Pökelaromas in Fleisch- und Rohwurstzeugnissen sind 20 – 40 mg Nitrit pro kg ausreichend (Klettner und Tröger, 2000).

2.3.1.3. Oxidationsschutz

Nitrit besitzt weiterhin eine antioxidative Wirkung. Diese basiert in erster Linie auf der Fähigkeit des Nitrits, prooxidativ wirkende Eisenionen zu binden. Durch die Bindung der Eisenionen werden diese daran gehindert, antioxidative Prozesse in Gang zu setzen (Gray et al., 1981). So wird durch die Reduzierung von Fe^{3+} zu Fe^{2+} Ionen verhindert, dass Fe^{3+} Ionen die Oxidation von Fetten bzw. fettlöslichen Stoffen katalysieren. Eine weitere antioxidative Funktion des Nitrits liegt in der Fähigkeit, ungesättigte Fettsäuren in der Zellmembran zu stabilisieren und die Aktivität von prooxidativen Bestandteilen der Muskulatur zu hemmen (Pearson et al., 1992).

Durch die bereits erwähnte Reaktion mit dem Myoglobin des Fleisches zum Stickoxidmyoglobin wirkt Nitrit ebenfalls antioxidativ. Durch Nitrit wird bei dieser Reaktion die Anlagerung des Sauerstoffs an das Myoglobin und damit dessen katalytische Aktivität bei der Fettoxidation verhindert. Des Weiteren wird durch Nitrit eine Hemmung der Oxidasen im Fleisch verursacht und damit ein oxidativer Fettabbau verhindert (Rödel et al., 1992). Qualitätsminderungen wie zum Beispiel im Geschmack (Ranzigkeit) werden somit stark verzögert oder vermieden (Lücke, 1999).

2.3.1.4. Konservierung und antimikrobielle Wirkung auf zellulärer Ebene

Trotz der vielfältigen positiven technologischen Wirkungen in Fleischprodukten ist Natriumnitrit nach der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung nur zur Konservierung zugelassen (ZZuV, 1998). Durch die Zugabe von 80 bis 150 mg/kg Natriumnitrit (Klettner und Tröger, 2000) soll eine Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen erreicht werden. So ist eine antimikrobielle Wirkung vor allem in *in Vitro* Versuchen für viele Mikroorganismen beschrieben (Cui et al., 2010; Gill und Holley, 2003; Zaika et al., 1991; Roberts und Smart, 1974). Gibson und Roberts (1986) konnten in Hirn-Herz-Bouillon zeigen, dass Zellen von *E. coli* gegenüber unterschiedlichen Nitritkonzentrationen (0, 50, 100, 200 und 400 µg/ml) toleranter waren als Bakterien der Spezies *Salmonella enterica*. Im Vergleich zu den *in Vitro* Versuchen liegen jedoch nur sehr wenige Daten mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen über die Wirkung von Natriumnitrit in Rohwurstzeugnissen vor. So konnten Hauschild et al., (1982) und Schnackel et al., (2003) eine anticlostridiale Wirkung gegenüber *Cl. botulinum* beobachten. Andere Autoren stellten jedoch fest, dass *Cl. botulinum* unabhängig vom Nitritzusatz in Rohwürsten nicht vermehrungsfähig sei (Lücke und Roberts, 1993). Unter anderem warnt Lücke (2003) vor einer Überbewertung der mikrobioziden Wirkung von Nitrit. Er (2003) führt dazu an, dass es keinen epidemiologisch feststellbaren Zusammenhang zwischen der Verwendung von Nitrit und einem Botulismusrisiko gibt und dass gerade auch in Rohwurstwaren die antimikrobielle Wirkung von Nitrit fraglich oder nicht relevant sei.

In anderen Arbeiten wird vor allem die antimikrobielle Wirkung gegenüber Salmonellen (Schnackel et al., 2003; Rice und Pierson, 1982) hervorgehoben. Darüber bestehen in der Literatur allerdings ebenfalls widersprüchliche Meinungen (Birzele et al., 2005; Lücke, 2003; Skovgaard, 1992; Schüppel und Krüger, 1986). Dass die antimikrobielle Wirkung von Nitrit in Rohwurstzeugnissen nicht eindeutig zugeordnet werden kann, zeigen die vorhandenen Publikationen. Weiterhin existieren nur sehr wenige Daten über die Wirkung unterschiedlicher Nitritkonzentrationen in den Rohwurstzeugnissen. So konnte in einer Peperoni gezeigt werden, dass eine steigende Nitritkonzentration zu einer stärkeren Abnahme von *E. coli* O157:H7 führte (Riordan et al., 1998). Annähernd gleiche Ergebnisse

konnten von Heir et al., (2010) in einer Salami mit Nitritkonzentrationen von 100 bis 500 ppm erzielt werden. Jedoch zeigten die beiden letztgenannten Publikationen auch die Schwachstellen in der Bewertung der antimikrobiellen Wirkung von Nitrit in Rohwürsten auf: Zum einen wurden unrealistisch hohe und gesetzlich nicht erlaubte Nitritkonzentrationen verwendet (Heir et al., 2010), und zum anderen waren die Produkte zwar marktgetreu, enthielten jedoch Zusätze wie in der oben genannten Peperoni, die es schwer machen, die beobachtete antimikrobielle Wirkung allein auf das zugesetzte Nitrit zurückzuführen.

In der Regel wurden in den Untersuchungen die gesetzlich vorgegebenen Nitritmengen eingesetzt (Birzele et al., 2005; Pichner et al., 2006; Rödel und Scheuer, 2001) oder deutlich erhöhte Konzentrationen von z.T. 500 mg/kg (Heir et al., 2010) und anschließend das Verhalten der Keime untersucht. Um die Wirkung von Natriumnitrit zu beurteilen, wurden weiterhin Challenge-Tests mit Produkten aus ökologischer Produktion ohne Natriumnitrit durchgeführt und diese anschließend mit vergleichbaren Würsten mit Nitritpökelsalz verglichen. So konnten Pichner et al. (2006) zeigen, dass die Keimzahl von shigatoxinbildenden *Escherichia coli* in Rohwürsten mit Nitrit schneller abnahm als in denen ohne Natriumnitrit. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Casey und Condon (2000) erzielen. Auf Grund der Datenlage ist es schwierig, verlässliche Aussagen über die Wirksamkeit von Natriumnitrit auf die unterschiedlichen Lebensmittelinfektionserreger in Rohwurstwaren zu treffen.

Antimikrobielle Wirkung auf zellulärer Ebene

In der Literatur wird häufig beschrieben, dass im Rohwurstprodukt nicht Nitrit der eigentliche wachstumshemmende Faktor ist, sondern Derivate, die während der Reifung durch chemische Reaktionen gebildet werden (Kaspar et al., persönliche Kommunikation; Cammack et al., 1999). In der Rohwurst nimmt der pH-Wert von Beginn der Reifung an zunächst kontinuierlich ab. Unter diesen Bedingungen katalysieren die Protonen der Säure die Umwandlung des Nitrits zur salpetrigen Säure (Säure-Base-Reaktion, vgl. Abb. 5) und anschließend weiter zu NO^{*}-Radikalen (Disproportionierung), Peroxynitrit, S-Nitrosothiol, Stickstoffdioxid, Di-Stickstoffdioxid und Tri-Stickstoffdioxid (Cammack et al., 1999; Fang, 1997; Honikel, 2008; Hoagland, 1914).

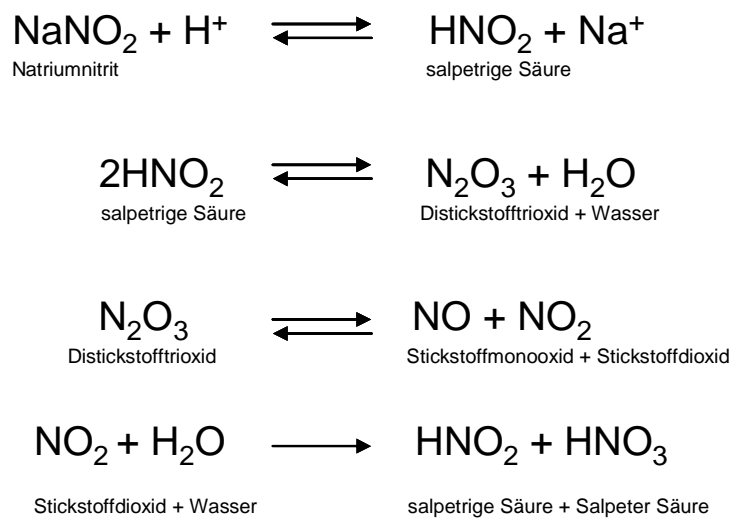


Abb. 5: Reaktion von Natriumnitrit in Fleisch (nach Honikel, 2008)

Als unpolare und nicht geladene Moleküle mit einem kleinen hydrodynamischen Radius (Stokes Radius) können NO*-Radikale die Zellmembran einfach durchqueren (Denicola et al., 1996/1998) und in das Cytoplasma gelangen. Verbindungen wie Peroxynitrit, welches aus der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit einem Hydroperoxid-Anion hervorgeht, dringen dagegen in Form ihrer Säure in das Zellinnere ein (Fang, 1997).

Die NO*-Radikale sind sehr zelltoxisch und führen zu Schäden an Proteinen (Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995), der DNA (Wink et al., 1991; Juedes und Wogan, 1996) und der Zellwandumhüllung (Rubbo, 1994; Halliwell et al., 1992; Cammack et al., 1999; Kaspar, mündliche Mitteilung). So reagieren die NO*-Radikale, aber auch Peroxynitrit oder Distickstofftrioxid, mit den Bestandteilen der DNA (vgl. Abb. 6) und können zu einer Desaminierung (Wink et al., 1991) und zu Strangbrüchen (oxidativer Schaden) führen (Wink et al., 1991; Juedes und Wogan, 1996; Cammack et al., 1999). Roy et al. (1995) und Haskin et al. (1995) konnten zeigen, dass die Ribonukleotid-Reduktase, welche für die Bildung der DNA essentiell ist, durch Stickstoffmonoxid inhibiert wird. Weiterhin konnte in *in-Vitro* Studien gezeigt werden, dass NO*-Radikale bzw. NO-Intermediate für die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich sind (vgl. Abb. 6). Somit können auftretende oxidative DNA-Schäden nicht repariert werden und Mutationen zunehmen (DeGroot und Fang, 1995; Fang, 1997; Kaspar, mündliche Mitteilung). Kroncke et al. (1994) konnten weiterhin demonstrieren, dass das aus Nitrit gebildete Stickstoffmonoxid sich an DNA-bindende Proteine, speziell an solche, die ein Zink-Finger-Motiv besitzen, anlagert und so die Gen-Regulation beeinflussen kann.

Neben Schäden auf molekularer Ebene können auch Proteine modifiziert und so verändert werden (vgl. Abb. 6), dass sie ihre Funktion verlieren (Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995). Bevorzugte Reaktionspartner sind die Häm- (Hentze, 1996) und Thiolgruppen (S-Nitrosylation) der Proteine (Stammler und Slivka, 1996; Morris und Hansen, 1981), hier vor allen Enzyme, die als reaktives Zentrum ein Eisen-Schwefelcluster tragen (Fang, 1997). Nach Tompkin et al. (1978) interagiert Stickstoffmonooxid, welches aus Nitrit gebildet wurde, mit Eisen-Schwefel-Proteinen unter deren Inaktivierung Proteine mit einem Eisen-Schwefelcluster spielen sowohl bei aeroben als auch bei anaeroben Bakterien eine wichtige Rolle im Energie-Metabolismus (Butler et al., 1985). Woods et al. (1981) und Woods und Wood, (1982) konnten nach Zusatz von Nitrit eine schnelle und starke Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration in Zellen von *Clostridium sporogenes* feststellen. Die gleichzeitig beobachtete Zunahme von Pyruvat deutet darauf hin, dass Nitrit das „Phosphoroclastic System“, welches drei Eisen-Schwefel-Proteine enthält, beeinflusst und inhibiert (Woods et al., 1981; Woods und Wood, 1982; Carpenter et al., 1987; McMindes und Siedler, 1988).

Des Weiteren konnten durch die Verwendung von Nitrit, hier vor allem durch die Verbindungen Peroxynitrit und Stickstoffdioxid, Schäden an Zellmembranen festgestellt werden (vgl. Abb. 6). Durch die Oxidation von Lipiden durch Peroxynitrit bzw. Stickstoffdioxid kann es zu einer deutlich reduzierten elektrophoretischen Beweglichkeit der Lipidmembran und zum Abbau lipidlöslichen Ubiquinols und α -Tocopherols (Halliwell et al., 1992; Rubbo et al., 1994) kommen. Infolge dessen können Zelltransportvorgänge gestört werden und es können strukturelle Schäden entstehen (Cammack et al., 1999; Fang, 1997; Kaspar, mündliche Mitteilung). Buchmann und Hansen (1987) zeigten weiterhin, dass die für die Lebensfähigkeit wichtigen Sulphydryl-Gruppen der Membranen durch Nitrit bzw. S-Nitrosothiol inaktiviert wurden und somit, wie am Beispiel von *Bacillus cereus* gezeigt, ein bakteriostatischer Zustand erzielt wurde. Zwar bedeuten strukturelle Schäden der Zellwand nicht zwangsläufig den Tod der Zelle, jedoch nimmt die Permeabilität stark zu und ermöglicht so den Eintritt von möglicherweise toxischeren Produkten.

Somit ist Nitrit per se nicht die antimikrobiologisch wirkende Verbindung, sondern vielmehr die Ausgangsverbindung, deren Derivate zu bakteriostatischen bzw. bakterioziden Wirkungen führen (Cammack et al., 1999).

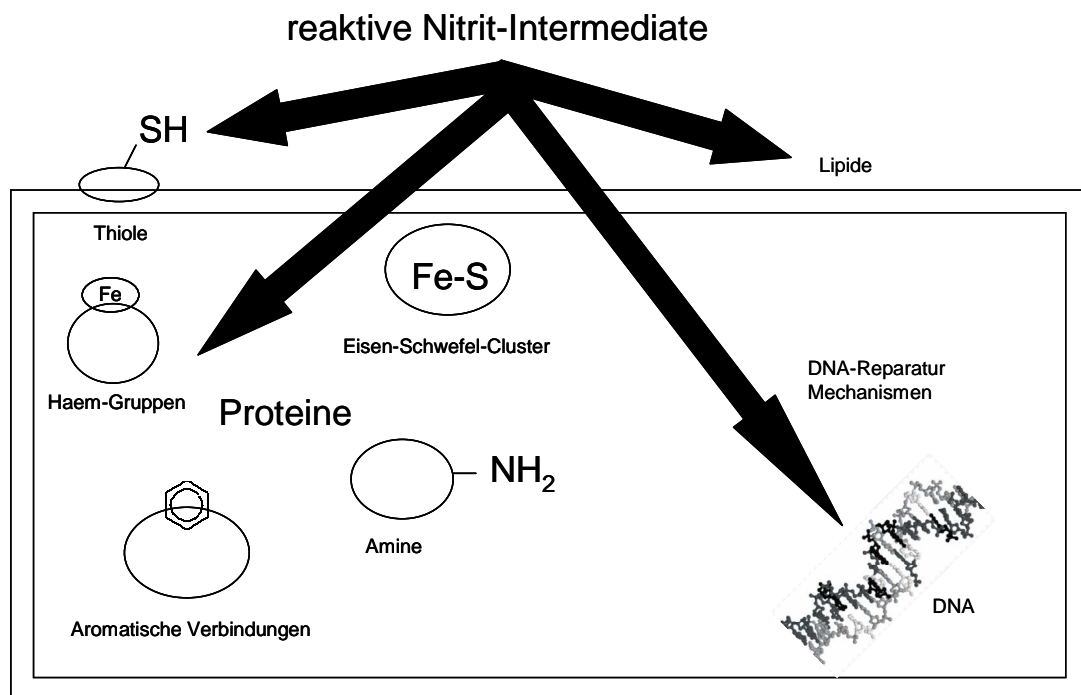


Abb. 6: Zelluläre Targets der reaktiven Nitrit-Intermediate (abgewandelt nach Fang, 1997)

2.3.2. Gesundheitliche Betrachtungen

Neben den positiven Wirkungen kann die Zugabe von Nitrit aber auch unerwünschte Folgen haben. So reagiert Nitrit in eiweißhaltigen Lebensmitteln zu Nitrosaminen (Rywotycki, 1997; Rywotycki, 2007) und ist in höheren Dosen toxisch (Bruningfann and Kaneene, 1993; Standefer et al., 1979). Bereits 1934 wurde in Deutschland ein Salzgemisch mit 0,5 - 0,6 % Nitrit als alleiniges Pökelmittel (Pökelsalz) vorgeschrieben (Nitrit GDV RP, 1934), nachdem es durch Fehlanwendungen zum gehäuften Auftreten der Blausucht vor allem bei Kleinkindern kam.

Obwohl die Menge von 0,68 mg Nitrit pro Tag, die täglich über gepökelte Fleischerzeugnisse aufgenommen wird, im Vergleich zu endogen aus Stickstoffmonoxid produziertem Nitrit (69 mg pro Tag) sehr gering ist (Lücke, 2003; Wild, 2003), kann diese zur Bildung von kanzerogenen Nitrosaminen beitragen.

Die Frage, ob durch den Konsum nitritgepökelter Fleischerzeugnisse Krebs beim Menschen induziert werden kann, wird zur Zeit kontrovers diskutiert (RZ-consult, 2000; Wild, 2003). Nitrosamine, wie z.B. N-Nitroso-dimethylamin, sind kanzerogen (Liteplo und Meek, 2001; Ray und Marshall, 2005). Die Nitrit-Nitrosamin-Hypothese besagt, dass bereits im Produkt und auch im Magen in Gegenwart von Nitrit und sekundären Aminen des Fleisches Nitrosamine entstehen (Honikel, 2008). Damit würde ein erhöhtes Risiko bestehen, durch

den Verzehr von gepökelten Rohwurstprodukten an Magenkrebs zu erkranken. Epidemiologische Studien, die aufzeigten, dass der Verzehr von nitritgepökeltem Fleisch in Zusammenhang mit der Entstehung von Leukämie bei Kindern (Peters et al., 1994), der Ausbildung von Gehirntumoren und der verminderten Fortpflanzungsfähigkeit stehen könnte (Preston-Martin et al., 1996; Sarasua und Savitz, 1994), wurden in den letzten Jahren durch wissenschaftliche Arbeiten widerlegt (Mikowski et al., 2010; van Loon et al., 1998; Zeegers et al., 2006) bzw. abgeschwächt (Eichholzer und Gutzwiller, 1998).

Neueren Untersuchungen zu Folge sollen die entstehenden reaktiven Stickstoffverbindungen im Magen unter bestimmten physiologischen Voraussetzungen auch positive Wirkungen haben. So wirken die Magensäure und die Stickstoffverbindungen synergistisch zusammen und könnten eine protektive Wirkung gegenüber *Yersinia* spp, *Salmonella* spp, *E. coli* und *Helicobacter pylori* entfalten (Lundberg et al., 2004; Dykhuizen et al., 1996; Dykhuizen et al., 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das entstandene Stickstoffmonoxid die Blutzirkulation der Magenschleimhaut anregt sowie die Dicke der Schleimschicht an der Wand des Magens fördert (Bjorne et al., 2004). Vermutlich ist dies einer der Gründe dafür, dass beim Menschen bislang durch die Aufnahme von Nitrit über gepökelte Fleischerzeugnisse keine direkte Krebs fördernde Wirkung epidemiologisch belegt werden konnte. Solange jedoch eine kanzerogene Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann, sollte der Zusatzstoff Natriumnitrit nur in technologisch und mikrobiologisch notwendigen Konzentrationen eingesetzt werden.

2.3.3. Rechtsnormen für konventionell gepökelte Rohwurstzeugnisse

Die Herstellung von Rohwürsten, die Verwendung von Zusatzstoffen und das Inverkehrbringen von Rohwürsten regeln in Deutschland Rechtsnormen. Die Grundlage bilden hierfür das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB), die Fleischverordnung (Fleisch-VO) sowie die Zusatzstoffzulassungsverordnung (ZZuIV). Stoffe, die in der ZZuIV aufgeführt und für die Fleischverarbeitung zugelassen sind, stellen in den angegebenen Konzentrationen keine gesundheitliche Gefährdung dar. Grundsätzlich sollte jedoch auch hier gelten: soviel wie nötig, so wenig wie möglich (Migros, 2011).

Die konventionelle Herstellung von Fleischerzeugnissen mit Pökelsalz ist in der Anlage 5, Teil C, Liste 1 der Zusatzstoffzulassungsverordnung von 1998 bzw. in Anhang III Teil C der EU-Richtlinie 95/2/EG geregelt. In der Änderung dieser Richtlinie (Richtlinie 2006/52/EG) wurde der Zusatz von Natriumnitrit in Fleischerzeugnissen auf 150 mg/kg begrenzt. Dies wurde auch durch die Verordnungen (EG) Nr. 1333/2008 und (EU) Nr. 1129/2011 bestätigt. Damit folgte die Europäische Union der Empfehlung der EFSA, die eine Regelung von Nitrit über die Zusatzmenge und nicht über den Höchstgehalt an Rückständen im Produkt

empfiehlt. Nach Meinung der EFSA würde eine solche Regelung einen möglichen Missbrauch von Nitrit als Zusatzstoff unterbinden und den Einsatz einwandfreier Rohware (EFSA, 2003) erzwingen.

2.3.4. Nitrathaltige Pflanzensäfte als Nitritersatzstoffe

2.3.4.1. Bedeutung

Natriumnitrit ist ein künstlicher Lebensmittelzusatzstoff, der neben vielfältigen positiven Eigenschaften wie der konservierenden Wirkung, Umrötung (Pökelrot), Geschmacksbildung (Pökelaroma) und der antioxidativen Wirkung (Thiemig et al., 2000) im Verdacht steht, durch die Reaktion mit Eiweißbestandteilen kanzerogene Nitrosamine zu erzeugen (Rywotycki, 1997; Rywotycki, 2007). Verglichen mit der endogen synthetisierten Nitritmenge aus Stickstoffmonoxid ist die Zufuhr aus gepökelten Fleischerzeugnissen mit 0,68 mg sehr gering. Somit tragen diese, wenn auch nicht in dem oft angenommenen Ausmaß, mit 1,3 % zur Gesamt-Nitritbelastung des Menschen bei (Wild, 2003). Daher streben die Hersteller eine Reduktion der Menge an Nitrit in den Rohwürsten auf ein notwendiges Minimum an. Ziel ist dabei, dem Wunsch des Verbrauchers nach einer Minimierung von Zusatzstoffen nachzukommen bzw. chemisch-synthetische durch natürliche Zutaten zu ersetzen, dabei aber gleichzeitig die mikrobiologische Stabilität und Sicherheit der Produkte zu gewährleisten.

Dies zeigt sich vor allem in den letzten Jahren durch die stetig wachsende Nachfrage nach sogenannten „grünen Produkten“. Im Zuge dieser Entwicklung kam es im Lebensmittelbereich zu einem starkem Wachstum der Bio-Branche (Hübsch, 2009; BÖLW, 2011 und 2013). So stieg der Umsatz von Bioprodukten von 2,1 Mrd. € im Jahr 2001 auf 5,3 Mrd. € in 2007 und 5,9 Mrd. € im Jahr 2010 (BÖLW, 2011; Hamm und Rippin, 2009). Davon entfielen im Jahr 2010 ca. 200 Mio. € und Jahr 2013 ca. 223 Mio. € auf Fleisch und Fleischprodukte aus dem ökologischen Landbau (BMELV, 2014). Und auch in den kommenden Jahren rechnen die Verbände mit einem weiteren Wachstum des Marktes für Bio-Produkte (BÖLW, 2011, BÖLW, 2014).

Durch die nun angebotenen Bio-Produkte wurde der Verbraucherwunsch nach Frische und Naturbelassenheit weitestgehend berücksichtigt, da chemische Zusatzstoffe weniger akzeptiert werden als Zutaten auf pflanzlicher Basis (Anonymus, 2009) wie zum Beispiel Gewürzextrakte, Gewürzöle oder Pflanzenextrakte.

Gewürzextrakte bzw. -öle enthalten als antimikrobielle Komponente ätherische Öle (Bajpai et al., 2008; Friedly et al., 2009; Munoz et al., 2009). Bis heute sind über 3000 verschiedene ätherische Öle bekannt. Dabei handelt es sich um z.T. komplexe natürliche Mischungen, die aus bis zu 60 unterschiedlichen Einzelkomponenten bestehen (Russo et al., 1998; Bakkali et

al., 2008). Bei den Hauptinhaltsstoffen, die eine antibakterielle (Chorianopoulos et al., 2008; Mourey und Cannillac, 2002; Oroojalian et al., 2010) Wirkung haben, handelt es sich vorwiegend um phenolische Verbindungen, Terpene, Ketone, Aldehyde, aliphatische Alkohole, Säuren und Isoflavonoide (Farag et al., 1989; Tassou, 1995; Dorman und Deans, 2000; Lopez-Malo et al., 2005; Chorianopoulos et al., 2008). Neben diesen existiert noch eine weitere wichtige Gruppe von antimikrobiell aktiven Stoffen aus ätherischen Ölen. In nahezu allen Lauchgewächsen wie zum Beispiel Knoblauch kommen organische Disulfide wie (z.B. Diallyldisulfid) vor (Shukla und Kalra, 2007). Unter *in-Vitro* Bedingungen zeigen diese ein sehr hohes antimikrobielles Potential sowohl gegen Gram-positive (Tsao and Yin, 2001) als auch gegen Gram-negative Bakterien (O'Gara, 2000) und wären somit für einen Einsatz in Lebensmitteln geeignet.

Obwohl ätherische Öle bzw. ihre Hauptbestandteile unter *in-Vitro* Bedingungen schon in geringen Konzentrationen eine sehr gute Keim-hemmende Wirkung zeigen (Bajpai et al., 2008; Friedly et al., 2009), müssten sie dem Produkt in deutlich höheren und somit in sensorisch nicht akzeptablen Konzentrationen zugesetzt werden (Shelef, 1983; Ultee und Smid, 2001).

In der Praxis werden daher Pflanzensäfte bzw. Pflanzenextrakte bevorzugt, die wie Sellerie (Walker, 1990), Spinat (Leszczynska, 1994), Rote Bete (Santamaria, 2006) oder Brennessel (Oztekin et al., 2002) einen hohen Nitratanteil haben. Diese haben den Vorteil, dass sie zum einen auf Grund ihrer roten Farbe das Rohwurstprodukt sofort umröten, und dass sie zum anderen Nitrit über chemische und mikrobiologische Prozesse über einen langen Zeitraum aus dem Nitrat regenerieren.

2.3.4.2. Technologie

Bei diesem, in der englischsprachigen Literatur auch als „indirect-curing“ bzw. „natural curing“ (Sebranek und Bacus, 2007) bezeichneten Prozess wandeln Starterkulturen mit einer Nitratreduktaseaktivität wie z.B. *Staphylococcus carnosum* oder *Staphylococcus xylosus* (Casaburi et al., 2005; Fiorentini et al., 2009; Fedtke et al., 2002) das vorhandene Nitrat z.B. aus Pflanzensäften wie Sellerie in Nitrit um. Die dabei gebildete Menge an Nitrit hängt von verschiedenen Faktoren ab (Sebranek und Bacus, 2007; Terns et al., 2011). So beeinflusst die gewählte Reifetemperatur die Aktivität der nitratreduzierenden Starterkultur (vgl. 2.1.5). Neben den Temperaturen ist die Auswahl der geeigneten Starterkultur und der Nitratgehalt der verwendeten Pflanzen von großer Bedeutung (Casaburi et al., 2005; Sindelar et al., 2007). Die ausgewählte Starterkultur muss zum einen eine schnelle Ansäuerung des Produktes bewirken und zum anderen Nitrat zu Nitrit reduzieren, um eine möglichst schnelle mikrobiologische Stabilisierung des Produktes herbei zuführen (vgl. 2.1.5).

Hinsichtlich der technologischen und sensorischen Wirkung wurden bereits vor allem für Brüh-, Kochwurst- und für Rohwurstherzeugnisse ohne bzw. mit reduziertem Nitritgehalt gute Ergebnisse erzielt (Xi et al., 2011; Terns et al., 2011; Magrinya et al., 2009). So konnten Magrinya et al. (2009) für eine luftgetrocknete Rohwurst zeigen, dass der Einsatz eines nitrathaltigen Sellerie-Extraktes zu einem akzeptablen Produkt führte und dass der verwendete Extrakt eine nützliche Alternative zu den konventionell verwendeten Zusatzstoffen darstellen könnte. Die mikrobiologische Stabilität solcher Rohwurstprodukte kann derzeit nicht ausreichend bewertet werden, da entsprechende wissenschaftliche Studien bislang fehlen. Alle bisher erzielten mikrobiologischen Daten stammen aus *in-Vitro* Versuchen (Misic et al., 2008; Dostbil, 2007; Sarkinas und Jasutiene, 2007) und lassen keine Rückschlüsse auf eine antimikrobielle Wirkung in der Matrix Rohwurst zu.

2.3.4.3. Rechtsnormen für ökologisch gepökelte Rohwurstprodukte

Für ökologische Produkte trat zum 01.12.2007 die EU-Verordnung Nr. 780/2006 zur Änderung des Anhangs VI der Verordnung Nr. 2092/91, übernommen durch Artikel 21 Absatz 2 der Verordnung (EG) Nr. 834/2007, in Kraft. In dieser wird ein Richtwert für den Zusatz von 80 mg/kg Natriumnitrit vorgeschlagen, sollte es keine technologische Alternative geben. Im darauffolgenden Jahr trat die Verordnung (EG) Nr. 889/2008 in Kraft, in der unter Artikel 27 Absatz 3 die Verwendung von Natriumnitrit in ökologischen Erzeugnissen hinsichtlich einer Streichung bis zum 31.12.2010 durch die Mitgliedsstaaten zu prüfen ist. Aus deutscher Sicht sind zurzeit keine mikrobiologisch sicheren Alternativen vorhanden, so dass nach jetzigem Kenntnisstand ein Zusatz von 80 mg/kg weiterhin erlaubt sein sollte.

Die rechtliche Situation der Verwendung nitrathaltiger Extrakte ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Der Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie empfiehlt daher bei Einsatz alternativer Zutaten wie Gemüsepulvern eine korrekte Deklaration dieser Zutaten (BVDF, 2010).

2.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation ist die Überprüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Natriumnitrit auf die wichtigsten pathogenen Lebensmittelinfektionserreger in Rohwurstherzeugnissen.

Die gewonnenen Daten sollen zeigen, ob der Zusatz von Nitrit in den gesetzlich fixierten Konzentrationen zur Herstellung eines mikrobiologisch stabilen Produktes notwendig ist oder ob er gegebenenfalls reduziert werden kann.

Die Ergebnisse dieses Vorhabens sollen dazu beitragen, Empfehlungen abzuleiten, ob und unter welchen Bedingungen eine Herstellung von hygienisch einwandfreien Rohwurstprodukten unter reduzierten Nitritkonzentrationen möglich ist.

Auch für die Erzeuger ökologischer Rohwurstprodukte ist das Vorhaben interessant, da bis jetzt für die Produktion von nitritfreien Erzeugnissen nur Erfahrungswerte, nicht jedoch wissenschaftlich fundierte Daten vorliegen.

Die gewonnenen Ergebnisse sollen zeigen, unter welchen Bedingungen auch ohne den Zusatzstoff Nitrit bzw. durch alternative pflanzliche Ersatzstoffe auf Basis von Nitrat ein mikrobiologisch sicheres Produkt hergestellt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Nährmedien

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden die folgenden Fest- und Flüssigmedien (siehe Tab. 3) verwendet. Alle Nährmedien wurden entsprechend den Angaben des Herstellers verarbeitet.

Tab. 3: Verwendete Nährmedien

Festmedien	
Agar	Hersteller
Columbia-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Schafsblut (defibriniert-steril)	ACILA, Mörfelden-Walldorf (D)
Desoxycholate-Hydrogen-Sulfide-Lactose-Agar nach SAKAZAKI; DHL-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Fluorocult®- <i>E. coli</i> -O157:H7-Agar	Merck, Darmstadt (D)
<i>Lactobacillus</i> -Agar nach DE MAN et al.; MRS-Agar	Oxoid, Wesel (D)
Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA)	bioMerieux, Nürtingen (D)
Palcam-Listeria-Selektiv-Agar nach VAN NETTEN et al.	Merck, Darmstadt (D)
Palcam-Listeria-Selektiv-Supplement nach VAN NETTEN et al.	Merck, Darmstadt (D)
Sorbitol-MacConkey-Agar; SMAC-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Standard-I-Nähragar	Merck, Darmstadt (D)
Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar	Merck, Darmstadt (D)
Flüssigmedien	
Bouillon	Hersteller
Caso-Bouillon (TSB)	Merck, Darmstadt (D)
EC-Bouillon	ACILA, Mörfelden-Walldorf (D)
Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon	Merck, Darmstadt (D)
Fraser-Listerien-Selektiv-Supplement	Merck, Darmstadt (D)
Pepton-Wasser (gepuffert)	Sifin, Darmstadt (D)
Ferri Ox (Supplement für Anreicherungsmedien)	Sifin, Deutschland (D)
<i>Salmonella</i> -Anreicherungsbouillon nach Rappaport und Vasiliadis (RVS-Bouillon)	Merck, Darmstadt (D)
Standard I Bouillon	Merck, Darmstadt (D)

3.2 Chemikalien

Alle Versuche wurden mit handelsüblichen Chemikalien höchster Reinheit durchgeführt. Spezielle Chemikalien sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 4).

Tab. 4: Herkunft der verwendeten Chemikalien

Substanz	Herkunft
Agar Agar	Merck, Darmstadt (D)
Agarose 3:1	Biometra, Göttingen (D)
Agarose NEFO Rotigarose®	Roth, Karlsruhe (D)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (D)
DNS Molekular Weight Marker XIII	Roche, Karlsruhe (D)
dNTP-Mix	Biometra, Göttingen (D)
Ethidiumbromidgebrauchslösung	Roth, Karlsruhe (D)
Fleischextrakt	Merck, Darmstadt (D)
Gel-Loading-Puffer	Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt (D)
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Biometra, Göttingen (D)
Magnesium freier Puffer	Biometra, Göttingen (D)
D-(-)-Mannit	Merck, Darmstadt (D)
Milchsäure	Merck, Darmstadt (D)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Natriumnitrit	Riedel-de-Haen, Seelze (D)
Novobiocin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Polymerase DyNAzyme II	Biometra, Göttingen (D)
Primer HB10	MWG, Ebersberg (D)
5'-ATT CCA CAC AAC ATA CGA GCC-3'	
Primer HB11	MWG, Ebersberg (D)
5'-GTT TCG CCA CCT CTG ACT TGA G-3'	
Primer KS7	MWG, Ebersberg (D)
5'-CCC GGA TCC ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC-3'	

Fortsetzung Tab. 4: Herkunft der verwendeten Chemikalien

Substanz	Herkunft
Primer KS8 5'-CCC GAA TTC AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'	MWG, Ebersberg (D)
Primer LP43 5'-ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G-3'	MWG, Ebersberg (D)
Primer LP44 5'-GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C-3'	MWG, Ebersberg (D)
Primer 139 5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA-3'	MWG, Ebersberg (D)
Primer 141 5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'	MWG, Ebersberg (D)
PUC 19 DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
L-(+)-Rhamnose-monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
Standard-Pufferlösung pH 7	Merck, Darmstadt (D)
Standard-Pufferlösung pH 4	Merck, Darmstadt (D)
Universalpepton M66	Merck, Darmstadt (D)
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe (D)
D-(+)-Xylose	Riedel-de-Haen, Seelze (D)

3.3 Geräte

Tab. 5: Verwendete Geräte, Software und Testkits

Gerät	Hersteller
a _w -Kryometer AWK-20 [®]	Nagy Messsysteme, Gäufelden (D)
Akrobit [®] Software	AMR, Holzkirchen (D)
Anemometer TA 3000	Airflow Lufttech. GmbH, Rheinbach (D)
Aspiration-Psychrometer nach Aßmann	MRI, Kulmbach (D)
Clip-Maschine Poly-Clip [®] System Typ SCH 7210	Niedecker GmbH, Frankfurt/ Main (D)
Datenlogger [®] ALMEMO 2890-9	AMR, Holzkirchen (D)
Dispenser Dose 803	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Einstabmesselektrode Typ SA Pt 6140	Schott, Mainz (D)
Elektrophoresekammer Agagel Midi Widi	Biometra, Göttingen (D)
Elektrophoresekammer Agagel Mini	Biometra, Göttingen (D)

Fortsetzung Tab. 5: Verwendete Geräte, Software und Testkits

Gerät	Hersteller
Fleischwolf FW82	Bizerba, Balingen (D)
Fleischkutter MTK 20/1 (Fassungsvermögen 10 l)	E. Müller & Söhne, Saarbrücken (D)
Fluoreszenzdetektor Dionex RF 200	Dionex Softron GmbH, Germering (D)
Fotoeinheit Cosmicar Televisionssystem	Biometra, Göttingen (D)
Kammermaschine C-300	MultiVac, Wolfertschwenden (D)
Klimakammern	Karl Weiss, Giessen (D)
Merckoquant® Nitrit-Teststäbchen	Merck, Darmstadt (D)
Merckoquant® Nitrat-Teststäbchen	Merck, Darmstadt (D)
Mikrowelle	Privileg, Fürth (D)
Multi Trip Temperature Logger	Tech Innovators LTD, Auckland (NZ)
Multi Trip Humidity & Temperature Logger	Tech Innovators LTD, Auckland (NZ)
pH-Meter pH 526	WTW, Weilheim (D)
pH-Elektrode SenTix®	WTW, Weilheim (D)
Rasterelektronenmikroskop S3000N	Hitachi, Tokio (J)
Stomacher 400	Colworth, London (GB)
Spezialrechenstab für Luftfeuchte	Karl Weiss, Giessen (D)
Temperatur-Feuchte-Transmitter FH A646-1	AMR, Holzkirchen (D)
Thermocycler C1000	Bio-Rad, München (D)
Transiluminator BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen (D)
Wasserbad	Memmert, Schwabach (D)
Wurstfüller (6 l)	Firma Dick, Deizisau (D)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)

3.4 Materialien für die Herstellung von Rohwürsten

Für die Herstellung von feinzerkleinerten und groben schnittfesten Rohwürsten wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Materialien verwendet.

Tab. 6: Verwendete Materialien für die Herstellung der Rohwursterzeugnisse

Material	Hersteller
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumsorbat	PROLABO, Darmstadt (D)
Natrium-L-(+)-ascorbat	Merck, Darmstadt (D)
Nalo® Cellulosehydrat-Därme (Ø 45 mm, L 20 cm)	Kalle GmbH, Wiesbaden (D)
NATASY S 507	Chr. Hansen, Nienburg (D)
Naturin R2 Kollagenfaserdärme (Ø 60 mm, L 40 cm)	Naturin GmbH, Weinheim (D)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (D)
Natriumnitrit	Riedel-de-Haen, Seelze (D)
Nitrit-Pökelsalz	Südsalz GmbH, München (D)
Pfeffer, weiß gemahlen	Raps GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Pflanzenextrakt	Raps GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Rindfleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil; R 2	E. Färber GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Salamiwürzung BE 1307	Chr. Hansen, Nienburg (D)
Schweinefleisch, fettfrei und ohne sichtbare Sehnen; S 1	E. Färber GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, mager mit max. 5 % sichtbarem Fettanteil; S 2	E. Färber GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, kerniger Rückenspeck; S 8	E. Färber GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Schweinefleisch, mittelfette Wammen ohne Schwarten und Drüsen; S 10	E. Färber GmbH & Co. KG, Kulmbach (D)
Schweinedünndarm Güteklasse A (Ø 32-36 mm)	Daum, Mainleus (D) und Börner-Eisenacher, Göttingen (D)
Schutzgas (20 % CO ₂ und 80 % N)	Rießner Gase, Lichtenfels (D)
Schutzkultur B-LC-20 Safe Pro®	Chr. Hansen, Nienburg (D)
Starterkultur BITEC-LS 1,	Gewürzmüller, Korntal-Münchingen (D)
Starterkultur SM-181 Bactoform®,	Chr. Hansen, Nienburg (D)
Starterkultur Tradi 302 Bactoform®,	Chr. Hansen, Nienburg (D)
Starterkulturen M-EK 4-Bactoform®, Edelschimmel	Chr. Hansen, Nienburg (D)

3.5 Mikroorganismen

Für die Belastungstests (Challengeuntersuchungen) wurden die in der Tabelle 7 aufgeführten pathogenen Stämme der Gattungen *Salmonella*, *Escherichia* und *Listeria* aus der Stammsammlung des Max Rubner-Instituts in Kulmbach eingesetzt. Der Salmonellen-Pool setzte sich aus insgesamt fünf Produktisolaten zusammen. Für den STEC/EHEC-Pool wurden insgesamt vier Isolate verwendet, darunter drei verschiedene *E. coli* O157:H7 sowie ein *E. coli* O26:H11. Der *L. monocytogenes* Pool bestand aus drei unterschiedlichen Serotypen, darunter zwei Humanisolate und ein Produktisolat. Diese Vorgehensweise wurde deswegen gewählt, um den Einfluss möglicher stammspezifischer Eigenschaften der Inokulationsspezies auf das Ergebnis zu minimieren.

Tab. 7: Pathogen, Serotyp, Stammnummer und Herkunft der verwendeten Isolate

Pathogen/Serotyp	Stammnummer	Herkunft
<i>Salmonella</i> Enteritidis	S 489	Bratwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	S 469	Bratwurst / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Derby Serotyp B	S 589	Fleischprobe / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Goldcoast Serotyp C	S 600	mech. entsehtes Fleisch (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Salmonella</i> Infantis	S 609	Fleischoberfläche / Schwein (D) (MRI, Kulmbach)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	E 118	Faeces / Rind (D) (Uni-Gießen)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 35150 E 134	Stuhl / Mensch (USA) (MRI, Kulmbach)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 43896 E 135	roher Hamburger (USA) (MRI, Kulmbach)
<i>Escherichia coli</i> O26: H11	E 165	Faeces / Kalb (Japan) (MRI, Kulmbach)
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2 a	SLCC 6139 Li 127	Liquor / Mensch (D) (Uni-Mannheim)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b	NTCC 10527 Li 2	Liquor / Mensch (D) (BgVV-Berlin)
<i>Listeria monocytogenes</i> 4d	Li 135	Produktionsumfeld der Rohwurstherstellung (MRI)

SLCC: Seeligers *Listeria* Culture Collection (Prof. Seeliger, Würzburg)

NTCC: National Collection of Type Cultures

ATCC: American Type Culture Collection

Li, E und S : Stammnummern der Stammsammlung des MRI, Kulmbach

3.6 Stammhaltung

Die verwendeten Mikroorganismen (vgl. 3.5) wurden auf Standard-I-Nähragar kultiviert und alle zwei Wochen neu überimpft, um mit frischen Kulturen arbeiten zu können. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 24 Stunden wurden die Platten bei + 4 °C gelagert. Zum Ausschluss einer Fremdinfection wurden in regelmäßigen Abständen Vereinzlungsausschläge und mik-

roskopische Präparate der verwendeten Stämme hergestellt und eine Prüfung auf Reinheit durchgeführt.

3.7 Kultivierung der Inokulationsstämmе

Von den Inokulationsstämmen (vgl. 3.6.) wurde eine Impföse Zellmaterial entnommen, in ein Reagenzglas mit 9 ml Standard-I-Nährbouillon (pH 7,2) überführt und für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert.

3.7.1 Inkubationsansätze für die *in Vitro* Versuche

Vor dem Beginn der *in Vitro* Untersuchungen wurden sowohl der pH-Wert der Nährbouillon mit Hilfe einer 40 % igen Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) oder einer 90 % igen Milchsäure-Lösung auf pH 7, pH 6 oder pH 5, als auch der Wasseraktivitätswert (a_w) mit Natriumchlorid (NaCl) auf 0,99, 0,98, 0,975, 0,965 und 0,94 eingestellt.

Nach der Kultivierung (vgl. 3.7) wurden je 1 ml der Bakteriensuspension des jeweiligen Stammes entnommen und in einem sterilen Reagenzglas zu einem Bakterienpool der jeweiligen Gattung vereinigt. Anschließend wurde 1 ml aus dem Kölbchen entnommen und in ein Reagenzglas, das mit 9 ml steriler 0,85 % iger Kochsalzlösung beschickt war, überführt. Mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe wurde eine Keimzahl von 1×10^4 KbE/ml hergestellt.

Anschließend wurden aus dieser Verdünnungsstufe 4,3 ml Bakteriensuspension entnommen und in einen sterilen Standkolben mit 50 ml Nährbouillon (Peptonwasser-*Salmonella* spp.; E.C.-Bouillon-STECE/EHEC; Fraser-Selektiv-Bouillon-*Listeria monocytogenes*) überführt. Natriumnitrit wurde danach in den Konzentrationen 0 mg/L 100 mg/L [1,45 mM], 150 mg/L [2,17 mM] und 200 mg/L [2,9 mM] zu den verschiedenen Ansätzen zugesetzt. Aus diesen wurden nun jeweils 4 ml entnommen und in sterile Reagenzgläser pipettiert, welche danach in eine klimatisierte Messbox eingebracht wurden. Die Versuche erfolgten bei konstant eingestellten Temperaturen von 25 °C und 17 °C.

3.7.2 Inkubationsansätze für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Der Einfluss von Natriumnitrit auf die Bakterienzellen von *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. wurde zudem elektronenmikroskopisch analysiert. Dazu wurden die Zellen, wie unter Punkt 3.7 beschrieben, vorkultiviert und dann in einen sterilen Standkolben mit 100 ml Nährbouillon überführt.

Natriumnitrit wurde in einer Endkonzentration von 100 mg/L [1,45 mM] und 200 mg/L [2,9 mM] den Medien zugesetzt. Dem Kontrollansatz wurde kein Nitrit zugegeben. Nach einer 24- stündigen Inkubation bei 25 °C und 180 rpm, wird fünfmal 1 ml Suspension unter

sterilen Bedingungen entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mittels Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 Minuten wurde das Nährmedium entfernt, das Zellpellet in 200 µl 0,85 % iger Kochsalzlösung aufgelöst und die 5 Zentrifugationsansätze vereinigt.

Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift mit steriler Kochsalzlösung wurden die Proben im Laboratorium für Elektronenmikroskopie des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des MRI Kulmbach präpariert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt.

3.7.3 Inkubationsansätze für die Challengeversuche

Zur Herstellung des Inokulums wurden zunächst Übernachtkulturen der einzelnen Stämme (Standard - I - Bouillon) durch Mischen von jeweils 1 ml der Bakteriensuspension zu einem Pool vereinigt. Nach dezimaler Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die gewünschten Inokulationsdosen (1×10^2 , 1×10^3 und 1×10^4 KbE/g hergestellt und mikrobiologisch in der Thomakammer überprüft. Für die Beimpfung des Wurstbrätes wurden jeweils 1,6 ml des so hergestellten Inokulums pro kg Rohmaterial verwendet. Die Zugabe der Inokula erfolgte während des Kutters bei Herstellungsbeginn. Die unbeimpften Kontrollchargen (Negativkontrollen) wurden dabei immer zuerst produziert.

3.8 Messung der Wasseraktivität (a_w -Wert)

Die Wasseraktivitätswerte wurden mit einem a_w -Kryometer über eine Dreifachmessung an den Tagen 0, 1, 3, 6, 8, 13, 20, 28 bzw. 42, 56 und 84 nach Herstellung der Rohwürste ermittelt (Rödel et al., 1989).

3.9 Messung des Säuregrades (pH-Wert)

Die pH-Wertmessung wurde an allen Untersuchungstagen (siehe 3.8) elektrometrisch mit einem pH-Meter durchgeführt. Die pH-Elektrode wurde dazu einmal täglich mit Standard-Pufferlösungen mit pH 4 und pH 7 bei Raumtemperatur kalibriert.

3.10 Nitrit- und Nitratbestimmung

Die Bestimmung des Nitrit- und Nitratgehaltes erfolgte semi-quantitativ mit Teststäbchen. Diese deckten im Falle der Nitritbestimmung einen Messbereich von 2-80 mg/l und für die Nitratmessung einen Bereich von 10 - 500 mg/l ab. Für höher konzentrierte Proben wurde eine dezimale Verdünnung der eingewogenen Probe (vgl. 3.13) mit 0,85 % iger Kochsalzlösung verwendet. Die Messung erfolgte aus der ersten Verdünnungsstufe.

Für die Messung des a_w -Wertes, pH-Wertes und des Nitrit-/Nitratgehaltes wurden die jeweiligen unbeimpften Negativkontrollen verwendet.

3.11 Redoxpotentialmessung

Die Messung des Redoxpotentials erfolgte kontinuierlich mit Einstabmesselektroden. Die aufgenommenen Messwerte wurden von einer Datenerfassungsanlage alle 15 Minuten gespeichert und zur weiteren Auswertung an einen Computer übertragen. Alle Redoxpotentialwerte wurden zu Beginn der Messung rechnerisch auf Null zurückgesetzt, um einen besseren Vergleich der Messreihen zu gewährleisten. Die Redoxpotentialkurven sind daher als relative Redoxpotentialwerte dargestellt. Eine eingehende Beschreibung der Methodik zur Redoxpotentialmessung wurde von Rödel und Scheuer (1998) publiziert.

Die Redoxelektroden steckten im Verlaufe der *in Vitro*-Untersuchungen zur Vermeidung von Kontaminationen in passgenauen Reagenzgläsern. Jedes dieser Röhrchen war mit 4 ml der entsprechenden Nährbouillon befüllt (vgl. 3.7.1). Zur Überprüfung des Einflusses der Temperatur wurden die Versuche bei 17 °C und 25 °C in temperierten Messboxen durchgeführt.

Parallel zur Erfassung der mikrobiellen Stoffwechselaktivität wurden, wie unter Punkt 3.13 beschrieben, Keimzahlbestimmungen durchgeführt, um eine genauere Aussage über das Verhalten der Mikroorganismen in den unterschiedlichen Versuchsansätzen treffen zu können. Zur statistischen Absicherung wurden alle Versuche dreimal zeitlich unabhängig voneinander wiederholt.

3.12 Rohwurstherstellung

Für die Challengeversuche wurden die am häufigsten im Handel angebotenen Produkttypen ausgewählt: kurzgereifte streichfähige Rohwurst, schnellgereifte schnittfeste Rohwurst, langgereifte schnittfeste Rohwurst, schimmelpilzgereifte Rohwurst sowie luftgetrocknete Mettwurst. Alle nachfolgend aufgeführten Rohwurstprodukte mit Ausnahme der Mettwurst wurden mit den in Tabelle 8 angegebenen Zusätzen hergestellt. Die Starterkultur bestand aus Kulturen von *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* subsp. *utilis* und *Kocuria varians*. Es handelte sich dabei um ein gefriergetrocknetes Konzentrat mit Dextrose (85 % +/- 5 %) und 5 % Magermilchpulver.

Tab. 8: Zusätze zur Herstellung der Rohwurstprodukte

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Glucose	3 g (3,0 %)
Pfeffer	3 g (0,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)
<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> <i>Kocuria varians</i>	
Natriumascorbat	0,5 g (0,05 %)

Die in den Klimakammern für die jeweiligen Reifeprogramme eingestellten Werte für die Temperatur und die relative Feuchte wurden an Hand von Datenloggern protokolliert und mit Hilfe eines Aspirations-Psychrometers überprüft.

3.12.1 Kurzgereifte streichfähige Rohwurst (Typ-Teewurst)

Bei allen Ansätzen wurde für die Vorchargen die aus Tab. 8 ersichtliche Grundrezeptur verwendet. Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 550 Gramm Schweinefleisch (S 1) und 450 Gramm Fett (S 10) verwendet. Die Zusätze wurden wie unter Tabelle 9 angegeben verwendet.

Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumchlorid und Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Verwendete Zusatzstoffe für die Herstellung einer streichfähigen Rohwurst²³

Zusatzstoff	Menge pro kg Rohmaterial
Natriumchlorid	25 g (2,5 %)
	30 g (3,0 %)
Natriumnitrit	0 g (0 %)
	0,1 g (0,001 %)
	0,15 g (0,0015 %)
	0,2 g (0,002 %)

Technologie der Herstellung

Das Zuschneiden und Wolfen (Körnung: 3 mm) der Rohmaterialien erfolgte am Tag vor der Herstellung der Rohwürste. Die Ausgangsmaterialien wurden anschließend bei 4 °C gelagert. Die Teilstücke wurden in einem Kutter, unter gleichzeitiger Zugabe des Inokulums

(siehe 3.7.3), der Gewürze und Starterkulturen (vgl. Tab. 8) auf die feinste Körnung gekuttert. Zu dem in Chargen aufgeteilten Brät erfolgte die Zugabe der Zusatzstoffe (vgl. Tab. 9) während der Zerkleinerungsphase im Kutter. Im Versuchsablauf wurden die unbeimpften Kontrollchargen zuerst produziert. Das Brät wurde anschließend in Cellulosehydrat-Därme zu je 200 g \pm 10 g abgefüllt.

Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste für ca. 5 Sekunden in eine 20 %-prozentige Kaliumascorbat-Lösung getaucht, um einen Oberflächenbewuchs während der Reife- und Lagerungsphase zu unterbinden. Die Reifung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern. Insgesamt wurden zwei Reifeprogramme (A und B) gefahren (siehe Tab. 10). Die relative Luftfeuchte wurde bei allen Versuchen auf 92 % und die Luftgeschwindigkeit auf einen festen Wert von 0,01 m/s eingestellt.

Tab. 10: Reife- und Lagerungsbedingungen für kurzgereifte streichfähige Rohwürste

Reifung	Reifeprogramm A		Reifeprogramm B		Luftgeschwindigkeit
	Temperatur	relative Feuchte	Temperatur	relative Feuchte	
4 h	22 °C	40-50 %	22 °C	40-50 %	-
72 h	24 °C	92 %	24 °C	92 %	0,01 m/s
48 h	22 °C	92 %	22 °C	92 %	0,01 m/s
24 h	18 °C	92 %	25 °C	92 %	0,01 m/s
Tag	Verpackung unter modifizierter Atmosphäre (70 % N, 30 CO₂) und Lagerung				
7-28 d	17 °C			17 °C	

Chargenkodierung

Jede Versuchscharge wurde für die anschließenden Untersuchungen codiert. Die Kodierung der Versuchschargen, die dazugehörigen Inokulationsdosen sowie das verwendete Reifeprogramm sind der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Chargen B0, C0 und D0 (Negativkontrollen der jeweiligen Nitritkonzentration) wurden in der Tabelle 11 nicht dargestellt.

Tab. 11: Hergestellten Chargen und Chargenkodierung

Chargencode	Natriumchlorid	Natriumnitrit	Reifeprogramm	Beimpfung
A0 Ia	25 g	0 g/kg	A	-
A0 Ib	25 g	0 g/kg	B	-
A0 IIa	30 g	0 g/kg	A	-
A0 IIb	30 g	0 g/kg	B	-
A Ia	25 g	0 g/kg	A	+
A Ib	25 g	0 g/kg	B	+
A IIa	30 g	0 g/kg	A	+
A IIb	30 g	0 g/kg	B	+
B Ia	25 g	0,1 g/kg	A	+
B Ib	25 g	0,1 g/kg	B	+
B IIa	30 g	0,1 g/kg	A	+
B IIb	30 g	0,1 g/kg	B	+
C Ia	25 g	0,15 g/kg	A	+
C Ib	25 g	0,15 g/kg	B	+
C IIa	30 g	0,15 g/kg	A	+
C IIb	30 g	0,15 g/kg	B	+
D Ia	25 g	0,2 g/kg	A	+
D Ib	25 g	0,2 g/kg	B	+
D IIa	30 g	0,2 g/kg	A	+
D IIb	30 g	0,2 g/kg	B	+

- ohne Inokulum (Negativkontrolle)

+ mit Inokulum

3.12.2 Schnellgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-GdL gereifte Salami)

Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 350 Gramm Schweinefleisch (S 2), 350 Gramm Rindfleisch (R 2) und 300 Gramm Schweinefett (S 8) verwendet. Zusätzlich zu den in Tabelle 8 angegebenen Zutaten wurden dem Brät noch 5 g/kg Glucono-delta-Lacton (GdL) zugefügt.

Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde nur Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Verwendete Zusatzstoffe für für schnellgereifte schnittfeste Rohwürste

Zusatzstoff	Menge pro kg Rohmaterial
Natriumchlorid	28 g (2,8 %)
Natriumnitrit	0 g (0 %)
	0,1 g (0,001 %)
	0,15 g (0,0015 %)
	0,2 g (0,002 %)

Technologie der Herstellung

Die Rohmaterialien wurden eine Woche vor der Herstellung des Produktes zugeschnitten und bis zur Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die tiefgefrorenen Teilstücke wurden in einem Kutter, unter gleichzeitiger Zugabe der Gewürze und Starterkulturen (siehe Tab. 8), auf eine Körnung von ca. 10 mm zerkleinert. Zu dem in Chargen aufgeteilten Brät erfolgte die Zugabe der Inokula (siehe 3.7.3) während der Zerkleinerungsphase im Kutter. Im Versuchsablauf wurden die unbeimpften Kontrollchargen zuerst produziert. Das Brät wurde anschließend in Kollagenfaserdärme abgefüllt.

Reife- und Lagerungsbedingungen

Die Reifung und Lagerung der hergestellten Erzeugnisse erfolgte wie in Tabelle 13 beschrieben. Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste für ca. 5 Sekunden in eine 20 % ige Kaliumascorbat-Lösung getaucht. Die Reifung erfolgte in vollautomatischen Klimakammern. Insgesamt wurden zwei Reifeprogramme (A und B) gefahren (siehe Tab. 13). Die Rohwürste wurden ab dem Tag 7 bei 17 °C und 85 % relativer Luftfeuchte gelagert.

Tab. 13: Reife- und Lagerungsbedingungen für schnellgereifte schnittfeste Rohwürste

Reifung	Reifeprogramm A		Reifeprogramm B		Luftgeschwindigkeit
	Temperatur	relative Feuchte	Temperatur	relative Feuchte	
4 h	22 °C	40-50 %	22 °C	40-50 %	-
24 h	24 °C	93-94 %	24 °C	93-94 %	0,2-0,3 m/s
24 h	22 °C	92 %	22 °C	92 %	0,3-0,4 m/s
24 h	20 °C	90 %	20 °C	90 %	0,4-0,5 m/s
72 h	19 °C	88 %	25 °C	88 %	0,3-0,4 m/s
Tag	Lagerung				
7-11 d	17 °C	85 %	17 °C	85 %	0,2-0,3 m/s
11-28 d	17 °C	85 %	17 °C	85 %	0,05-0,1 m/s

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen und die dazugehörigen Zusätze sowie die Reifebedingungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Chargen und Chargenkodierung für schnellgereifte schnittfeste Rohwürste

Chargencode	Natriumnitrit	Reifeprogramm	Beimpfung
E0 Ia	0 g/kg	A	-
E0 Ib	0 g/kg	B	-
F Ia	0 g/kg	A	+
FI b	0 g/kg	B	+
G0 Ia	0,1 g/kg	A	-
G0 Ib	0,1 g/kg	B	-
GI a	0,1 g/kg	A	+
GI b	0,1 g/kg	B	+
H0I a	0,15 g/kg	A	-
H0I b	0,15 g/kg	B	-
HI a	0,2 g/kg	A	+
HI b	0,2 g/kg	B	+
I0 a	0,2 g/kg	A	-

Fortsetzung Tab. 14: Chargen und Chargenkodierung für schnellgereifte schnittfeste Rohwürste

I 0 b	0,2 g/kg	B	-
I 1 a	0,2 g/kg	A	+
I 1 b	0,2 g/kg	B	+

- ohne Inokulum (Negativkontrolle)

+ mit Inokulum

3.12.3 Langgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-Salami)

Pro Kilogramm Rohmaterial wurden 350 Gramm Schweinefleisch (S 2), 350 Gramm Rindfleisch (R 2) und 300 Gramm Schweinefett (S 8) verwendet. Die Zusätze wurden wie unter Tabelle 8 angegeben verwendet.

Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde Natriumchlorid und Natriumnitrit in unterschiedlichen Mengen zugegeben (siehe Tab. 15).

Tab. 15: Verwendete Zusatzstoffe für langgereifte schnittfeste Rohwürste

Zusatzstoff	Menge pro kg Rohmaterial
Natriumchlorid	28 g (2,8 %)
	34 g (3,4 %)
Natriumnitrit	0 g (0 %)
	0,1 g (0,001 %)
	0,15 g (0,0015 %)
	0,2 g (0,002 %)

Technologie der Herstellung

Die Herstellung der langgereiften schnittfesten Rohwurst erfolgte analog der Produktion für eine schnellgereifte mit GdL produzierte Rohwurst (siehe 3.12.2) nur ohne GdL.

Reife- und Lagerungsbedingungen

Die Reifung und Lagerung der hergestellten Erzeugnisse erfolgte wie in Tabelle 16 beschrieben. Im Vergleich zu den kurz- bzw. schnellgereiften Rohwürsten wurde nur ein Reifeprogramm verwendet.

Tab. 16: Reife- und Lagerungsbedingungen für langgereifte schnittfeste Rohwürste

Reifung	Temperatur	Relative Luftfeuchte	Luftgeschwindigkeit
4 h	22 °C	40 – 50 %	-
24 h	24 °C	94 %	0,2 – 0,3 m/s
24 h	22 °C	92 %	0,3 – 0,4 m/s
24 h	20 °C	90 %	0,4 – 0,5 m/s
72 h	19 °C	88 %	0,3 – 0,4 m/s
	Lagerung		
2 d	17 °C	85 %	0,2 – 0,3 m/s
16 d	17 °C	85 %	0,01 – 0,05 m/s
60 d	17 °C	82 %	0,01 – 0,05 m/s

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen sowie die Auswahl der Zusatzstoffe und Reifebedingungen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Chargen und Chargenkodierung für langgereifte schnittfeste Rohwürste

Chargencode	Natriumnitrit	Natriumchlorid	Beimpfung
J0 Ia	0 g/kg	2,8 %	-
J0 Ib	0 g/kg	3,4 %	-
J Ia	0 g/kg	2,8 %	+
J Ib	0 g/kg	3,4 %	+
K0 Ia	0,1 g/kg	2,8 %	-
K0 Ib	0,1 g/kg	3,4 %	-
K Ia	0,1 g/kg	2,8 %	+
K Ib	0,1 g/kg	3,4 %	+
L0 Ia	0,15 g/kg	2,8 %	-
L0 Ib	0,15 g/kg	3,4 %	-
L Ia	0,15 g/kg	2,8 %	+
L Ib	0,15 g/kg	3,4 %	+
M0 Ia	0,2 g/kg	2,8 %	-

Fortsetzung Tab. 17: Chargen und Chargenkodierung für langgereifte schnittfeste Rohwürste

M0 lb	0,2 g/kg	3,4 %	-
M la	0,2 g/kg	2,8 %	+
M lb	0,2 g/kg	3,4 %	+

- ohne Inokulum (Negativkontrolle)

+ mit Inokulum

3.12.4 Schimmelpilzgereifte Rohwurst (Typ Edelschimmel-Salami)

Die Auswahl und Zusammenstellung des Ausgangsmaterials sowie der Zusätze erfolgte analog der Produktion für eine langgereifte Rohwurst (vgl. 3.12.3).

Technologie der Herstellung

Die Herstellung der schimmelpilzgereiften Rohwurst erfolgte wie bereits für die schnellgereifte mit GdL produzierte Rohwurst (siehe 3.12.2) beschrieben nur ohne GdL.

Reife- und Lagerungsbedingungen

Nach einer Angleichzeit von 4 Stunden wurden die hergestellten Rohwürste für 5 Sekunden in eine Edelschimmelpilz-Lösung (MEK-4) getaucht. Die Edelschimmelpilzkultur bestand aus einem gefriergetrockneten Konzentrat mit Dextrose (85 % +/- 5 %) und 5 % Magermilchpulver. Die anschließende Reifung erfolgte wie in Tabelle 18 aufgeführt.

Tab. 18: Reife- und Lagerungsbedingungen für schimmelpilzgereifte Rohwurst

Reifung	Temperatur	Relative Luftfeuchte	Luftgeschwindigkeit
4 h	22 °C	40 – 50 %	-
3 d	20 °C	92 %	0 – 0,01 m/s
4 d	18 °C	88 %	0,05 – 0,1 m/s
7 d	15 °C	85 %	0,1 – 0,2 m/s
7 d	15 °C	80 %	0,1 – 0,2 m/s
14 d	15 °C	75 %	0,1 – 0,2 m/s
7 d	15 °C	72 %	0,1 – 0,2 m/s
Zeit	Lagerung		
42 d	15 °C	72 %	0,01 – 0,05 m/s

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen sowie die Auswahl der Zusatzstoffe und Reifebedingungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Chargen und Chargenkodierung für schimmelpilzgereifte Rohwurst

Chargencode	Natriumnitrit	Natriumchlorid	Beimpfung
N0 Ia	0 g/kg	2,8 %	-
N0 Ib	0 g/kg	3,4 %	-
N Ia	0 g/kg	2,8 %	+
N Ib	0 g/kg	3,4 %	+
O0 Ia	0,1 g/kg	2,8 %	-
O0 Ib	0,1 g/kg	3,4 %	-
O Ia	0,1 g/kg	2,8 %	+
O Ib	0,1 g/kg	3,4 %	+
P0 Ia	0,15 g/kg	2,8 %	-
P0 Ib	0,15 g/kg	3,4 %	-
P Ia	0,15 g/kg	2,8 %	+
P Ib	0,15 g/kg	3,4 %	+
Q0 Ia	0,2 g/kg	2,8 %	-
Q0 Ib	0,2 g/kg	3,4 %	-
Q Ia	0,2 g/kg	2,8 %	+
Q Ib	0,2 g/kg	3,4 %	+

- ohne Inokulum (Negativkontrolle)

+ mit Inokulum

3.12.5 Luftgetrocknete Mettwurst – Hausmacher Art

Das Originalbrät wurde von einem Industriebetrieb angeliefert und bestand aus 670 Gramm Schweinefleisch (S 2) und 330 Gramm Fett (S 8). Die Zusätze wurden wie in Tabelle 20 angegeben bereits vom Hersteller dem Brät zugesetzt.

Tab. 20: Zusätze zur Herstellung von luftgetrockneter Mettwurst (Hausmacher Art)

Bestandteil	Menge pro kg Rohmaterial
Glucose	3 g (0,3 %)
Natriumchlorid	28 g (2,8 %)
Salamiwürzung	13 g (1,3 %)
Starterkultur	0,8 g (0,08 %)

Zusatzstoffe

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde zum einen ein natürlicher nitrathaltiger Nitritersatzstoff (NATASY S507) und zum anderen Natriumnitrit dem Brät zugegeben (siehe Tab. 21).

Tab. 21: Verwendete Zusatzstoffe für die Herstellung luftgetrockneter Mettwurst (Hausmacher Art)

Zusatzstoff	Menge pro kg Rohmaterial
NATASY S507	5 g (0,5 %)
Natriumnitrit	0,15 g (0,0015 %)

Starterkulturen

In den Versuchen wurde die Originalstarterkultur SM 181 der Firma Gewürzmüller verwendet.

Technologie der Herstellung

Das Zuschneiden, Wolfen und die Anlieferung der Rohmaterialien erfolgte durch den Produzenten am Tag vor der Herstellung der Mettwürste. Die Ausgangsmaterialien wurden bis zum nächsten Tag bei +4 °C gelagert. Das Inokulum (siehe 3.7.3) wurde dem Rohmaterial zugegeben und das so erhaltene Brät zur besseren Durchmischung mit der Keimsuspension 5-10 Runden gekuttert. Die unbeimpften Kontrollchargen wurden im Versuchsablauf zuerst hergestellt. Das Brät wurde anschließend in Naturdärme abgefüllt und wie in Tabelle 22 angegeben gereift.

Tab. 22: Übersicht der geprüften Reife- und Lagerungsbedingungen für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art)

Reifung	Temperatur	relative Luftfeuchte	Luftgeschwindigkeit
4 h	22 °C	40 – 50 %	0 m/s
30 h	24 °C	94 – 96 %	0,2 – 0,3 m/s
24 h	22 °C	90 – 91 %	0,4 m/s
24 h	18 °C	84 – 86 %	0,5 m/s
96 h	14 °C	74 – 76 %	0,5 – 0,6 m/s
Verpackung unter Schutzatmosphäre (70 % N, 30 % CO₂) und Lagerung			
28 d	17 °C	74 – 76 %	0 m/s

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen sowie die dazugehörigen Zusätze und Beimpfungen sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Chargen und Chargenkodierung für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art)

Chargencode	Zusatz	Beimpfung
R0 a	-	-
SI a	NATASY S507	-
TI a	Natriumnitrit	-
SII a	NATASY S507	2 log ₁₀ KbE/g
SII b	NATASY S507	4 log ₁₀ KbE/g
TII a	Natriumnitrit	2 log ₁₀ KbE/g
TII b	Natriumnitrit	4 log ₁₀ KbE/g

- ohne Inokulum, bzw. ohne Zusatz (Negativkontrolle)

3.12.6 Luftgetrocknete Mettwurst – Hausmacher Art mit optimierter Starterkultur

Die Herstellung, die Zugabe der Zusätze und die Reifung erfolgten wie bereits unter 3.12.5 beschrieben. In den Versuchen wurden unabhängig voneinander die Originalstarterkulturen SM 181 und die schneller absäuernde Startkulturen Tradi 320 Bactoferm® (siehe Tab. 24) verwendet. Die Zugabe der alternativen Starterkultur erfolgte in Kombination mit einer speziellen antilisteriellen Schutzkultur B-LC-20 Safe Pro®.

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen sowie die dazugehörigen Zusätze und Beimpfungen sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Chargen und Chargenkodierung für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art) mit optimierter Starterkultur

Chargencode	Zusatz	Starterkultur	Beimpfung
U0 a	-	SM 181	-
V0 b	-	Tradi 302/B-LC-20	-
WI a	NATASY S507	SM 181	-
WI b	NATASY S507	Tradi 302/B-LC-20	-
XI a	Natriumnitrit	SM 181	-
XI b	Natriumnitrit	Tradi 302/B-LC-20	-
WII a	NATASY S507	SM 181	2 log ₁₀ KbE/g
WII b	NATASY S507	Tradi 302/B-LC-20	2 log ₁₀ KbE/g
XII a	Natriumnitrit	SM 181	2 log ₁₀ KbE/g
XII b	Natriumnitrit	Tradi 302/B-LC-20	2 log ₁₀ KbE/g

- ohne Inokulum, bzw. ohne Zusatz (Negativkontrolle)

3.12.7 Herstellung langgereifter schnittfester Rohwurst (Typ Salami) unter Verwendung einer optimierten Temperaturführung

Die Auswahl und Zusammenstellung des Ausgangsmaterials sowie der Zusätze erfolgte analog der Produktion für eine langgereifte Rohwurst (vgl. 3.12.3)

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde ein natürlicher nitrathaltiger Nitritersatzstoff (NATASY S507) und parallel als Kontrollansatz Natriumnitrit dem Brät zugegeben (siehe Tab. 25).

Tab. 25: Verwendete Zusatzstoffe für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art) mit optimierter Starterkultur und optimierter Temperaturführung

Zusatzstoff	Menge pro kg Rohmaterial
NATASY S507	5 g (0,5 %)
Natriumnitrit	0,15 g (0,0015 %)

Starterkulturen

In allen Versuchen wurde die schnellensäuernde Starterkultur B-LC-20 Safe Pro® der Firma Chr. Hansen eingesetzt.

Technologie der Herstellung

Die Herstellung der langgereiften schnittfesten Rohwurst erfolgte analog der Produktion für eine schnellgereifte mit GdL produzierte Rohwurst (siehe 3.12.2).

Reife- und Lagerungsbedingungen

In den Versuchen wurde zum einen ein herkömmliches Reifeprogramm (A) mit einem alternativen Reifeverfahren (B) verglichen (siehe Tab. 26).

Tab. 26: Reife- und Lagerungsbedingungen für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art) mit optimierter Starterkultur und optimierter Temperaturführung

Reifung	Reifeprogramm A		Reifeprogramm B		Luftgeschwindigkeit
	Temperatur	relative Feuchte	Temperatur	relative Feuchte	
4 h	22 °C	40-50 %	22 °C	40-50 %	-
24 h	24 °C	94 %	20 °C	94 %	0,2-0,3 m/s
24 h	22 °C	92 %	18 °C	92 %	0,3-0,4 m/s
24 h	20 °C	90 %	18 °C	90 %	0,4-0,5 m/s
72 h	18 °C	88 %	18 °C	85 %	0,3-0,4 m/s
24 h	18 °C	85 %	18 °C	83 %	
	Lagerung bis zum Tag 42				
	17 °C, 83 % relative Feuchte und 0,05 – 0,1 m/s Luftgeschwindigkeit				

Chargenkodierung

Die Kodierung aller Versuchschargen sowie die Auswahl der Zusatzstoffe und Reifebedingungen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tab. 27: Chargen und Chargenkodierung für luftgetrocknete Mettwurst (Hausmacher Art) mit optimierter Starterkultur und optimierter Temperaturführung

Chargencode	Zusatz	Reifeprogramm	Beimpfung
Y0 a	-	A	-
Z0 b	-	B	-
AAI a	NATASY S507	A	-
AAI b	NATASY S507	B	-
ABI a	Natriumnitrit	A	-
ABI b	Natriumnitrit	B	-
ACII a	NATASY S507	A	2 log ₁₀ KbE/g
ACII b	NATASY S507	B	2 log ₁₀ KbE/g
ADII a	Natriumnitrit	A	2 log ₁₀ KbE/g
ADII b	Natriumnitrit	B	2 log ₁₀ KbE/g

- ohne Inokulum, bzw. ohne Zusatz (Negativkontrolle)

3.13 Mikrobiologische Untersuchungen

Für die Challengeuntersuchungen wurde ausschließlich Rohmaterial mit Gesamtkeimzahlen < 10³ KbE/g verwendet und die Qualität jeweils vor Versuchsbeginn mikrobiologisch abgesichert. Für die Untersuchungen zur Wirksamkeit unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen wurden zu jedem Probennahmezeitpunkt (Tag 0, 1, 3, 6, 13, 20, 28 bzw. 42, 56 und 84) jeweils drei Würste eines Ansatzes untersucht und die Medianwerte inkl. Standardabweichung bestimmt. Bei den Analysen zur Wirksamkeit von pflanzlichen Nitritersatzstoffen erfolgte die Probennahme abweichend an den Tagen 0, 1, 3, 6, 13 und 42. Die mikrobiologischen Begleituntersuchungen umfassten die aerobe mesophile Keimzahl (GKZ), die Pseudomonaden-, *Enterobacteriaceae*- und Milchsäurebakterienkeimzahl.

3.13.1 Aerobe mesophile Keimzahl, Pseudomonaden-, *Enterobacteriaceae*- und Milchsäurebakterienkeimzahl

Von jedem Rohwurst-Produkt wurden jeweils drei Würste untersucht. Von diesen wurden 25 Gramm in sterile Stomacherbeutel eingewogen und mit 225 ml steriler, physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und homogenisiert. Nach Anlegen einer dezimalen Verdünnungsreihe wurden für die Bestimmung der aeroben mesophilen Keimzahl jeweils 0,1 ml der Erstverdünnung bzw. der entsprechenden Verdünnungsstufe auf Standard I Agar ausgespatelt und für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Die *Enterobacteriaceae*- Keimzahl wurde auf DHL-Agar nach 24 h bei 37 °C und die Milchsäurebakterien-Anzahl auf MRS-Agar nach 48 h bei 30 °C bestimmt. Der Nachweis von Pseudomonaden wurde mit Hilfe der Cytochromoxidase-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden die auf DHL-Agar gewachsenen Kolonien mit Nadi-Reagenz benetzt. Kolonien, die nach ca. 1 min eine gleichmäßig tiefblaue Farbe aufwiesen, wurden als Pseudomonaden gezählt. Die Berechnung der Keimzahl der eingepflichten Stämme sowie die Zahl aerober Milchsäurebakterien und der aeroben mesophilen Keimzahl erfolgte wie unter der Methode L 06.00 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB Punkt 8 beschrieben.

3.13.2 Nachweis von *Salmonella* spp.

Kultureller Nachweis

Der Nachweis der inokulierten Salmonellen erfolgte jeweils im Dreifachansatz (3 Würste) mit kulturellen und molekularbiologischen Methoden. Beim kulturellen Nachweis nach DIN EN ISO 6579:2003 wurden 25 g Probe, sowohl aus der Wurstmitte als auch aus dem Randbereich entnommen und in einen Stomacherbeutel mit Seitenfilter überführt. Anschließend wurde die Probe zwei Minuten in einem Stomacher mit 225 ml 0,85 % -iger Kochsalzlösung homogenisiert. Das Homogenat wurde auf XLD- und DHL-Agar ausgespatelt. Bei Keimzahlen unter 10 KbE/g wurden 25 g Probe in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (+ FerriOx) bei 37 °C für 18 Stunden angereichert und aus dieser Voranreicherung 0,1 ml in RVS-Bouillon für weitere 24 Stunden bei 41 °C angereichert, bevor Verdünnungsausstriche auf XLD- und DHL-Agar folgten. Die Anreicherung der Proben erfolgte jeweils nur bei Keimzahlen <10 kbE/g. Parallel zur selektiven Anreicherung wurde zur Bestätigung des Ergebnisses auch ein molekularbiologischer Nachweis durchgeführt.

Molekularbiologischer Nachweis

Für den genotypischen Nachweis von *Salmonella enterica* wurden die Proben nach einer von Miko et al. (2000) modifizierten Methode nach Rahn et al. (1992) auf das Vorliegen des *invA*-Gens untersucht. Für die DNA-Extraktion wurde 1 ml des inkubierten Voranreicherungsmediums für 15 min bei 100 °C erhitzt, durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 8000 rpm Zellbruchstücke von der genomischen DNA getrennt, 5 µl des Überstandes entnommen und dem Ansatz für die PCR (siehe Tabelle 28) zugegeben.

Tab. 28: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm zum Nachweis des *invA*-Gens in *Salmonella* spp.

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
37, 78 µl Aqua bidest	<u>Denaturierung:</u>
5 µl Puffer (Mg-frei)	5 min 95 °C
0,65 µl MgCl ₂	<u>Amplifikation: 25 Zyklen</u>
0,8 µl dNTP-Mix	70 sec 90 °C
0,075 µl Primer 139	100 sec 60 °C
0,075 µl Primer 141	102 sec 72 °C
0,625 µl Polymerase	<u>Renaturierung:</u>
5 µl genomische DNA	7 min 72 °C

Nach dem Ablauf des Cyclerprogrammes (vgl. Tab. 29) wurden die Amplifikate mit je 5 µl Gel-Loading-Puffer gemischt, 10 µl einer Probe auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese elektrophoretisch getrennt (125 V, 45 min). Je Gel wurden zwei Positivkontrollen und der Molecular Weight Marker XIII, je Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach Färben der Gele in Ethidiumbromidlösung wurden die Laufbanden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein spezifisches Amplifikat (284 Basenpaare) auf Höhe der Positivkontrolle galt als positiver *Salmonella*-Nachweis. Als Positivkontrolle diente ein Pool von Stämmen der Serovaritäten *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Infantis.

Um falsch negative Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren auszuschließen, wurden für alle Proben externe Amplifikationskontrollen mitgeführt (siehe Tabelle 29).

Tab. 29: Reaktionsansatz für die Amplifikationskontrolle

PCR-Reaktionsansatz	PCR-Cyclerprogramm
16, 60 µl Aqua bidest	<u>Denaturierung:</u>
3,13 µl Puffer (Mg-frei)	5 min 95 °C
0,60 µl MgCl ₂	<u>Amplifikation: 25 Zyklen</u>
2,0 µl dNTP-Mix	30 sec 95 °C
0,1 µl Primer HB 10	30 sec 65 °C
0,1 µl Primer HB 11	60 sec 72 °C
0,2 µl Taq-Polymerase	<u>Renaturierung:</u>
1 µl puC 19 DNA	7 min 72 °C

Ein spezifisches Amplifikat auf Höhe der Positivkontrolle (429 Basenpaare) galt als Bestätigung für eine nicht inhibierte PCR.

3.13.3 Nachweis von shigatoxinbildenden *Escherichia coli*

Kultureller Nachweis

Für den kulturellen Nachweis wurden 25 g Probe mit 225 ml einer 0,85 %-igen Kochsalzlösung zunächst homogenisiert und das Homogenisat parallel auf SMAC- und DHL-Agar ausgespatelt. Bei Keimzahlen unter 10 KbE/g wurden 25 g Probenmaterial zunächst 18 Stunden bei 37 °C in 225 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) angereichert und anschließend 1,0 ml der Suspension in 4 ml steriler TSB mit Zusatz von 10 mg Novobiocin/l erneut für 16 Stunden bei 180 rpm angereichert.

Nachfolgend wurden Verdünnungsstufen auf SMAC ausplattiert und bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden verdächtige Kolonien von den SMAC und DHL Nährböden (37 °C, 24 h) abgenommen und auf einem chromogenen Medium (Fluorocult) für 24 Stunden bei 30 °C subkultiviert. β-D-Glucuronidase-positive Kolonien wurden als *Escherichia coli* gewertet. Parallel dazu erfolgte der molekularbiologische Nachweis.

Molekularbiologischer Nachweis

Für den genotypischen Nachweis von STEC/EHEC wurden die Proben nach einer von Cebula et al. (1995) modifizierten Methode nach Schmidt et al. (1994) auf die Fähigkeit zur Shigatoxinbildung (*stx 1*- und *stx 2*-Gen), in Anlehnung an die Methode L07.18-1 der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB, untersucht.

Von den Anreicherungen wurden 0,2 ml Zellmaterial entnommen und in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung in einem 2 ml Eppendorfgefäß suspendiert. Die Suspension wurde 10

Minuten bei 100 °C gekocht. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Jeweils 1 µl des Überstandes wurde in einem folgenden Schritt den Reaktionsansätzen (siehe Tab. 30 und 31) zugegeben. In zwei separaten PCR-Ansätzen wurden sowohl das *stx 1*- als auch das *stx 2*-Gen nachgewiesen.

Tab. 30: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm zum Nachweis des *stx 1*-Gens in STEC/EHEC

PCR-Reaktionsansatz		PCR-Cyclerprogramm
20,25 µl	Aqua bidest	<u>Denaturierung:</u> 5 min 94 °C <u>Amplifikation: 30 Zyklen</u> 30 sec 94 °C 60 sec 52 °C 40 sec 72 °C <u>Renaturierung:</u> 5 min 72 °C
2,5 µl	Puffer (blau)	
0,50 µl	dNTP-Mix	
0,25 µl	Primer KS 7	
0,25 µl	Primer KS 8	
0,25 µl	Polymerase DyNAzyme II	
1 µl	genomische DNA	

Tab. 31: Reaktionsansatz und Cyclerprogramm zum Nachweis des *stx 2*-Gens in STEC/EHEC

PCR-Reaktionsansatz		PCR-Cyclerprogramm
20,25 µl	Aqua bidest	<u>Denaturierung:</u> 5 min 94 °C <u>Amplifikation: 30 Zyklen</u> 90 sec 94 °C 90 sec 64 °C 90 sec 72 °C <u>Renaturierung:</u> 5 min 72 °C
2,5 µl	Puffer (blau)	
0,50 µl	dNTP-Mix	
0,25 µl	Primer LP 43	
0,25 µl	Primer LP 44	
0,25 µl	Polymerase DyNAzyme II	
1 µl	genomische DNA	
1 µl	Aqua bidest. für Negativkontrolle	

Nach Ablauf des Cyclerprogrammes (siehe Tab. 30 und 31) wurden den Amplifikaten je ca. 4 µl Gel-Loading-Puffer zugesetzt. Jeweils 10 µl der Proben-Puffer Mischung wurden unter Mitführung des Molecular Weight Markers XIII in einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (125 V, 45 min), mit Ethidiumbromidlösung gefärbt, in Aqua dest. gewaschen und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als positiv wurden Amplifikate bewertet, die sich auf Höhe der Positivkontrolle (*E. coli* E 134 - ATCC 35150) befanden, also im Fall von *stx 1* 285 bp und im Fall von *stx 2* 584 bp hatten.

3.13.4 Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Kultureller Nachweis

Den Rohwürsten wurden unter sterilen Bedingungen 10 g Probenmaterial entnommen und zusammen mit 90 ml gepuffertem Peptonwasser für zwei Minuten im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurde die Keimsuspension zur Wiederbelebung geschädigter Zellen, analog zur Methode L 00.00-22 der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, für eine Stunde stehen gelassen.

Die Keimzahlbestimmung von *L. monocytogenes* erfolgte auf Palcam-Medium und parallel dazu auf Chromogen-*Listeria*-Agar (ALOA). Zur Keimzählung wurden jeweils dezimale Verdünnungsreihen angelegt, die Verdünnungsstufen auf Palcam- und Chromogen-*Listeria*-Agar ausgespatelt und die Agarplatten für 48 Stunden bei 37 °C aerob bebrütet. Sowohl vom Palcam- als auch vom Chromogen-*Listeria*-Agar wurden die charakteristischen Kolonien ausgezählt. Je Untersuchungstag wurden jeweils vier verdächtige Kolonien der niedrigst auswertbaren Verdünnungsstufe auf Standard I-Agar subkultiviert und zur Kontrolle bestätigt.

Zur Bestätigung wurden die HENRY'sche Beleuchtung und der CAMP-Test durchgeführt (Seeliger und Jones, 1986; Hammer, 2000) sowie das Hämolyseverhalten und die Rhamnose- sowie die Xyloseverwertung überprüft (Seeliger und Jones, 1986).

Da in den Untersuchungen die Keimzahlen nicht unter den von 10 KbE/g sanken, wurde keine Anreicherung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung von Natriumnitrit – *in Vitro* Untersuchungen

Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation sollte unter *in Vitro* Bedingungen das Verhalten von *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (STEC) und *Listeria monocytogenes* unter verschiedenen Milieubedingungen mit bzw. ohne Zusatz von Natriumnitrit untersucht werden. Die a_w -Werte wurden im Flüssigmedium durch unterschiedliche NaCl-Gehalte eingestellt.

4.1.1 *Salmonella* spp.

4.1.1.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und a_w -Werten von 0,99, 0,975 und 0,965 wurde in den Ansätzen mit 0, 100, 150 und 200 mg/l Nitrit ein vergleichbares Wachstum nachgewiesen. Innerhalb von 24 h bzw. 48 h konnten in den Röhrcchen Keimzahlen von 8 \log_{10} KBE/ml nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Mit abnehmendem a_w -Wert wurde eine Verlängerung der lag-Phase festgestellt. Bis zum Tag 7 blieben die Keimzahlen anschließend in allen Ansätzen bei ca. 8 \log_{10} KBE/ml stabil (siehe, Abb. 7 und Anhang Abb. 8).

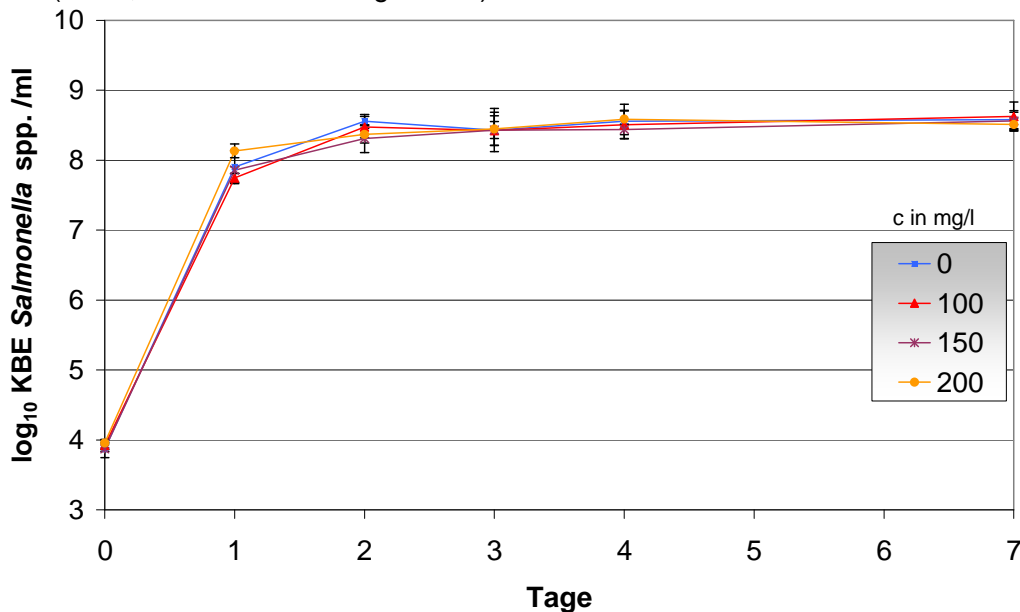


Abb. 7: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,975; die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Die Ergebnisse, die durch Ermittlung der Keimzahl erzielt wurden, wurden durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt. Innerhalb der ersten 20

Stunden fielen die Redoxkurven steil ab und zeigten unabhängig von der eingesetzten Nitritmenge zunächst einen fast identischen Verlauf bis zu einem Redoxpotentialwert von -200 bis -300 mV (Relativwerte). Nach 48 Stunden lagen die relativen Werte in den Ansätzen mit den niedrigsten Nitritkonzentrationen bei ca. 350 mV und bei denen mit 200 mg/l bei ca. 270 mV. Die Kontrolle ohne Nitrit erreichte bei allen getesteten a_w -Werten ein relatives Redoxpotential von < -400 mV (siehe Abb. 9).

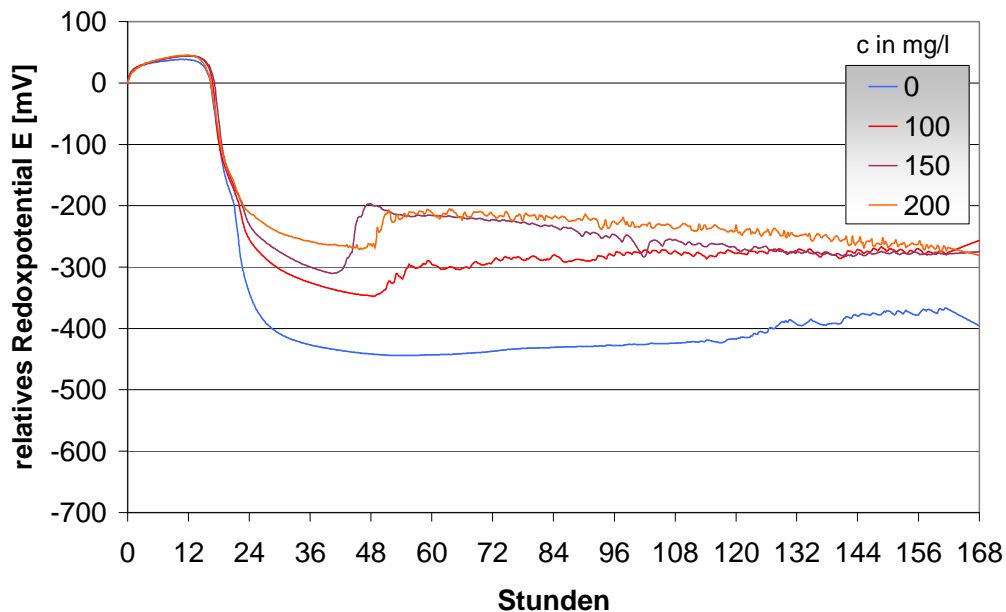


Abb. 9: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Natriumnitrit c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf bei *Salmonella spp.* bei pH 7, a_w : 0,975, 25 °C in Peptonwasser; die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus der Messung von Dreifachansätzen.

Während der Vermehrung der Salmonellen konnte in den Ansätzen bei pH 7 und a_w : 0,975 in den ersten 24 Stunden ein pH-Wertabfall von 7 auf ca. 6,8 beobachtet werden. Im weiteren Verlauf stieg der pH-Wert an und erreichte nach 7 Tagen in allen Röhrcchen Werte von ca. 8 (siehe Anhang Abb.10). Bei einem a_w -Wert von 0,965 wurden nach 7 Tagen pH-Werte von 7,28 -7,36 gemessen (Anhang Abb. 11).

In den Ansätzen mit 100 mg Nitrit/l wurden am Tag 7 noch 15 mg/l und in solchen mit 150 bzw. 200 mg/l noch Konzentrationen zwischen 30 und 40 mg/l detektiert (siehe Anhang Abb.12).

Bei einem pH-Wert von 6 wurde bis zu einem a_w -Wert von 0,975 kein antimikrobieller Einfluss auf die inkubierten Salmonellen beobachtet. Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 wurde innerhalb der ersten 48 Stunden eine Hemmung des Salmonellen-Wachstums in den Röhrcchen mit Natriumnitrit festgestellt (siehe Abb.13). So wurden in den Röhrcchen ohne Nitrit Keimzahlen

von annähernd $7,8 \log_{10}$ KBE/ml nach 48 h erreicht, während dieses in den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/l erst nach 72 Stunden dokumentiert werden konnte.

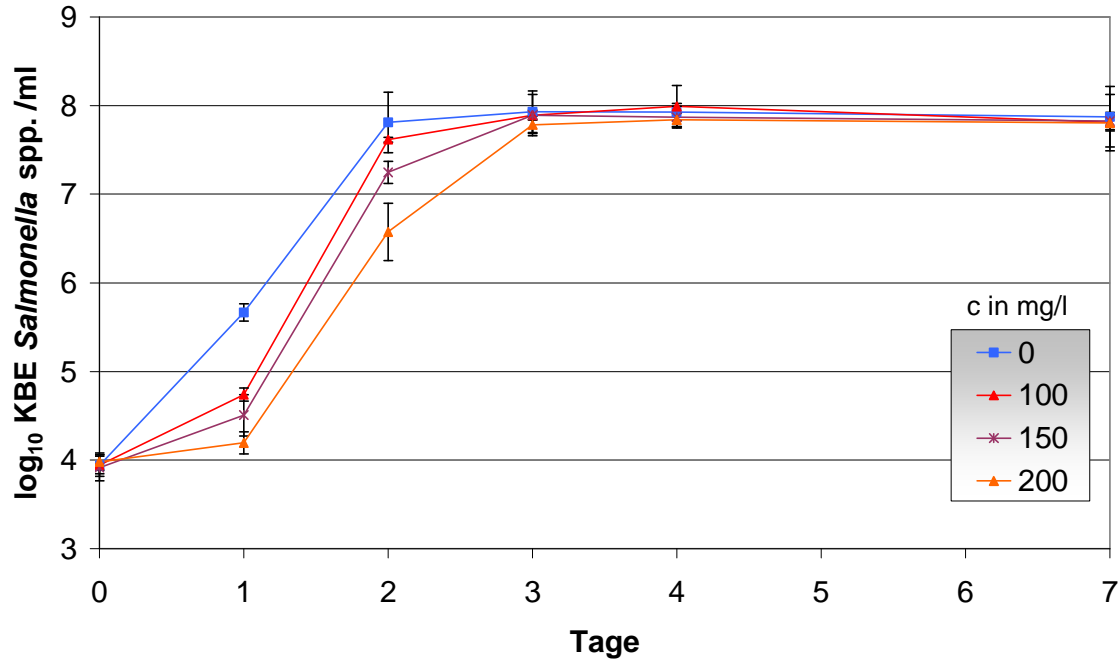


Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,965; die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Die Messung des relativen Redoxpotentials bestätigte die Ergebnisse der Keimzahlmessung (siehe Anhang Abb. 14). Hier wurde zum einen zuerst eine Abnahme des relativen Redoxpotential in den Röhrchen ohne Nitrit dokumentiert und zum anderen konnten in diesen die niedrigsten Redoxwerte dokumentiert werden (siehe Anhang Abb.14).

Der pH-Wert stieg in dieser Versuchsreihe innerhalb von 7 Tagen von 6 auf 6,3 an. Dabei stieg der pH-Wert zuerst in den Ansätzen, in denen mit 0 und 100 mg/l die geringsten Nitritkonzentrationen zugesetzt wurde (siehe Anhang Abb. 15).

Die Natriumnitritkonzentration nahm während der 7-tägigen Untersuchung kontinuierlich ab. In den Ansätzen mit 100 mg Natriumnitrit/l wurden am Tag 7 ca. 20 mg/l und in solchen mit 200 mg/l ca. 45 mg Natriumnitrit/l nachgewiesen (Anhang Abb.16).

Bei einem pH-Wert von 5 wurde in keinem der Ansätze mit Natriumnitrit ein Wachstum der Salmonellen festgestellt. Stattdessen konnte eine deutliche Abnahme der Salmonellen beobachtet werden (siehe Abb.17). Dabei wurde festgestellt, dass in den Ansätzen mit 200 mg

Nitrit/l die Keimzahl schneller sank, als in denen mit 0 oder 100 mg Nitrit/l. Nach 7 Tagen konnten in diesen Ansätzen auch nach Anreicherung keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden.

Das Absterben der eingesetzten Keime wurde auch durch die parallele Erfassung der mikrobiellen Aktivität bestätigt. So konnte eine Abnahme des relativen Redoxpotentials nur in der Kontrolle ohne Nitrit festgestellt werden. Nach 24 Stunden wurde hier ein Wert von ca. -700 mV (siehe Anhang Abb.18) und eine Zunahme der Keimzahl um 3 Zehnerpotenzen (siehe Abb.17) registriert.

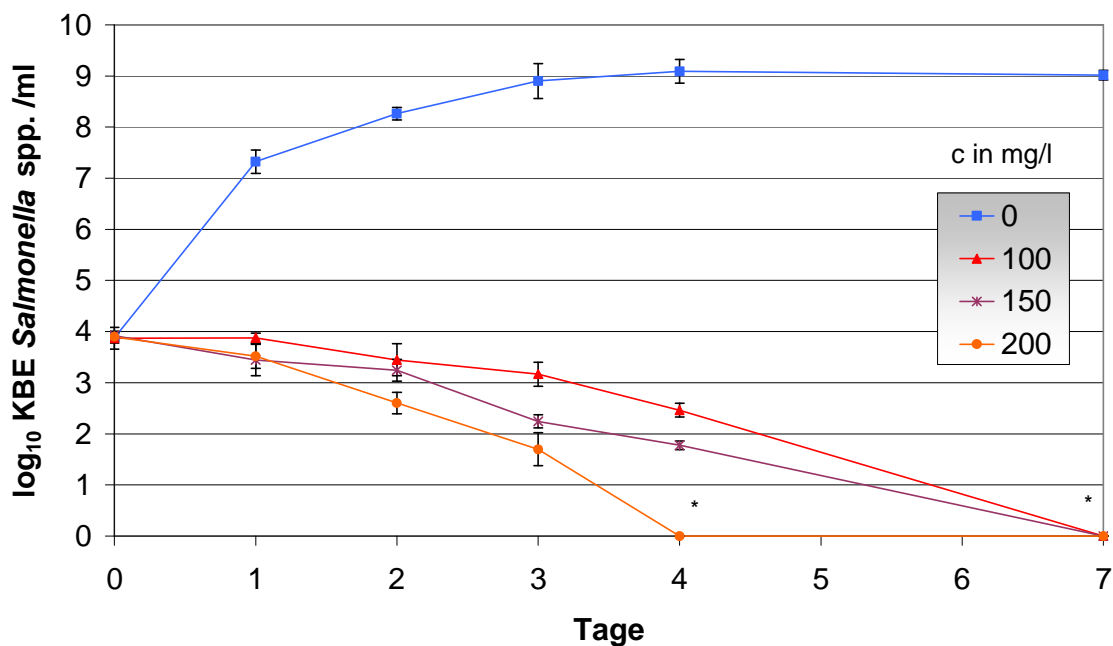


Abb. 17: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum KbE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,99; die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich

Der pH-Wert der Negativkontrolle stieg innerhalb von zwei Tagen von 5 auf Werte über 5,8 und erreichte am Tag 7 den Wert von 6,7 (siehe Anhang Abb. 19). In den Röhrcchen mit Natriumnitrit blieb der pH-Wert nahezu unverändert und erreichte nach 7 Tagen Werte von annähernd 4,9 (siehe Anhang Abb. 19).

Die Nitritkonzentration nahm in allen Ansätzen ab. Am Tag 7 wurden in den Röhrcchen Natriumnitritkonzentrationen zwischen 20 mg/l (Ansatz mit 100 mg/l) und 40 mg/l (Ansatz mit 200 mg/l) nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 20).

4.1.1.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Analog zu den Untersuchungen bei 25 °C (vgl. 4.1.1.1) war kein hemmender Einfluss des Natriumnitrits, bei einem pH-Wert von 7 feststellbar (siehe Anhang Abb. 21).

Bei pH-Wert 6 verlängerte sich in Ansätzen mit Natriumnitrit im Vergleich zur Kontrolle mit 0 mg Nitrit/l die elektronische lag-Phase der Salmonellen im Schnitt um 72 Stunden und es wurden deutlich niedrigere Keimzahlen gemessen (siehe Anhang Abb. 22). Bei Wasseraktivitätswerten von 0,965 konnte im Medium für die Ansätze mit 150 mg und 200 mg Natriumnitrit/l keine Vermehrung festgestellt werden (siehe Abb. 23). Die Keimzahl blieb in diesen Röhrchen bis zum Tag 7 konstant im Bereich von 3 bis 4 \log_{10} KbE/ml. Eine Zunahme der Zelldichte auf 7 \log_{10} KbE/ml konnte nur in der Negativkontrolle beobachtet werden (siehe Abb. 23). Um 48 Stunden verzögert stieg die Zahl der Salmonellen im Medium mit 100 mg Nitrit/l an und erreichte nach 7 Tagen Werte um 5,7 \log_{10} KbE/ml (siehe Abb. 23).

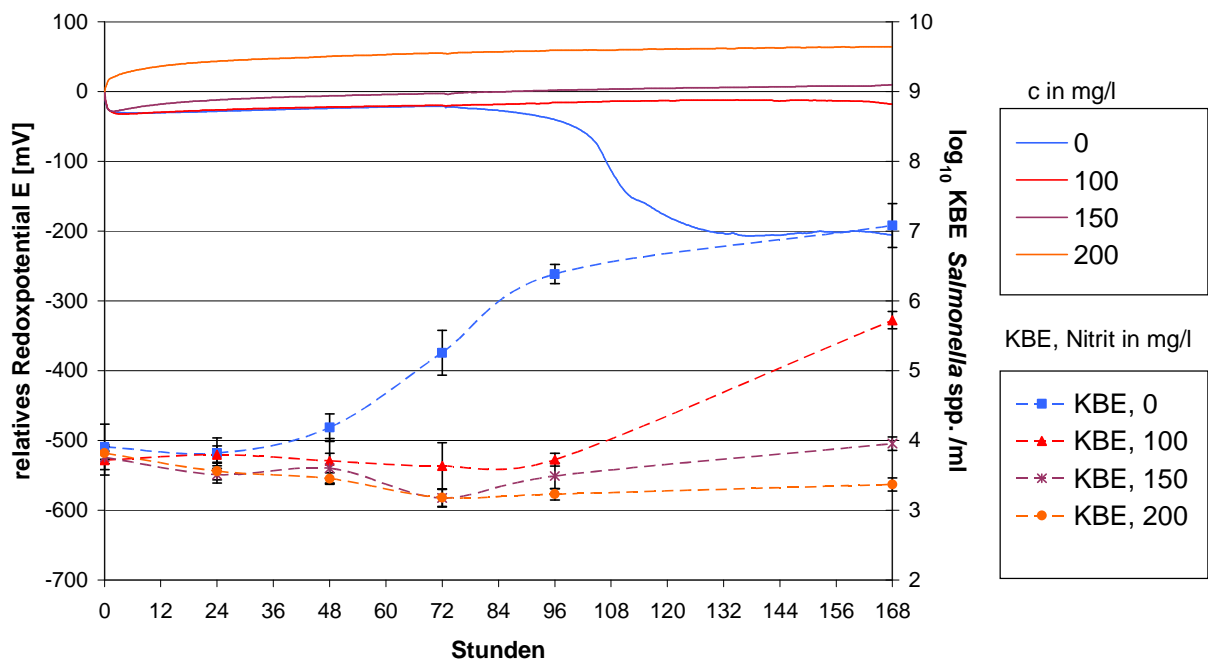


Abb. 23: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,965; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Bei einem pH-Wert von 5 und a_w -Werten von 0,99, 0,975 und 0,965 war kein Wachstum der mit Nitrit inkubierten Organismen zu beobachten. Dabei nahm die Keimzahl in den Ansätzen mit 150 mg und 200 mg Nitrit/l schneller ab als in denen mit 100 mg/l (siehe Abb. 24).

In der Kontrolle mit 0 mg/l wurde bei a_w -Werten von 0,99 und 0,975 während der 7-tägigen Untersuchung eine leichte Zunahme der Salmonellen um 2 bis 3 Zehnerpotenzen beobachtet (siehe Abb. 24).

Bei pH 5 und einer Wasseraktivität von 0,965 wurde in keinem Ansatz ein Wachstum der Salmonellen nachgewiesen. Die beobachtete Absterbekinetik war in den Röhren mit 150 mg/l und 200 mg/Natriumnitrit/l am ausgeprägtesten. Ein Nachweis von *Salmonella* spp. am Tag 7 war nur in der Negativkontrolle und den Röhren mit 100 mg/l möglich (siehe Anhang Abb. 25).

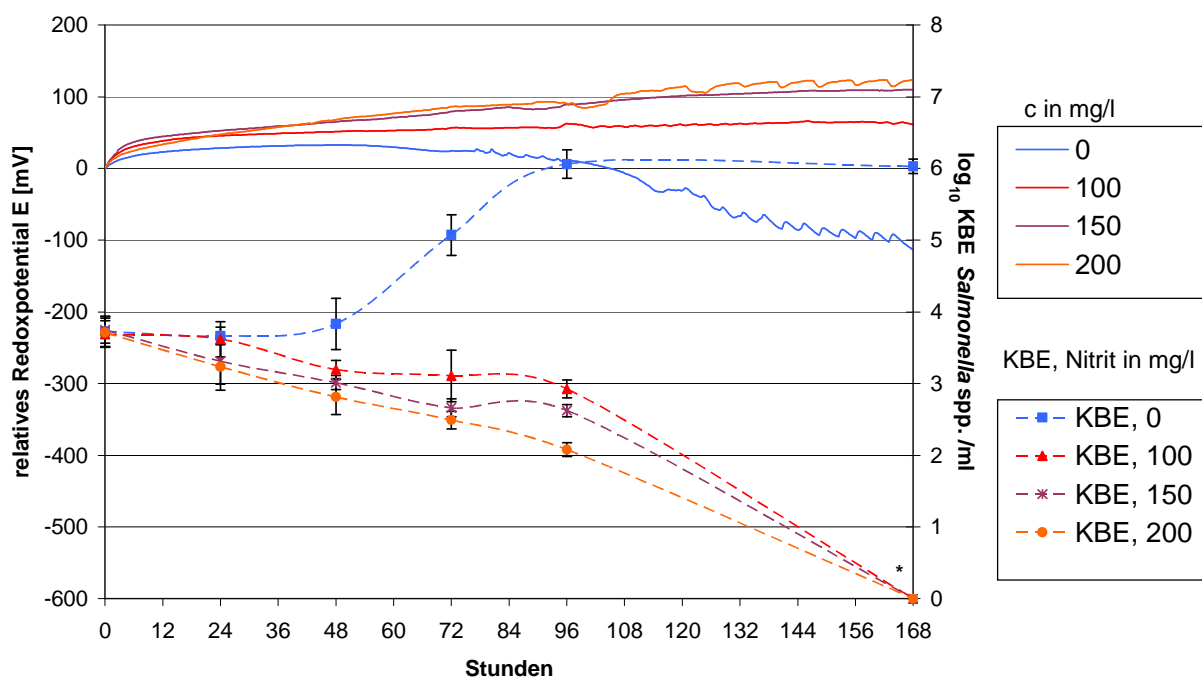


Abb. 24: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum KbE/ml von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,975; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich

Die Ergebnisse der Keimzählung konnten durch die parallele Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt werden, da ein leichter Abfall des relativen Redoxpotentials nur in den Röhren ohne Nitrit gemessen werden konnte (vgl. Abb. 24). In den Ansätzen mit Nitrit blieb das Redoxpotential konstant bzw. stieg leicht auf Werte um + 100 mV an (siehe Abb. 24)

Der pH-Wert stieg während des Beobachtungszeitraumes in der Kontrolle ohne Nitrit auf Werte von 5,6 an. In den Röhrchen mit Natriumnitrit blieb der pH-Wert konstant und lag bis zum Tag 7 zwischen 4,8 und 4,9 (siehe Abb. 26).

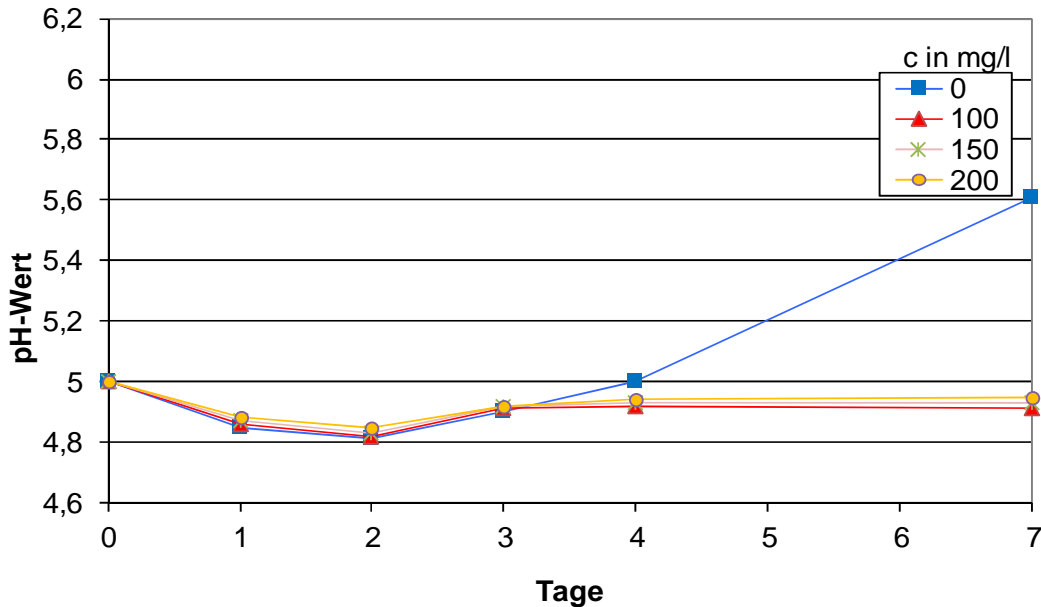


Abb. 26: Verlauf der pH-Werte in Peptonwasser mit unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,975.

Die Natriumnitritkonzentrationen nahmen stark ab und erreichten am Tag 7 in den Röhrchen Werte zwischen 25 mg/l (Ansatz mit 100 mg/l) und 45 mg/l (Ansatz mit 200 mg/l) (vgl. Abb. 27).

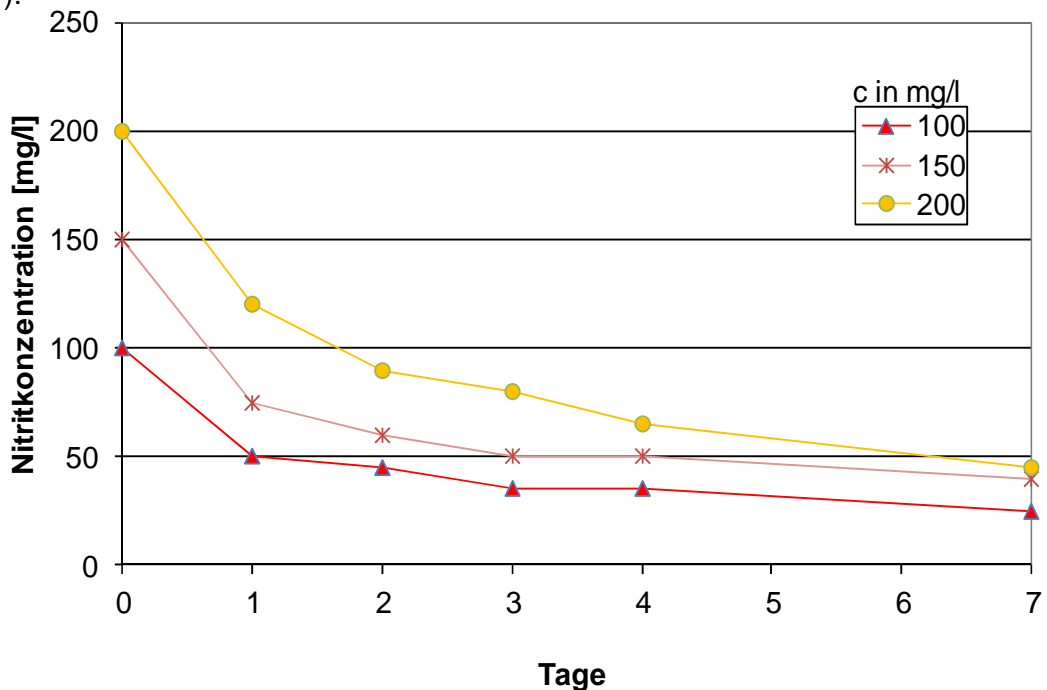


Abb. 27: Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen in Peptonwasser mit unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,975.

4.1.1.3 Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_W -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 zeigte sich, dass Natriumnitrit bei a_W -Werten von 0,99, 0,975, 0,965 und einer hohen Anfangskeimzahl zwischen 6,3 und 7 \log_{10} KbE/ml keinen Einfluss auf das Wachstum von *Salmonella* spp. hatte (siehe Anhang Abb. 28). Die Keimzahlverläufe entsprachen denen der Kontrolle ohne Nitrit und erreichten nach 7 Tagen Werte über 8 \log_{10} KbE/ml. Bei einer Absenkung des pH-Wertes auf 6 in Kombination mit einem erniedrigten a_W -Wert von 0,965 traten Unterschiede bei den verwendeten Temperaturen auf (vgl. Anhang Abb. 28 und Abb. 29). Bei 25 °C wurde zwischen den Ansätzen mit 0 mg Nitrit/l und denen mit 100, 150 und 200 mg/l kein Unterschied im Wachstumsverhalten beobachtet. Bei 17 °C wurde bei pH 6 eine Hemmung des mikrobiellen Wachstums beobachtet. In der Kontrolle ohne Nitrit wurden bereits nach 72 Stunden Keimzahlen von 7,8 \log_{10} KbE/ml und in denen mit Nitrit erst nach 7 Tagen erreicht (vgl. Anhang Abb. 29).

Bei einem pH-Wert von 5 wurde bei Wasseraktivitätswerten von 0,99, 0,975 und 0,965 eine Hemmung der Salmonellen durch den Zusatzstoff Natriumnitrit festgestellt. Im Vergleich zur Kontrolle nahm die Zahl der Salmonellen mit zunehmender Nitritkonzentration ab. Am Tag 7 konnten in den Röhrchen mit 150 und 200 mg Nitrit/l keine Salmonellen mehr nachwiesen werden. Diese Beobachtung war bei einer Temperatur von 25 °C ausgeprägter als bei 17 °C (siehe Abb. 30 und Anhang Abb. 31).

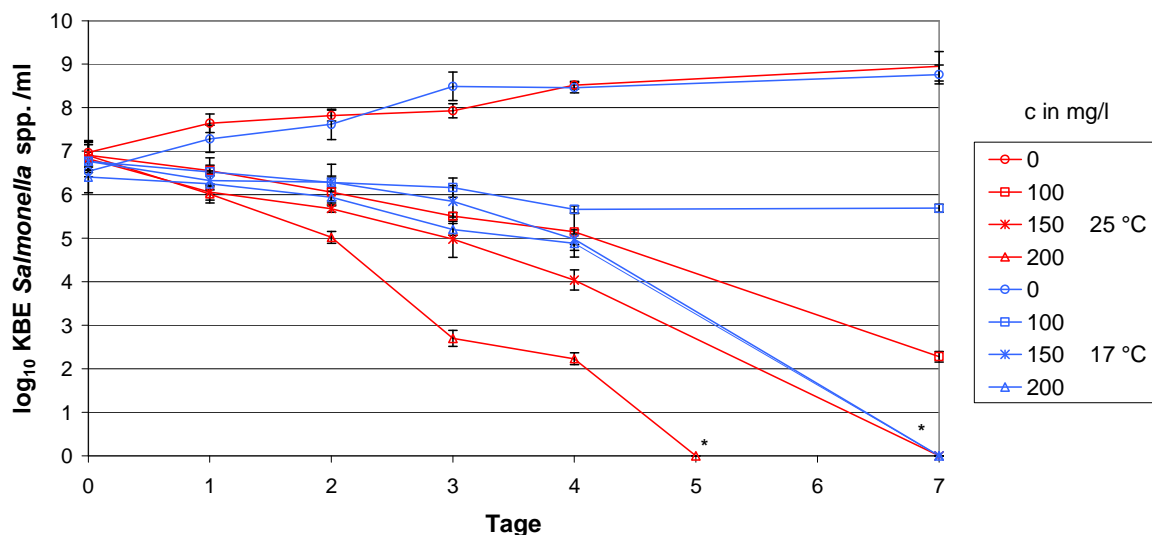


Abb. 30: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei pH 5 und a_W : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l); die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich

4.1.2 Shigatoxinbildende *Escherichia coli*

4.1.2.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_W-Werten

Natriumnitrit hatte bei einem pH-Wert von 7 und a_W-Werten von 0,99 keinen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von shigatoxinbildenden *Escherichia coli*. Die Keimzahl- und die Redoxpotentialverläufe entsprachen denen der Kontrolle ohne Nitrit (siehe Anhang Abb. 32).

Bei einem a_W-Wert von 0,975 wurde eine Verlängerung der lag-Phase um ca. 24 Stunden beobachtet. Nach 4 Tagen wurden in allen Ansätzen annähernd gleiche Keimzahlen von zwischen 8 und 8,5 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen (siehe, Abb.33).

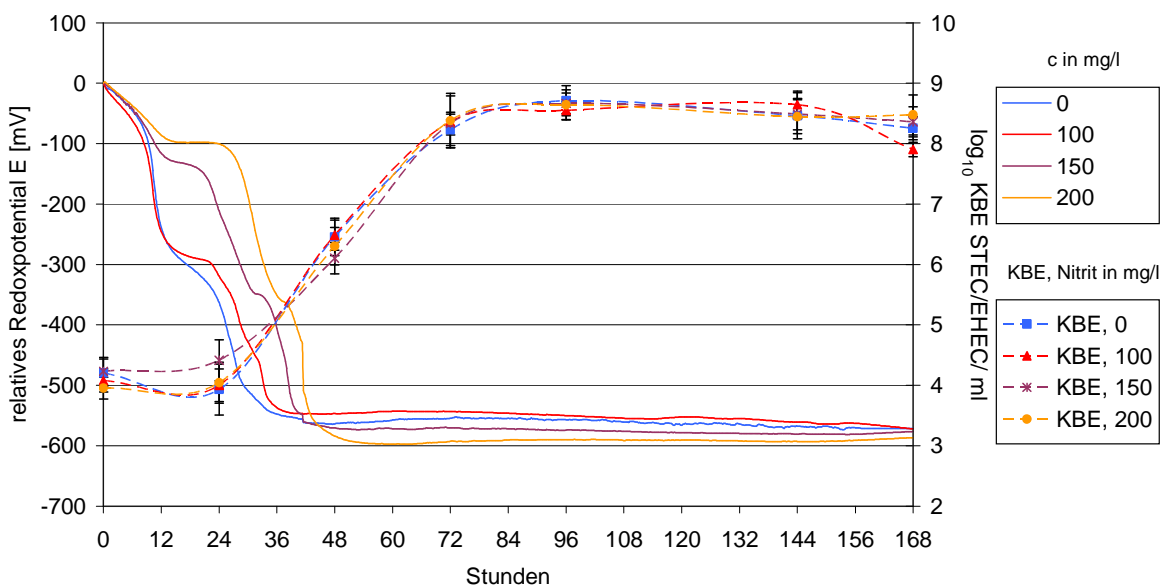


Abb.33: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_W: 0,975; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Im Vergleich zur Messung der Keimzahl konnten durch die Erfassung des relativen Redoxpotentials Unterschiede zwischen den Ansätzen mit 0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/l festgestellt werden. Innerhalb der ersten 12 Stunden fielen die Redoxkurven ab und zeigten unabhängig von der eingesetzten Nitritmenge einen fast identischen Verlauf bis zu einem Redoxpotentialwert von -100 mV (Relativwerte). Anschließend konnte in den Ansätzen mit 150 mg/l und 200 mg Nitrit /l die Ausbildung einer kurzen Plateauphase beobachtet werden, während im Vergleich die Kurven mit 0 und 100 mg Nitrit /l weiter abnahmen. Nach 48 Stunden lagen die relativen Redoxwerte in allen Ansätzen zwischen -550 und -600 mV (siehe Abb. 33).

Bei einem a_w -Wert von 0,965 und einem pH-Wert von 7 wurde zunächst in allen Ansätzen eine deutliche Abnahme der Keimzahl detektiert (siehe Anlage Abb. 34), so dass am 2. Untersuchungstag ein direkter Nachweis der Bakterien nicht mehr möglich war. Am Tag 4 stiegen die Keimzahlen in den Röhren mit 0 und 100 mg Nitrit/l wieder an und erreichten am Tag 7 Keimzahlen von $8 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 34).

Der pH-Wert sank in allen Ansätzen bis zu einem Wasseraktivitätswert von 0,975 gleichmässig innerhalb von 4 Tagen auf Werte um 6,4 ab. Die Abnahme war unabhängig von den eingesetzten Nitritkonzentrationen (siehe Anhang Abb. 35). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 sank der pH-Wert in den Röhren mit 0 und in denen mit 100 mg Nitrit/l von pH 7 am Tag 0 auf pH 6,9 am Tag 7 ab.

Der Nitritgehalt nahm in den Ansätzen mit einem Wasseraktivitätswert von 0,99 und 0,975 kontinuierlich ab, so dass am Tag 4 in den Ansätzen mit 100 und 150 mg Nitrit/l kein Nachweis mehr möglich war. Bei einem Zusatz von 200 mg/l wurde Natriumnitrit erst ab dem Tag 5 bzw. 6 nicht mehr nachgewiesen. Wurde der a_w -Wert auf 0,965 abgesenkt, war eine Detektion von Natriumnitrit in den Röhren mit 100 mg/l und 150 mg/l bis zum Tag 6 und in denen mit 200 mg Nitrit/l bis zum Tag 7 möglich (siehe Anhang Abb. 36).

Bei einem pH-Wert von 6 konnte im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit in allen Ansätzen mit Natriumnitrit eine Hemmung der inkubierten STEC/EHEC Stämme beobachtet werden (Abb. 37). Die Hemmung nahm mit abnehmendem a_w -Wert zu (siehe Anhang Abb. 38 und Abb. 39). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 wurde unabhängig von der eingesetzten Nitritkonzentration kein Wachstum mehr festgestellt. Die Keimzahl der inkulierten Mikroorganismen blieb bis zum Tag 7 nahezu konstant zwischen 3,5 und $4 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 39). Die Ergebnisse der Keimzahlmessung wurden durch die parallelen Messungen des Redoxpotentials bestätigt (siehe Abb. 37, Anhang Abb. 38 und Abb. 39). Eine Abnahme des Potentials während der 7-tägigen Untersuchung wurde in Ansätzen mit 0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/l nicht festgestellt. Das relative Redoxpotential lag zwischen – 20 und – 70 mV bei einem a_w -Wert von 0,965 (siehe Anhang Abb. 39).

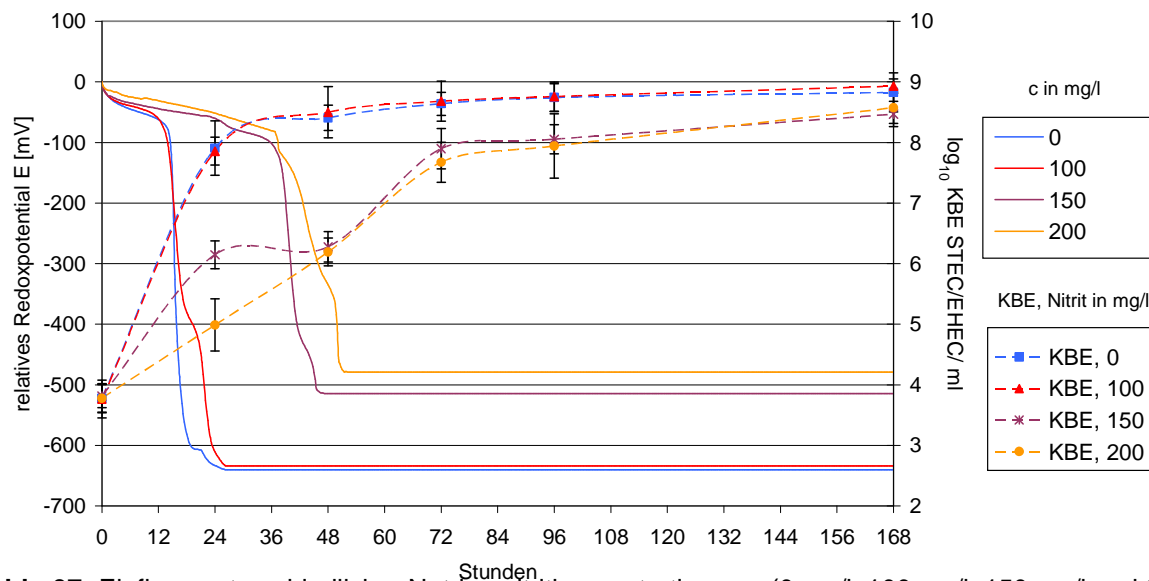


Abb. 37: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,99; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Der pH-Wert nahm bei einem a_w -Wert von 0,99 innerhalb von 5 Tagen in den Ansätzen mit 0, 100 und 150 mg Nitrit /l von 6 auf 5,55 ab. In den Röhrchen mit 200 mg/l sank der pH-Wert ab Tag 3 ab und erreichte zum Untersuchungszeitende am Tag 7 Werte um 5,85 (siehe Anhang Abb. 40). Mit weiter sinkendem a_w -Wert nahm die Zeitspanne bis zum Absinken des pH-Wertes in allen Ansätzen zu. So konnte bei einem Wasseraktivitätswert von 0,975 erst nach 4 Tagen eine Abnahme des pH-Wertes beobachtet werden (siehe Anhang Abb. 41). Bei einem a_w -Wert von 0,965 blieb der pH-Wert in allen Ansätzen bis zum Tag 7 konstant bei 6 (siehe Anhang Abb. 42).

Die Natriumnitritkonzentration lag in den Ansätzen mit 100 und 150 mg/l bei a_w -Werten von 0,99 und 0,975 innerhalb von 4 Tagen unterhalb der Nachweisgrenze. In den Röhrchen mit 200 mg/l verzögerte sich die Abnahme um 24 Stunden (siehe Anhang Abb. 43). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 wurde Natriumnitrit bis zum Tag 7 in allen Ansätzen mit Ausnahme der Negativkontrolle nachgewiesen. Die Konzentrationen lagen zwischen 30 und 60 mg Nitrit/l (siehe Anhang Abb. 44).

Bei einem pH-Wert von 5 wurde keine Vermehrung mehr beobachtet. Stattdessen war mit abnehmendem Wasseraktivitätswert eine Zunahme der Absterbekinetik festzustellen (siehe Abb. 45 und Anhang Abb. 46). Diese Beobachtung wurde auch durch die parallele Erfassung der mikrobiellen Aktivität bestätigt. Eine Abnahme des relativen Redoxpotentials wurde in keinem der Ansätze festgestellt (siehe Abb. 45 Anhang Abb. 46). Die relativen Werte schwankten dabei um ca. 20 bis 30 mV (siehe Anhang Abb. 45 und Abb. 46).

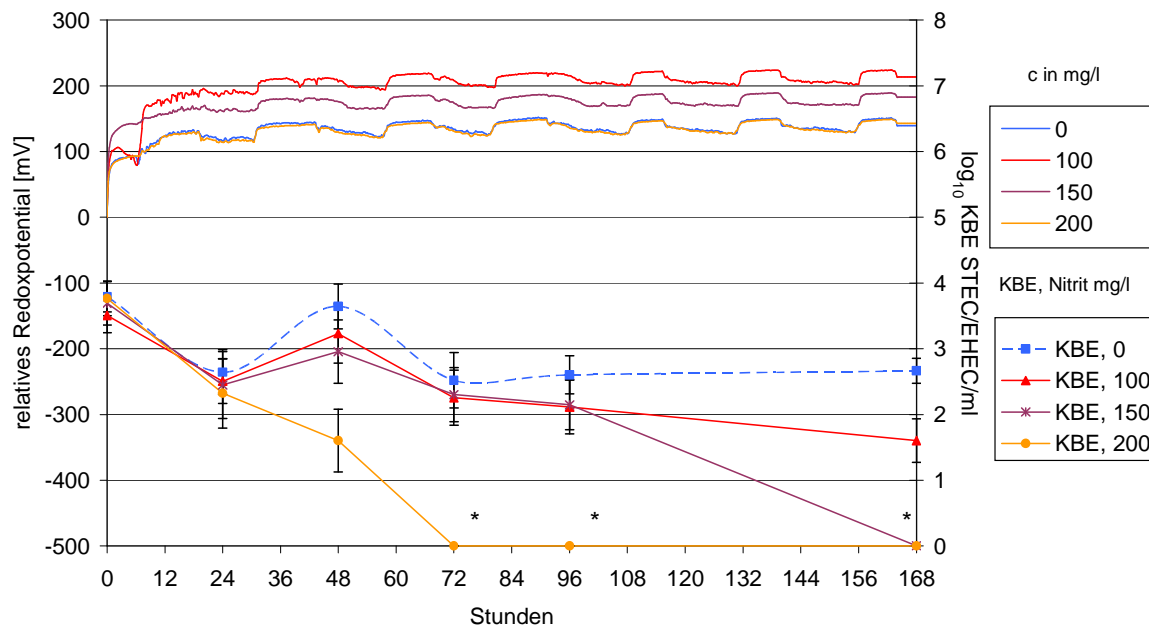


Abb. 45: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,99; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich

Der eingestellte pH-Wert von 5 schwankte in allen Röhrcchen bis zum Tag 7 zwischen 5 und 4,9 (siehe Anhang Abb. 47 und Abb. 48).

Die Nitritkonzentration nahm ab, so dass am Tag 7 in den Ansätzen Werte zwischen 20 mg/l (Ansatz mit 100 mg/l) und 40 mg/l (Ansatz mit 200 mg/l) nachgewiesen wurden (siehe Anhang Abb. 49 und Abb. 50).

4.1.2.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und Wasseraktivitätswerten von 0,99 und 0,975 wurden analog zu den Untersuchungen bei 25 °C (vgl. 4.1.2.1) vergleichbare Keimzahlverläufe festgestellt (siehe Abb. 51).

Bei einem a_w -Wert von 0,975 wurde jedoch eine Verlängerung der lag-Phase um 24 Stunden beobachtet. Nach 24 Stunden stiegen die Keimzahlen von 3,8 log₁₀ KbE/ml auf 8,2 log₁₀ KbE/ml am Tag 4 und blieben anschließend auf diesem Niveau bis zum Tag 7 (siehe Anhang Abb. 52).

Die Ergebnisse wurden durch die Erfassung des relativen Redoxpotentials bestätigt. So fielen alle Redoxpotentialkurven in den Ansätzen mit einer hohen Wasseraktivität von 0,99

gleichmässig stark ab und erreichten nach ca. 48 Stunden Werte von ca. -500 mV (siehe Abb. 51).

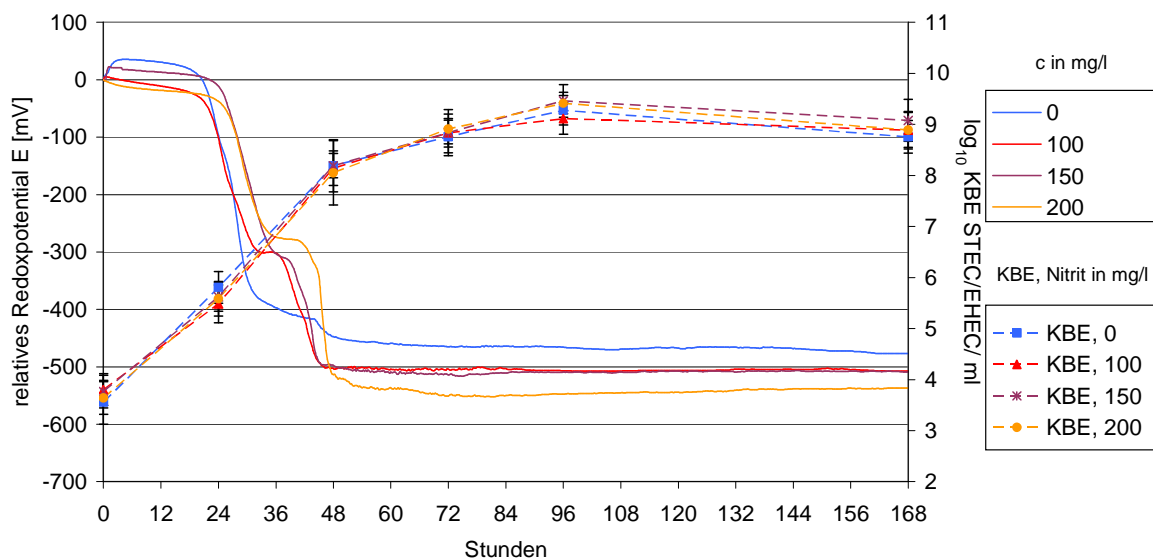


Abb. 51: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,99; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Wurde der a_w -Wert auf 0,975 erniedrigt, wurden im Vergleich zu den Keimzahlverläufen Unterschiede zwischen den Redoxpotentialverläufen der einzelnen Nitritkonzentrationen festgestellt (siehe Anhang Abb. 52). So konnten in den Röhren mit 0 mg Nitrit/l bereits nach 84 Stunden Werte von – 550 mV gemessen werden, während dies in denen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l erst nach annähernd 96 Stunden detektiert werden konnte.

Bei einem a_w -Wert von 0,965 sanken die Keimzahlen in den Röhren mit 0 und 100 mg Nitrit/l innerhalb von 48 Stunden von 3,3 \log_{10} KbE/ml auf 2 \log_{10} KbE/ml ab. In den Ansätzen mit 150 und 200 mg/l fiel die Keimzahl in den ersten 24 Stunden um 2 Zehnerpotenzen auf 1,2 \log_{10} KbE/ml ab und stieg anschließend bis zum Tag auf 2 \log_{10} KbE/ml an (siehe Anhang Abb. 53). Nach 7 Tagen wurden in allen Ansätzen vergleichbare Keimzahlen von 7,3 \log_{10} KbE/ml nachgewiesen.

Der pH-Wert sank in allen Ansätzen ab. Bei einem a_w -Wert von 0,99 wurden nach 3 Tagen Werte von 6,3 gemessen. Anschließend stieg der pH-Wert leicht an und erreichte einen Wert von ca. 6,6 am Tag 7 (siehe Anhang Abb. 54). Wurde der Wasseraktivitätswert auf 0,975 gesenkt, wurde auch eine Verzögerung des pH-Wertabfalls in den Röhren beobachtet. So konnte in den Ansätzen mit einem a_w -Wert von 0,975 erst nach 4 Tagen eine Abnahme des pH-Wertes im Medium registriert werden (siehe Anhang Abb. 55). Wurde der

Wasseraktivitätswert auf 0,965 eingestellt, blieb der pH-Wert bis zum Tag 7 nahezu konstant bei 7 (siehe Anhang Abb. 56).

Bei einem pH-Wert von 7 und einem a_w -Wert von 0,99 und 0,975 sank die Natriumnitritkonzentration in allen Ansätzen ab, so dass nach 4 bzw. 7 Tagen kein Nitrit im Medium mehr nachgewiesen wurde (siehe Anhang Abb. 57 und Abb. 58). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,965 war ein Nachweis bis zum Tag 7 unabhängig von der zugesetzten Nitritmenge möglich (siehe Anhang Abb. 59). Hier wurden zum Ende des Untersuchungszeitraumes noch Konzentrationen von 30 bis 20 mg/l nachgewiesen.

Bei einem pH-Wert von 6 zeigte der Zusatzstoff Natriumnitrit einen deutlichen hemmenden Einfluss auf die eingesetzten shigatoxinbildenden *Escherichia coli*. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit wurde eine Zunahme der Keimzahl in den Röhrchen mit 100, 150 und 200 mg/l erst nach 96 Stunden gemessen (siehe Abb. 60). Am Tag 7 konnten nur in den Ansätzen mit 100 und 150 mg/l mit der Kontrolle vergleichbare Keimzahlen von 8 \log_{10} KbE/ml nachgewiesen werden. In denen mit 200 mg Nitrit/l lag die Keimzahl am Tag 7 bei 7 \log_{10} KbE/ml (siehe Abb. 60).

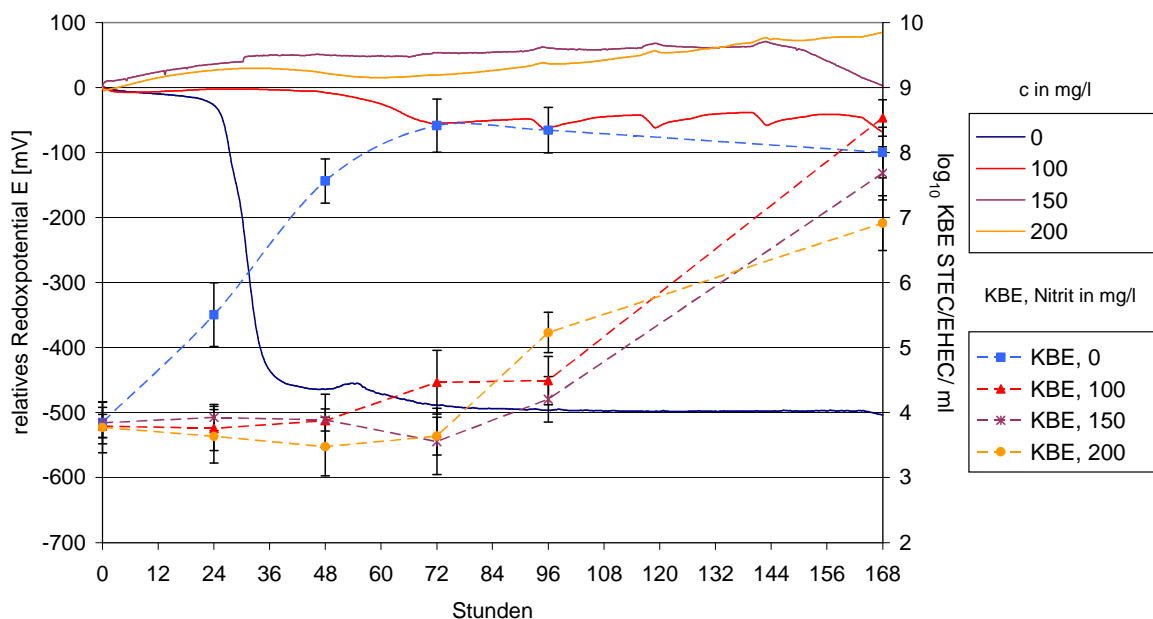


Abb. 60: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,99; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Wurde der a_w -Wert auf 0,975 abgesenkt, konnten in den Ansätzen mit Nitrit neben dem bereits beobachteten verzögerten Wachstum auch deutlich niedrigere Keimzahlen von 6 \log_{10} KbE/ml festgestellt werden (siehe Anhang Abb. 61).

Bei einem a_W -Wert von 0,965 nahmen die Keimzahlen zunächst in den ersten 48 Stunden um 1 bis 2 Zehnerpotenzen deutlich ab. Anschließend stieg die Zahl der shigatoxinbildenden *Escherichia coli* wieder an. In den Ansätzen mit 100 mg/l Nitrit konnten nach 7 Tagen Keimzahlen von $6 \log_{10}$ KbE/ml in denen mit 200 mg/l $4 \log_{10}$ KbE/ml nachgewiesen werden (siehe Anhang Abb. 62). Im Vergleich dazu wurden in der Kontrolle ohne Nitrit Keimzahlen von annähernd $8 \log_{10}$ KbE/ml festgestellt. Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen wurden durch die parallele Erfassung des Redoxpotentials bestätigt (siehe Abb. 60 und Anhang Abb. 61 und Abb. 62).

Der pH-Wert sank bei einem a_W -Wert von 0,99 innerhalb der ersten 48 Stunden in allen Ansätzen von 6 auf 5,85 ab. Eine weitere Abnahme konnte anschließend nur in den Röhrrchen der Kontrolle ohne Nitrit beobachtet werden. Hier wurden nach 7 Tagen pH-Werte von 5,6 gemessen (siehe Anhang Abb. 63). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,975 veränderte sich der pH-Wert in allen Ansätzen bis zum Tag 4 nur geringfügig auf 5,98. In den Röhrrchen mit Natriumnitrit blieb der pH-Wert anschließend bis zum Tag 7 konstant. In denen ohne Nitrit konnte eine weitere Absenkung des pH-Wertes auf 5,75 am Tag 7 dokumentiert werden (siehe Anhang Abb. 64). Ab einem a_W -Wert von 0,965 konnte keine Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden (siehe Anhang Abb. 65). Er blieb konstant bis zum Tag 7 bei pH 6.

Die eingesetzten Nitritkonzentrationen nahmen innerhalb von 7 Tagen in allen Ansätzen, auch in denen mit a_W -Werten von 0,99, 0,975 und 0,965 auf Werte zwischen 30 und 20 mg/l ab (siehe Anhang Abb. 66, Abb. 67 und Abb. 68).

Bei einem pH-Wert von 5 und Wasseraktivitäten von 0,99, 0,975 und 0,965 wurde kein Wachstum der Organismen beobachtet. So blieben die Keimzahlen in den Röhrrchen mit 0 mg/l bis zum Tag 7 nahezu unverändert bei $3,5 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Abb. 69). Dagegen nahmen die Keimzahlen in den Ansätzen mit Nitrit um 1 bis 2 Zehnerpotenzen während der 7-tägigen Untersuchungen auf Werte um $2,6 \log_{10}$ KbE/ml (100 und 150 mg Nitrit /l) und $1,4 \log_{10}$ KbE/ml (200 mg Nitrit /l) ab.

Bei einem pH-Wert von 5 und einem a_W -Wert von 0,965 starben die Mikroorganismen in den Röhrrchen mit 150 mg und 200 mg Nitrit/l innerhalb von 48 Stunden ab. Ein Nachweis war anschließend bis zum Tag 7 nicht mehr möglich (siehe Anhang Abb. 70). In den Ansätzen mit 100 mg Nitrit/l nahm die Keimzahl innerhalb von 4 Tagen um 2 Zehnerpotenzen auf $2 \log_{10}$ KbE/ml ab. Ab Tag 7 wurden in diesen Ansätzen keine shigatoxinbildenden *Escherichia coli* mehr nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 70). Die Keimzahl in der Kontrolle ohne Nitrit blieb nahezu unverändert bei $3,7 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 70).

Die mikrobiologischen Ergebnisse werden durch die parallele Messung des Redoxpotentials bestätigt (siehe Abb. 69 und Anhang Abb. 70). In keinem der Versuche konnte eine Abnahme des Redoxpotentials beobachtet werden. Das relative Redoxpotential blieb für die einzelnen Versuchsansätze konstant zwischen - 50 bis + 50 mV (siehe Abb. 69).

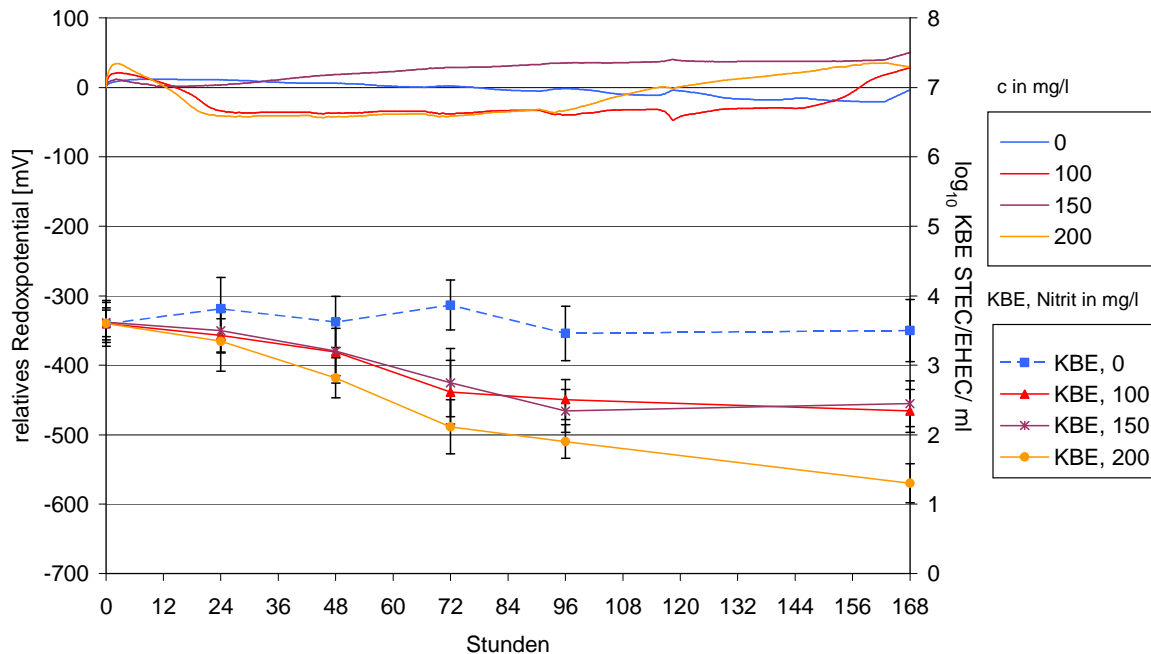


Abb. 69: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_W : 0,975; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Der pH-Wert blieb bei den Ansätzen mit a_W -Werten von 0,99, 0,975 bzw. 0,965 während des Untersuchungszeitraumes nahezu konstant (siehe Anhang Abb. 71 und Abb. 72) und schwankte in den Ansätzen mit 0, 100, 150 und 200 mg/l im Bereich von 5,05 und 4,95 (siehe Anhang Abb. 71 und Abb. 72).

In allen Ansätzen, auch mit unterschiedlichen a_W -Werten nahm die Nitritkonzentration innerhalb von 48 Stunden ab. Am Tag 7 waren in den Röhrchen Werte zwischen 5 mg/l (Ansatz mit 100 mg/l) und 50 mg/l (Ansatz mit 200 mg/l) nachweisbar (siehe Anhang Abb. 73 und Abb. 74).

4.1.2.3 Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_W -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und einem a_W -Wert von 0,99 zeigte Natriumnitrit, sowohl bei 25 °C als auch bei 17 °C, keinen Einfluss auf das Wachstum von shigatoxinbildenden *E. coli* (siehe Anhang Abb. 75). In allen Ansätzen wurden nach 3 Tagen Keimzahlen von 8,7 log₁₀ KbE/ml

erreicht. Wurde der Wasseraktivitätswert auf 0,965 eingestellt, war in den Ansätzen bei 25 °C eine deutliche Abnahme der Keimzahl innerhalb der ersten 24 Stunden feststellbar. Die Keimzahl fiel auf Werte zwischen 5 log₁₀ und 5,5 log₁₀ KbE/ml ab. Anschließend stieg die Keimzahl sowohl in den Ansätzen ohne Nitrit als auch in solchen mit Natriumnitrit an und erreichte am Tag 3 Keimzahlen von 7,2 log₁₀ bis 7,9 log₁₀ KbE/ml. Bis zum Tag 7 blieben die Keimzahlen auf diesem Niveau. In den Röhrcchen, die bei 17 °C inkubiert wurden, wurde keine Abnahme der Keimzahl festgestellt. Die Zahl der shiagtoxinbildenden *E. coli* blieb zunächst konstant und erreichte am Tag 3 Keimzahlen von 7,2 log₁₀ bis 7,9 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 76).

Bei einem pH-Wert von 6 und einer Temperatur von 25 °C wurde in den Ansätzen mit 200 mg Natriumnitrit/l eine deutliche Hemmung des Wachstums der Keime beobachtet. So betrug die Zunahme der Keimzahl in der Negativkontrolle und den Ansätzen mit 100 und 150 mg Nitrit/l nach 24 Stunden 2 Zehnerpotenzen und in denen mit 200 mg Nitrit/l eine Zehnerpotenz. Am dritten Untersuchungstag wurden jedoch in allen Ansätzen annähernd gleiche Keimzahlen von 8,7 log₁₀ KbE/ml erreicht (siehe Anhang Abb. 77).

Bei einer Temperatur von 17 °C und einem pH-Wert von 6 wurde im Vergleich zur Negativkontrolle in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l eine Hemmung der Vermehrung der Mikroorganismen festgestellt (siehe Anhang Abb. 77). So lagen am Tag 2 die Keimzahlen der Negativkontrolle bei 8,2 log₁₀ KbE/ml. Zum selben Zeitpunkt konnten in den Röhrcchen mit 100 mg/ Nitrit Keimzahlen von 7,9 log₁₀ KbE/ml und in solchen mit 150 und 200 mg Nitrit/l 6,4 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen werden. Am Tag 7 lagen die Werte in allen Ansätzen zwischen 8,1 log₁₀ KbE/ml und 8,9 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 77).

Wurde die Wasseraktivität bei einem pH-Wert von 6 auf 0,965 eingestellt, erfolgte in den Ansätzen mit einer Inkubationstemperatur von 25 °C eine Abnahme der Keimzahl. Die Reduktion der Keimzahl war in den ersten 24 Stunden in den Röhrcchen der Negativkontrolle und in denen mit 100 mg Nitrit/l am größten. Hier sanken die Keimzahlen um 3 Zehnerpotenzen auf Werte von 3 log₁₀ KbE/ml. Anschließend stiegen diese wieder an und erreichten nach 7 Tagen Werte zwischen 8,1 log₁₀ KbE/ml und 7,9 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 78). In den Ansätzen mit 150 und 200 mg Nitrit /l nahm die Keimzahl zunächst kontinuierlich ab. So wurden analog in den Röhrcchen mit 150 mg/l 4,8 log₁₀ KbE/ml und in solchen mit 200 mg Nitrit/l 3,8 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen. Bis zum Tag 7 nahm die Keimzahl leicht zu und erreichte im Fall von 150 mg Nitrit/l Werte von 6,7 log₁₀ KbE/ml und in den Ansätzen mit 200 mg/l 5,6 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 78).

Bei 17 °C, einem pH-Wert von 6 und einem a_w-Wert von 0,965 blieben die Keimzahlen in den ersten 48 Stunden nahezu unverändert bei 6 log₁₀ KbE/ml. Anschließend konnte eine

deutliche Vermehrung der Mikroorganismen in den Röhrcchen der Negativkontrolle und in solchen mit 100 mg Nitrit/l auf Werte zwischen 8,7 \log_{10} KbE/ml und 8,4 \log_{10} KbE/ml beobachtet werden (siehe Anhang Abb. 78). In den Ansätzen mit 150 und 200 mg Nitrit/l nahm die Keimzahl im gleichen Zeitraum auf Werte zwischen 7,3 \log_{10} KbE/ml und 8 \log_{10} KbE/ml zu.

Bei einem pH-Wert von 5 und einem Wasseraktivitätswert von 0,99 blieben die Keimzahlen der Negativkontrolle innerhalb der 7-tägigen Untersuchung nahezu konstant bei 6,5 \log_{10} KbE/ml. In den Röhrcchen mit Natriumnitrit nahmen die Keimzahlen deutlich ab. Nach 7 Tagen wurden in dem Ansatz mit 100 mg Nitrit/l und einer Inkubationstemperatur von 17 °C shigatoxinbildende *E. coli* in Höhe von 3,5 \log_{10} KbE/ml nachgewiesen. In den Röhrcchen, die mit 100 mg Natriumnitrit bei 25 °C, sowie in solchen mit 150 mg und 200 mg Nitrit/ml bei 17 °C bebrütet wurden, war nach 7 Tagen kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich (siehe Abb. 79).

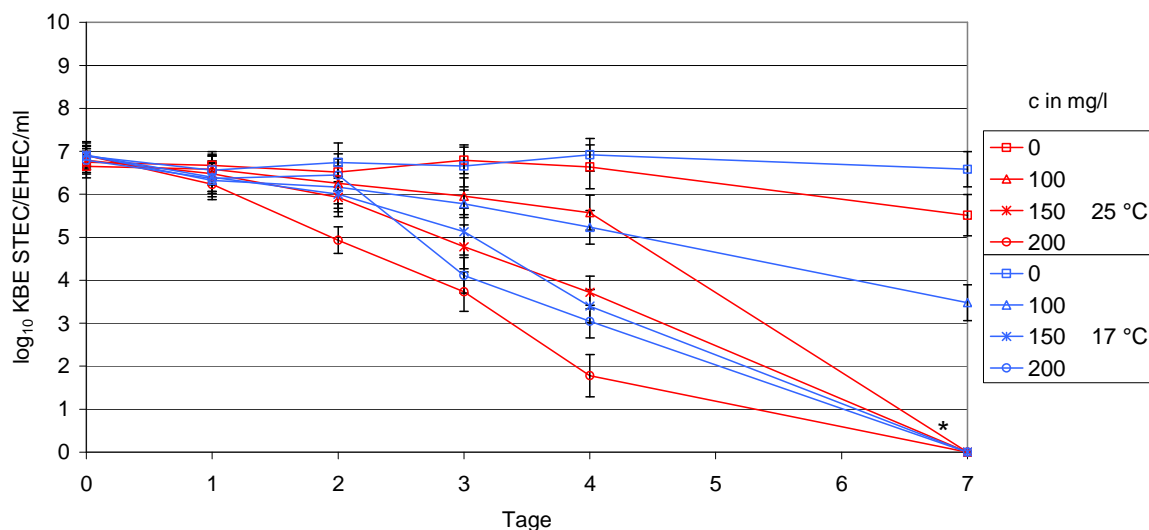


Abb.79 : Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei pH 5 und a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l); die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Mikroorganismen mehr möglich

Bei einem pH-Wert von 5 und einem a_w -Wert von 0,965 nahmen die Keimzahlen in den Röhrcchen mit Natriumnitrit mit einer Ausnahme bis zum Tag 7 um 2 bis 3 Zehnerpotenzen ab (siehe Anhang Abb. 80). Bei einer Temperatur von 25 °C und einem Zusatz von 200 mg Nitrit/l, wurden am Tag 7 keine shigatoxinbildenden *E. coli* mehr nachgewiesen. Die Keimzahl der Negativkontrolle nahm um eine halbe bzw. eine Zehnerpotenz ab (siehe Anhang Abb. 80).

4.1.3 *Listeria monocytogenes*

4.1.3.1 Vergleich der Wachstumskinetik bei 25 °C und verschiedenen pH- und a_W -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und einem a_W -Wert von 0,98 hatte Natriumnitrit in den ersten 24 Stunden nur in einer Konzentration von 200 mg/l einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von *Listeria monocytogenes* (siehe Abb. 81). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Natriumnitrit wurden zwischen dem Tag 2 und Tag 7 in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg/l niedrigere Keimzahlen ermittelt. Während in der Kontrolle am Tag 4 8,75 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen wurden, lag die Keimzahl in den Röhrchen mit Nitrit ca. eine Zehnerpotenz niedriger. Diese Beobachtung setzte sich bis zum Tag 7 fort und wurde durch die parallele Erfassung des Redoxpotentials bestätigt (siehe Abb. 81). Das relative Redoxpotential der Kontrolle sank innerhalb von 36 Stunden auf einen Wert von – 600 mV. Dagegen nahm das Redoxpotential in den Ansätzen mit Nitrit im gleichen Zeitraum auf etwa – 300 mV ab (siehe Abb. 81).

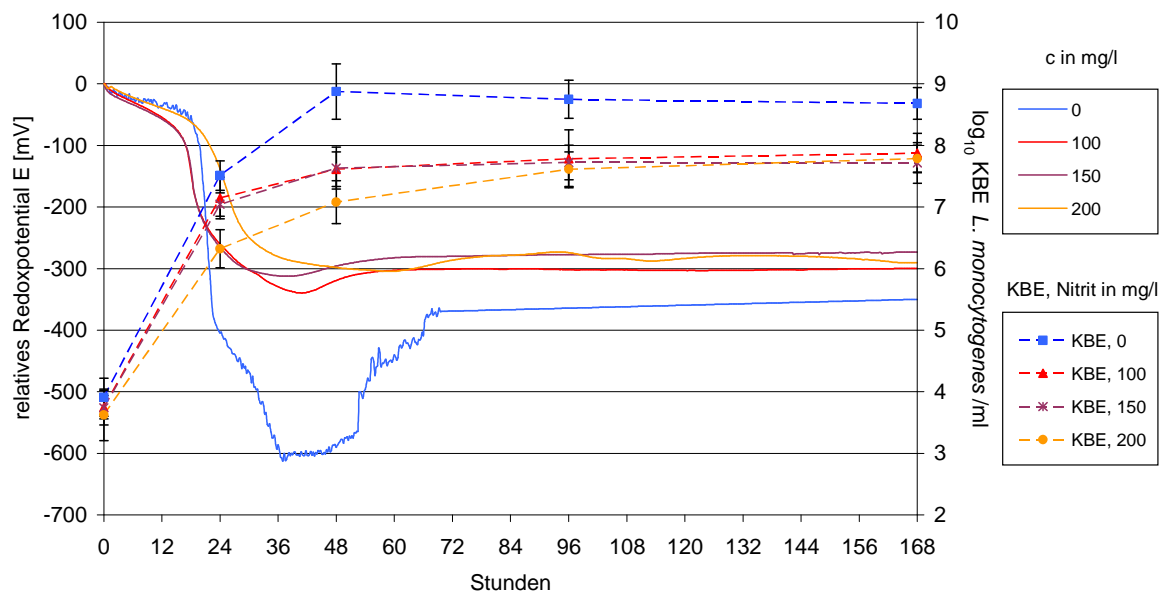


Abb. 81: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_W : 0,98; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Ab einem a_W -Wert von 0,97 wurde ein beschleunigtes Wachstum der Mikroorganismen im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit festgestellt. Die Anfangskeimzahlen von ca. 3,78 log₁₀ KbE/ml nahmen innerhalb von 3 Tagen auf ca. 7,6 log₁₀ KbE/ml zu (siehe Anhang Abb. 82).

Bei einer Absenkung des Wasseraktivitätswertes auf 0,94 wurde in den Röhrcchen mit 100, 150 und 200 mg/l eine Zunahme der Keimzahl von $3,85 \log_{10}$ KbE/ml am Tag 0 auf $6,6 \log_{10}$ KbE/ml am Tag 3 nachgewiesen. Im gleichen Zeitraum stieg die Keimzahl in den Ansätzen mit 0 mg Nitrit/l auf $5 \log_{10}$ KbE/ml. Am Tag 7 betrug die Zahl der Listerien in den Röhrcchen mit Nitrit $7,2 \log_{10}$ KbE/ml und in denen mit 0 mg/l $6,1 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 83).

Die Ergebnisse der Keimzahlbestimmung wurden durch die Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale bestätigt (siehe Anhang Abb. 82 und Abb. 83). So nahm das relative Redoxpotential zunächst am stärksten in den Röhrcchen mit 150 und 200 mg Nitrit/l ab. So wurden nach annähernd 60 Stunden Redoxpotentiale von -300 mV gemessen. Im Vergleich dazu nahm das Redoxpotential der Kontrolle ohne Nitrit verzögert ab. Es erreichte bei einem a_W -Wert von 0,97 nach 108 Stunden und bei einem a_W -Wert von 0,94 nach 144 Stunden relative Werte um -500 mV. Bei den Redoxpotentialverläufen der Kontrolle mit 0 mg Nitrit/l wurde des Weiteren die Ausbildung einer Plateauphase beobachtet. Diese betrug bei einem a_W -Wert von 0,94 ca. 30 Stunden. Erst danach fiel das Redoxpotential von -400 mV auf ca. -500 mV (siehe Anhang Abb. 83).

Der pH-Wert sank bei a_W -Werten von 0,98 und 0,97 innerhalb von 3 Tagen auf Werte um 6,6 (siehe Anhang Abb. 84). Wurde der a_W -Wert weiter auf 0,94 abgesenkt, verzögerte sich die Abnahme auf 6,6 um ca. 24 Stunden (siehe Anhang Abb. 85).

Die Nitritkonzentrationen nahmen kontinuierlich ab und waren bis zum Tag 7 im Medium nachweisbar (siehe Anhang Abb. 86 und Abb. 87). Die Rest-Nitritkonzentrationen lagen zwischen 5 mg/l (Ansätze mit 100 mg Nitrit/l) und 40 mg/l (Ansätze mit 200 mg Nitrit/l).

Bei einem pH-Wert von 6 und a_W -Werten von 0,98 und 0,97 nahm die Keimzahl der Listerien in den Ansätzen mit Natriumnitrit innerhalb der ersten 24 bis 48 Stunden am stärksten zu. So stieg bei einem a_W -Wert von 0,97 die Keimzahl in den Röhrcchen mit 100 und 150 mg Nitrit/l auf $7 \log_{10}$ bzw. $6 \log_{10}$ KbE/ml. Im Vergleich dazu blieb die Listerienzahl in der Negativkontrolle während der ersten 24 Stunden nahezu unverändert (siehe Anhang Abb. 88 und Abb. 89). Anschließend nahm die Keimzahl der Kontrolle zu und erreichte bei einem a_W -Wert von 0,98 $8,5 \log_{10}$ KbE/ml und bei einer Wasseraktivität von 0,97 etwa $8 \log_{10}$ KbE/ml. Ähnliche Keimzahlen wurden in den Röhrcchen mit Nitrit bei beiden ebengenannten Wasseraktivitäten nach 7 Tagen nachgewiesen.

Bei einem a_W -Wert von 0,955 wurde in den Ansätzen mit 150 mg/l und 200 mg/l Natriumnitrit im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit ein verzögertes Wachstum festgestellt (siehe Anhang Abb. 90). Nach 24 Stunden waren in der Kontrolle Listerienzahlen von $5,7 \log_{10}$ KbE/ml, in

den Röhrcchen mit 150 mg Nitrit/l 5,2 log₁₀ KbE/ml und in solchen mit 200 mg Nitrit/l 4,6 log₁₀ KbE/ml vorhanden. Am Tag 7 wurden in allen Ansätzen annähernd gleiche Keimzahlen von 8 log₁₀ KbE/ml detektiert (siehe Anhang Abb. 90).

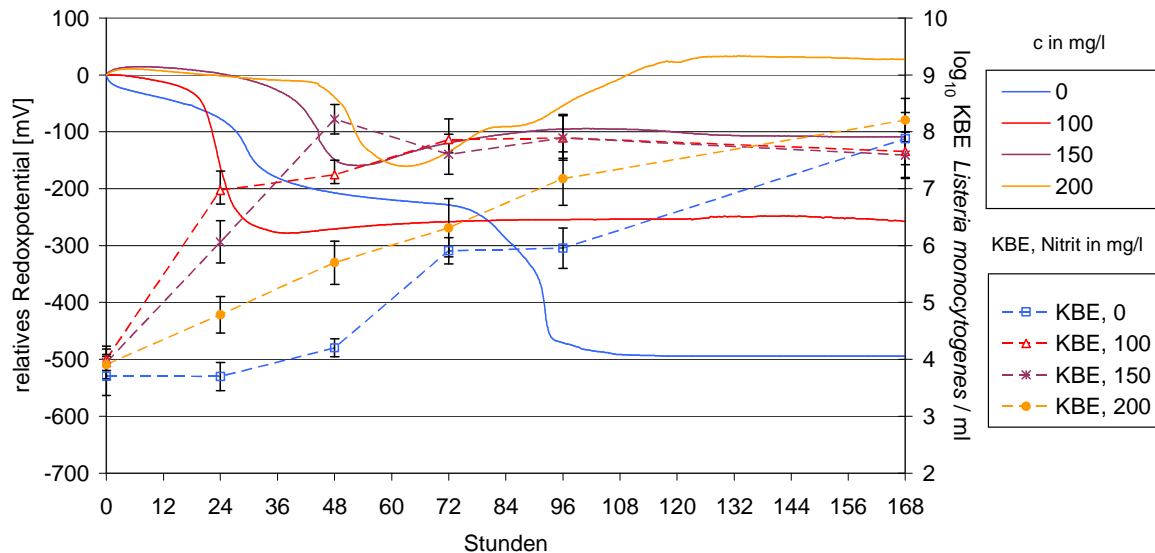


Abb.89: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w: 0,97; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Bei einem a_w-Wert von 0,94 und einem pH von 6 blieb die Listerienzahl in den Röhrcchen mit 200 mg/l innerhalb der ersten 3 Tage konstant. Anschließend stieg die Keimzahl bis zum Tag 7 auf 7 log₁₀ KbE/ml an (siehe Anhang Abb. 91). Im Vergleich dazu wurde in den Ansätzen mit 0 mg/l und in solchen mit 100 mg Nitrit/l eine Vermehrung nachgewiesen. Nach 3 Tagen waren in diesen Röhrcchen 7,5 log₁₀ KbE/ml und nach 7 Tagen ca. 8 log₁₀ KbE/ml erfassbar (siehe Anhang Abb. 91).

Die Ergebnisse der Keimzählungen konnten durch die Messung des relativen Redoxpotentials bestätigt werden (siehe Abb. 88 und Anhang Abb. 91). Die Redoxpotentiale der Kontrolle sanken am stärksten ab und erreichten nach ca. 108 Stunden Werte von - 500 mV. In den Röhrcchen mit 100 mg Nitrit/l nahm das Redoxpotential auf ca. – 250 mV und in denen mit 200 mg Nitrit/l auf -100 bzw. - 50 mV ab (siehe Anhang Abb. 88 und 91).

Der pH-Wert von 6 nahm in den Ansätzen mit a_w: 0,98 unabhängig von der zugesetzten Natriumnitritkonzentration innerhalb von 3 Tagen gleichmässig auf 5,8 ab. Bei einer Wasseraktivität von 0,97 wurde in den Röhrcchen mit 200 mg Nitrit/l eine deutlich verzögerte Abnahme des pH-Wertes auf 5,9 am Tag 4 beobachtet (siehe Anhang Abb. 92).

In der Kontrolle ohne Nitrit und in den Röhrchen mit 100 und 150 mg Nitrit/l bei einem a_W -Wert von 0,97 waren am Tag 3 pH-Werte von 5,85 messbar. Bei einer weiteren Erniedrigung der Wasseraktivität auf 0,94 war eine Abnahme innerhalb der ersten drei Tage nur in der Kontrolle beobachtbar. In den Ansätzen mit 100 und 150 mg/l Nitrit nahm der pH-Wert ab dem Tag 3 ab und erreichte am Tag 7 Werte von 5,92 im Vergleich zu 5,77 in der Kontrolle ohne Nitrit. Bei 200 mg/l Nitrit war keine Veränderung des pH-Wertes im Verlauf des Untersuchungszeitraumes feststellbar (siehe Anhang Abb. 93).

Die Natriumnitritkonzentrationen nahmen in allen Ansätzen kontinuierlich ab. Unabhängig von den überprüften Wasseraktivitäten wurden am Tag 7 bei einer Ausgangskonzentration von 100 mg Nitrit/l 5 mg/l und in solchen mit 200 mg Nitrit/l 40 mg/l nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 94 und 95).

Bei einem pH-Wert von 5 und einem a_W -Wert von 0,98 nahmen die Keimzahlen in der Kontrolle und in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l bis zum Tag 7 ab und erreichten Werte von 3,3 bis 3,7 \log_{10} KbE/ml (siehe Abb. 96).

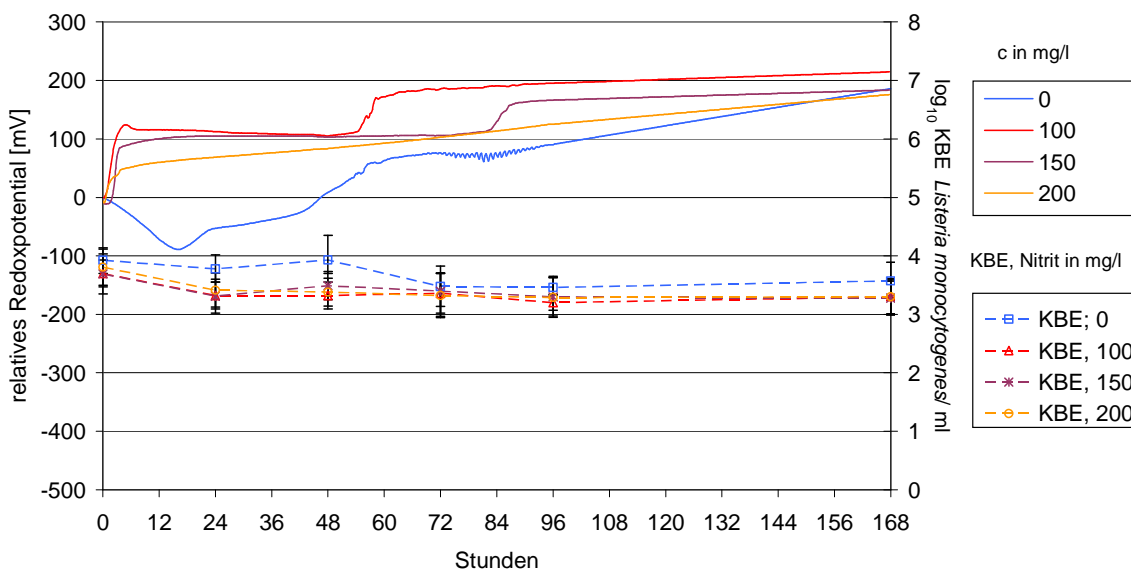


Abb. 96: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_W : 0,98; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Wurde der Wasseraktivitätswert auf 0,97 gesenkt, so nahmen die Listerienzahlen in den Ansätzen mit Natriumnitrit schneller ab als in der Kontrolle. Die Keimzahl sank in den Röhrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l innerhalb von 48 Stunden um eine halbe Zehnerpotenz auf 3,3 \log_{10} KbE/ml. Zwischen dem Tag 2 und Tag 7 nahmen die Listerienzahlen noch einmal deutlich ab. Am Tag 7 wurden in den Röhrchen mit 200 mg

Nitrit/l 1,3 log₁₀ KbE/ml, in denen mit 150 mg Nitrit/l 2,5 log₁₀ KbE/ml und in solchen mit 100 mg Nitrit/l 2,6 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen. Die Keimzahl der Kontrolle blieb während der siebentägigen Untersuchung bei etwa 3,9 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 97).

Bei einem a_w-Wert von 0,94 blieb die Keimzahl der Negativkontrolle bis zum Tag 7 bei 4 log₁₀ KbE/ml. In den Röhrcchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l sanken die Listerienzahlen deutlich ab. Dabei war die Absterbekinetik in den Ansätzen mit 200 mg Nitrit ausgeprägter als in solchen mit 100 mg Nitrit/l. Am Tag 7 wurden keine Listerien mehr in den Röhrcchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit /l nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 98).

Durch die Messung der mikrobiellen Aktivität über die Redoxpotentiale konnten die Ergebnisse bestätigt werden, da über den gesamten Untersuchungszeitraum in keinem der Ansätze eine Abnahme des Redoxwertes und damit eine Zunahme der mikrobiellen Aktivität feststellbar war (siehe Abb. 96 und Anhang Abb. 97 und 98).

Der pH-Wert blieb während der Untersuchungen bei allen getesteten Nitritkonzentrationen und Wasseraktivitätswerten nahezu unverändert bei 5 (siehe Anhang Abb. 99 und Abb. 100).

Die Nitritkonzentration nahm im Medium relativ zügig ab. Am Tag 4 wurden zwischen 5 und 30 mg/l Nitrit nachgewiesen. Am Tag 7 war in allen Ansätzen kein Nitrit mehr detektierbar (siehe Anhang Abb. 101 und 102).

4.1.3.2 Vergleich der Wachstumskinetik bei 17 °C und verschiedenen pH- und a_w-Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und einem Wasseraktivitätswert von 0,98 stieg die Listerienzahl in der Negativkontrolle und in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l innerhalb von 3 Tagen auf 7,5 log₁₀ KbE/ml an (siehe Anhang Abb. 103). Bis zum Tag 7 blieben die Keimzahlen anschließend nahezu konstant.

Bei einer Absenkung des a_w-Wertes auf 0,97 wurde in den Röhrcchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l im direkten Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Vermehrung beobachtet. So stieg die Listerienzahl in den Ansätzen mit Nitrit innerhalb von 3 Tagen auf 7,8 log₁₀ KbE/ml an. In der Negativkontrolle betrug die Keimzahl zum selben Zeitpunkt 6,3 log₁₀ KbE/ml. Am Tag 4 wurden in allen Ansätzen annähernd gleiche Listerienzahlen von 7,5 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen. Bis zum Ende der Untersuchungen am Tag 7 sanken die Keimzahlen in den Röhrcchen mit Nitrit auf ca. 6 bzw. 6,5 log₁₀ KbE/ml, während die Listerienzahl in den Ansätzen mit 0 mg Nitrit/l auf 8,5 log₁₀ KbE/ml anstieg (siehe Abb. 104).

Dieses Ergebnis wurde über die Messung der Redoxpotentiale bestätigt, so wurde in den Ansätzen von 100, 150 und 200 mg Nitrit/l bereits nach ca. 70 Stunden ein minimales Redoxpotential von ca. -330 mV gemessen (siehe Abb. 104). In den Röhrcchen der Kontrolle

sank des relative Redoxpotential verzögert ab und erreichte nach annähernd 96 Stunden minimale Werte von – 300 mV (siehe Abb. 104).

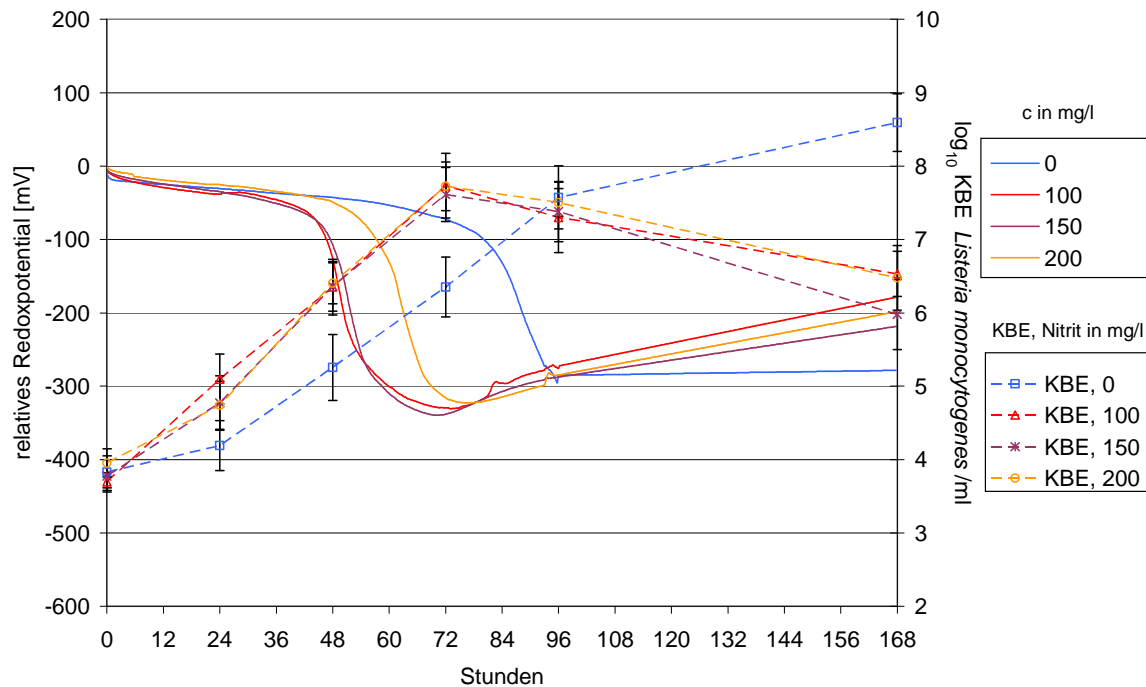


Abb. 104: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,97; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 blieben die Keimzahlen der Listerien in allen Ansätzen in den ersten 24 Stunden konstant. In den Röhrcchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l nahm die Keimzahl bis zum Tag 3 anschließend auf Werte von ca. 6 \log_{10} KbE/ml zu (siehe Anhang Abb. 105). Im gleichen Zeitraum stieg die Zahl der Listerien in den Ansätzen der Kontrolle auf 5,3 \log_{10} KbE/ml. Zwischen dem 3. und 7. Tag nahmen die Keimzahlen in allen Röhrcchen zu, so dass annähernd gleiche Keimzahlen von ca. 6,3 \log_{10} KbE/ml nachgewiesen wurden.

Der pH-Wert nahm in den Untersuchungen bei einem a_w von 0,98 innerhalb eines Tages in allen Ansätzen auf Werte um 6,6 ab (siehe Anhang Abb. 106). Anschließend stieg der pH-Wert in allen Röhrcchen bis zum Tag 7 auf Werte von 6,7 an. Mit absinkendem Wasseraktivitätswert sanken auch die minimalen pH-Werte im Medium. Während bei einem a_w -Wert von 0,97 noch Werte von 6,7 und 6,8 erreicht wurden, lagen diese bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 zwischen 6,8 und 6,9. Bei den a_w -Werten von 0,97 und 0,94

wurde ein Unterschied im pH-Wertverlauf zwischen der Kontrolle und den Röhrchen mit Natriumnitrit im Vergleich zu der pH-Wertentwicklung bei einem a_w -Wert von 0,98 festgestellt. Im Mittel lagen die gemessenen pH-Werte der Negativkontrolle 0,1 pH-Einheiten unter denen der Ansätze mit Natriumnitrit (siehe Anhang Abb. 106, 107 und 108).

Die Nitritkonzentration nahm bei einem pH-Wert von 7 und a_w -Werten von 0,98, 0,97 und 0,94 kontinuierlich im Medium ab. Am Tag 7 konnten je nach Ansatz zwischen 5 mg/l (100 mg Nitrit/l) und 35 mg Nitrit/l (200 mg Nitrit/l) erfasst werden (siehe Anhang Abb. 109 und Abb. 110).

Bei einem pH-Wert von 6 und a_w -Werten von 0,98 und 0,97 wurden die höchsten Keimzahlen jeweils in den Kontrollen nachgewiesen. Am Tag 7 waren in der Kontrolle ohne Nitrit Keimzahlen von $8,5 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Abb. 111) bzw. $7 \log_{10}$ KbE/ml vorhanden (siehe Anhang Abb. 112). In den Röhrchen mit 100 bzw. 150 mg Nitrit/l stieg die Keimzahl nur langsam an und erreichte am Tag 7 Keimzahlen von $7 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Abb. 111) bzw. $6,5 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 112). Bei einem Zusatz von 200 mg Nitrit/l wurde im Vergleich zu den Ansätzen mit 100 und 150 mg Nitrit/l eine Vermehrung der Zellen erst nach etwa 4 Tagen nachgewiesen.

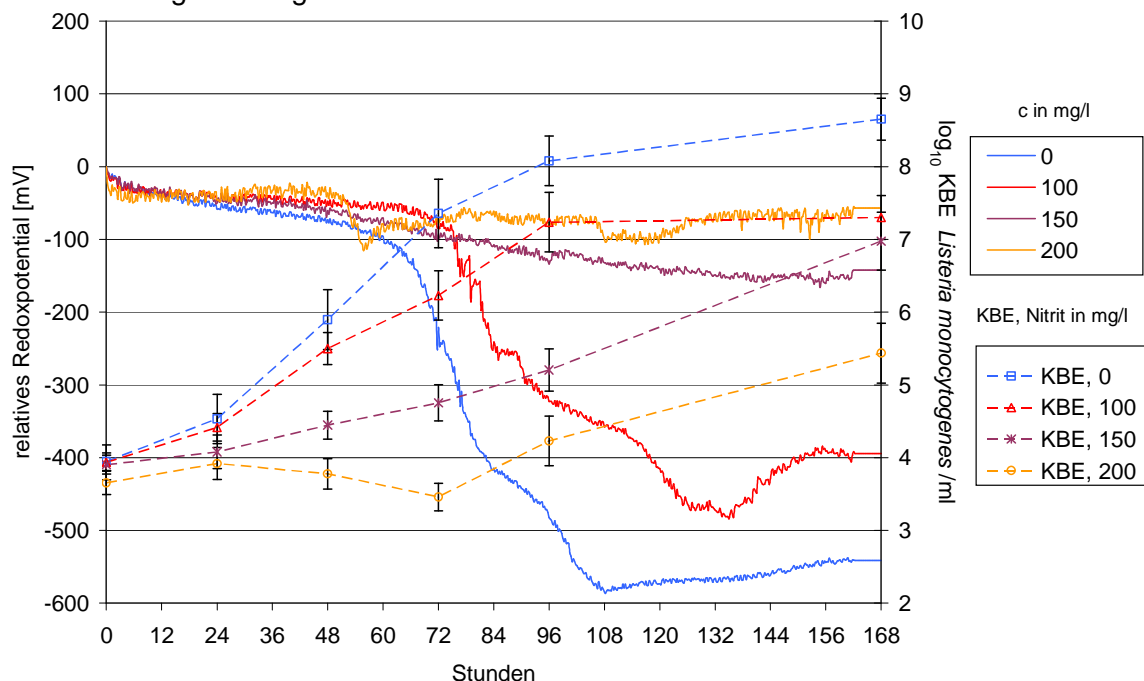


Abb. 111: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,98; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Am Tag 7 wurden in diesen Röhrchen Keimzahlen von $5,5 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Abb. 111) und $6,2 \log_{10}$ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 112) festgestellt.

Bei einem Wasseraktivitätswert auf 0,94 war keine Vermehrung in der Kontrolle oder den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l nachweisbar. Die Keimzahlen von *Listeria monocytogenes* blieben im Bereich von 3,9 log₁₀ KbE/ml bis 4,2 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 113).

Die Ergebnisse der Keimzählung konnten durch die Erfassung des Redoxpotentials bestätigt werden. Das relative Redoxpotential nahm bis zum Tag 7 nur leicht auf – 100 mV ab (siehe Anhang Abb. 113).

Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,98 nahm der pH-Wert in den Ansätzen mit 0, 100 und 150 mg Nitrit/l auf Werte um 5,6 bis zum Tag 2 ab. In den Röhrrchen mit 200 mg Nitrit/l sank der pH-Wert auf etwa 5,7 am Tag 4. Bei a_w-Werten von 0,97 verzögerte sich die Abnahme des pH-Wertes um ca. 24 Stunden. In allen Ansätzen wurden am Tag 3 pH-Werte um 5,8 gemessen (siehe Anhang Abb. 114). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 wurde in allen Ansätzen eine Abnahme des pH-Wertes auf 5,9 am Tag 2 beobachtet (siehe Anhang Abb. 115). Am Tag 7 lagen die Werte bei allen Ansätzen zwischen 5,9 und 5,85 (siehe Anhang Abb. 115).

Die eingesetzten Natriumnitritkonzentrationen nahmen bei den getesteten a_w-Werten von 0,98, 0,97 und 0,94 während der 7-tägigen Untersuchung kontinuierlich ab. Am Tag 7 lagen die Konzentrationen zwischen 5 (100 mg/l) und 40 mg Nitrit/l (200 mg/l) (siehe Anhang Abb. 116 und 117).

Bei einem pH-Wert von 5 und a_w-Werten von 0,98 und 0,97 lag die Keimzahl der Listerien in der Kontrolle ohne Nitrit bis zum Tag 4 konstant zwischen 3,5 log₁₀ KbE/ml und 3,7 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 118). Bis zum Tag 7 sank diese anschließend um eine halbe bzw. ganze Zehnerpotenz. In den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l nahm die Listerienzahl innerhalb der ersten 48 Stunden gleichmässig auf Werte von 3 log₁₀ KbE/ml ab (siehe Anhang Abb. 118 und Abb. 119). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,97 veränderte sich die Keimzahl bis zum Tag 7 anschließend nicht mehr (siehe Abb. 119). In den Untersuchungen mit einem a_w-Wert von 0,98 stieg die Keimzahl in den Röhrrchen mit Nitrit zunächst auf 3,3 log₁₀ KbE/ml an und sank ab Tag 4 erneut ab. Am Tag 7 wurden in den Ansätzen mit 100 mg Nitrit/l Keimzahlen von 3,2 log₁₀ KbE/ml und in solchen mit 200 mg Nitrit/l Listerienzahlen von 2 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 118). Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 nahmen die Keimzahlen in den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l gleichmässig ab und erreichten am Tag 7 Werte um 2 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 120). In der Kontrolle waren am Tag 7 Keimzahlen von 3,8 log₁₀ KbE/ml nachweisbar (siehe Anhang Abb. 120).

Die Ergebnisse der Keimzählungen wurden durch die Messung der Redoxpotentiale bestätigt. In keinem Ansatz wurde ein Abfall des relativen Redoxpotential unter -100 mV dokumentiert (siehe Abb. 119, Anhang Abb. 118 und 120).

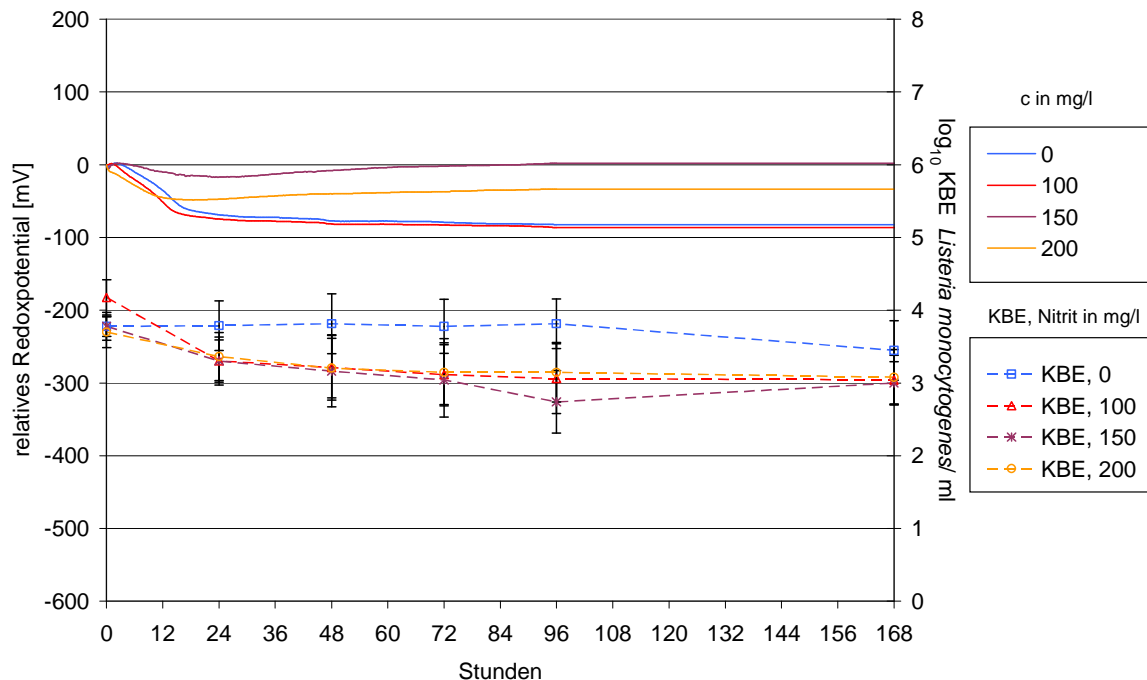


Abb. 119: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Selektiv-Bouillon bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,97; die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Die pH-Werte lagen in allen Ansätzen während der 7-tägigen Untersuchung im Bereich um 5 (siehe Anhang Abb. 121 und Abb. 122).

Die Nitritkonzentration nahm bei den a_w -Werten von 0,98, 0,97 und 0,94 in allen Ansätzen kontinuierlich ab. Bereits nach 3 Tagen lagen die Werte in den Röhrcchen mit 100 mg Nitrit/l bei 10 mg Nitrit/l und in denen mit 200 mg Nitrit/l bei 50 mg Nitrit/l (siehe Anhang Abb. 123 und Abb. 124). Am Tag 7 wurden Nitritkonzentrationen zwischen 5 und 30 mg Nitrit/l gemessen.

4.1.3.3 Vergleich der Wachstumskinetiken mit hohem Anfangsinokulum bei 25 °C und 17 °C und verschiedenen pH- und a_w -Werten

Bei einem pH-Wert von 7 und einem Wasseraktivitätswert von 0,98 wurde in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l sowohl bei 25 °C als auch bei 17 °C, keine Vermehrung von *Listeria monocytogenes* beobachtet (siehe Anhang Abb. 125). Bis zum Tag 4 blieben die Ausgangskeimzahlen von $6,8 - 7 \log_{10}$ KbE/ml konstant. Am Tag 7 lagen die Keimzahlen in den Röhrcchen bei einer Inkubationstemperatur von 17 °C bei ca. $7,7 \log_{10}$ KbE/ml und damit

etwas höher als in denen, die bei 25 °C bebrütet wurden. Hier wurden am Tag 7 Keimzahlen von ca. 7,3 – 7,5 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 125).

In den Negativkontrollen bei 17 °C und 25 °C stieg die Listerienzahl nach 3 Tagen auf Werte von ca. 9 log₁₀ KbE/ml. Bis zum Tag 7 blieb die Keimzahl anschließend konstant auf diesem Niveau (siehe Anhang Abb. 125).

Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 und einem pH-Wert von 7 stieg die Keimzahl der Kontrolle, die bei 25 °C inkubiert wurde, innerhalb von 3 Tagen auf 8,5 log₁₀ KbE/ml. In den Kontrollen, die bei 17 °C gelagert wurden, wurden zum selben Zeitpunkt 7,5 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen. Vergleichbare Keimzahlen von 8,5 log₁₀ KbE/ml wurden erst am Tag 7 festgestellt (siehe Anhang Abb. 126). In den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l blieb die Keimzahl in den ersten 24 Stunden konstant bei 6,5 – 6,8 log₁₀ KbE/ml. Anschließend wurde in den Ansätzen bei 25 °C eine leichte Zunahme der Listerienzahl bis zum Tag 2 beobachtet. Zwischen dem 2. und 4. Tag sanken die Keimzahlen auf 5,9 – 6,5 log₁₀ KbE/ml ab. Am Tag 7 wurden bei 25 °C in den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l Listerienzahlen von 6,5 - 6,8 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 126). Die Keimzahl in den Ansätzen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l, die bei 17 °C inkubiert wurden, nahm ab dem Tag 1 langsam, aber kontinuierlich zu. Am Tag 7 wurden in diesen Röhrrchen Listerienzahlen von 7,2 - 7,6 log₁₀ KbE/ml nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 126).

Bei einem pH-Wert von 6 und einem a_w-Wert von 0,98 wurde nur in der Kontrolle bei 25 °C ein anfängliches Wachstum beobachtet. Hier stiegen die Keimzahlen von 6,5 log₁₀ KbE/ml auf 8,5 log₁₀ KbE/ml am Tag 3 an (siehe Anhang Abb. 127). In der Kontrolle, die bei 17 °C gelagert wurde, nahm die Keimzahl erst nach 24 Stunden zu und erreichte nach 4 Tagen annähernd vergleichbare Werte von 8,5 log₁₀ KbE/ml. In den Röhrrchen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l und einer Inkubationstemperatur von 25 °C stiegen die Keimzahlen nach 24 Stunden an und erreichten am Tag 7 Werte zwischen 7,7 und 8 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 127). Dabei war zu beobachten, dass die Keimzahlen in den Röhrrchen mit 100 und 150 mg Nitrit/l etwas schneller zunahmten als in solchen mit 200 mg Nitrit/l. In den Röhrrchen mit Natriumnitrit und einer Temperatur von 17 °C nahm die Keimzahl bis zum Tag 1 um eine halbe Zehnerpotenz ab. In den Röhrrchen mit 100 mg Nitrit/l stieg die Keimzahl zunächst bis zum Tag 4 auf 8 log₁₀ KbE/ml an und lag am Tag 7 abschließend bei 7,6 log₁₀ KbE/ml. Im Vergleich dazu nahm die Keimzahl in den Röhrrchen mit 150 mg Nitrit/l erst am dritten Tag zu und erreichte am Tag 7 Werte von 7,5 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 127). In den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/l sank die Keimzahl bis auf 5,4 log₁₀ KbE/ml am Tag 3 und nahm anschließend bis auf 6,5 log₁₀ KbE/ml am Tag 7 zu (siehe Anhang Abb. 127).

Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,94 wurde mit Ausnahme der Kontrolle bei 25 °C eine Abnahme der Listerien um eine halbe Zehnerpotenz bis zum Tag 3 nachgewiesen. Die Keimzahl der Kontrolle ohne Nitrit und einer Temperatur von 25 °C stieg im gleichen Zeitraum um eine halbe Zehnerpotenz an und erreichte Werte von 7,5 log₁₀ KbE/ml. Die Listerienzahl der Kontrolle bei 17 °C nahm erst ab dem dritten Tag zu und erreichte am Ende der Untersuchungen Werte von 7,3 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 128). Die Keimzahlen der Röhren mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/l blieben sowohl bei 17 °C als auch bei 25 °C nach der anfänglichen Abnahme konstant bei 6,4 – 6,6 log₁₀ KbE/ml (siehe Anhang Abb. 128).

Bei einem pH-Wert von 5, a_w-Werten von 0,98 und 0,94 wurde sowohl bei 17 °C als auch bei 25 °C eine Abnahme der Listerien um 1 bis 4 Zehnerpotenzen bis zum Tag 7 nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 129 und 130). Am stärksten war die Reduktion der Keimzahl in den Röhren mit 200 mg Nitrit/l bei 25 °C. Hier lagen die Werte am Tag 7, zwischen 2,5 und 3 log₁₀ KbE/ml. Bei 17 °C wurden in den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/l am Tag 7 Listerienzahlen zwischen 4,3 und 5 log₁₀ KbE/ml dokumentiert. Die mit 6,2 log₁₀ KbE/ml höchsten Keimzahlen wurden sowohl bei 17 °C als auch bei 25 °C in den Kontrollen ohne Nitrit festgestellt (siehe Anhang Abb. 129 und 130).

4.1.4 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Wirkung von Natriumnitrit auf die Zellen von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden *E. coli* und *L. monocytogenes* wurde zudem elektronenmikroskopisch untersucht.

Salmonella spp.:

Bei einem pH-Wert von 7 sowie unterschiedlichen a_w-Werten von 0,99 und 0,975 wurden in den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/l und in denen ohne Nitrit kurze Stäbchen mit einer Größe von 2-3 x 0,6-0,9 µm beobachtet (siehe Abb. 131).

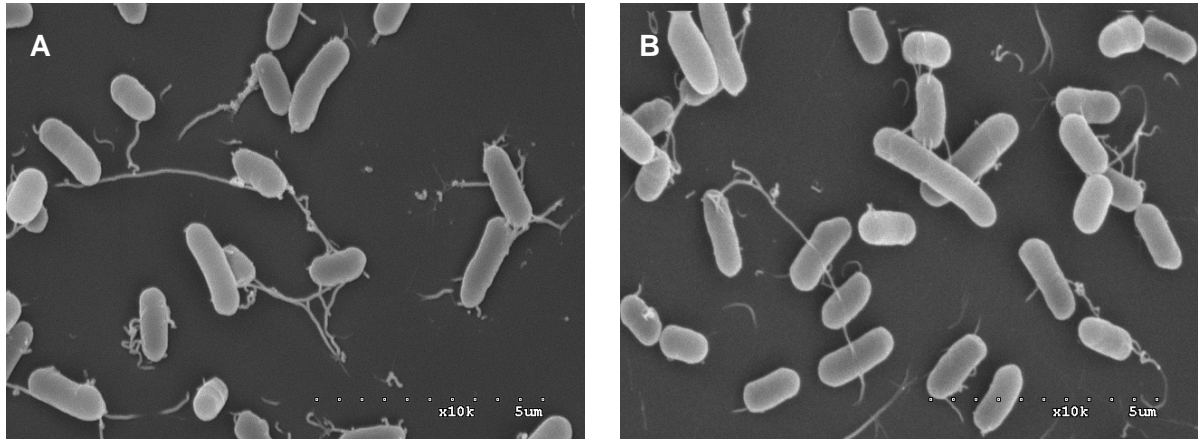


Abb. 131: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,99, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,59 \log_{10} KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) bei einem pH-Wert von 7 (Vergrößerung: 10.000)

Bei pH-Werten von 6 bzw. 5 wurden mit und ohne Zusatz von Natriumnitrit Stäbchen mit einer Länge von 2-4 μm und einer Breite von 0,4-0,6 μm detektiert. Im Vergleich zu den Untersuchungen bei einem pH-Wert von 7 (vgl. Abb. 131) waren die Stäbchen, die mit Nitrit inkubiert wurden, bei niedrigeren pH-Werten morphologisch etwas dünner und länger als diejenigen, die ohne Nitrit angezogen wurden (vgl. Abb. 132 und Abb. 133).

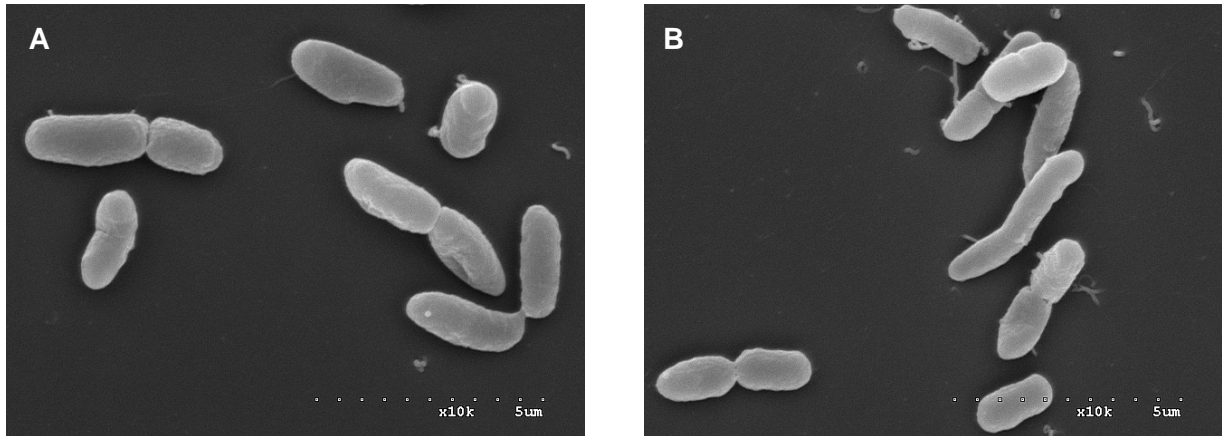


Abb. 132: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,54 \log_{10} KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) bei einem pH-Wert von 6 (Vergrößerung: 10.000)

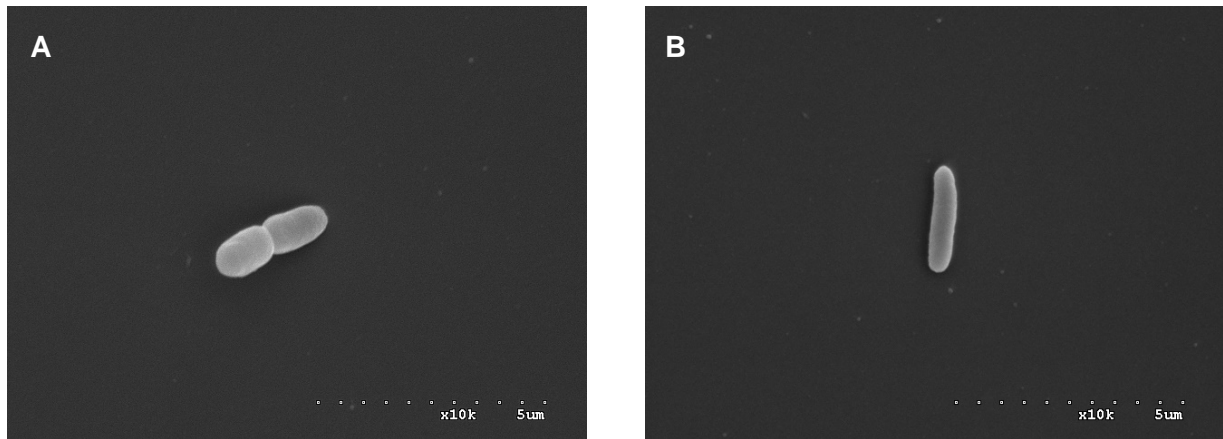


Abb. 133: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* spp. nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,66 \log_{10} KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) bei einem pH-Wert von 5 (Vergrößerung: 10.000)

Shigatoxinbildende *Escherichia coli*:

Bei den mit und ohne Natriumnitrit inkubierten Zellen wurden bei einem pH-Wert von 7 und a_w -Werten von 0,99 und 0,975 Zellen mit einer Länge von 2-3 μm und einer Breite von 0,8 bis 1 μm festgestellt (siehe Abb. 133). Morphologisch waren die Stäbchen in den Ansätzen mit und ohne Nitrit identisch (siehe Abb. 134).

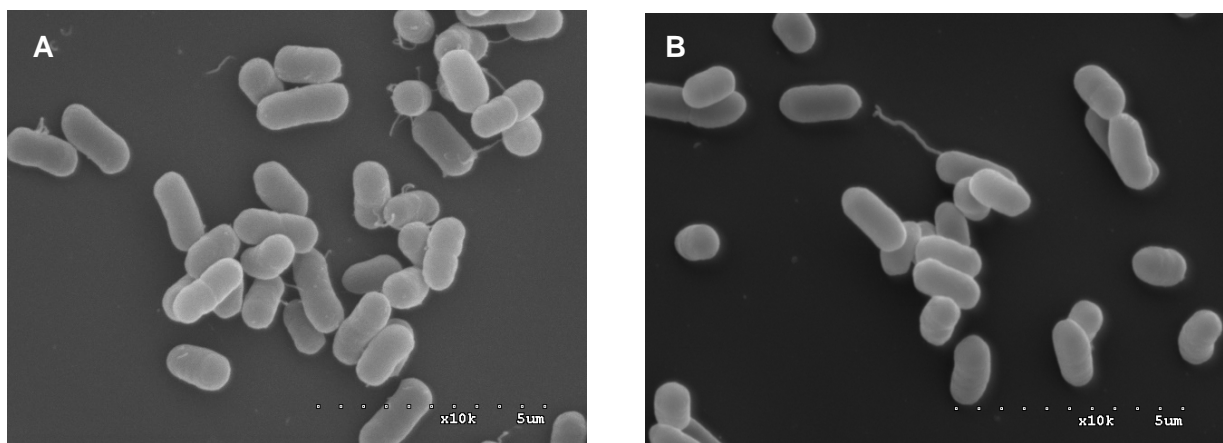


Abb. 134: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von shigatoxinbildenden *E. coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,99, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,57 \log_{10} KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) bei einem pH-Wert von 7 (Vergrößerung: 10.000)

Bei einem pH-Wert von 6 wurden in den Ansätzen mit a_w : 0,99, 0,975 und mit 0 bzw. 200 mg Nitrit/l eine verstärkte Bildung von Zellaggregaten beobachtet (siehe Abb. 135). Die Zellen waren kokkoide Stäbchen mit einer Größe von 2-3 x 0,8-1 μm . Die Zellen wiesen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen glatte Oberflächen auf (vgl. Abb. 135).

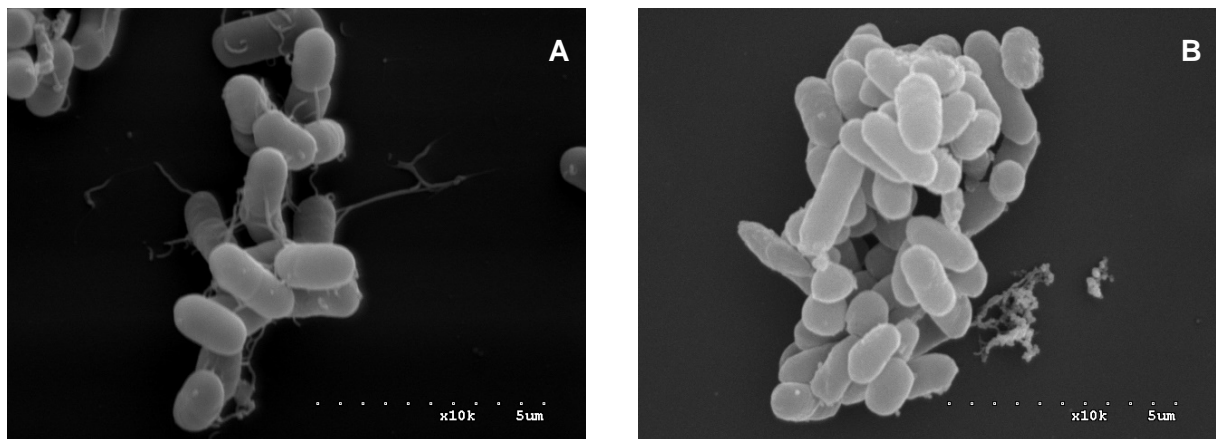


Abb. 135: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von shigatoxinbildenden *E. coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,57 log₁₀ KbE/ml) ohne (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) bei einem pH-Wert von 6 (Vergrößerung: 10.000)

Bei einem pH-Wert von 5 und a_w -Werten von 0,99 und 0,975 wurden lange schmale Stäbchen mit einer Länge von 3 - 4 μ m und einer Breite von 0,4 - 0,6 μ m beobachtet (siehe Abb. 136 B). Morphologisch waren die Zellen, die mit 0 mg/l und 200 mg Nitrit/l inkubiert wurden, identisch und wiesen eine glatte Oberfläche auf.

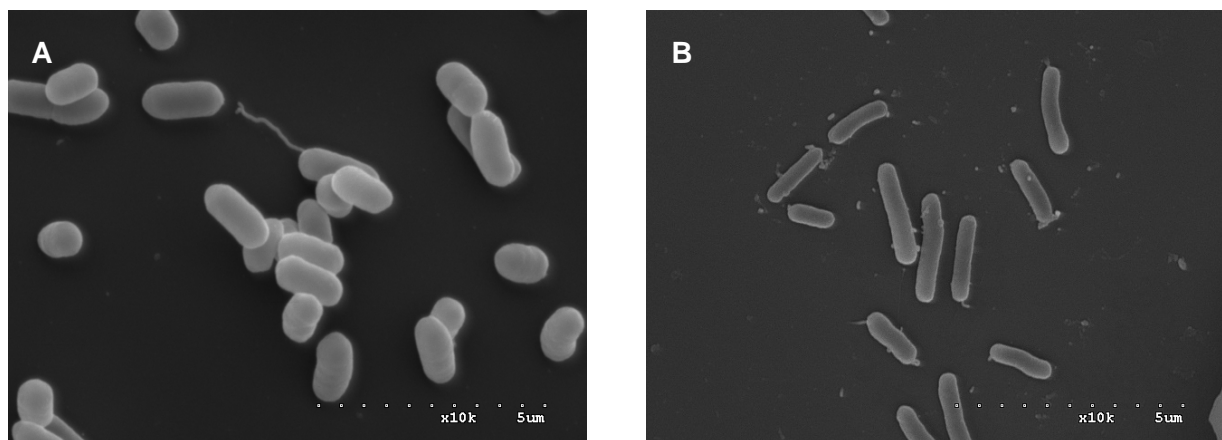


Abb. 136: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von shigatoxinbildenden *E. coli* nach einer 24-stündigen Inkubation in Peptonwasser (a_w : 0,975, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,53 log₁₀ KbE/ml, 200 mg Natriumnitrit/l) bei pH 7(A) und bei einem pH-Wert von 5 (B) (Vergrößerung: 10.000)

Listeria monocytogenes:

Bei einem pH-Wert von 7, einem a_w -Wert von 0,98 und einer Natriumnitritkonzentration von 0 mg/l wurden Stäbchen mit einer Größe von 1 – 2,5 x 0,3 – 0,4 μ m beobachtet (vgl. Abb. 137). In den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/l wurden bei denselben Bedingungen kleine

Stäbchen mit einer Länge von 0,5 – 1 µm und einer Breite von 0,2 – 0,3 µm festgestellt (siehe Abb.137).

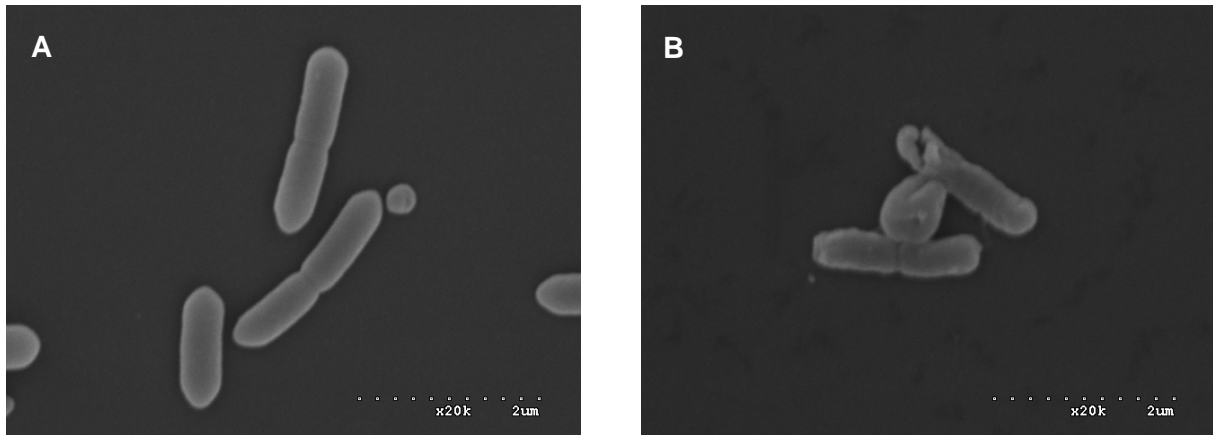


Abb. 137: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *L. monocytogenes* nach einer 24-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon (pH: 7 und a_w : 0,98, Temp.: 25 °C, Inokulum: 6,48 log₁₀ KbE/ml) ohne Natriumnitrit (A) und mit 200 mg Natriumnitrit/l (B) (Vergrößerung: 20.000)

Morphologisch wiesen die Listerien, die mit 200 mg/l inkubiert wurden, deutlich sichtbare strukturelle Schäden auf. Im Vergleich dazu besaßen die Zellen der Kontrolle ohne Nitrit eine glatte Oberfläche (vgl. Abb. 137).

Bei einem pH-Wert von 7, einer Wasseraktivität von 0,955 und bei 0 bzw. 200 mg Nitrit/l, wurden in allen mikroskopischen Aufnahmen sehr lange Stäbchen dokumentiert. Diese wiesen eine Länge von 4 bis 6 µm und eine Breite von 0,4 bis 0,5 µm auf (vgl. Abb. 138). Die Oberfläche der Listerien war in allen Ansätzen glatt (siehe Abb. 138).

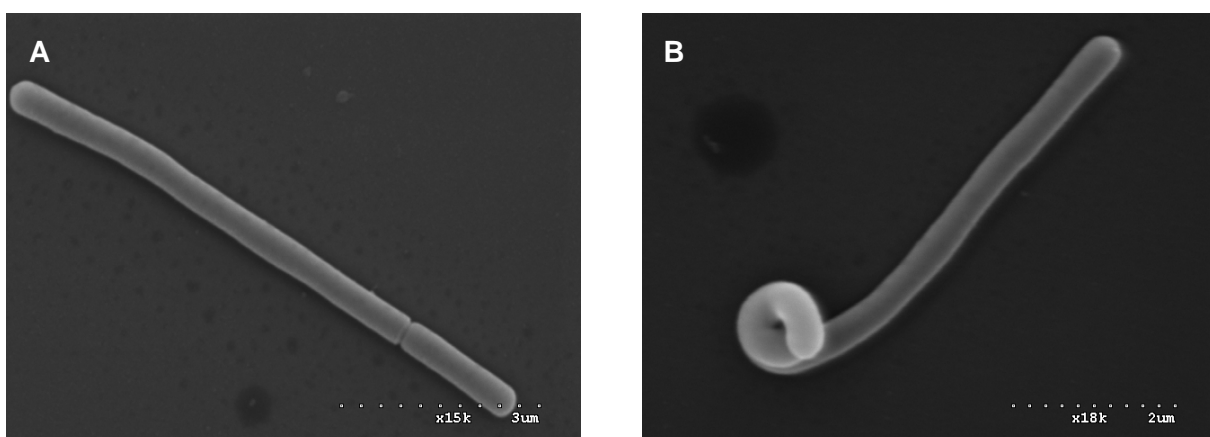


Abb. 138: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *L. monocytogenes* nach einer 24-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon (pH: 7 und a_w : 0,955, Temp.: 25 °C, Inokulum: 6,7 log₁₀ KbE/ml) ohne Natriumnitrit (A) und mit 200 mg/l Natriumnitrit (B) (Vergrößerung: A: 15.000 und B: 18.000)

Bei pH-Werten von 6 bzw. 5 wurden in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei allen getesteten Bedingungen Stäbchen detektiert. Diese hatten eine Länge von 0,7 – 2,2 μm und eine Breite von 0,4 – 0,5 μm (siehe Abb. 139).

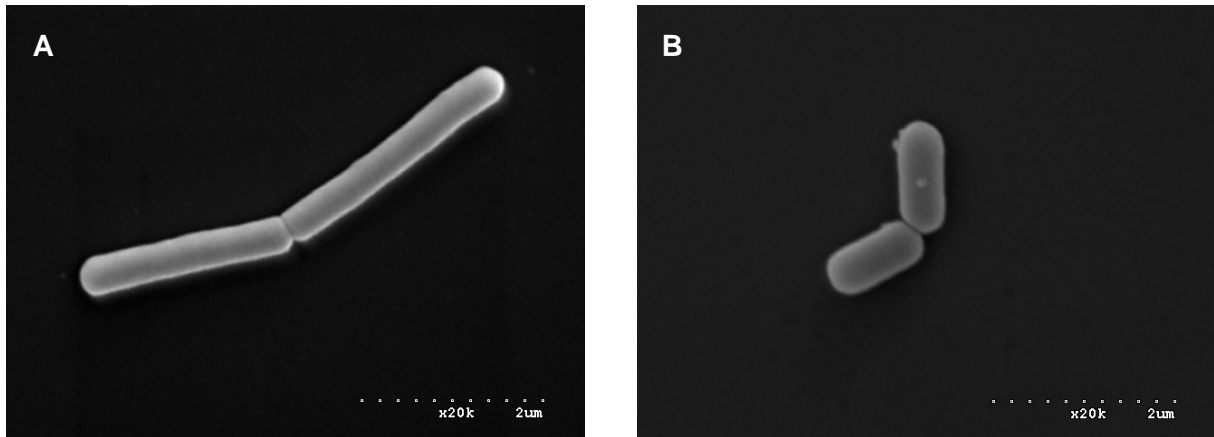


Abb. 139: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *L. monocytogenes* nach einer 24-stündigen Inkubation in Fraser-Listerien-Selektiv-Bouillon (a_w : 0,955, Temp.: 25 °C, Inokulum 6,48 \log_{10} KbE/ml und 200 mg Natriumnitrit/l) bei einem pH-Wert von 6 (A) und 5 (B) (Vergrößerung: 20.000)

Die Oberfläche war sowohl bei denen mit Nitrit als auch bei denen ohne Nitrit inkubierten Zellen glatt und ohne strukturelle Schäden.

4.2 Wirkung von Natriumnitrit – *in Situ* Untersuchungen

4.2.1 Kurzgereifte streichfähige Rohwurst (Typ-Teewurst)

Bei den Untersuchungen wurden zwei Reifeprogramme getestet. Ein Standardreifeprogramm (A) und ein Reifeprogramm (B), welches durch eine Temperaturerhöhung zwischen dem vierten und sechsten Tag eine metabolische Erschöpfung (Leistner, 1992) der Keime hervorrufen sollte. Parallel dazu wurden zwei unterschiedliche Kochsalzkonzentrationen von 2,5 % und 3 % und die Wirkung des Zusatzstoffes Natriumnitrit (0, 100, 150 und 200 mg/kg) auf das Verhalten der pathogenen Keime untersucht.

Physikalisch-chemische Parameter:

Am Tag 0 betrug der a_w -Wert in den Rohwürsten mit 2,5 % NaCl 0,968 und in denen mit 3 % NaCl 0,962 (siehe Abb. 140 und Anhang Abb. 141). Die Wasseraktivität nahm in allen Chargen des Reifeprogrammes A gleichmäßig ab und erreichte nach 28 Tagen in den Würsten mit 2,5 % NaCl Werte zwischen 0,952 und 0,948. In den Produkten mit 3 % NaCl, wurden am Tag 28 Wasseraktivitäten zwischen 0,94 und 0,945 gemessen (siehe Anhang Abb. 141).

Am Tag 28 wurden im Reifeprogramm B in den Produkten mit einem Kochsalzgehalt von 2,5 % a_W -Werte von 0,943 und in solchen mit 3 % NaCl a_W -Werte von 0,936 gemessen (siehe Abb. 140 und Anhang Abb. 141).

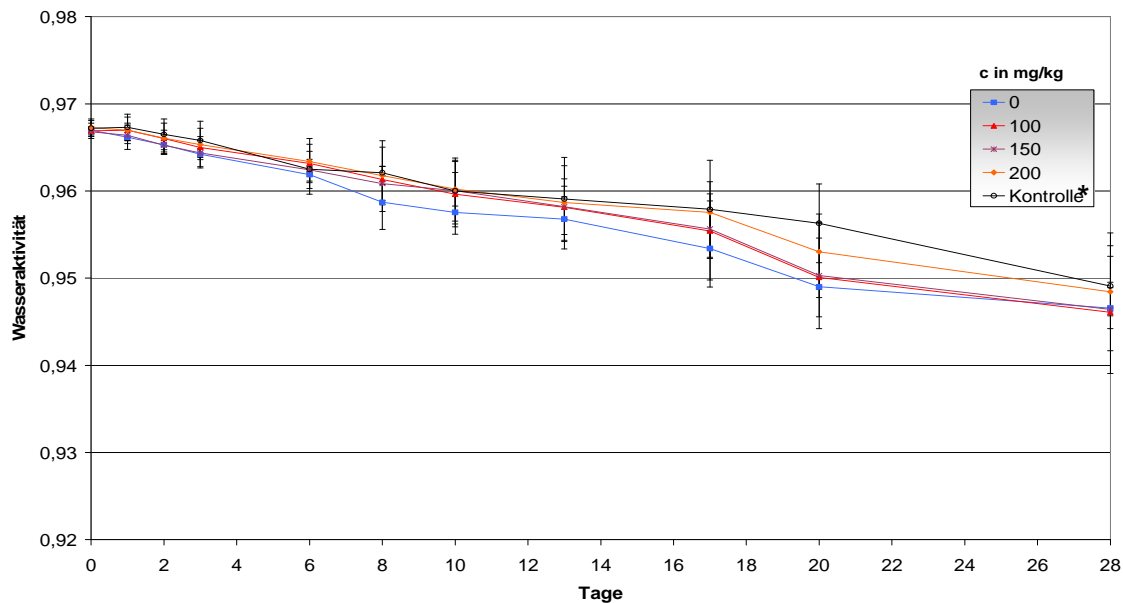


Abb. 140: Verlauf der a_W -Werte in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm A und 2,5 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Der Anfangs-pH-Wert lag zwischen 5,78 und 5,88 und fiel bei allen Chargen innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,17 und 5,35 (Abb. 142) ab. Mit Zunahme der Lagerungszeit stieg der pH-Wert auf Werte zwischen 5,45 und 5,52 in allen Versuchsansätzen an (vgl. Abb. 142 und Anhang Abb. 143).

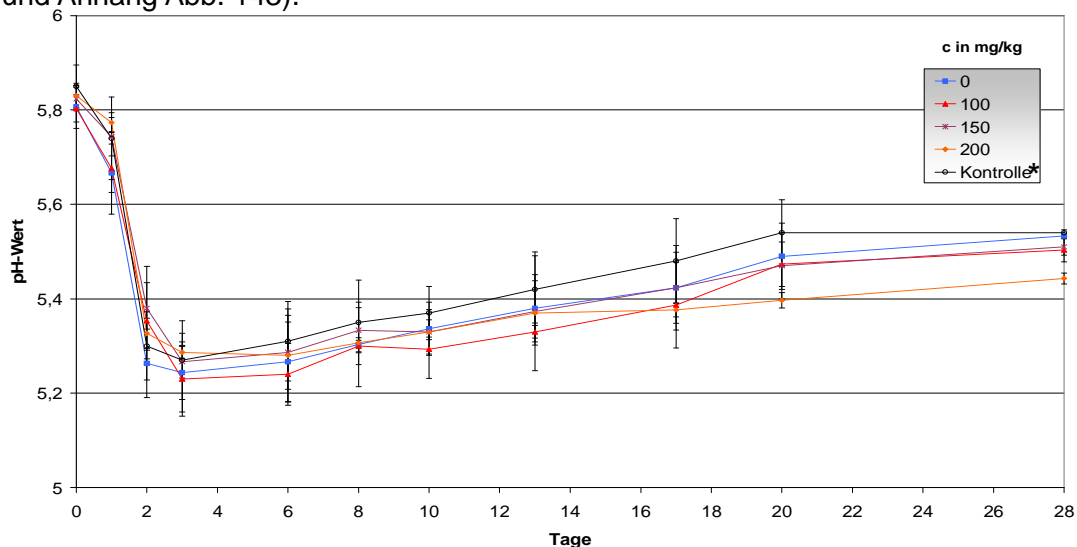


Abb. 142: Verlauf der pH-Werte in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm A und 2,5 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Natriumnitrit wurde in den Konzentrationen 0, 100, 150 und 200 mg/kg dem Brät zugesetzt. Unmittelbar nach der Abfüllung der Rohwürste betrug die gemessene Konzentration 80 – 90 mg/kg, 130 - 140 mg/kg bzw. 180 - 190 mg/kg. Während der Reifung nahm die Natriumnitritmenge stark ab. Nach sechs Tagen sank die Natriumnitritkonzentration in den Chargen mit 150 und 200 mg/kg unter die Nachweisgrenze von 20 mg/kg (siehe Anhang Abb. 144). Für die mit 100 mg/kg Nitrit hergestellten Produkte war dies bereits nach drei Reifetagen der Fall. Ein Einfluss der unterschiedlichen Kochsalzkonzentrationen sowie der Reifeprogramme A und B auf die Abnahme der Nitritkonzentration war nicht feststellbar (vgl. Anhang Abb. 144 und Abb. 145).

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Zwischen dem Tag 0 und 3 nahmen die Keimzahlen in allen Chargen von 7 log₁₀ KbE/g auf 8,6 log₁₀ KbE/g zu. Am Tag 28 konnten annähernd gleiche Keimzahlen von 8,7 log₁₀ KbE/g nachgewiesen werden (siehe Abb. 146).

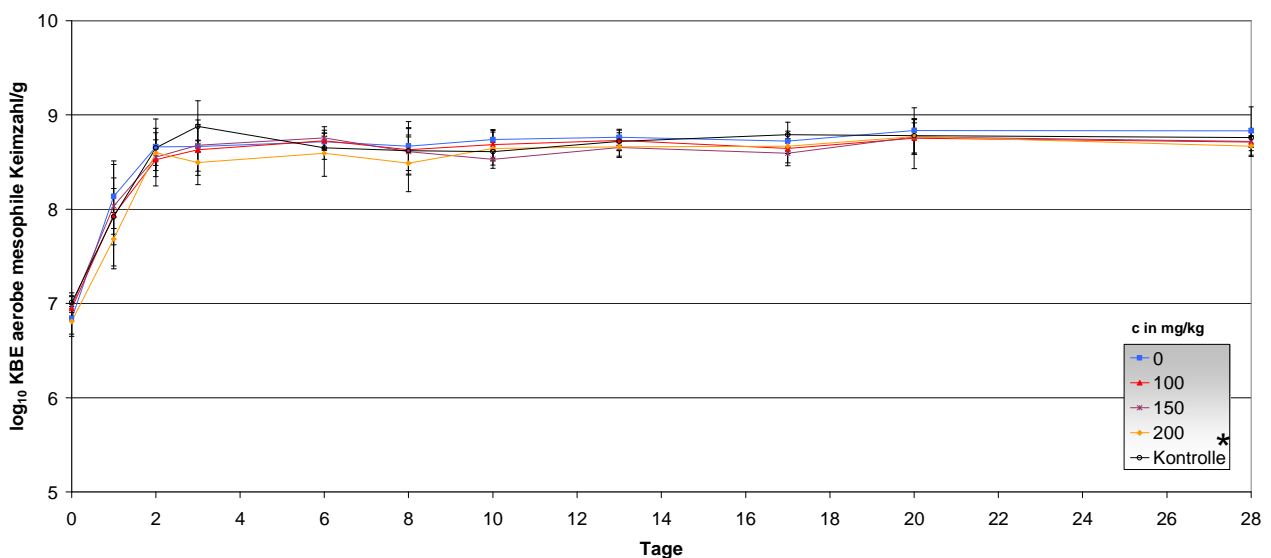


Abb. 146: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm A und 2,5 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

In allen Chargen (0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg) erfolgte die Vermehrung der Milchsäurebakterien von 6,3 log₁₀ KbE/g um zwei Zehnerpotenzen auf 8,3 log₁₀ KbE/g am Tag 3 (vgl. Abb. 147). Bis zum Ende der Untersuchungen blieb die Zahl der Milchsäurebakterien bei Werten über 8,0 log₁₀ KbE/g (Abb. 147).

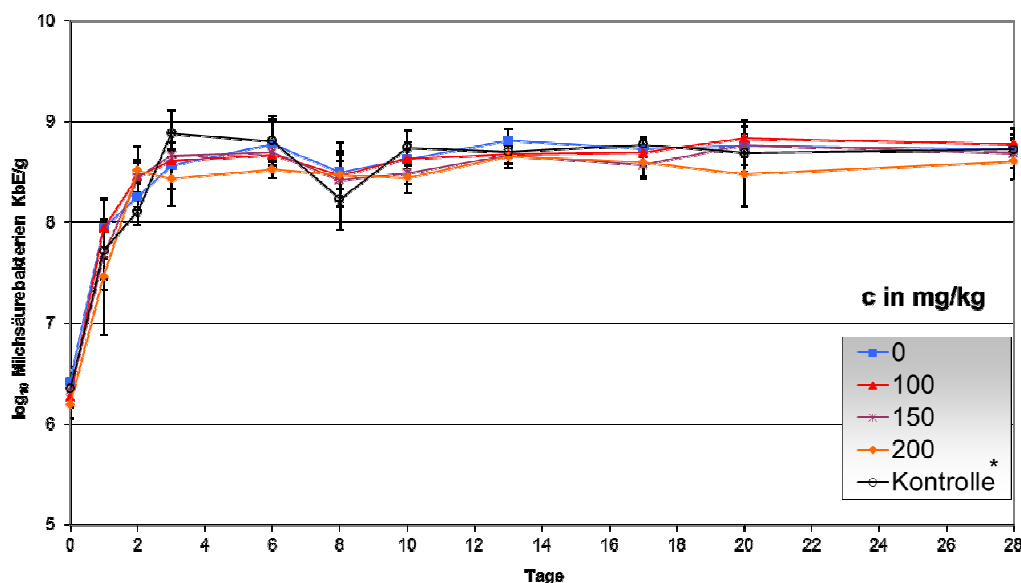


Abb. 147: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm A und 2,5 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Salmonella spp.

Reifeprogramm A

Das Verhalten von *Salmonella* spp. in kurzgereiften streichfähigen Rohwürsten gibt die Abb. 148 wieder. Bei einer Inokulationshöhe des Ausgangsbrätes mit ca. 3,6 log₁₀ KbE/g wurde innerhalb der ersten drei Reifetage eine deutliche Zunahme der Salmonellen-Zahl nur in den Ansätzen ohne Natriumnitrit beobachtet. In den Produkten, die mit 2,5 % NaCl hergestellt wurden, betrug die Zunahme etwa zwei Zehnerpotenzen und erreichte Werte von 5,5 log₁₀ KbE/g. In den mit 3 % Kochsalz produzierten Rohwürsten wurde ab Tag 6 ein leicht verzögerter Anstieg auf Keimzahlen von 5,5 log₁₀ KbE/g beobachtet (vgl. Anhang Abb. 149). Auf diesem hohen Niveau stabilisierte sich die Keimzahl und sank bis zum Tag 28 in beiden Ansätzen auf 5,1 – 5,4 log₁₀ KbE/g ab.

In den Chargen, denen Natriumnitrit in den Konzentrationen von 100, 150 und 200 mg/kg zugegeben wurde, wurde keine Zunahme der Keimzahl festgestellt. Die Salmonellen-Zahl sank über den Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab. Am Tag 28 wurden Keimzahlen von ca. 50 – 80 KbE/g (2,5 % NaCl) bzw. 100 – 250 KbE/g (3 %) detektiert (siehe Abb. 148 und Anhang Abb. 149).

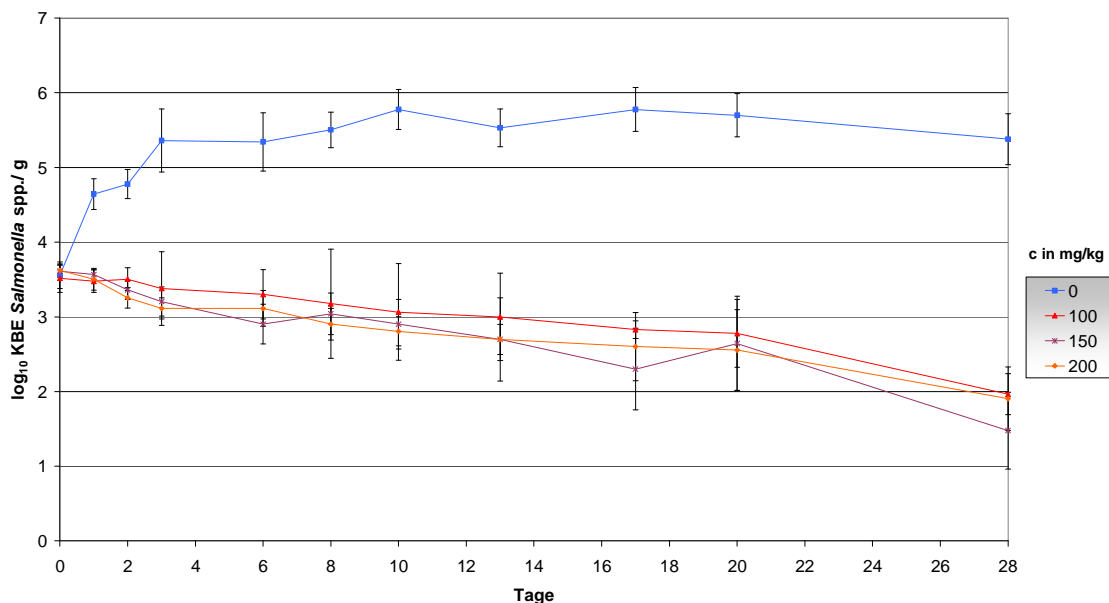


Abb. 148: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Reifeprogramm B

Analog zum Reifeprogramm A konnte in den Ansätzen ohne Nitrit eine Vermehrung von *Salmonella* spp. innerhalb der ersten 3 Tage festgestellt werden (siehe Abb. 150). Die Keimzahl erreichte Werte von 5,8 log₁₀ KbE/g (2,5 % NaCl) bzw. 5,3 log₁₀ KbE/g (3 % NaCl). Auf diesem Niveau blieb die Zahl von *Salmonella* spp. zunächst und sank ab Tag 20 auf 4,9 log₁₀ KbE/g (2,5 % NaCl) und 4,5 log₁₀ KbE/g (3 % NaCl). In den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg sank die Keimzahl von 3,8 log₁₀ KbE/g kontinuierlich ab und erreichte in allen Chargen nach 28 Tagen z.T. Keimzahlen von unter 10 KbE/g. Ein Nachweis der Organismen war zu diesem Zeitpunkt nur noch nach Anreicherung möglich war (vgl. Abb. 150 und Anhang Abb. 151).

ERGEBNISSE

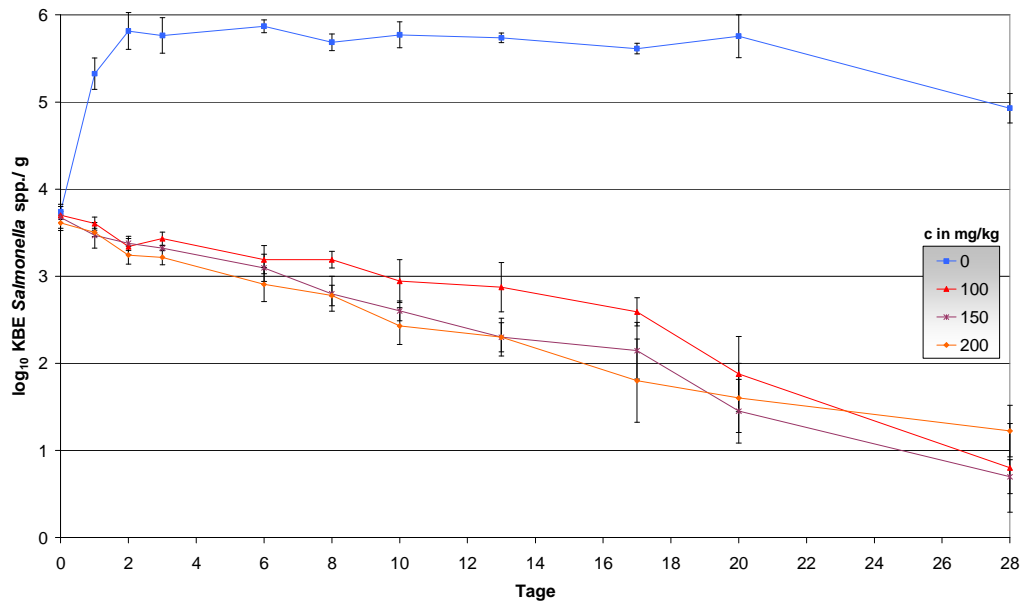


Abb. 150: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Shigatoxinbildende *Escherichia coli*

Reifeprogramm A

Bei einer Kochsalzkonzentration von 2,5 % sank die Zahl der *E. coli* in allen Chargen ab, in den ersten drei Tagen von 3,8 log₁₀ KbE/g auf Werte um 3,3 – 3,5 log₁₀ KbE/g. Bis zum Tag 28 blieb die Keimzahl konstant auf diesem Niveau (siehe Abb. 152).

Bei einem Zusatz von 3 % NaCl nahmen die Keimzahlen der *Escherichia coli* von 3,8 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 3,5 log₁₀ KbE/g am Tag 3 ab (siehe Anhang Abb.153). Zwischen dem Tag 3 und Tag 20 blieben die Keimzahlen zunächst konstant auf diesem Niveau und erreichten Werte zwischen 3,4 und 3,1 log₁₀ KbE/g. Am Tag 28 wurden in der Kontrolle ohne Nitrit 2,85 log₁₀ KbE/g und in den Chargen mit Nitrit Keimzahlen zwischen 2,6 und 2,4 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 153).

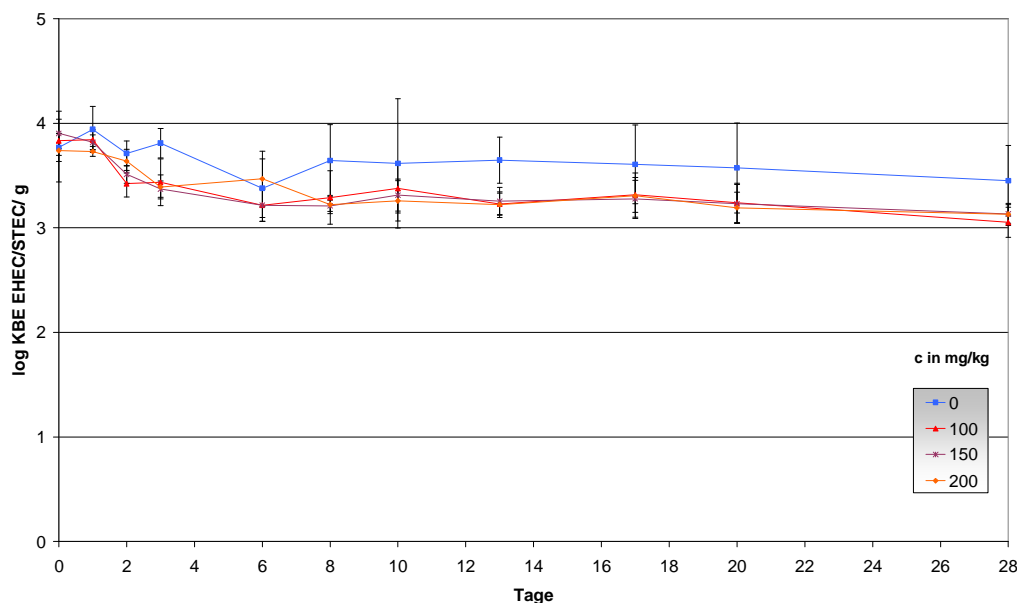


Abb. 152: Verhalten von STEC/EHEC in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Reifeprogramm B

Bei einer Kochsalzkonzentration von 2,5 % nahm die Keimzahl von Beginn der Reifung kontinuierlich ab, so dass am Tag 3 sowohl in den Ansätzen der Kontrolle als auch in solchen mit Nitrit Keimzahlen von $3 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen wurden. Im weiteren Verlauf der Lagerung sank die Zahl der pathogenen Mikroorganismen zunächst bis zum Tag 17 auf Werte zwischen 2,8 und $3 \log_{10}$ KbE/g. Zwischen dem Tag 17 und dem Tag 28 wurde anschließend eine starke Abnahme der Keimzahl beobachtet. In der Kontrolle wurden Keimzahlen von $2,2 \log_{10}$ KbE/g und in den Rohwürsten mit Nitrit Keimzahlen zwischen 1,6 und $1,9 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 154).

Bei einer Kochsalzkonzentration von 3 % im Ausgangsbrät wurde eine gleichmäßige und konstante Abnahme der Keimzahl im Produkt festgestellt (vgl. Anhang Abb. 155). Zwischen dem Tag 0 und dem Tag 13 nahm die Keimzahl von $3,9 \log_{10}$ KbE/g auf 2,6 bis $2,8 \log_{10}$ KbE/g ab. Am Tag 28 wurden in allen Chargen (0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg) Keimzahlen zwischen 25 und 40 KbE/g nachgewiesen (siehe Anhang Abb.155).

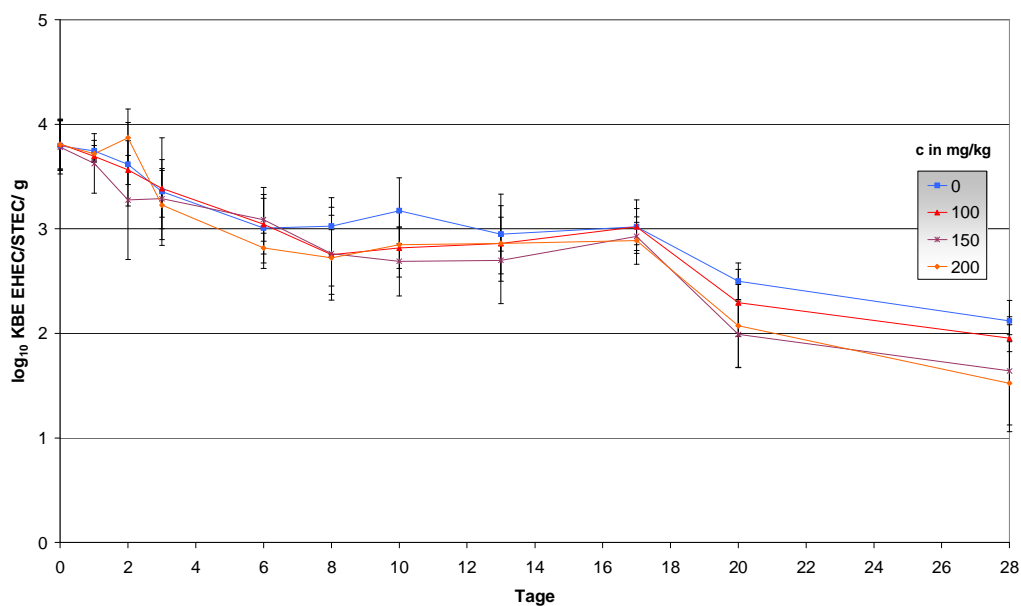


Abb. 154: Verhalten von STEC/EHEC in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Listeria monocytogenes

Reifeprogramm A

Listeria monocytogenes wurde im Mittel in einer Keimzahl von 3,8 – 3,9 log₁₀ KbE pro g dem Brät zugegeben. In den Chargen mit 2,5 % NaCl wurde zwischen dem Tag 0 und dem Tag 1 in der Kontrolle ohne Nitrit ein Anstieg der Keimzahl auf 4,8 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 156). Anschließend änderte sich die Listerienzahl der Kontrolle nur geringfügig während Reifung und Lagerung und erreichte am Tag 28 Werte um 4,8 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 156). In den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg blieben die Keimzahlen über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant bei Werten zwischen 3,6 und 3,8 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 156).

Bei einer Kochsalzkonzentration von 3 % nahm die Keimzahl nur in der Kontrolle von 3,8 log₁₀ KbE/g auf 4,3 log₁₀ KbE/g am Tag 1 zu (siehe Anhang Abb. 157). In den Ansätzen mit Nitrit sank die Listerienzahl zwischen dem Tag 0 und Tag 2 ganz leicht und blieb anschließend bis zum Tag 28 konstant, so dass in den Chargen mit 100 mg Nitrit/kg Keimzahlen von 3,7 log₁₀ KbE/g, in denen mit 150 mg Nitrit/kg 3,6 log₁₀ KbE/g und in denen mit 200 mg Nitrit/kg 3,4 log₁₀ KbE/g nachgewiesen wurden (siehe Anhang Abb. 157).

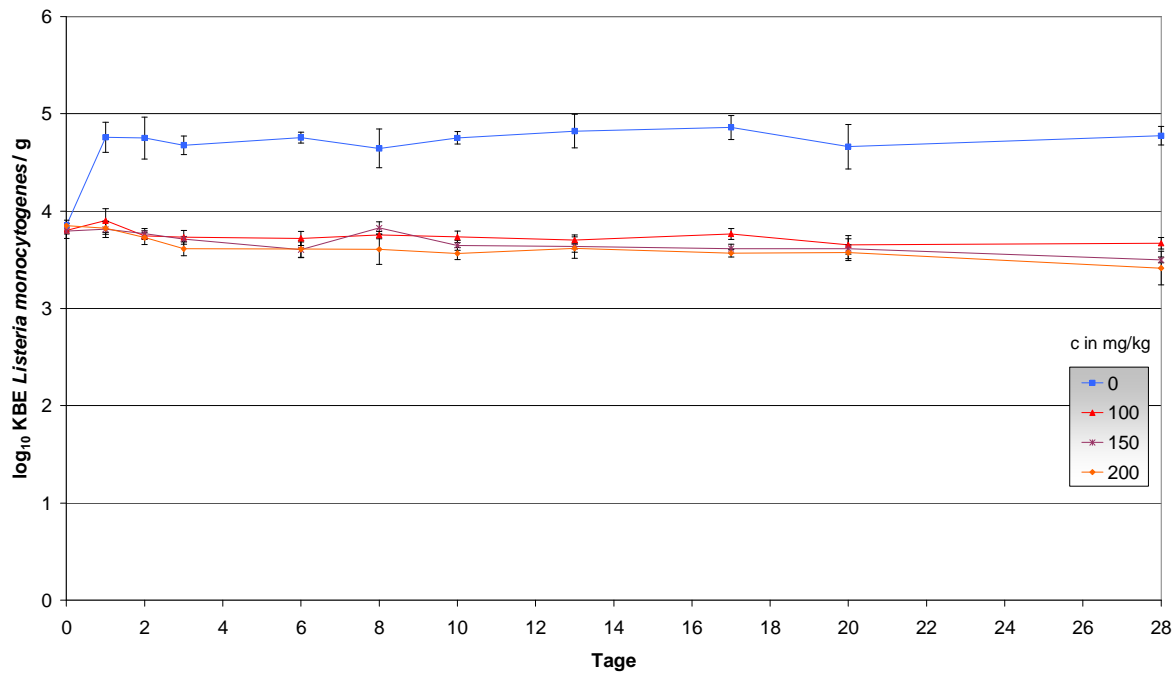


Abb. 156: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Reifeprogramm B

Das Ausgangsbrät mit 2,5 % NaCl wurde mit einer Keimsuspension von 3,8 log₁₀ KbE/g inokuliert (siehe Abb. 158). In den ersten 24 Stunden wurde eine Zunahme der Keimzahl in der Kontrolle ohne Nitrit auf 4,8 log₁₀ KbE/g nachgewiesen. Auf diesem Niveau verblieb die Listerienzahl in der Kontrolle bis zum Tag 28. In den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Natriumnitrit/kg sank die Listerienzahl von 3,85 log₁₀ KbE/g am Tag 0 kontinuierlich auf 3 log₁₀ KbE/g am Tag 28 (siehe Abb. 158).

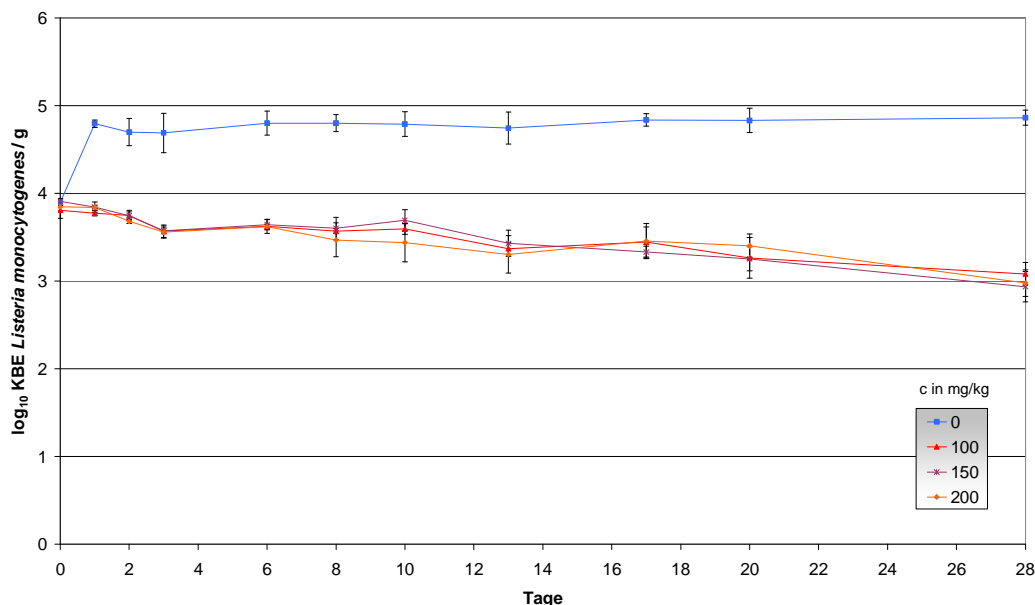


Abb. 158: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (2,5 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Bei einer Kochsalzkonzentration von 3 % nahm die Listerienzahl in der Kontrolle ohne Nitrit innerhalb von 24 Stunden von 3,9 log₁₀ KbE/g auf 4,5 log₁₀ KbE/g zu (siehe Anhang Abb. 159). Während der weiteren Reifung und Lagerung blieb die Keimzahl stabil, so dass am Tag 28 Keimzahlen von 4,7 log₁₀ KbE/g nachgewiesen wurden (siehe Anhang Abb. 159). In den Produkten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg sank die Zahl der Listerien bis zum Tag 3 auf 3,7 log₁₀ KbE/g. Zwischen dem Tag 3 und dem Tag 28 blieben die Keimzahlen annähernd konstant. Am Tag 28 wurden in den Würsten mit 100 mg Nitrit/kg Listerienzahlen von 3,6 log₁₀ KbE/g, in solchen mit 150 mg Nitrit/kg 3,3 log₁₀ KbE/g und in denen mit 200 mg Nitrit/kg 3,2 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 159).

4.2.2 Schnellgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-GdL-Salami)

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei Reifeprogramme getestet, ein Standardreifeprogramm A und ein Reifeprogramm B, welches durch eine Temperaturerhöhung ein vorzeitiges Absterben der Keime hervorrufen sollte. Bei allen Chargen sollte der Einfluss des Zusatzstoffes Natriumnitrit sowie der Einfluss der zwei Reifeprogramme auf das Verhalten der verwendeten Keime untersucht werden.

Physikalisch-chemische Parameter:

Im Reifeprogramm A nahm der a_w -Wert von 0,964 über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich bis zum Tag 28 ab. Die Abnahme der Wasseraktivität war bei allen Chargen vergleichbar, so dass am Tag 28 a_w -Werte zwischen 0,886 und 0,893 gemessen wurden (siehe Abb. 160). Im Reifeprogramm B wurde eine für alle Produkte vergleichbare Abnahme der Wasseraktivität nachgewiesen. Der a_w -Wert sank von 0,966 am Tag 0 auf Werte zwischen 0,883 und 0,886 (siehe Anhang Abb. 161).

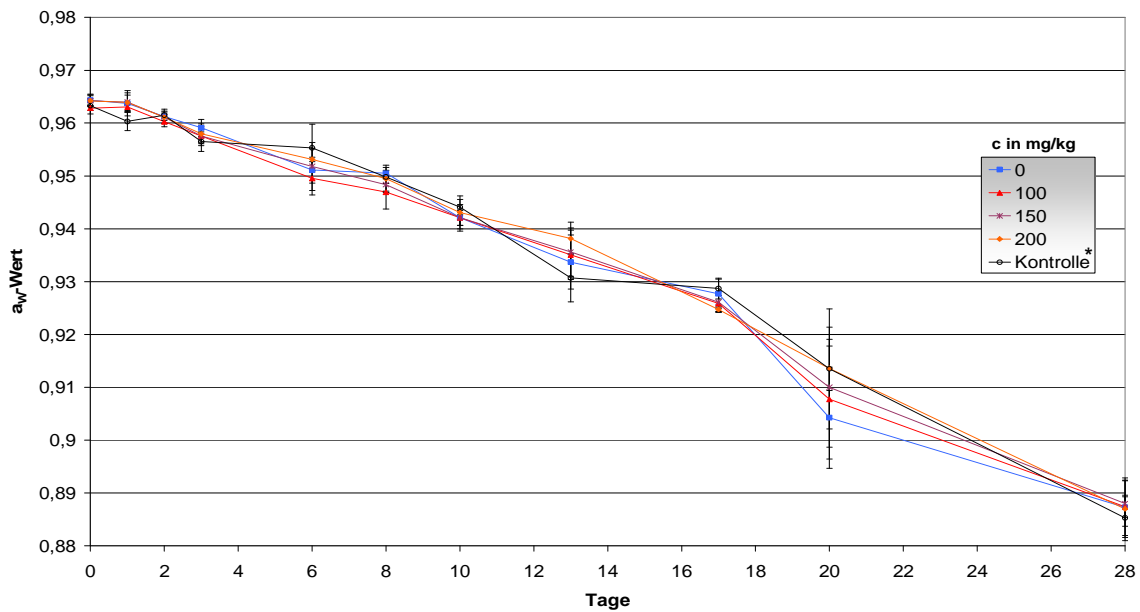


Abb. 160: Verlauf der a_w -Werte in einer schnellgereiften schnittfesten Rohwurst (Reifeprogramm A). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Der Anfangs-pH-Wert lag im Reifeprogramm A zwischen 5,75 und 5,85 und fiel bei allen Produkten innerhalb von drei Tagen auf Werte von 4,9 ab. Mit fortschreitender Reifung und Lagerung stieg der pH-Wert auf Werte zwischen 5,1 und 5,25 am Tag 28 an (siehe Abb. 162).

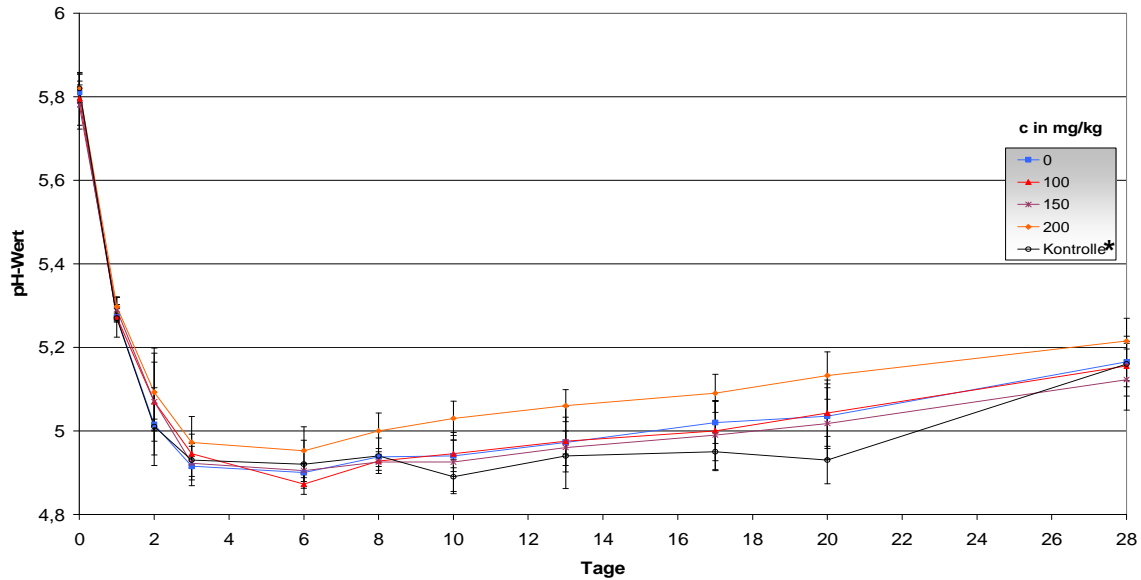


Abb. 162: Verlauf der pH-Werte in einer schnellgereiften schnittfesten Rohwurst (Reifeprogramm A). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Im Reifeprogramm B sank der pH-Wert von 5,85 am Tag 0 auf 5,1 am Tag 3 ab. Anschließend stieg der pH-Wert zwischen dem Tag 10 und dem Tag 28 an. Am Tag 28 wurden in allen Würsten pH-Werte zwischen 5,15 und 5,25 gemessen (siehe Anhang Abb. 163).

Die Natriumnitritkonzentration nahm im Reifeprogramm A und im Programm B ab und sank nach 24 Stunden in den Ansätzen mit 100 und 150 mg Nitrit/kg unter die Nachweisgrenze von 20 mg/kg ab (siehe Abb. 164 und Anhang Abb. 165). In den Würsten mit 200 mg Natriumnitrit/kg war nach 48 h kein Natriumnitrit mehr nachweisbar (siehe Abb. 164 und Anhang Abb. 165).

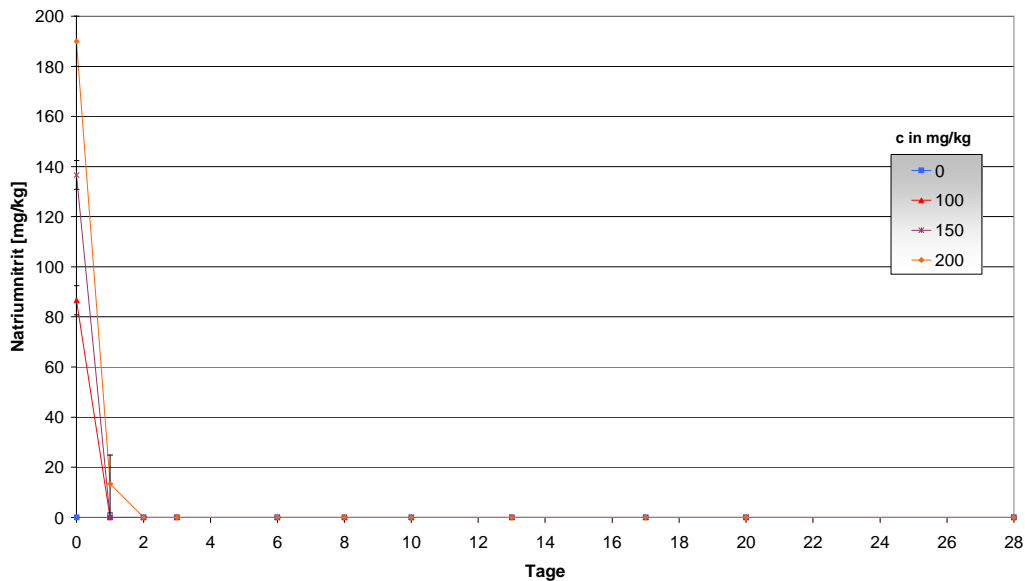


Abb. 164: Verlauf der Natriumnitritkonzentration (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Die aerobe mesophile Keimzahl blieb während der ersten 24 Stunden nahezu konstant bei $7 \log_{10}$ KbE/g (siehe Anhang Abb. 166). Zwischen dem Tag 1 und Tag 3 nahm die Keimzahl um eineinhalb Zehnerpotenzen auf $8,4 \log_{10}$ KbE/g zu und blieb anschließend bis zum Tag 28 auf diesem Niveau. Der Verlauf der Milchsäurebakterienzahl war mit dem der aeroben mesophilen Keimzahlen (GKZ) nahezu identisch, wobei die GKZ durch die miterfassten Mikrokokken der Starterkulturen höher lagen (vgl. Anhang Abb. 166 und Abb. 167). Während der ersten 24 Stunden nahm die Zahl der Milchsäurebakterien leicht von $6,1 \log_{10}$ KbE/g auf $6,3 \log_{10}$ KbE/g zu. Anschließend stiegen die Keimzahlen stark an und erreichten am Tag 3 Werte von $8,49 \log_{10}$ KbE/g. Bis zum Ende der Untersuchungen fiel die Zahl der Milchsäurebakterien nicht unter $8,0 \log_{10}$ KbE/g (siehe Abb. 167).

ERGEBNISSE

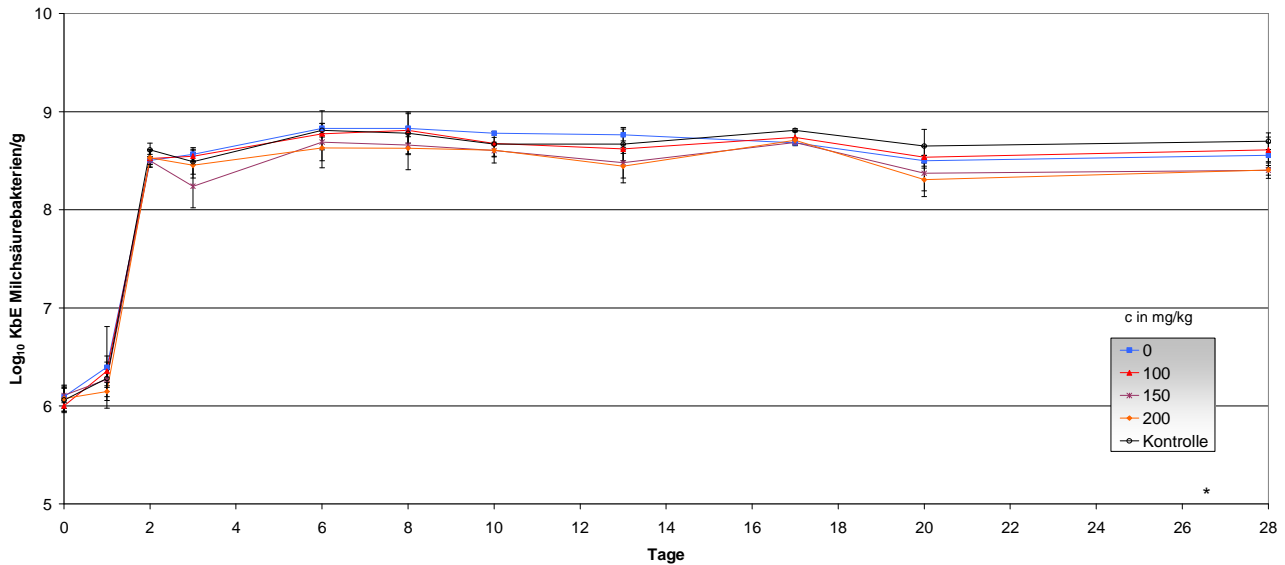


Abb. 167: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Salmonella spp.:

Reifeprogramm A

Das Brät wurde mit einer *Salmonella* spp. Keimmenge von ca. 3,0 - 3,5 log₁₀ KbE/g inokuliert (siehe Abb. 168). In allen Chargen nahm die Zahl Salmonellen ab. In den Würsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg wurden am Tag 2 Keimzahlen von 2 log₁₀ KbE/g nachgewiesen. Nach 6 Tagen lagen die Keimzahlen unter 10 KbE/g und ein Nachweis der Salmonellen war nur noch nach Anreicherung möglich (siehe Abb. 168). Ab dem Tag 13 konnten in den Chargen mit Nitrit auch nach Anreicherung keine Salmonellen mehr isoliert und nachgewiesen werden. In der Kontrolle ohne Nitrit sank die Salmonellenzahl bis zum Tag 2 auf Werte von 2,9 log₁₀ KbE/g und anschließend weiter auf 1,3 log₁₀ KbE/g am Tag 13. Am Tag 20 und 28 wurden in dem zuletzt genannten Ansatz keine Salmonellen mehr festgestellt (siehe Abb. 168).

ERGEBNISSE

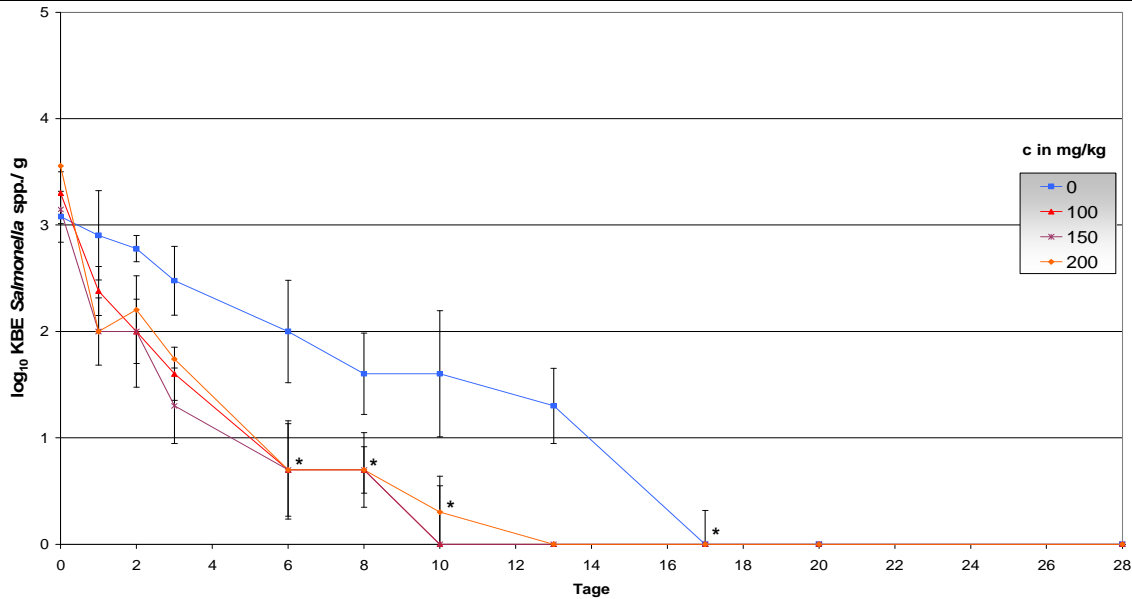


Abb. 168: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Reifeprogramm B

In den Würsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nahm die Zahl der Salmonellen zügig ab. Sie sank von $3,5 \log_{10}$ KBE/g am Tag 0 auf $2 \log_{10}$ KBE/g am Tag 2 (siehe Anhang Abb. 169). Ab dem Tag 6 war ein Nachweis nur noch nach Anreicherung (< 10 KBE/g) und am Tag 13 war kein Nachweis mehr möglich. In den Würsten ohne Nitrit sank die Keimzahl auf $2,7 \log_{10}$ KBE/g am Tag 2 und nahm weiter bis zum Tag 8 auf 10 KBE/g ab (siehe Anhang Abb. 169). Ab dem Tag 17 wurden keine Salmonellen mehr in diesen Produkten festgestellt.

Shigatoxinbildende *Escherichia coli*:

Reifeprogramm A

Das Brät wurde mit einer EHEC/STEC-Keimmenge von $4 \log_{10}$ KBE/g beimpft. Innerhalb der ersten drei Reifetage wurde in allen Chargen eine Abnahme der Keime auf $2,8 - 3 \log_{10}$ KBE/g festgestellt (siehe Abb. 170). Zwischen dem Tag 3 und dem Tag 17 sank die Keimzahl in den Produkten mit 100 und 150 mg Nitrit/kg auf $1,1 \log_{10}$ KBE/g ab. In den Würsten mit 200 mg Nitrit/kg nahm die Zahl der Salmonellen im gleichen Zeitraum auf $1,3 \log_{10}$ KBE/g ab. In der Kontrolle ohne Nitrit wurden am 17. Tag Salmonellen-Zahlen von $1,7 \log_{10}$ KBE/g detektiert. Am Tag 28 wurden in den Produkten mit Nitrit auch nach

Anreicherung keine Salmonellen mehr nachgewiesen. In den Untersuchungen ohne Nitrit war ein Nachweis bis zum letzten Untersuchungstag möglich (siehe Abb. 170).

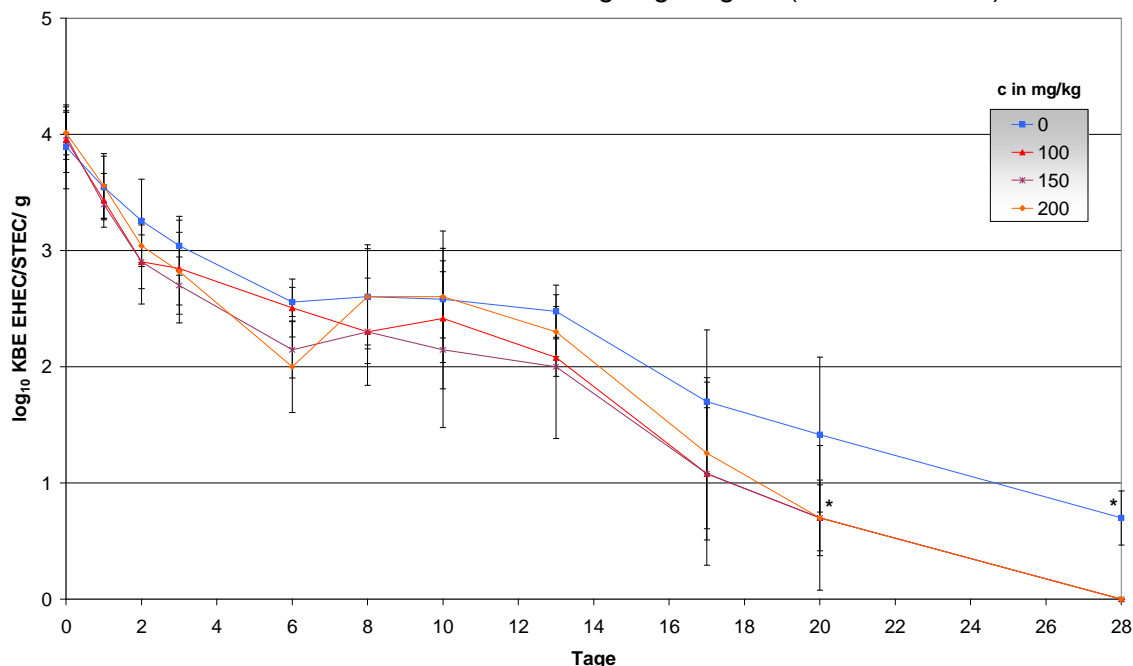


Abb. 170: Verhalten von STEC/EHEC in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Reifeprogramm B

Im Vergleich zum Reifeprogramm A wurde durch eine Temperaturerhöhung auf $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ zwischen dem vierten und sechsten Tag (Reifeprogramm B) eine deutlichere Abnahme der Keimzahlen im Produkt erreicht (vgl. Abb. 170 und Anhang Abb. 171). Am Tag 6 wurden in den Ansätzen mit 200 mg Nitrit/kg Keimzahlen von $1,3 \log_{10}$ KbE/g, in solchen mit 100 mg Nitrit/kg $1,9 \log_{10}$ KbE/g und in denen der Kontrolle ohne Nitrit $2,5 \log_{10}$ KbE/g festgestellt (siehe Anhang Abb. 171). In den Würsten mit 150 mg Nitrit/kg war am Tag 6 kein quantitativer Nachweis mehr möglich. Ab dem Tag 8 waren STEC/EHEC in allen mit Nitrit hergestellten Produkten qualitativ nach Anreicherung detektierbar. In den Kontrollen ohne Nitrit wurden die shigatoxinbildenden *Escherichia coli* bis zum Tag 17 quantitativ mit Keimzahlen von etwa 10 KbE/g nachgewiesen. Zum Ende der Untersuchung am Tag 28 war kein qualitativer Nachweis der eingepflichten Keime mehr möglich (siehe Anhang Abb. 171).

Listeria monocytogenes:

Reifeprogramm A

Listeria monocytogenes wurde dem Brät in einer Keimzahl von ca. 3,8 log₁₀ KbE/g zugegeben (siehe Abb. 172). In keiner Charge nahm im Untersuchungszeitraum die Zahl der Listerien zu. Zwischen dem Tag der Beimpfung und dem Tag 6 nahm die Keimzahl um etwa eine Zehnerpotenz ab. In der Kontrolle ohne Nitrit wurden am Tag 6 Keimzahlen von 2,8 log₁₀ KbE/g ermittelt (siehe Abb. 172). In den Würsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg wurden am Tag 6 3,2 log₁₀ KbE/g rekultiviert. Bis zum Tag 20 blieben die Listerienzahlen zunächst auf diesem Niveau. Am Tag 28 wurden in der Kontrolle Keimzahlen von 1,7 log₁₀ KbE/g und in denen mit Nitrit 1,8 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 172).

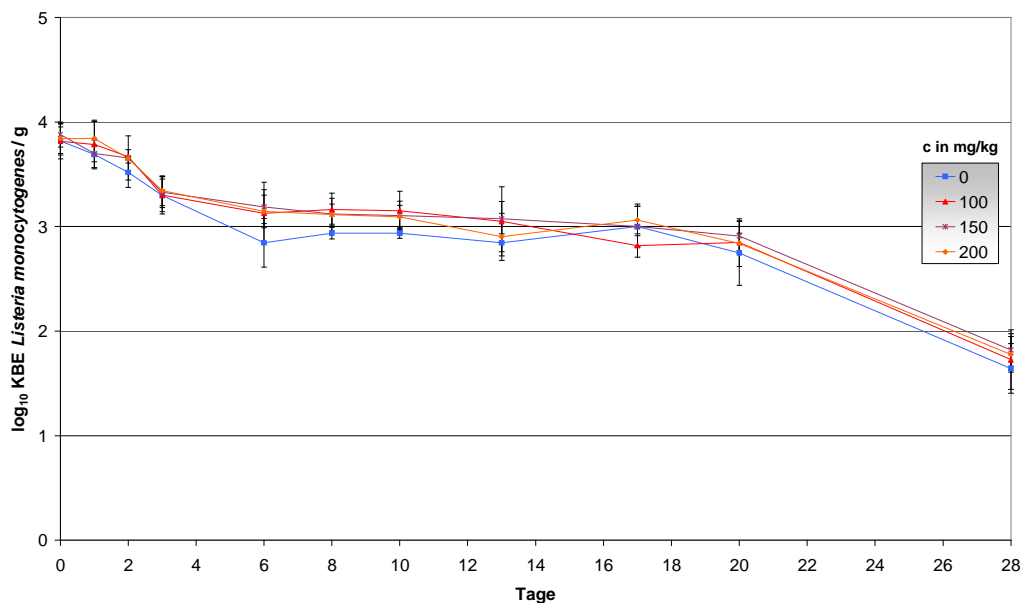


Abb. 172: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Reifeprogramm B

Während der ersten 6 Untersuchungstage nahmen die Keimzahlen in allen Produkten gleichmäßig von 3,8 log₁₀ KbE/g auf 3,1 log₁₀ KbE/g ab. Zwischen dem Tag 6 und dem Tag 13 wurde in der Kontrolle eine stärkere Abnahme der Keimzahl nachgewiesen als in Proben, die mit Natriumnitrit hergestellt wurden. In den Chargen ohne Nitrit betrug die Zahl der Listerien am Tag 13 2,3 log₁₀ KbE/g, in denen mit 100 mg Nitrit/kg 2,9 log₁₀ KbE/g und in solchen mit 150 und 200 mg Nitrit/kg noch 2,7 log₁₀ KbE/g (siehe Anhang Abb. 173).

Nach 28 Tagen waren in der Kontrollcharge und Chargen mit 150 und 200 mg Nitrit/kg Keimzahlen von $1,6 \log_{10}$ KbE/g erfassbar. In den Produkten mit 100 mg Nitrit/kg wurden $2,8 \log_{10}$ KbE/g festgestellt (siehe Anhang Abb. 173).

4.2.3 Langgereifte schnittfeste Rohwurst (Typ-Salami)

Bei den Versuchsansätzen wurden zwei verschiedene Salzkonzentrationen getestet, eine Salzkonzentration von 2,8 % und eine von 3,4 % NaCl. Neben den unterschiedlichen Kochsalzkonzentrationen sollte die Wirkung von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen auf die Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* überprüft werden.

Physikalisch-chemische Parameter:

In den Rohwürsten mit einer Kochsalzkonzentration von 2,8 % nahm der a_w -Wert von 0,964 am Tag 0 kontinuierlich bis zum Tag 84 ab. Am Tag 84 wurden sowohl in der Kontrolle als auch in Chargen mit unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen Wasseraktivitäten zwischen 0,835 und 0,84 nachgewiesen (siehe Abb. 174).

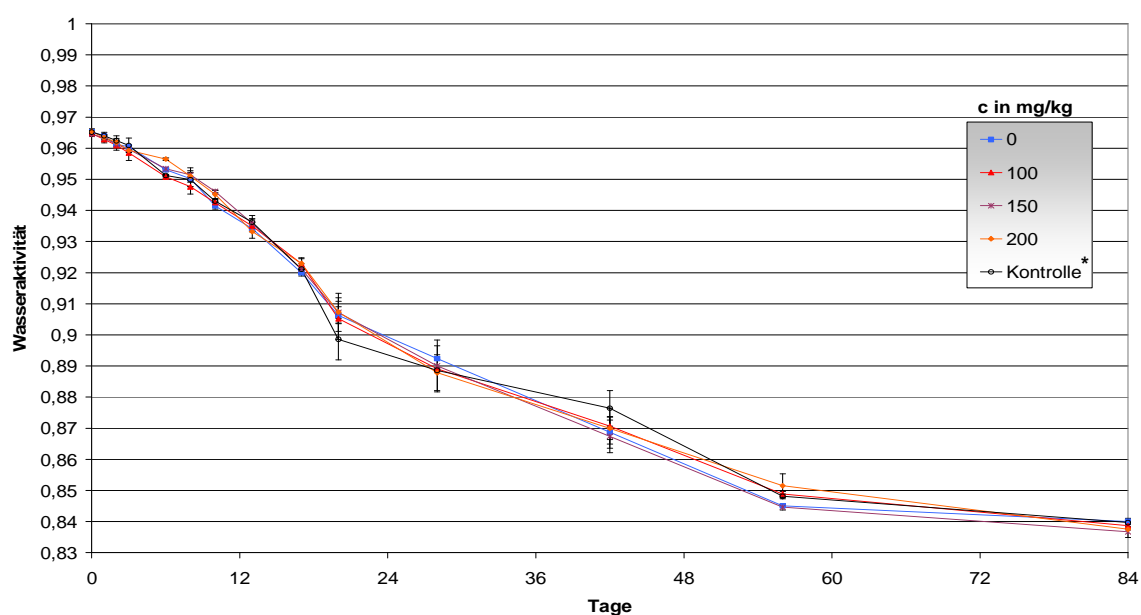


Abb. 174: Verlauf der a_w -Werte in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Bei einer Kochsalzkonzentration von 3,4 % lag der a_w -Wert am Tag 0 bei 0,959 (siehe Anhang Abb. 175). Während der Reifung und Lagerung sank die Wasseraktivität in den Würsten kontinuierlich bis zum letzten Untersuchungstag. Am Tag 84 wurden in allen

Chargen annähernd gleiche a_w -Werte von 0,834 bis 0,84 gemessen (siehe Anhang Abb. 175).

In den Produkten mit 2,8 % NaCl fiel der Anfangs-pH-Wert von 5,85 bei allen Chargen zunächst innerhalb von drei Tagen auf Werte zwischen 5,1 und 5,3 ab (siehe Abb. 176). Die niedrigsten pH-Werte wurden mit 5,1 am Tag 3 in den Ansätzen ohne Natriumnitrit gemessen. Ab Tag 3 stieg der pH-Wert anschließend in allen Produkten an und erreichte am Tag 84 Werte von 5,55 (siehe Abb. 176).

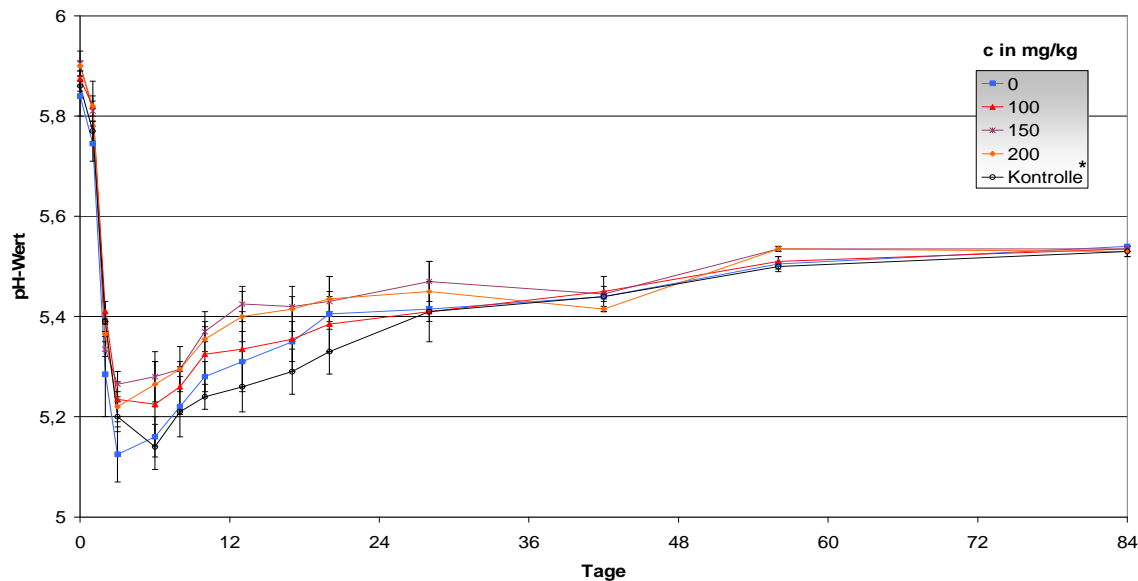


Abb. 176: Verlauf der pH-Werte in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Am Tag 0 wurden in den Rohwürsten mit 3,4 % NaCl pH-Werte zwischen 5,8 und 5,85 gemessen. Bis zum Tag 3 sank der pH-Wert in den Produkten ohne Nitrit auf Werte von 5,1 und stieg anschließend bis zum Tag 84 auf 5,6 an (siehe Anhang Abb. 177). In den Chargen mit 100 mg Nitrit/kg nahm der pH bis zum Tag 3 auf Werte von 5,15 und in denen mit 150 und 200 mg Nitrit/kg auf 5,2 ab. Anschließend wurde in diesen Chargen ein Anstieg des pH-Wertes bis zum Tag 84 auf 5,6 beobachtet (siehe Anhang Abb. 177).

Die zugesetzte Natriumnitritkonzentration nahm sowohl in den Produkten mit 2,8 % NaCl als auch in solchen mit 3,4 % NaCl in allen Chargen schnell ab (siehe Abb. 178 und Anhang Abb. 179). Nach 6 Tagen war die Nitritkonzentration bis unter die Nachweisgrenze des eingesetzten Testverfahrens abgesunken (siehe Abb. 178 und Anhang Abb. 179).

ERGEBNISSE

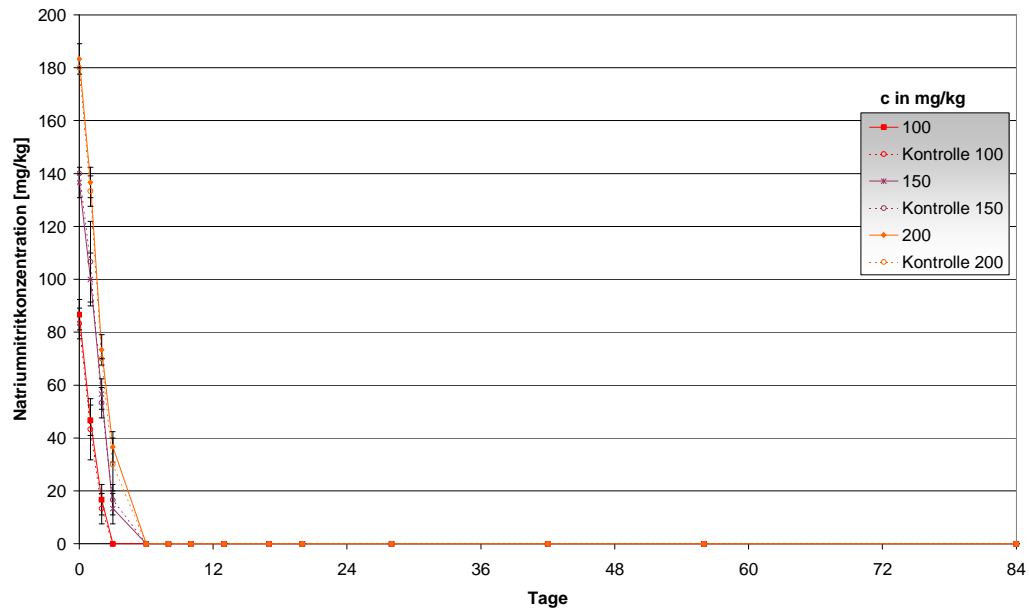


Abb. 178: Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Die aerobe mesophile Keimzahl stieg sowohl in den Produkten mit 2,8 % NaCl als auch in denen mit 3,4 % NaCl innerhalb von 2 Tagen von 6,8 \log_{10} KbE/g auf 8,5 \log_{10} KbE/g an (siehe Abb. 180 und Anhang Abb. 181). Bis zum Tag 84 blieb die aerobe mesophile Keimzahl bei Werten oberhalb von 8 \log_{10} KbE/g.

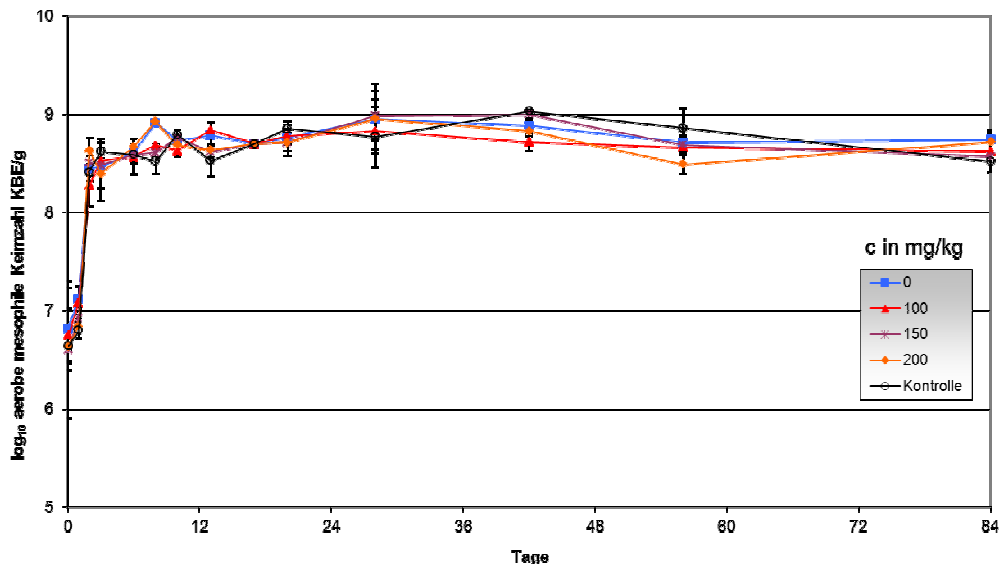


Abb. 180: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer langgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

ERGEBNISSE

Die Zahl der Milchsäurebakterien nahm zwischen dem Tag 0 und dem Tag 2 in den Produkten mit 2,8 % und 3,4 % NaCl zu. In allen Produkten wurden am Tag 2 Keimzahlen von etwa $8,3 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen. Anschließend stiegen die Keimzahlen um etwa 0,2 log-Stufen an und blieben bis zum Tag 84 auf einem Niveau von $8,5 \log_{10}$ KbE/g (siehe Abb. 182 und Anhang Abb. 183).

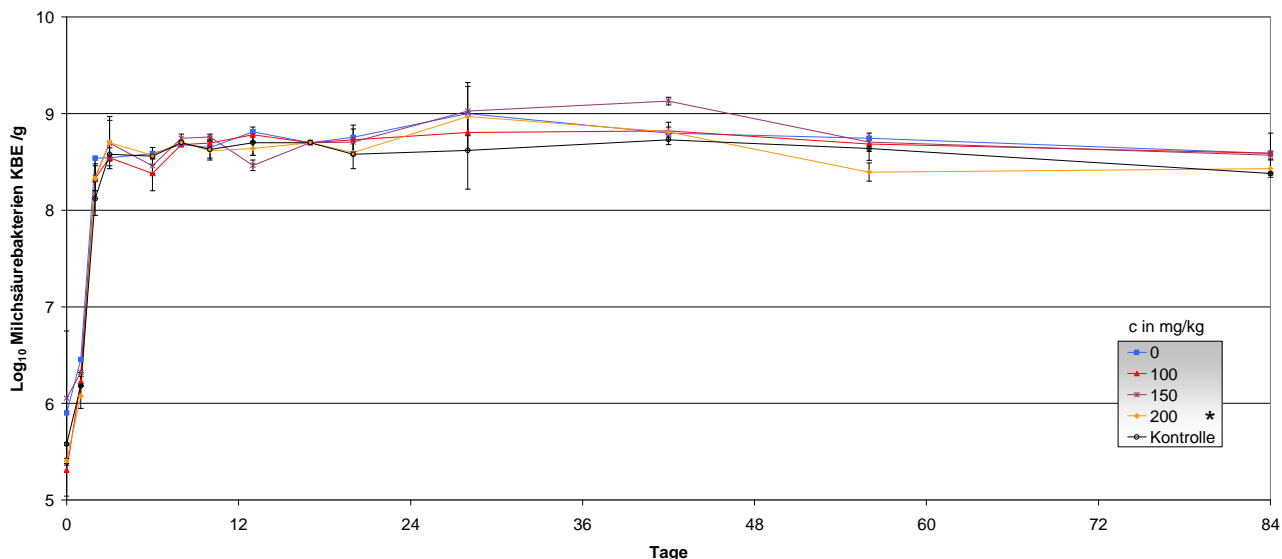


Abb. 182: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer langgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Salmonella spp.

2,8 % Kochsalz

Salmonella spp. wurde in einer Keimmenge von ca. $3,5 \log_{10}$ KbE/g dem Brät zugegeben (siehe Abb. 184). In den Würsten ohne Nitrit nahm die Zahl der Salmonellen innerhalb von 3 Tagen auf $4,8 \log_{10}$ KbE/g zu. Anschließend sank die Keimzahl bis zum Tag 13 wieder auf das Ausgangsniveau von $3,5 \log_{10}$ KbE/g. Mit fortschreitender Lagerung sank die Keimzahl weiter ab. Am Tag 56 waren auch nach Anreicherung Salmonellen nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 184).

In den Würsten mit 100, 150 und 200 mg Natriumnitrit/kg nahm die Zahl der Salmonellen ab. Am Tag 6 waren in allen mit Nitrit hergestellten Chargen Keimzahlen von etwa $2 \log_{10}$ KbE/g detektierbar (siehe Abb. 184).

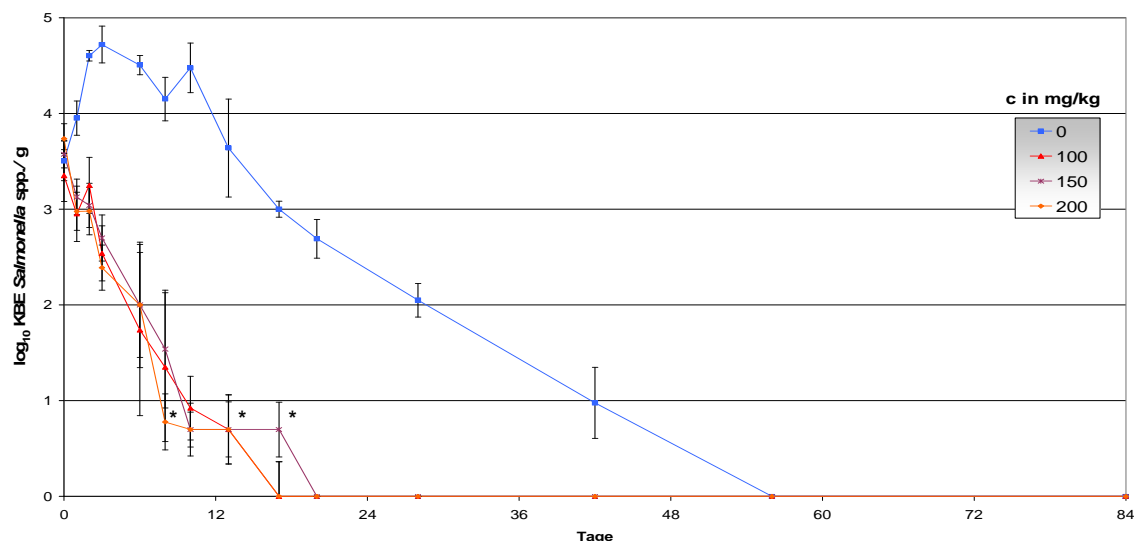


Abb. 184: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer langgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze ($1 \log_{10}$ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

Am Tag 8 waren die Salmonelleninokulate in den Würsten mit 200 mg Nitrit/kg nur noch nach Anreicherung rekultivierbar. In den Produkten mit 100 und 150 mg Nitrit/kg waren Salmonellen bis zum Tag 10 qualitativ erfassbar. Ab dem Tag 20 waren Salmonellen in den Produkten mit Natriumnitrit nicht mehr nachweisbar.

3,4 % Kochsalz

In den Rohwürsten ohne den Zusatz von Nitrit nahm die Keimzahl innerhalb von 2 Tagen von $3,5 \log_{10}$ KbE/g auf $4,36 \log_{10}$ KbE/g zu. Danach sank die Zahl der Salmonellen bis zum Tag 17 auf $3 \log_{10}$ KbE/g und auf $1,5 \log_{10}$ KbE/g am Tag 28 ab. Am Tag 42 wurden auch nach Anreicherung keine Salmonellen mehr in den Produkten ohne Natriumnitrit nachgewiesen.

In den Würsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nahm die Keimzahl vom Tag 0 an ab. Nach 6 Tagen war in den Produkten mit 200 mg Nitrit/kg ein Nachweis der Salmonellen nur nach Anreicherung möglich (siehe Anhang Abb. 185). In den Chargen mit 100 bzw. 150 mg Nitrit/kg sank die Keimzahl ab Tag 10 bzw. Tag 8 unter die quantitative Nachweisgrenze von $10 \log_{10}$ KbE/g. Am Tag 20 wurden in den Rohwürsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg keine Salmonellen mehr nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 185).

Shigatoxinbildende *Escherichia coli*

2,8 % Kochsalz

Shigatoxinbildende *E. coli* wurden dem Brät in Keimsuspensionen von 3,8 - 4,2 log₁₀ KbE/g zugegeben (siehe Abb. 186). In allen Produkten war ab dem Tag 0 eine Abnahme der Keimzahl zu beobachten. In den Produkten mit 200 mg Nitrit/kg wurden am Tag 3 Keimzahlen von 3,5 log₁₀ KbE/g und in denen mit 100 bzw. 150 mg Nitrit/ kg 3,7 log₁₀ KbE/g festgestellt (siehe Abb. 186). Im selben Zeitraum nahm die Anzahl der STEC in den Kontrollwürsten ohne Nitrit auf 3,8 log₁₀ KbE/g ab. Mit fortschreitender Lagerung sanken die Keimzahlen in allen Produkten ab. Am Tag 28 war in den mit Nitrit hergestellten Chargen nur noch ein qualitativer Nachweis möglich. In den Würsten ohne Nitrit wurden noch 1,6 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 186). Ab dem Tag 42 wurden in den mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg hergestellten Produkten auch nach Anreicherung keine STEC/EHEC mehr festgestellt. In den Kontrollen ohne Nitrit waren sie ab Tag 56 nicht mehr detektierbar.

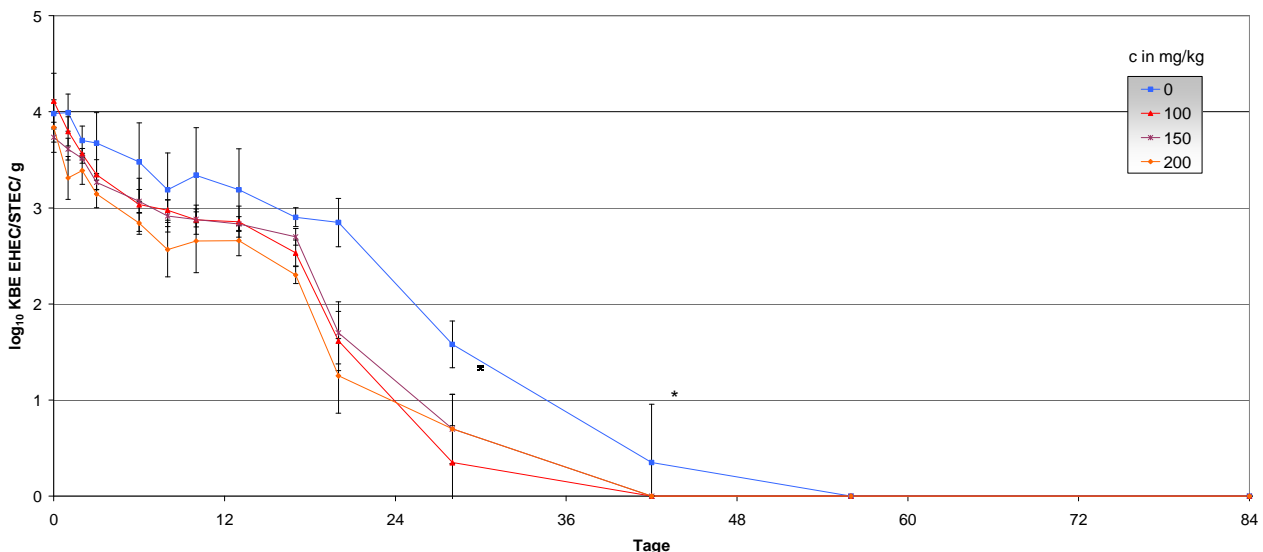


Abb. 186: Verhalten von STEC/EHEC in einer langgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

3,4 % Kochsalz

Die Anfangskeimzahl von 4,3 log₁₀ KbE/g sank in allen Produkten von Tag 0 an ab. In den Produkten, produziert mit 200 mg Natriumnitrit/kg, konnten am Tag 8 Keimzahlen von 1,6 log₁₀ KbE/g, in den Erzeugnissen mit 150 mg Nitrit/kg 2,2 log₁₀ KbE/g und in solchen mit 100 mg Nitrit/kg 2,6 log₁₀ KbE/g erfasst werden. Im gleichen Zeitraum sanken die

Keimzahlen in den Proben ohne Nitrit auf $3 \log_{10}$ KbE/g (siehe Anhang Abb. 187). Am Tag 17 war ein Nachweis der shigatoxinbildenden *E. coli* in den Würsten mit Nitrit nur noch qualitativ und am Tag 28 gar nicht mehr möglich. In den Ansätzen ohne Nitrit waren STEC/EHEC noch bis zum Tag 28 qualitativ nach Anreicherung nachweisbar. Am Tag 42 wurden dann auch in diesen Produkten keine STEC/EHEC mehr detektiert (siehe Anhang Abb. 187).

Listeria monocytogenes

2,8 % Kochsalz

Das Brät wurde mit einer Keimzahl *L. monocytogenes* von $3,8 \log_{10}$ KbE/g beimpft (siehe Abb. 188). Zwischen dem Tag 0 und 2 wurde in den Würsten ohne Nitrit eine Vermehrung der Listerien auf $4,8 \log_{10}$ KbE/g beobachtet. Anschließend sank die Keimzahl bis zum Tag 6 wieder auf das Ausgangsniveau und blieb bis zum Tag 84 konstant bei $3,8 \log_{10}$ KbE/g (siehe Abb. 188).

In den Chargen mit Nitrit nahm die Keimzahl vom Tag 0 an ab. Am Tag 13 wurden in den Produkten mit 200 mg Nitrit/kg Keimzahlen von $2,6 \log_{10}$ KbE/g und in denen mit 100 und 150 mg Nitrit/ kg von $3,4 \log_{10}$ KbE/g erfasst (siehe Abb. 188). Anschließend sanken die Keimzahlen bis zum Tag 84 um eine Zehnerpotenz. In den Produkten mit 200 mg Nitrit/kg wurden am Tag 84 $1,6 \log_{10}$ KbE/g und in denen mit 100 und 150 mg Nitrit/kg $2,4 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen.

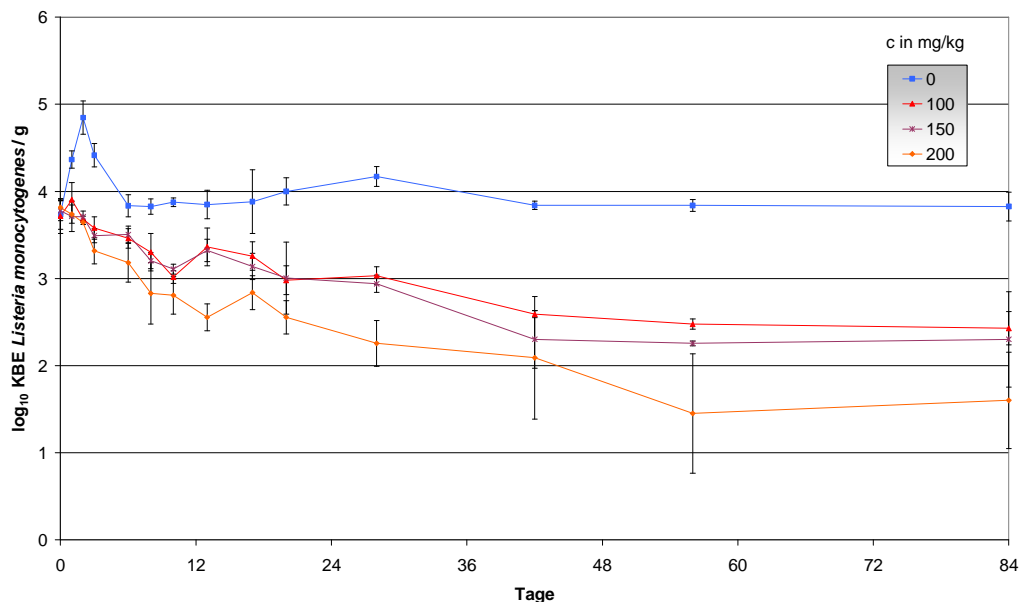


Abb. 188: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer langgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

3,4 % Kochsalz

In den Chargen ohne Nitrit stieg die Listerienzahl von 3,7 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 5 log₁₀ KbE/g am Tag 2. Anschließend nahm die Keimzahl in diesen Ansätzen ab. Am Tag 6 wurden Werte von 4,6 log₁₀ KbE/g und am Tag 84 Keimzahlen von 3,9 log₁₀ KbE/g detektiert (siehe Anhang Abb. 189).

In den Rohwürsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg sank die Keimzahl bis zum Tag 28 in allen Ansätzen auf 2,4 log₁₀ KbE/g ab. Anschließend nahm die Zahl der Listerien in den Produkten mit 200 mg Nitrit/kg ab. Am Tag 42 lagen diese bei 1,5 log₁₀ KbE/g und am Tag 84 war ein Nachweis der Listerien in den Chargen mit 200 mg Nitrit/kg nur noch nach Anreicherung möglich (siehe Anhang Abb. 189). In den Erzeugnissen mit 150 mg Nitrit/kg sanken die Keimzahlen langsamer ab. Am Tag 42 wurden Listerienzahlen von 2,3 log₁₀ KbE/g ermittelt und am Tag 84 war auch in diesen Produkten nur noch ein qualitativer Nachweis möglich. Die Keimzahl in den Chargen mit 100 mg Nitrit/kg nahm von 2,4 log₁₀ KbE/g am Tag 28 auf 2,2 log₁₀ KbE/g am Tag 84 ab (siehe Anhang Abb. 189).

4.2.4 Schimmelpilzgereifte Rohwurst (Typ-Edelschimmel Salami)

Analog zu den Untersuchungen mit einer langgereiften Salami wurden zwei verschiedene Salzkonzentrationen getestet, eine Kochsalzkonzentration von 2,8 % und eine von 3,4 % NaCl. Neben den unterschiedlichen Kochsalzkonzentrationen sollte die Wirkung von unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen auf die Überlebensfähigkeit von *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* überprüft werden.

Physikalisch-chemische Parameter:

Der a_w-Wert nahm in allen Würsten der Chargen mit 2,8 % NaCl von 0,964 am Tag 0 auf Werte zwischen 0,817 und 0,81 am Tag 84 ab (siehe Abb. 190).

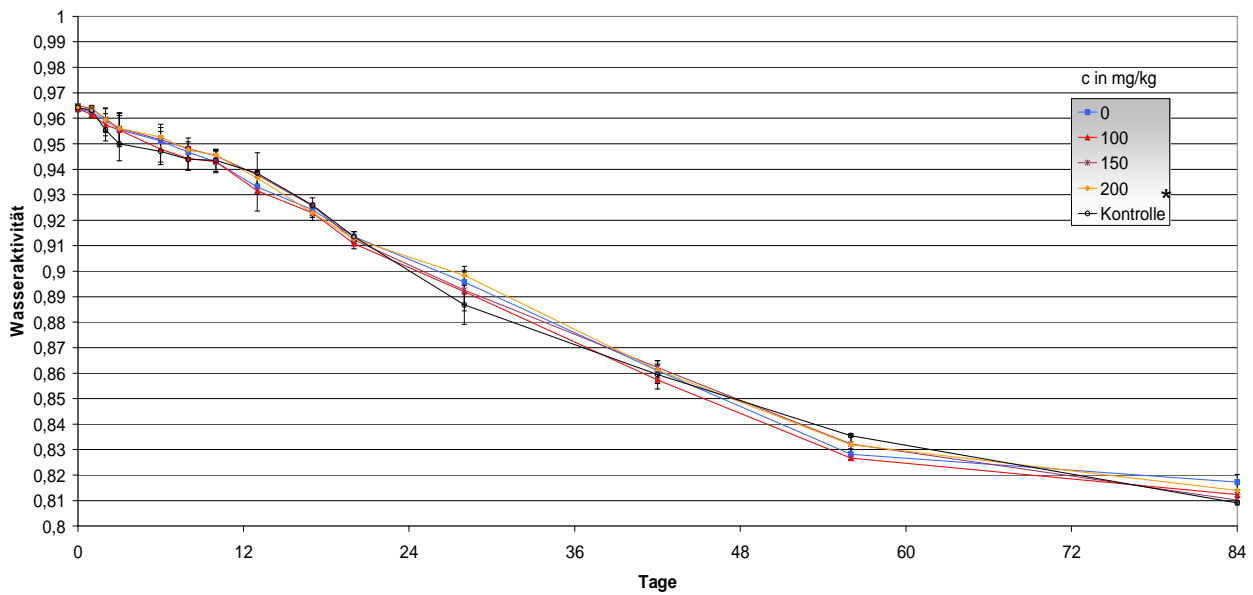


Abb. 190: Verlauf der a_w -Werte in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

In den Produkten mit 3,4 % NaCl nahm der Wasseraktivitätswert kontinuierlich während der Reifung und Trocknung ab. Er sank von 0,959 am Tag 0 auf a_w -Werte zwischen 0,81 und 0,80 am Tag 84 (siehe Anhang Abb. 191).

Der pH-Wert in den Produkten mit 2,8 % Kochsalz sank von 5,83 am Tag 0 auf Werte zwischen 5,2 und 5,3 am Tag 3. Am Tag 8 wurden in der Kontrolle und in den Würsten mit 100 mg Nitrit/kg pH-Werte von 5,06 und in solchen mit 150 und 200 mg Nitrit/kg Werte von 5,15 gemessen. Im weiteren Verlauf der Reifung und Lagerung stieg der pH-Wert in allen Chargen vergleichbar an. Am Tag 84 wurden pH-Werte zwischen 6,1 und 6,25 detektiert (siehe Abb. 192).

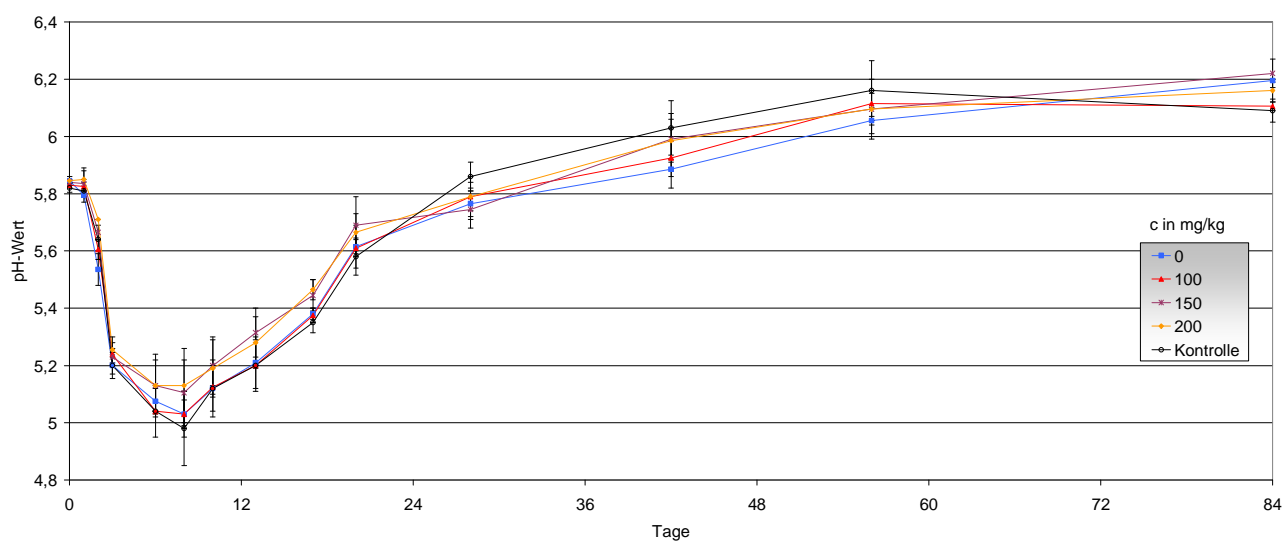


Abb. 192: Verlauf der pH-Werte in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

In den Rohwürsten mit 3,4 % NaCl nahm der pH-Wert von 5,85 am Tag 0 in den Kontrollen auf 5,16 am Tag 3 ab. In den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg wurden am Tag 3 pH-Werte von 5,25 bzw. 5,3 gemessen (siehe Anhang Abb. 193). Anschließend sank der pH-Wert in den Chargen mit Nitrit weiter auf 5,08 am Tag 6 und stieg im Laufe der Reifung und Lagerung bis zum Tag 84 auf pH-Werte von 6,25 an. Der pH-Wert in den Produkten ohne Nitrit stieg etwas langsamer an und erreichte am Tag 84 Werte von 6,19 (siehe Anhang Abb. 193).

Sowohl in den Produkten mit 2,8 % NaCl als auch in denen mit 3,4 % NaCl nahm die Natriumnitritkonzentration zügig ab (siehe Abb. 194 und Anhang Abb. 195). Am Tag 2 lag die gemessene Nitritkonzentration in den Würsten mit 100 mg Nitrit/kg unter 20 mg/kg, in denen mit 150 mg Nitrit/kg zwischen 50 und 60 mg/kg und in solchen mit 200 mg Nitrit/kg zwischen 70 und 85 mg/kg. Ab dem Tag 6 war Natriumnitrit nicht mehr nachweisbar.

ERGEBNISSE

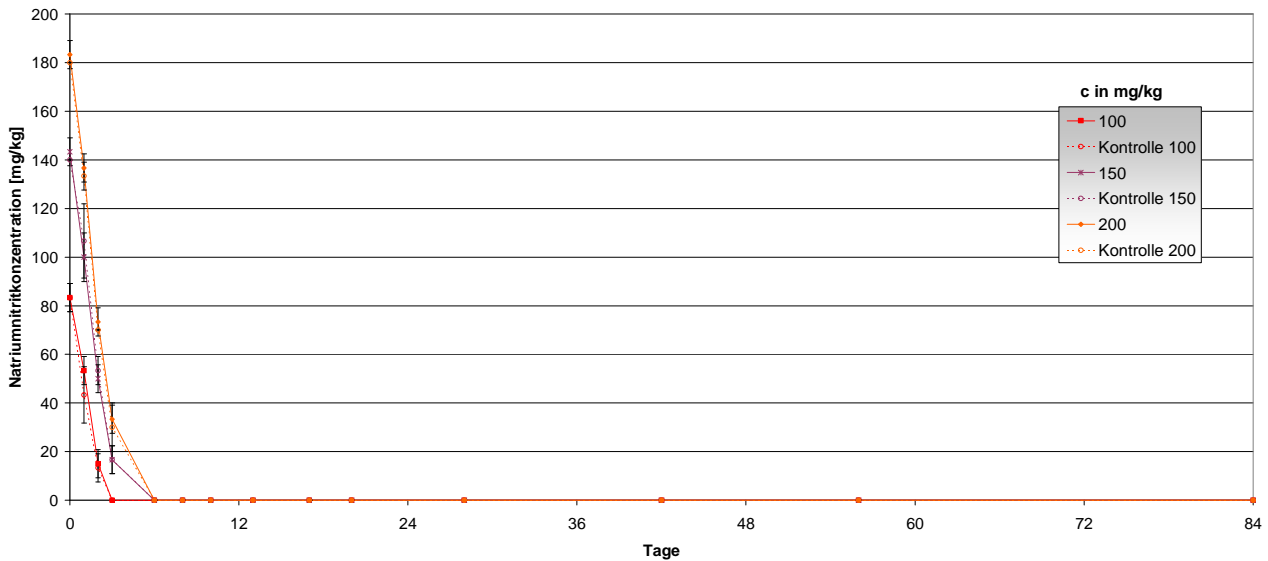


Abb. 194: Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Der Verlauf der aeroben mesophilen Keimzahlen (siehe Abb. 196) war bei allen Versuchschargen nach 3 Tagen mit dem Verlauf der Milchsäurebakterienzahl (siehe Abb. 198) vergleichbar. Die aerobe mesophile Keimzahl stieg von 6,5 bis 6,8 \log_{10} KbE/g am Tag 0 auf 8,5 bis 9 \log_{10} KbE/g am Tag 3 an (siehe Abb. 196 und Anhang Abb. 197). Anschließend blieb die Keimzahl auf diesem Niveau und fiel bis zum Tag 84 nicht unter 8 \log_{10} KbE/g ab. Parallel zur Vermehrung der aeroben mesophilen Keimzahl wurde auch ein Anstieg der Milchsäurebakterien nachgewiesen. Die Zahl der Milchsäurebakterien stieg von 5,5 \log_{10} KbE/g auf 8,5 \log_{10} KbE/g am Tag 2 an. Bis zum Ende der Untersuchungen am Tag 84 blieben die Keimzahlen immer über 8 \log_{10} KbE/g (siehe Abb. 198 und Anhang Abb. 199).

ERGEBNISSE

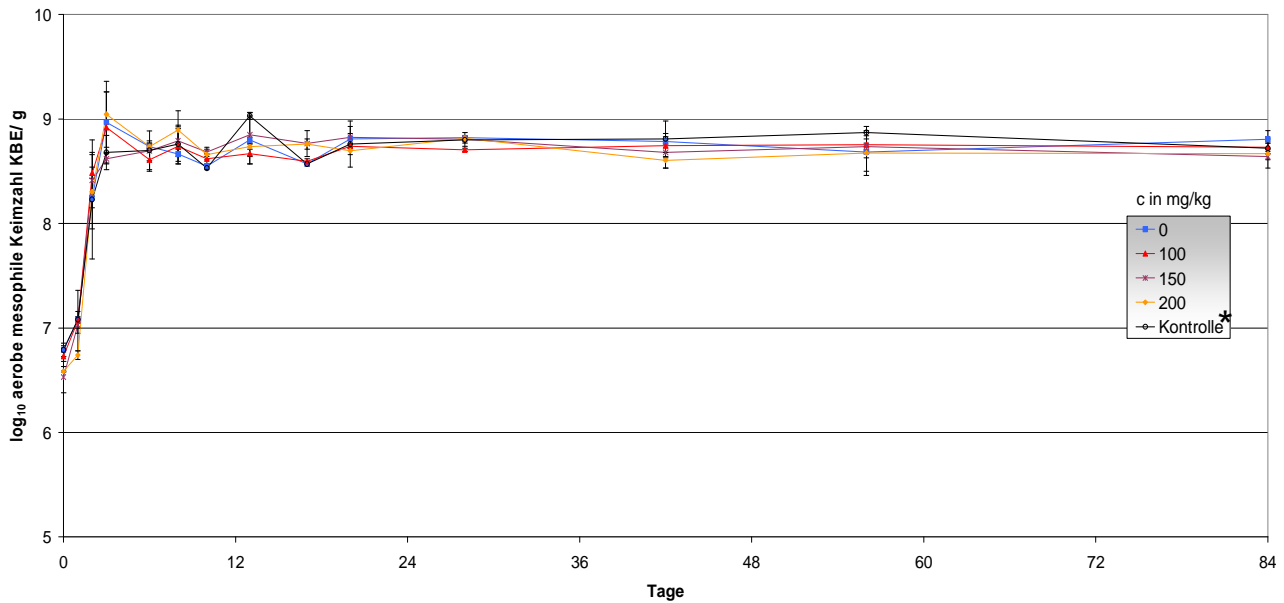


Abb. 196: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

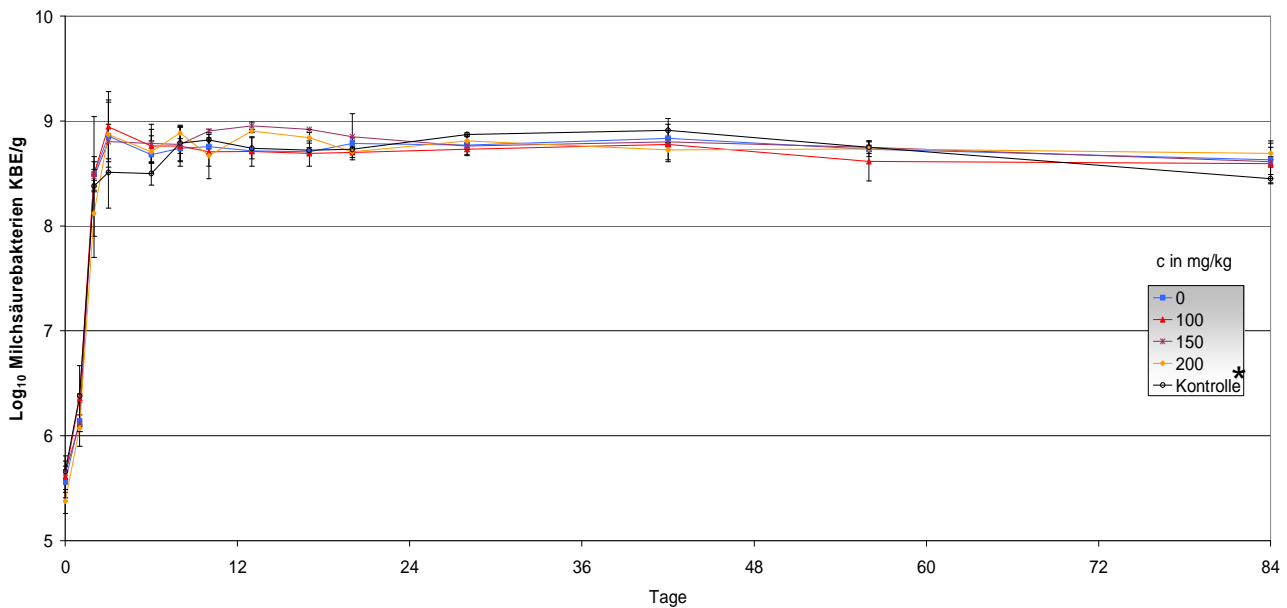


Abb. 198: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

Salmonella spp.

2,8 % Kochsalz

Zwischen dem Tag der Beimpfung und dem Tag 2 wurde in den Chargen ohne Nitrit eine Zunahme der Salmonellenzahl von 3,4 log₁₀ KbE/g auf 4,4 log₁₀ KbE/g beobachtet (siehe Abb. 200). Ab dem dritten Tag sanken die Keimzahlen in diesen Würsten und erreichten am Tag 28 Werte von 2 log₁₀ KbE/g. Am Tag 56 war in den Produkten ohne Nitrit letztmalig ein Nachweis nach Anreicherung möglich.

Die Keimzahlen sanken in den Rohwürsten mit Nitrit kontinuierlich. Am Tag 6 wurden in den Chargen mit 200 mg Nitrit/kg Keimzahlen von 10 KbE/g, in denen mit 150 mg Nitrit/kg 20 KbE/g und in solchen mit 100 mg Nitrit/kg 2,1 log₁₀ KbE/g nachgewiesen. Ab dem Tag 17 war ein Nachweis der Salmonellen in den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich. Nach weiteren elf Tagen waren in diesen Ansätzen am Tag 28 Salmonellen nicht kultivierbar (siehe Abb. 200).

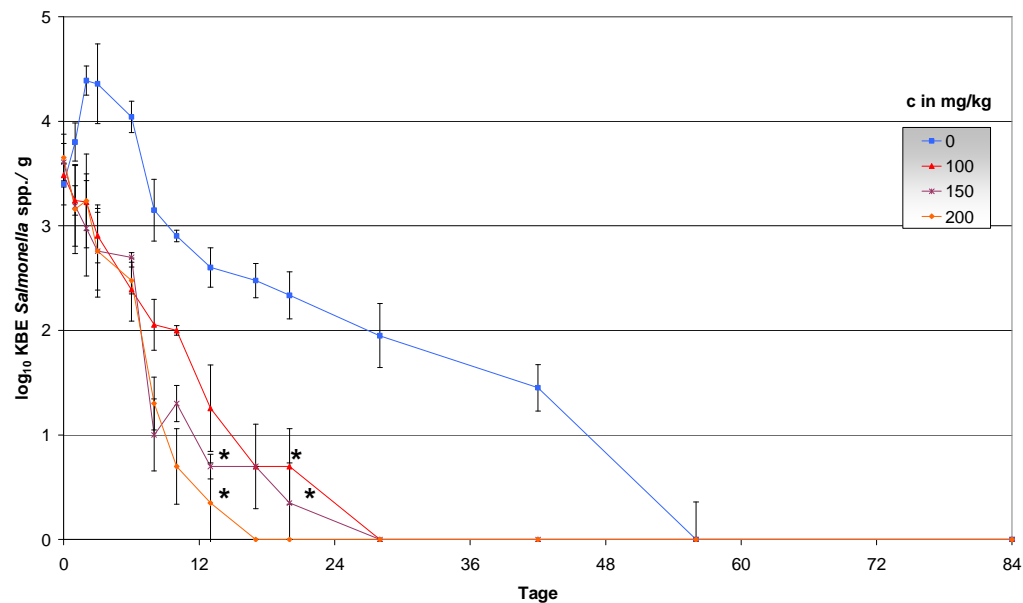


Abb. 200: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

3,4 % Kochsalz

In den Produkten ohne Natriumnitrit stieg die Salmonellenzahl von 3,5 log₁₀ KbE/g auf 4 log₁₀ KbE/g am Tag 6 an (siehe Anhang Abb. 201). Mit fortschreitender Reifung und Lagerung sank die Keimzahl und erreichte am Tag 28 Werte von 50 KbE/g. Nach 42 Tagen

wurden in den Würsten ohne Nitrit keine Salmonellen mehr nachgewiesen. In den Produkten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nahmen die Keimzahlen kontinuierlich ab und erreichten am Tag 3 Werte von 3 log₁₀ KbE/g. Am Tag 6 wurden in den Chargen mit 200 mg Nitrit/kg Keimzahlen von 30 KbE/g, in solchen mit 150 mg Nitrit/kg 100 KbE/g und in denen mit 100 mg Nitrit/kg 2,3 log₁₀ KbE/g nachgewiesen. Ab dem Tag 28 waren Salmonellen in den Produkten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg quantitativ und qualitativ nicht mehr nachweisbar (siehe Anhang Abb. 201).

Shigatoxinbildende *Escherichia coli* (STEC/EHEC)

2,8 % Kochsalz

Die anfängliche Keimzahl von 4,2 log₁₀ KbE pro g Brät nahm in allen Chargen ab. Bereits am Tag 13 wurden in den Würsten mit 0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg 3 log₁₀ KbE/g detektiert (siehe Abb. 202). Mit fortschreitender Reifung und Lagerung sanken die Keimzahlen in den Produkten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg auf 1,5 log₁₀ KbE/g am Tag 28. Zum selben Zeitpunkt wurden in den Würsten ohne Nitrit 2 log₁₀ KbE/g festgestellt. Ab dem Tag 42 wurden auch nach Anreicherung keine shigatoxinbildenden *Escherichia coli* mehr nachgewiesen (siehe Abb. 202).

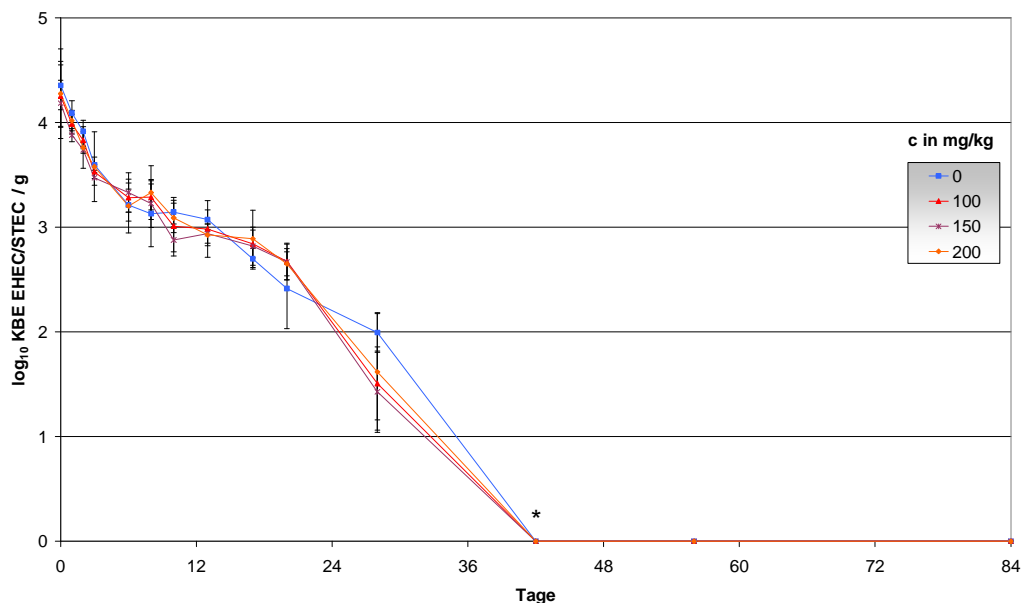


Abb.202: Verhalten von STEC/EHEC in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

3,4 % Kochsalz

Zwischen dem Tag 0 und dem Tag 8 sank die Keimzahl in allen Rohwürsten von 3,7 log₁₀ KbE/g auf 2,8 log₁₀ KbE/g (siehe Anhang Abb. 203). Anschließend nahm die Keimzahl weiter kontinuierlich ab. In den Rohwürsten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg waren die eingepfimpften Keime ab dem Tag 28 nur noch nach Anreicherung nachweisbar. Zum selben Zeitpunkt wurden in den Produkten ohne Nitrit noch 1,1 log₁₀ KbE/g festgestellt. Am Tag 42 wurden auch nach Anreicherung in den Ansätzen mit 0, 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg keine shigatoxinbildenden *E. coli* mehr detektiert (siehe Anhang Abb. 203).

Listeria monocytogenes

2,8 % Kochsalz

In den Rohwürsten ohne Nitrit nahm die anfängliche Listerienzahl von 3,9 log₁₀ KbE/g auf 4,5 log₁₀ KbE/g am Tag 2 zu (siehe Abb. 204). Mit fortlaufender Reifung sank die Listerienzahl in diesen Chargen bis zum Tag 84 auf Werte von 3,8 log₁₀ KbE/g ab.

In den Ansätzen mit Nitrit wurde keine Vermehrung der zugesetzten Keime beobachtet (siehe Abb. 204). Die Konzentration von *Listeria monocytogenes* in den Produkten mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nahm bis zum Untersuchungstag 84 auf Werte zwischen 3,7 und 3,8 log₁₀ KbE/g ab. Die Reduktion über den gesamten Reife- und Lagerungszeitraum betrug etwa eine Zehnerpotenz (siehe Abb. 204).

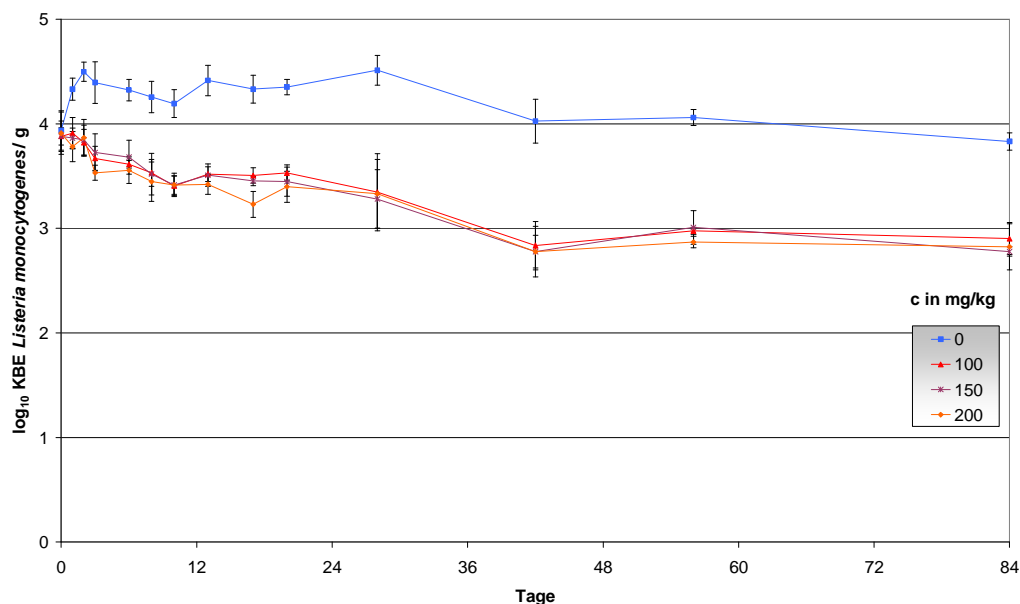


Abb. 204: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (2,8 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

3,4 % Kochsalz

In den Würsten ohne Nitrit nahm die Listerienzahl von anfänglich 3,8 log₁₀ KbE/g auf 4,7 log₁₀ KbE/g am Tag 2 zu. Anschließend sank die Keimzahl zunächst auf 4,5 log₁₀ KbE/g am Tag 8 und weiter bis auf 4 log₁₀ KbE/g am Tag 84 (siehe Anhang Abb. 205).

Bei den Chargen mit 100, 150 und 200 mg Nitrit/kg nahm die Keimzahl auf 3 log₁₀ KbE/g am Tag 21 ab. Am Tag 84 wurden Keimzahlen von 2,7 bis 2,9 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Anhang Abb. 205).

4.3 Nitritersatzstoffe auf pflanzlicher Basis

Ziel der Untersuchungen war die Überprüfung der mikrobiologischen Sicherheit von Rohwürsten mit einem nitrathaltigen Pflanzensaft anstelle von Nitritpökelsalz. Dazu wurden luftgetrocknete Mettwürste nach Vorgaben eines kooperierenden Industriebetriebes sowie in einer weiteren Charge mit einer alternativen stark ansäuernden Starterkultur produziert. Als Nitritersatzstoff diente ein kommerziell erhältlicher nitrathaltiger Pflanzensaft.

4.3.1 Konventionelle Starterkultur

Bei den Versuchsansätzen wurden die Originalrezeptur ohne Nitritpökelsalz eines Herstellers „X“ und eine Rezeptur mit Zusatz von Nitritpökelsalz verglichen. In der Originalrezeptur wurde der Zusatzstoff Nitrit durch den Einsatz eines Pflanzensaftes (NATASY S507) ersetzt. Die mikrobiologische Stabilität des Produktes gegenüber den pathogenen Keimen *Salmonella* spp., shigatoxinbildenden *E. coli* und *L. monocytogenes* wurde unter Simulation eines „worst case“ Modells (sehr hohe Belastung der Rohstoffe) und an Hand eines „realistic case“ Modells (geringe Belastungshöhe) geprüft.

Physikalisch-chemische Parameter:

Der anfängliche a_w-Wert von 0,965 nahm in allen Chargen bis zum Tag 13 kontinuierlich auf Werte zwischen 0,88 und 0,895 ab (siehe Abb. 206). Anschließend sank die Wasseraktivität in den Produkten bis zum Tag 42 auf a_w-Werte von 0,86 ab.

Am Tag 0 lagen die pH-Werte zwischen 5,9 und 5,95. Bis zum Tag 3 nahmen diese in allen Chargen auf Werte um 5,15 ab und stiegen bis zum Tag 42 auf 5,6 an (siehe Abb. 206).

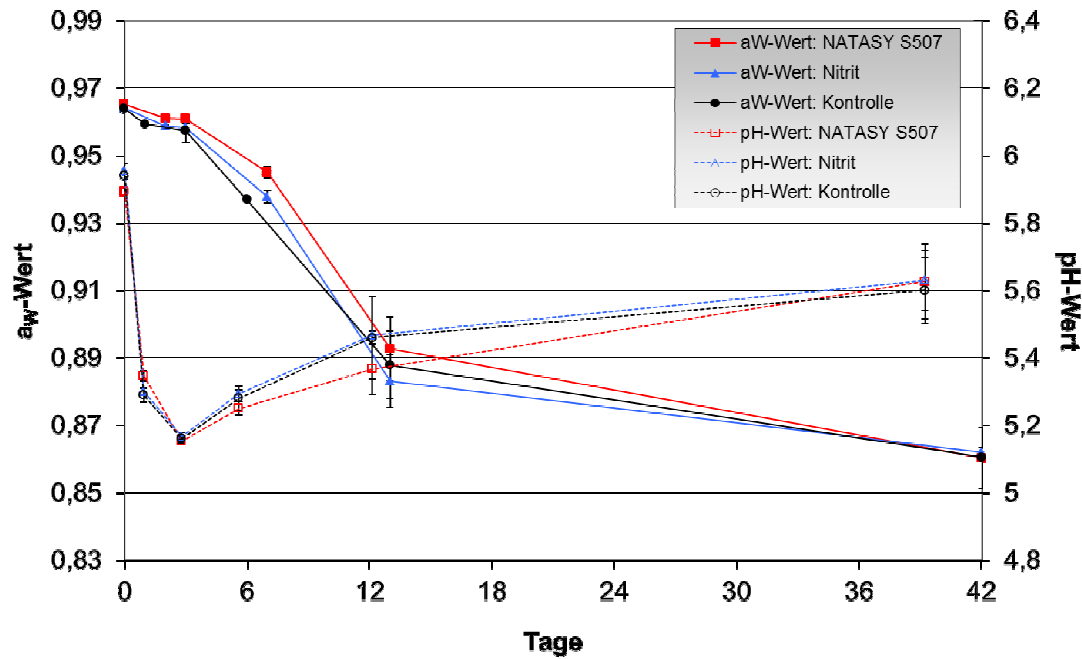


Abb. 206: Verlauf der pH- und a_w -Werte in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

In den Würsten mit Natriumnitrit sank die zugesetzte Konzentration von 150 mg/kg bis zum Tag 3 auf Werte um 40 – 50 mg/kg. Ab dem Tag 6 war Natriumnitrit nicht mehr nachweisbar. In den Chargen mit dem nitrathaltigen Pflanzensaft nahm die Nitratkonzentration von ca. 160 mg/kg am Tag 0 auf ca. 45 mg/kg am Tag 42 ab (siehe Abb. 207). Natriumnitrit war in den mit einem Pflanzensaft (NATASY S507) hergestellten Produkten während der 42-tägigen Reifung und Lagerung nicht detektierbar.

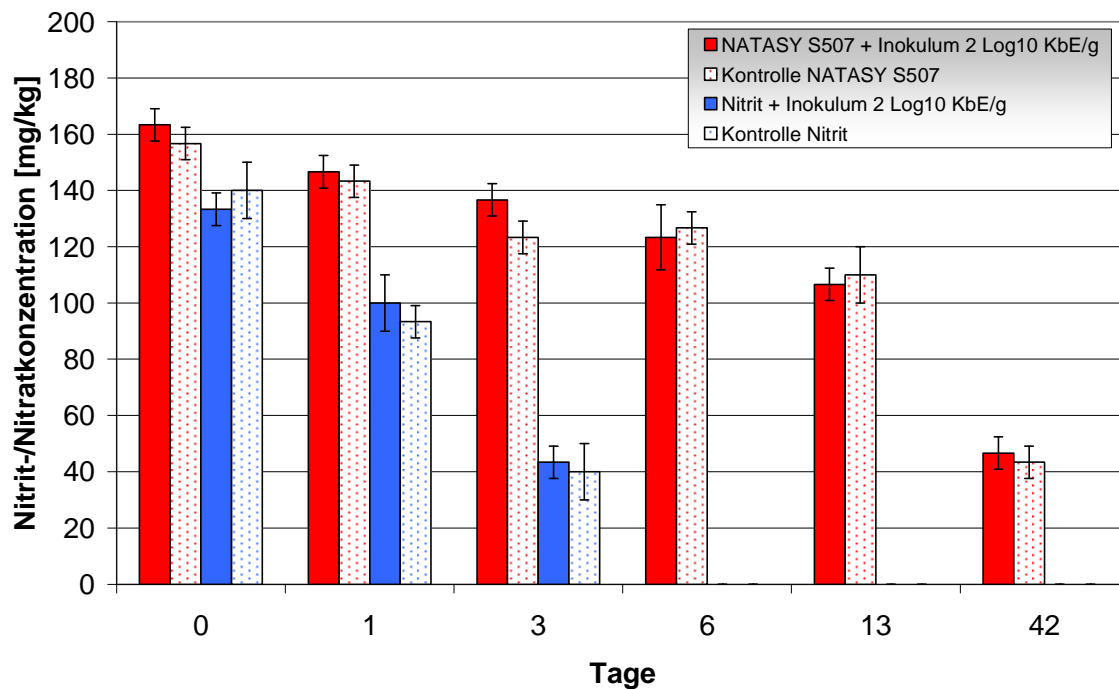


Abb. 207: Natriumnitrit- bzw. Nitratkonzentration (NATASY S507) während der Reifung einer luftgetrockneten Mettwurst. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Innerhalb von drei Tagen stieg die aerobe mesophile Keimzahl in allen Chargen von $6,9 \log_{10}$ KbE/g auf $8,6 \log_{10}$ KbE/g an (siehe Abb. 208). Bis zum Tag 42 sank die Keimzahl anschließend nicht unter $8,2 \log_{10}$ KbE/g. Die Art des Zusatzstoffes hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung der aeroben mesophilen Keimzahl (siehe Abb. 208).

Die Zahl der Milchsäurebakterien lag zu Beginn der Untersuchungen bei $6,3 \log_{10}$ KbE/g. Die Zahl der Milchsäurebakterien nahm bis zum Tag 3 auf $8,5 \log_{10}$ KbE/g zu (siehe Abb. 209). Anschließend sank die Keimzahl bis zum Tag 42 auf $7,2 \log_{10}$ KbE/g ab. Ein Einfluss der Zusatzstoffe Natriumnitrit und des Pflanzensaftes NATASY S507 war im Vergleich zu den Kontrollen nicht beobachtbar (siehe Abb. 209).

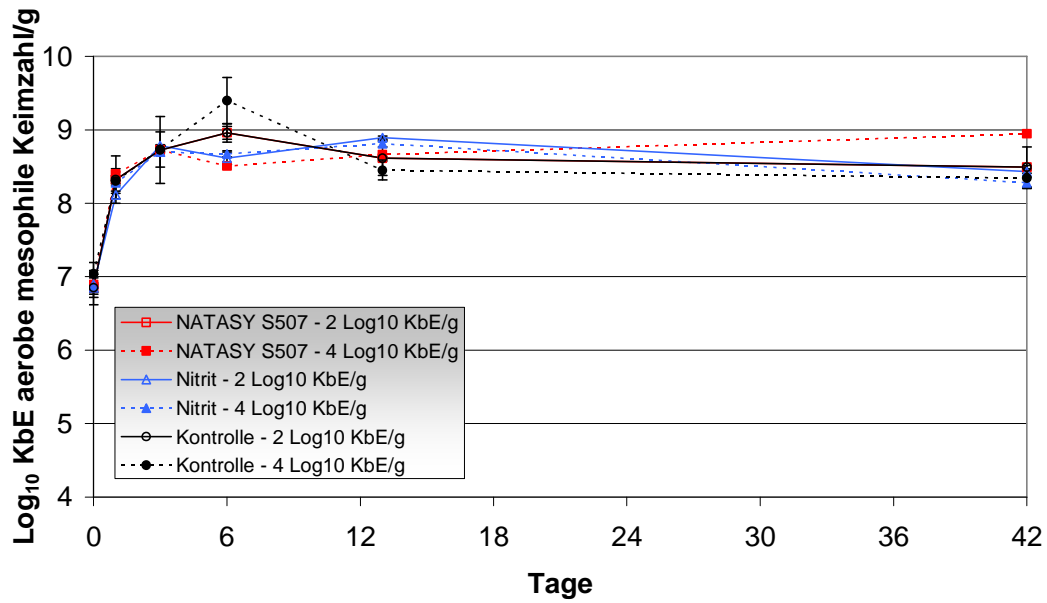


Abb. 208: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

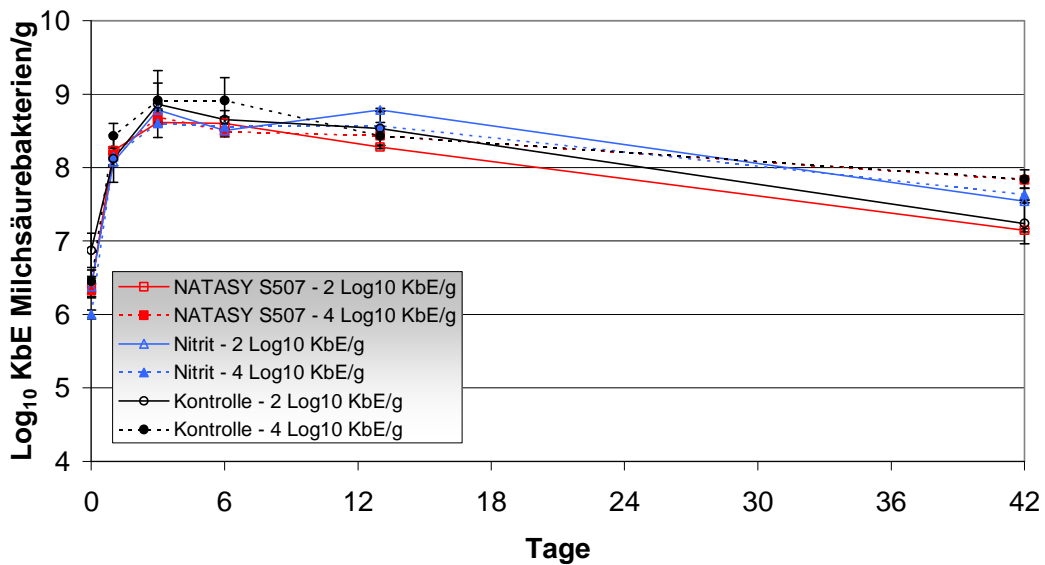


Abb. 209: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

4.3.1.1 *Salmonella* spp.

Originalrezeptur:

Das Verhalten von *Salmonella* spp. in einer luftgetrockneten Mettwurst mit einem nitrathaltigen Pflanzensaft gibt die Abbildung 210 wieder. In den Produkten mit einer Beimpfung von $4,7 \log_{10}$ KbE/g (worst case) stieg die Keimzahl bis zum Tag 3 auf $6,1 \log_{10}$ KbE/g. Anschließend sank die Zahl der Salmonellen auf $4,6 \log_{10}$ KbE/g am Tag 13 und weiter auf $3,4 \log_{10}$ KbE/g am Tag 42 (siehe Abb. 210).

Wurde das Ausgangsbrät mit einer Keimzahl von $2,9 \log_{10}$ KbE/g (realistic case) beimpft, stiegen die Keimzahlen innerhalb von drei Tagen auf $5,5 \log_{10}$ KbE/g. Mit fortschreitender Reifung und Lagerung nahm die Zahl der Salmonellen in den Würsten deutlich ab. Am Tag 13 wurden $4,4 \log_{10}$ KbE/g und am Tag 42 noch $1,3 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 210).

Brät mit Nitritzusatz:

Die Zahl der Salmonellen sank in den Würsten von $4,73 \log_{10}$ KbE/g (worst case) am Tag 0 auf $4 \log_{10}$ KbE/g am Tag 3. Bis zum Tag 42 nahm die Keimzahl anschließend weiter ab. Am Tag 42 war ein Nachweis der eingeimpften Salmonellen nur noch nach Anreicherung möglich (siehe Abb. 210 und Abb. 211). In den Produkten mit einer Inokulationsdosis von $2,85 \log_{10}$ KbE/g sank die Keimzahl innerhalb von 3 Tagen auf $2,7 \log_{10}$ KbE/g. Mit weiter fortschreitender Reifung und Lagerung nahm die Zahl der Salmonellen in den Produkten weiter ab. Am Tag 42 war nur noch ein qualitativer Nachweis der eingeimpften Mikroorganismen möglich (siehe Abb. 210 und Abb. 211).

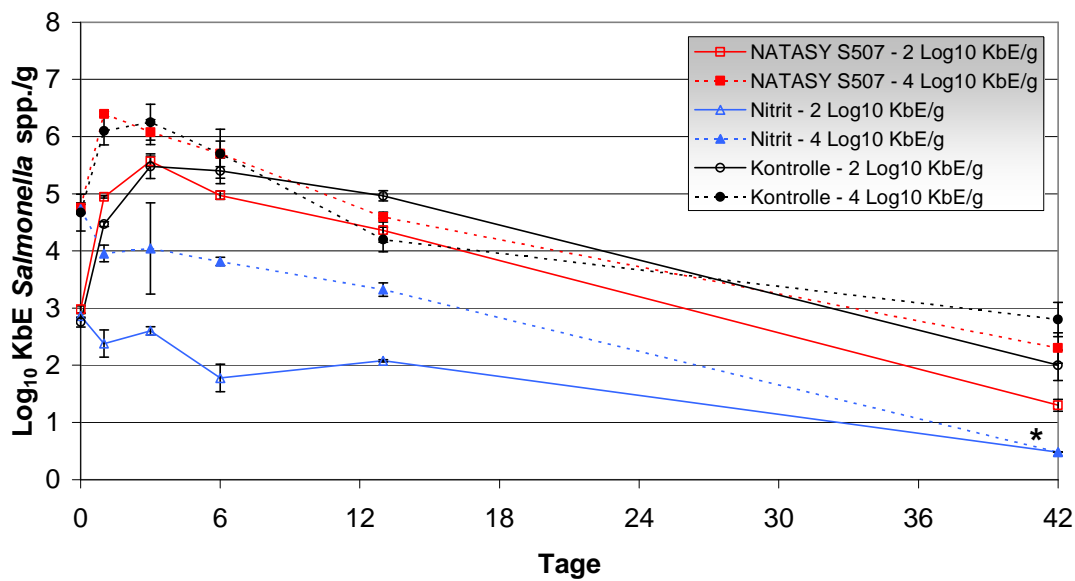
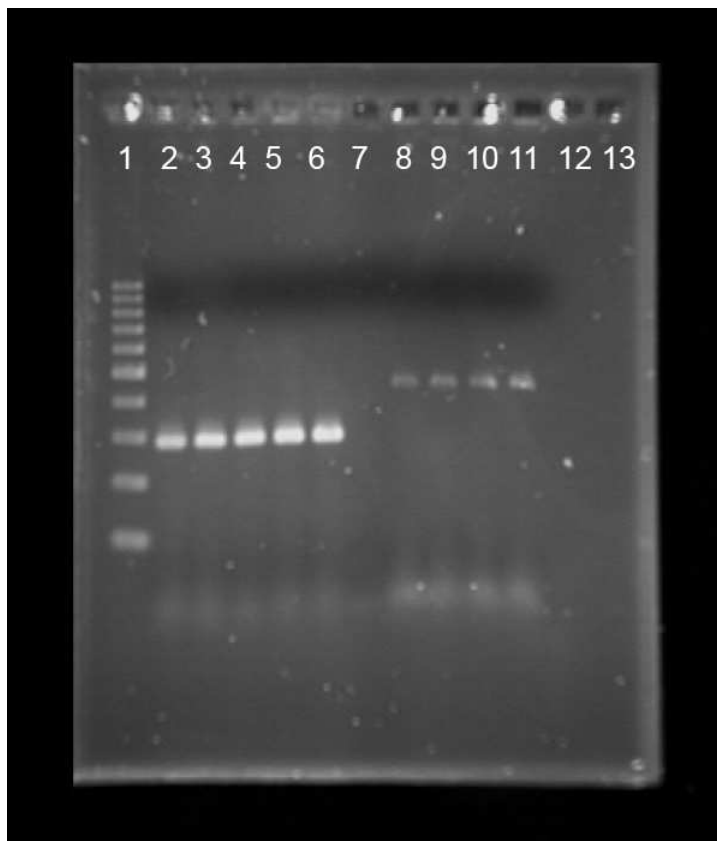


Abb. 210: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war



Bahnen

- 1 DNA-Molekulargewichtsmarker
- 2 Probe A - 2 Log₁₀ KbE/g *Salmonella* spp. + Natriumnitrit Tag 42
- 3 Probe B - 2 Log₁₀ KbE/g *Salmonella* spp. + Natriumnitrit Tag 42
- 4 Probe A - 4 Log₁₀ KbE/g *Salmonella* spp. + Natriumnitrit Tag 42
- 5 Probe A - 4 Log₁₀ KbE/g *Salmonella* spp. + Natriumnitrit Tag 42
- 6 Positivkontrolle
- 7 Negativkontrolle
- 8-11 Amplifikationskontrollen
- 12 leer
- 13 leer

Abb. 211: Elektrophoresegel der *invA*-Gen PCR der Mettwurstproben mit NPS-Zusatz

4.3.1.2 *Shigatoxinbildende Escherichia coli*

Originalrezeptur:

In den Chargen mit einer hohen Inokulation wurden shigatoxinbildende *E. coli* in einer Keimzahl von $4,68 \log_{10}$ KbE/g zugegeben (siehe Abb. 212). In den ersten sechs Tagen blieb die Keimzahl zunächst konstant. Anschließend sanken die STEC-Keimzahlen auf $3,5 \log_{10}$ KbE/g am Tag 13. Am Tag 42 wurde STEC/EHEC nur noch qualitativ nachgewiesen (siehe Abb. 212).

Bei einer niedrigen Beimischung des Brätes mit $2,8 \log_{10}$ KbE/g wurde zunächst eine anfängliche Vermehrung auf $3,4 \log_{10}$ KbE/g am Tag 3 festgestellt. Anschließend sank die Keimzahl kontinuierlich. Am Tag 42 waren auch nach Anreicherung und molekularbiologischer Diagnostik shigatoxinbildende *E. coli* nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 212).

Die Verläufe der *E. coli*-Zahlen (STEC/EHEC) entsprachen denen der Kontrollen ohne Zusatzstoff (siehe Abb. 212).

Brät mit Nitritzusatz:

Das Brät wurde zunächst mit einer Keimsuspension von $4,77 \log_{10}$ KbE/g belastet (worst case). Bis zum Tag 6 blieb die Keimzahl in den Würsten konstant. Zwischen dem Tag 6 und dem Tag 13 nahm die Zahl der STEC/EHEC um eine Zehnerpotenz auf $3,5 \log_{10}$ KbE/g ab. Am letzten Untersuchungstag war nur noch ein qualitativer Nachweis nach Anreicherung möglich (siehe Abb. 212).

In den Würsten mit einer niedrigen Inokulationshöhe nahm die Zahl der STEC/EHEC in den ersten drei Tagen von $2,85 \log_{10}$ KbE/g auf $3,2 \log_{10}$ KbE/g zu. Anschließend sanken die Keimzahlen und erreichten am Tag 13 Werte von $2,4 \log_{10}$ KbE/g. Am Tag 42 wurden shigatoxinbildende *E. coli* nur noch qualitativ nachgewiesen (siehe Abb. 212).

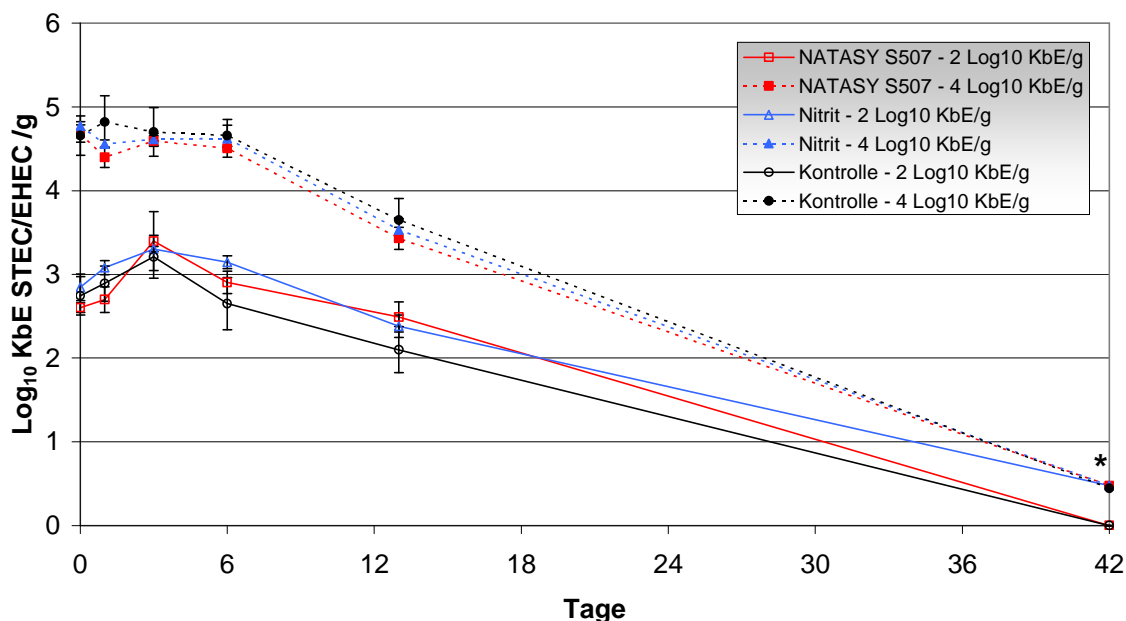


Abb. 212: Absterbeverhalten von STEC/EHEC in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

4.3.1.3 *Listeria monocytogenes*

Originalrezeptur:

Das Ausgangsmaterial wurde mit einer Keimsuspension von 4,9 log₁₀ KbE/g inokuliert (siehe Abb. 213). Innerhalb der ersten drei Tage wurde ein leichter Anstieg auf 5,2 log₁₀ KbE/g nachgewiesen. Anschließend blieb die Zahl der Listerien bis zum Tag 42 konstant auf diesem Niveau.

In den Chargen mit einem niedrigen Inokulum wurde innerhalb der ersten 3 Tage ein Anstieg der Keimzahl von *L. monocytogenes* von 3,6 log₁₀ KbE/g auf 5 log₁₀ KbE/g beobachtet. Zwischen dem Tag 3 und dem Tag 42 blieben die Listerienzahlen annähernd konstant bei 5 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 213). Der Verlauf der Listerienzahl in den Produkten mit der Originalrezeptur war mit demjenigen der Kontrolle ohne Zusatzstoff vergleichbar (siehe Abb. 213).

Brät mit Nitritzusatz:

Innerhalb der ersten 6 Tage sank die Keimzahl der Listerien in den hoch inokulierten Chargen von 4,9 log₁₀ KbE/g auf 4,6 log₁₀ KbE/g. Anschließend nahm die Keimzahl auf 5,2 log₁₀ KbE/g am Tag 13 zu und sank anschließend bis zum Tag 42 wieder auf 4,1 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 213).

In den Würsten mit einer niedrigen Keimdosis stieg die Zahl der Listerien zunächst von 3,3 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 3,8 log₁₀ KbE/g am Tag 1. Anschließend sanken die Keimzahlen und erreichten bis zum Tag 6 Werte von 3 log₁₀ KbE/g. Bis zum Tag 42 blieben die Keimzahlen anschließend annähernd auf diesem Niveau. Am Tag 42 wurden in den Würsten noch Listerienzahlen von 2,8 log₁₀ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 213).

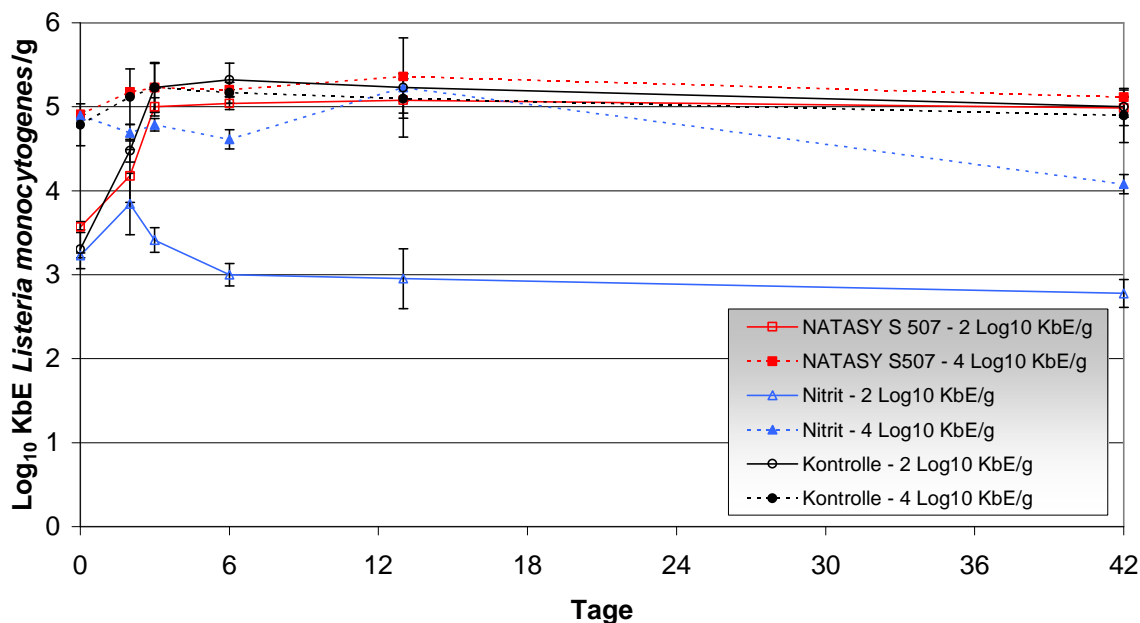


Abb. 213: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss eines nitrathaltigen Pflanzensaftes (NATASY S507) und Natriumnitrit (150 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

4.3.2 Optimierte Starterkultur

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in einer mit einem pflanzlichen Nitritersatzstoff (NATASY S507) hergestellten Mettwurst eine Vermehrung pathogener Keime nicht ausgeschlossen werden kann. Vor allem in den Chargen, die mit den grampositiven Vertretern *L. monocytogenes* beimpft wurden, ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Abnahme der Keimzahl im Produkt beobachten (vgl. 4.3.1). Der Verzicht auf den Zusatz von Natriumnitrit birgt somit ein Risiko, das insbesondere bei einer Belastung der Rohstoffe mit *L. monocytogenes* gegeben ist. Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher die Vermehrung von *Listeria monocytogenes*, vor allem in den kritischen ersten Reifetagen, zu verhindern. Dazu wurden das Verhalten/ die Absterbekinetiken von *L. monocytogenes* in einer Mettwurst, die ohne Nitritzusatz hergestellt wurde, erfasst. Statt einer wie in den vorangegangenen Versuchen bisher üblich, wurde an Stelle der Starterkultur (SM 181) jetzt eine stark absäuernde Starterkultur (Tradi 302 Bactoferm) mit einer antilisteriellen Schutzkultur (B-LC-20 Safe Pro) kombiniert. Dazu wurde

die Originalrezeptur mit einem nitrathaltigen Pflanzensaft (NATASY S507) mit einer Rezeptur mit Nitritpökelsalz, unter Simulation eines „realistic case“ (niedrige Beimpfung), verglichen.

Physikalisch-chemische Parameter:

Der a_w -Wert lag am Tag 0 kurz nach der Beimpfung zwischen 0,967 und 0,971 (siehe Abb. 214). Die Wasseraktivität nahm in allen Chargen bis zum Verpacken am Tag 14 auf Werte von 0,85 ab. (siehe Abb. 214).

Nach der Verpackung in Schutzgas am Tag 14 nahm der Wasseraktivitätswert in allen Chargen bis zum Tag 42 auf Werte zwischen 0,84 und 0,85 ab (siehe Abb. 214).

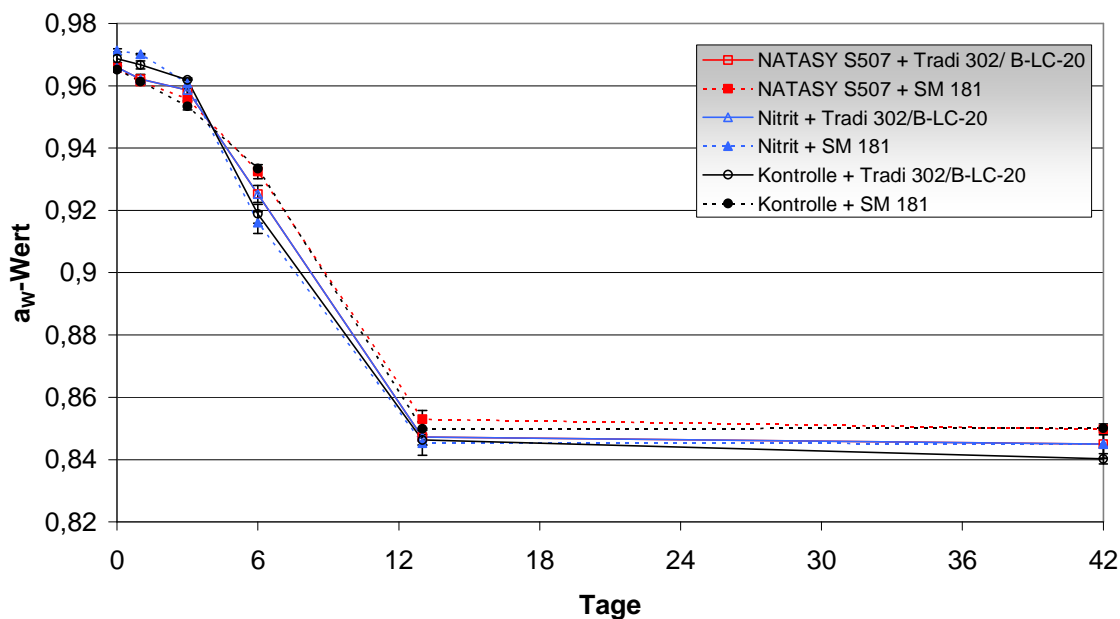


Abb. 214: Verlauf der a_w -Werte in einer luftgetrockneten Mettwurst hergestellt mit zwei unterschiedlich schnell säuernden Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

In den Produkten mit der Starterkultur SM 181 lagen die pH-Werte am Tag 0 zwischen 5,9 und 5,95 (siehe Abb. 215). Zwischen dem Tag 0 und dem Tag 6 sank der pH-Wert ab und erreichte in den mit Pflanzensaft hergestellten Produkten Werte von 5,25 und in denen mit Natriumnitrit Werte von 5,3. Anschließend stieg der pH-Wert in allen Würsten bis zum Tag 42 auf 5,42 an.

Die pH-Werte in den Produkten mit den Starterkulturen Tradi 302/B-LC-20 und dem Zusatz von NATASY S507 fielen von 5,8 am Tag 0 auf Werte zwischen 5,08 und 5,1 am Tag 6. In den Würsten mit Natriumnitrit nahm der pH-Wert im selben Zeitraum von 5,95 auf 5,18 ab (siehe Abb. 215). Im weiteren Verlauf der Reifung und Lagerung stieg der pH-Wert in den

Rohwürsten mit dem Pflanzensaft auf 5,34 und in solchen mit Natriumnitrit auf 5,44 am Tag 42 an (siehe Abb. 215).

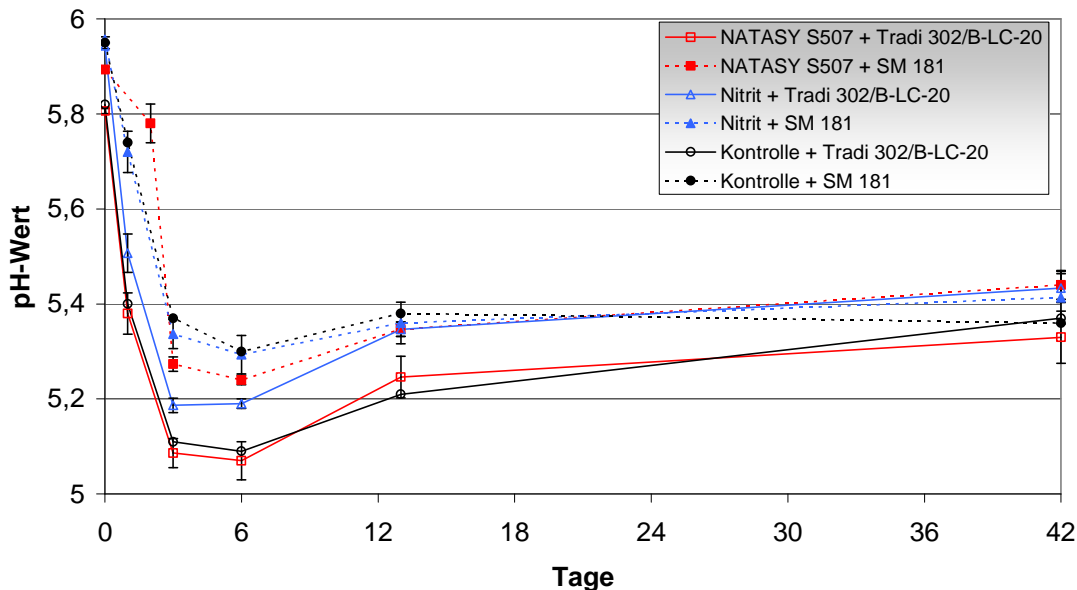


Abb. 215: Verlauf der pH-Werte in einer luftgetrockneten Mettwurst hergestellt mit zwei unterschiedlich schnell säuernden Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Die zugesetzte Natriumnitritmenge nahm in den Chargen mit der Starterkultur Tradi 302/B-LC-20 von 135 mg/kg am Tag 0 auf 82,5 mg/kg am Tag 1 und auf 22,5 mg Nitrit/kg am Tag 3 ab. Am Tag 6 war Natriumnitrit in den Produkten nicht mehr detektierbar (siehe Abb. 216).

Im selben Zeitraum sank die Nitritkonzentration in den Würsten mit der Startkultur SM 181 von 135 mg/kg auf 92,5 mg/kg am Tag 1 und auf 42,5 mg Nitrit/kg am Tag 3. Auch in diesen Chargen war ab dem Tag 6 Natriumnitrit nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 216).

Die Nitratkonzentration sank bei den Würsten mit NATASY S507 in den Chargen mit der Starterkultur SM 181 und in denen mit Tradi 302/B-LC-20 gleichmässig ab (siehe Abb. 216). Nach 3 Tagen wurden in den Würsten Konzentrationen von 135 mg Nitrat/kg und nach 42 Tagen noch Konzentrationen zwischen 45 und 50 mg/kg nachgewiesen (siehe Abb. 216).

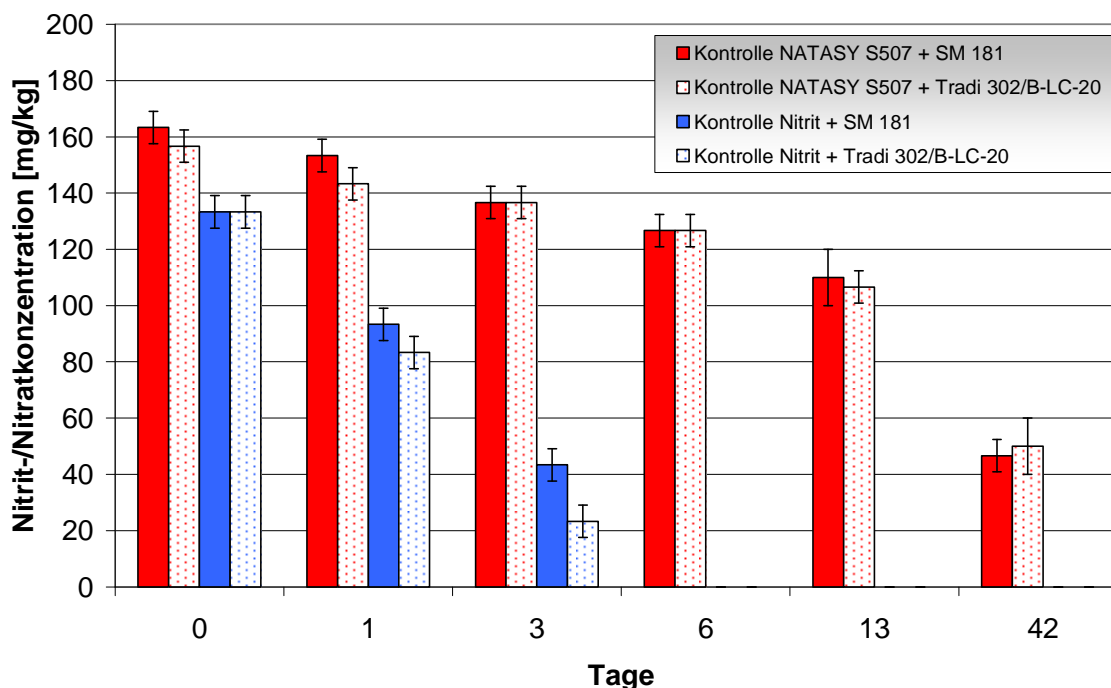


Abb. 216: Abnahme der Natriumnitrit- bzw. Nitratkonzentration (NATASY S507) in einer luftgetrockneten Mettwurst hergestellt mit zwei unterschiedlich schnell säuernden Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

In den Würsten mit der Starterkultur Tradi 302/B-LC-20 stieg die Zahl der aeroben mesophilen Keime innerhalb von einem Tag auf 8,5 log₁₀ KbE/g und weiter auf 8,7 log₁₀ KbE/g am Tag 3. Anschließend blieben die Keimzahlen auf diesem Niveau und blieben bis zum Tag 42 bei Werten um 8,4 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 217).

Die Keimzahl nahm in den Produkten mit der Starterkultur SM 181 von 7,5 bzw. 7,8 log₁₀ KbE/g auf Werte von 8,5 log₁₀ KbE/g am Tag 3 zu. Bis zum Ende wurde eine Keimzahl im Bereich von 8,4 log₁₀ KbE/g festgestellt (siehe Abb. 217).

Einen ähnlichen produkttypischen Verlauf nahmen die Milchsäurebakterien. Die Absolutwerte waren jedoch auf Grund der nicht miterfassten *Micrococcaceae*-Arten der Starterkulturen etwas niedriger (siehe Anhang Abb. 218).

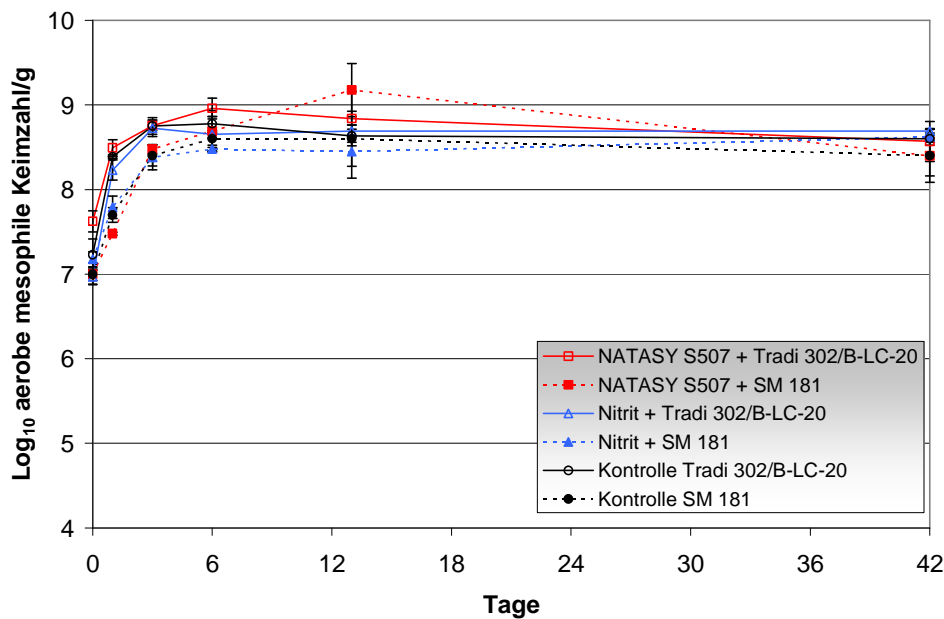


Abb. 217: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer luftgetrockneten Mettwurst hergestellt mit zwei unterschiedlich schnell säuernden Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

4.3.2.1 Verwendung der Starterkultur SM 181

Originalbrät:

Listeria monocytogenes wurde dem Brät in einer Keimzahl von 2,26 log₁₀ KbE pro g zugegeben (siehe Abb. 219). Nach einer anfänglichen Vermehrung in den ersten drei Reifetagen auf 3 log₁₀ KbE/g nahm die Listerienzahl kontinuierlich ab. Am Tag 42 waren Listerien-Zahlen von 2,15 log₁₀ KbE/g detektierbar (siehe Abb. 219).

Brät mit Nitritzusatz:

In den Mettwürsten mit Natriumnitrit nahm die Zahl der inokulierten Listerien von 2,65 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 2,3 log₁₀ KbE/g am Tag 3 ab. Anschließend sank die Keimzahl weiter auf 1,7 log₁₀ KbE/g am Tag 13 und auf 20 KbE/g am Tag 42 (siehe Abb. 219).

4.3.2.2 Verwendung der Starterkultur Tradi 302 und B-LC-20 Safe Pro®

Originalbrät:

In den Würsten wurde zwischen dem Tag der Beimpfung und dem Tag 1 eine Zunahme der Keime von 2,2 log₁₀ KbE/g auf 2,53 log₁₀ KbE/g festgestellt. Anschließend blieben die Keimzahlen bis zum Tag 6 auf diesem Niveau. Mit weiter fortschreitender Reifung und Lagerung sank die Keimzahl bis zum Tag 42 auf 1,5 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 219).

Brät mit Nitritzusatz:

In den Produkten mit Natriumnitrit wurde das Brät mit einer Dosis von $2,51 \log_{10}$ KbE/g inokuliert. Die Zahl der Listerien nahm innerhalb der ersten 24 Stunden um etwa eine halbe Zehnerpotenz auf $2,1 \log_{10}$ KbE/g ab (siehe Abb. 219). Nach 13 Tagen wurden in den Produkten Keimzahlen von $1,6 \log_{10}$ KbE/g und am Tag 42 von 20 KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 219).

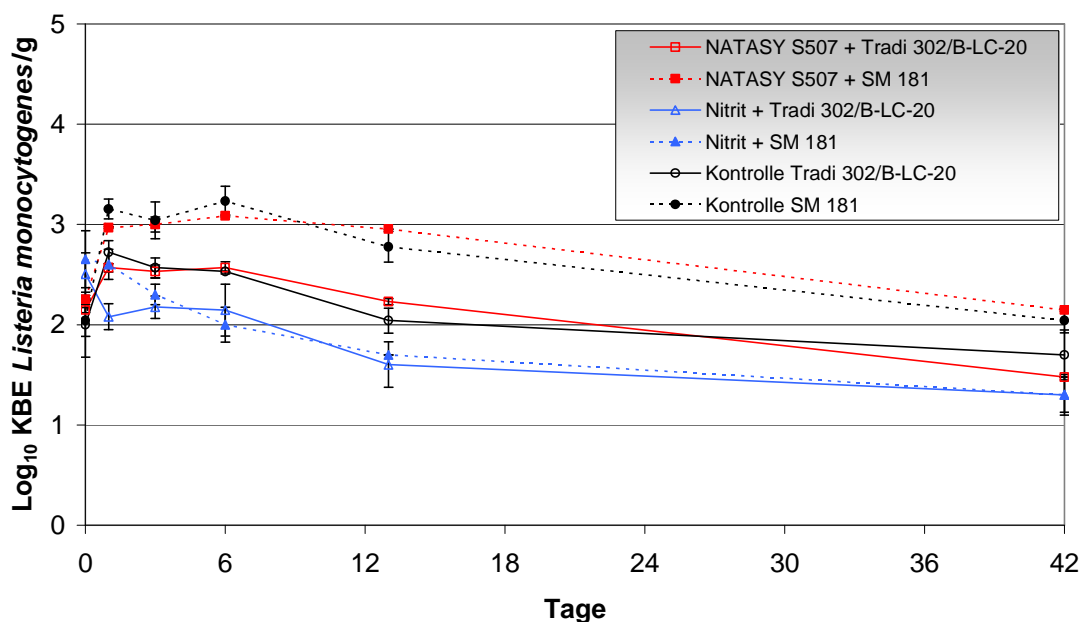


Abb. 219: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss zweier unterschiedlich stark absäuender Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

4.3.3 Verwendung eines alternativen Reifeprogramms für die Herstellung einer langgereiften schnittfesten Salami

In der vorangegangenen Untersuchung (vgl. 4.3.2) konnte gezeigt werden, dass auch eine stark absäuende Starterkultur die Vermehrung von *L. monocytogenes* in einem Nitritpökelsalz-freien Rohwurstprodukt nicht ganz verhindern konnte. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse konnte in den ersten drei Reifetagen eine Vermehrung nicht ausgeschlossen werden.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher, das Verhalten/ bzw. die Absterbekinetiken von *L. monocytogenes* in einem schnittfesten Rohwurstprodukt (Typ Salami), das ohne Nitritzusatz unter optimierten Reifetemperaturen hergestellt wurde, zu überprüfen.

Als Ersatz diente erneut ein kommerziell erhältlicher Pflanzenextrakt (NATASY S507). In den Challengeuntersuchungen wurde ein herkömmliches Reifeprogramm (A) mit einer

Anfangstemperatur von 24 °C mit einem alternativ entwickelten Reifeverfahren (B) mit einer Starttemperatur von 20 °C verglichen.

Physikalisch-chemische Parameter:

In allen Chargen lag der a_w -Wert am Tag 0 zwischen 0,961 und 0,964 (siehe Abb. 220). Mit fortschreitender Reifung nahm die Wasseraktivität in allen Würsten bis zum Tag 3 auf 0,958 ab. Anschließend sank der Wasseraktivitätswert in den Produkten, die mit dem Reifeprogramm A hergestellt wurden, kontinuierlich ab und erreichte am Tag 13 a_w -Werte von 0,937 und am Tag 42 Werte zwischen 0,858 und 0,864.

In den Würsten, die mit dem Reifeprogramm B hergestellt wurden, konnten am Tag 13 a_w -Werte zwischen 0,9314 und 0,925 und am Tag 42 a_w -Werte zwischen 0,843 und 0,848 gemessen werden (siehe Abb. 220).

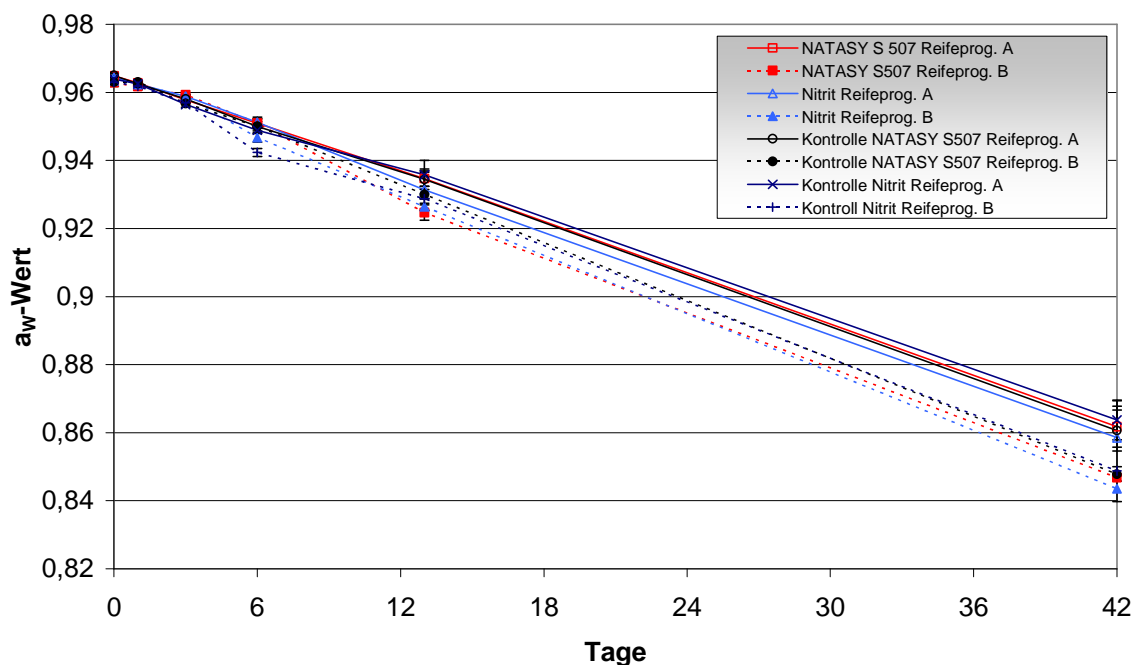


Abb. 220: Verlauf der a_w -Werte in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Der pH-Wert lag in allen Würsten am Tag 0 zwischen 5,78 und 5,84 (siehe Abb. 221). In den Chargen des Reifeprogrammes A nahm der pH-Wert bis zum Tag 3 auf Werte zwischen 5,04 und 5,09 ab (siehe Abb. 221). Anschließend stieg der pH-Wert an und erreichte am Tag 13 Werte zwischen 5,14 und 5,23. Zum Ende der Untersuchungen am Tag 42 wurden in den Produkten des Reifeprogrammes A pH-Werte zwischen 5,41 und 5,46 festgestellt (siehe Abb. 221).

Am Tag 3 wurde in den Rohwürsten des Reifeprogrammes B pH-Werte zwischen 5,15 und 5,19 gemessen. Anschließend fiel der pH-Wert in den Produkten weiter ab. Am Tag 6

wurden pH-Werte zwischen 5,05 und 5,11 detektiert (siehe Abb. 221). Mit weiter fortschreitender Reifung und Lagerung stieg der pH-Wert an und erreichte am Tag 42 Werte zwischen 5,37 und 5,49 (siehe Abb. 221).

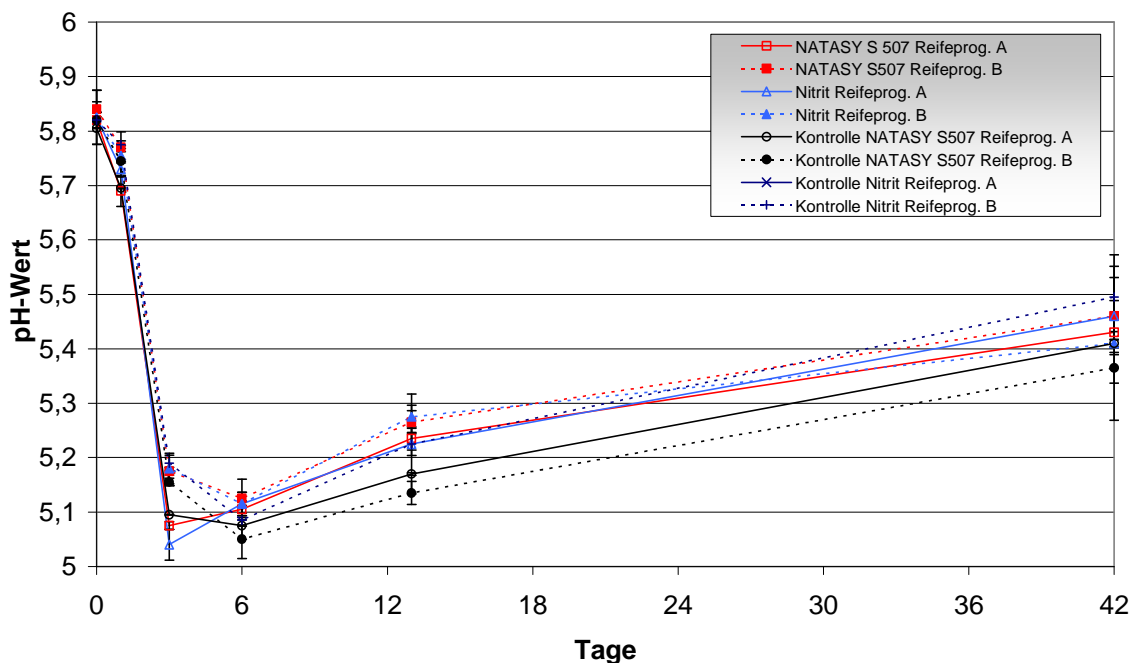


Abb. 221: Verlauf der pH-Werte in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Die zugesetzte Natriumnitritmenge von 136 mg/kg nahm in den Chargen des Reifeprogrammes A bis zum Tag 6 kontinuierlich ab. Am Tag 1 wurden Nitritkonzentrationen von 93 mg/kg und am Tag 6 von 23 mg Nitrit/kg gemessen. Anschließend war in diesen Produkten bis zum Tag 42 kein Natriumnitrit mehr nachweisbar (siehe Abb. 222).

Die Nitritkonzentration in den Rohwürsten des Reifeprogrammes B sank von anfänglich 143 mg/kg auf 73 mg Nitrit/kg am Tag 3 und weiter auf 36 mg Nitrit/kg am Tag 6. Bis zum Tag 42 war anschließend kein Natriumnitrit mehr detektierbar (siehe Abb. 222).

Die Nitratkonzentration sank in allen Chargen bis zum Tag 42 (siehe Abb. 222). Am Tag 0 wurden in den Würsten Nitratkonzentrationen zwischen 163 und 166 mg/kg gemessen, die anschließend auf 133 mg Nitrat/kg am Tag 13 und auf Werte zwischen 56 und 60 mg Nitrat/kg am Tag 42 abnahmen (siehe Abb. 222).

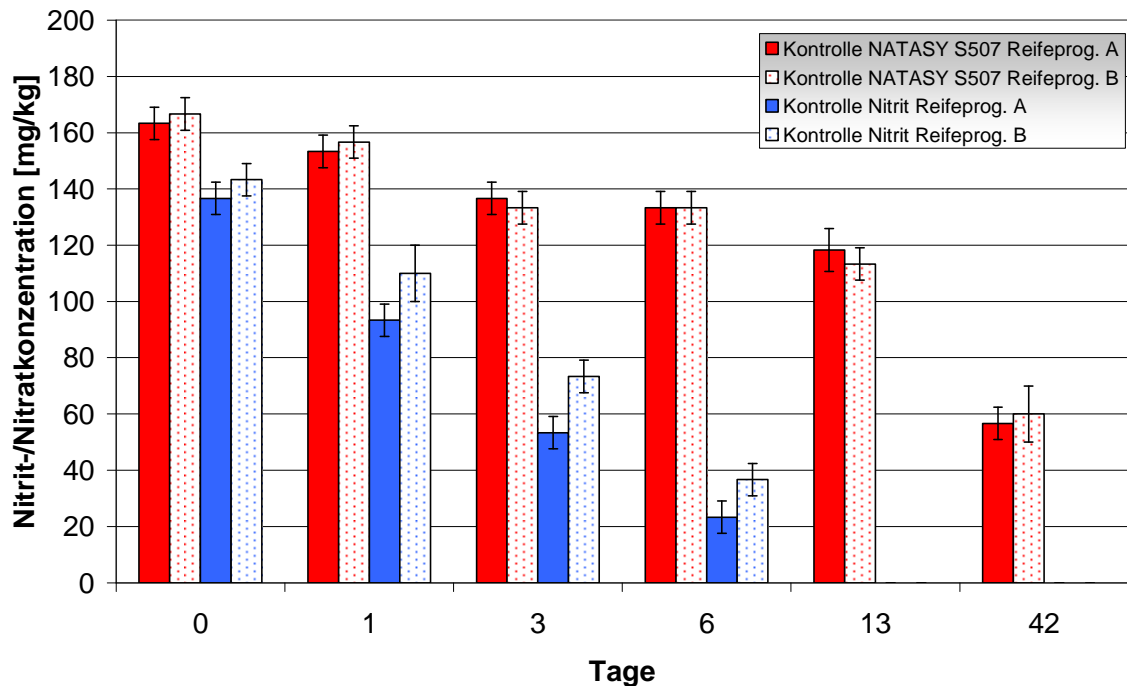


Abb. 222: Natriumnitrit- bzw. Nitratkonzentration (NATASY S507) in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Aerobe mesophile Keim- und Milchsäurebakterienzahl:

Die aerobe mesophile Keimzahl nahm in den Produkten mit dem Pflanzensaft NATASY S507 in dem Reifeprogramm A von 6,5 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 8,1 log₁₀ KbE/g am Tag 1 und weiter auf 8,6 log₁₀ KbE/g am Tag 3 zu (siehe Abb. 223). Bis zum Tag 42 blieb die Keimzahl konstant über 8,4 log₁₀ KbE/g.

In den Würsten mit dem Pflanzensaft und dem Reifeprogramm B stieg die Zahl der aeroben mesophilen Keimzahl bis zum Tag 1 auf 7,8 log₁₀ KbE/g und weiter auf 8,7 log₁₀ KbE/g am Tag 3. Anschließend blieb die Keimzahl bis zum Tag 42 oberhalb von 8 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 223).

In den Produkten mit Natriumnitrit nahm die Zahl der aeroben Keimzahl im Reifeprogramm A von 6,5 log₁₀ KbE/g auf 7,6 log₁₀ KbE/g am Tag 1 und weiter auf 8,7 log₁₀ KbE/g am Tag 3 zu. Anschließend sank die Keimzahl bis zum Tag 42 auf 8,3 log₁₀ KbE/g ab (siehe Abb. 224). In den Chargen mit Nitrit im Reifeprogramm B stieg die Keimzahl von 6,7 log₁₀ KbE/g am Tag 0 auf 7,4 log₁₀ KbE/g am Tag 1 und weiter auf 8,6 log₁₀ KbE/g am Tag 6. Bis zum Ende der Untersuchungen sank die Keimzahl auf 8,2 log₁₀ KbE/g (siehe Abb. 223).

Die Verläufe der Milchsäurebakterien waren denen der aeroben mesophilen Keimzahl ähnlich. Auf Grund der nicht miterfassten Mikrokokken lagen die Milchsäurebakterienzahlen

vor allem am Tag 0 und Tag 1 ca. eine halbe Zehnerpotenz unter denen der aeroben mesophilen Keimzahl (siehe Anhang Abb. 224).

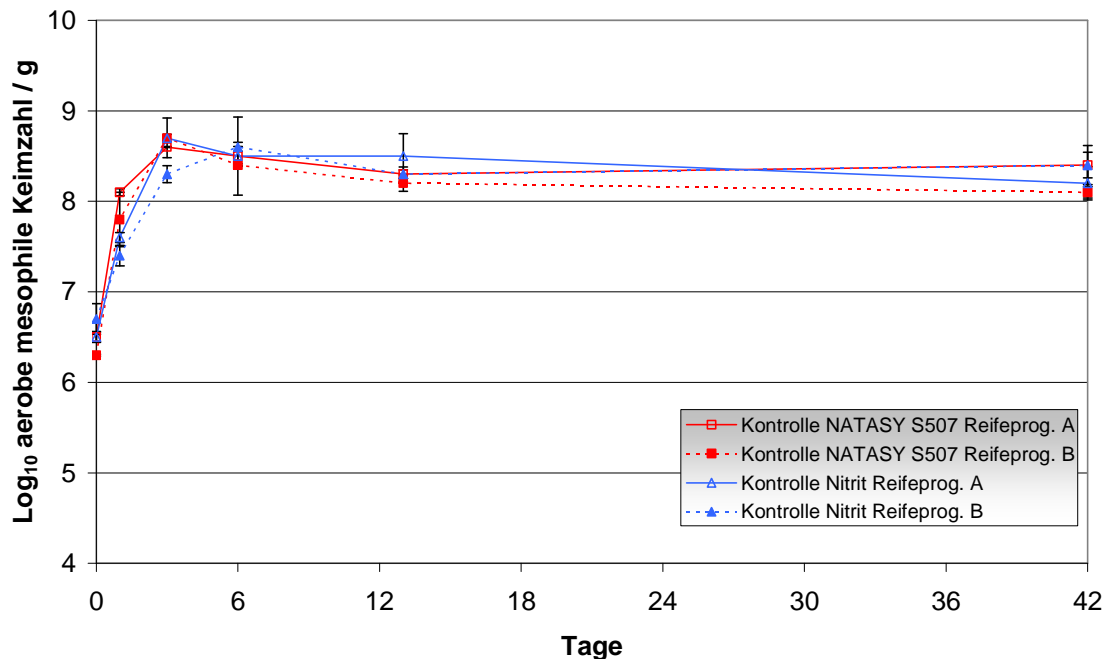


Abb. 223: Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

Originalrezeptur:

Reifeprogramm A

Das Ausgangsmaterial wurde mit einer Listerienkonzentration von $2,3 \log_{10}$ KbE/g inokuliert (siehe Abb. 225). Zwischen dem Tag 0 und dem Tag 1 wurde in den Würsten eine Zunahme der Keimzahl auf $2,8 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen (siehe Abb. 225). Anschließend blieb die Keimzahl bis zum Tag 13 auf diesem Niveau und sank anschließend auf $2,2 \log_{10}$ KbE/g am Tag 42 ab (siehe Abb. 225).

Reifeprogramm B

Die Listerienzahl nahm von $2,3 \log_{10}$ KbE/g am Tag 0 auf $2,4 \log_{10}$ KbE/g am Tag 1 leicht zu. Anschließend sank die Keimzahl bis auf $2,2 \log_{10}$ KbE/g am Tag 13 und weiter auf 49 KbE/g am Tag 42 (siehe Abb. 225).

Brät mit Nitritzusatz:

Reifeprogramm A

Die Zahl der Listerien nahm innerhalb von 24 Stunden von 2,2 log₁₀ KbE/g auf 2,3 log₁₀ KbE/g am Tag 1 zu (siehe Abb. 225). Anschließend sank die Keimzahl auf 2 log₁₀ KbE/g am Tag 6. Bis zum Ende der Untersuchungen nahm die Keimzahl kontinuierlich auf 38 KbE/g am Tag 42 ab (siehe Abb. 225).

Reifeprogramm B

Das Brät wurde mit einer Keimzahl von 2,3 log₁₀ KbE/g am Tag 0 inokuliert. Bis zum Tag 6 sank die Listerienzahl auf 2 log₁₀ KbE/g und auf 30 KbE/g am Tag 42 ab (siehe Abb. 225).

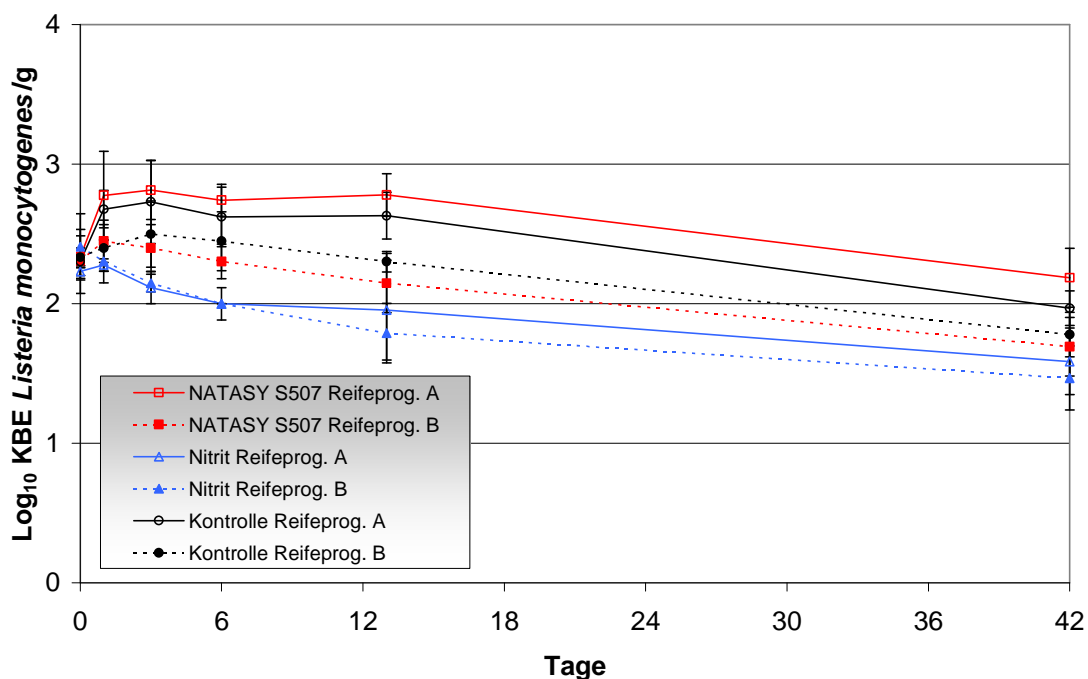


Abb. 225: Verhalten von *L. monocytogenes* in einer langgereiften Salami unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

5 Diskussion

5.1. *In-Vitro* Untersuchungen

Im ersten Teil der Arbeiten sollte unter *in Vitro* Bedingungen das Verhalten von *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (EHEC/STEC) und *Listeria monocytogenes* unter verschiedenen Milieubedingungen mit bzw. ohne Zusatz von Natriumnitrit untersucht werden.

In den Untersuchungen mit den Gram-negativen Mikroorganismen *Salmonella* spp. und den shigatoxinbildenden *Escherichia coli* wurde bei einem pH-Wert von 7, Inkubationstemperaturen von 25 °C und 17 °C und Wasseraktivitätswerten bis 0,975 keine Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle ohne Natriumnitrit beobachtet (vgl. 4.1.1. und 4.1.2). Erst bei einem a_w -Wert von 0,965 in Kombination mit 100, 150 und 200 mg/l Natriumnitrit wurde eine leichte Verzögerung im Wachstum im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Dieses Verhalten war bei den shigatoxinbildenden *E. coli* etwas ausgeprägter als bei den inkubierten Salmonellen.

Es wird vermutet, dass die stärkere Anpassung des Stoffwechsels an die beiden Umweltbedingungen, gesenkte Wasseraktivitätswerte und Natriumnitrit, zu dieser Beobachtung führt. Bei niedrigen a_w -Werten wie 0,975 und 0,965 nehmen Salmonellen und auch *Escherichia coli* Kaliumionen auf. Durch die dadurch bedingte gleichzeitige Aufnahme des Gegenions Glutamat kommt es in der Zelle zur Anreicherung hoher Konzentrationen von Kaliumglutamat (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003). In Folge dieser Anreicherung kann es im Zytoplasma der Zelle zu Störungen bzw. Beeinträchtigungen der Enzymfunktionen kommen (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003; Wijnker et al., 2006). Wie bereits unter 2.2.1. beschrieben besteht ein weiterer physiologischer Nachteil der Gram-negativen Bakterien darin, dass in den Zellen im Vergleich zu den Gram-positiven ein vergleichsweise geringer Zellinnendruck herrscht. Dadurch wird bei osmotischem Stress die Plasmolyse zusätzlich verstärkt. In Kombination mit beeinträchtigten Enzymfunktionen und dem Einfluß von Natriumnitrit kann dies bei *Salmonella* spp. und STEC/EHEC zu höheren Absterberaten unter osmotisch ungünstigen Bedingungen führen (Gutierrez et al., 1995; Mellefont et al., 2003; Wijnker et al., 2006).

Nach dem zunächst verzögerten Wachstum wurde jedoch auch für mit Natriumnitrit inkubierten Mikroorganismen, bei einem a_w -Wert von 0,965 eine Vermehrung beobachtet. Es kann daher vermutet werden, dass nach der eben erwähnten kurzfristigen Anpassung eine zweite Anpassung an niedrige Wasseraktivitätswerte ablief (vgl. 2.2.1. und 2.2.2.). Dazu bildeten die Organismen verstärkt die osmoprotektive Substanz Prolin bzw. nahmen diese aus dem umgebenden Medium auf (Csonka, 1981; Csonka, 1989). Prolin unterstützt bei

niedrigen Wasseraktivitätswerten in den Bakterien zum einen die Stabilität von Proteinen und sorgt weiterhin dafür, dass diese im Zytoplasma löslich und funktionstüchtig bleiben (Schobert und Tscheche, 1978). Des Weiteren werden bei der Aufnahme von Prolin aus der Umgebung Natrium- und zu einem deutlich geringeren Teil auch Kaliumionen (Symport-Transporter) aufgenommen. Diese wiederum unterstützen die Aufrechterhaltung des Zellinnendrucks und ermöglichen die Adaptation der Zellen. Es kann vermutet werden, dass nach der Anpassung des Stoffwechsels an den niedrigeren a_w -Wert wieder Stoffwechselenergie vermehrt zur Verfügung steht, um die Schäden die durch Natriumnitrit entstanden sind, zu beheben. Hierzu gehören Proteininaktivierungen oder DNA-Schäden (Fang, 1997; Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995; Kroncke et al., 1994). Dies würde auch das beobachtete Verhalten der beiden Keime im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatzstoff erklären. In der Kontrolle ohne Nitrit war zwar im Vergleich zu einer Wasseraktivität von 0,99 eine etwas längere Lag-Phase zu sehen, diese ist jedoch mit der Anpassung an die niedrigeren a_w -Werte zu erklären, jedoch wurde ein deutlich besseres Wachstum beobachtet als in den Ansätzen ohne Nitrit.

In den Versuchen die mit *Listeria monocytogenes* bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt wurden, konnte eine sehr interessante Beobachtung gemacht werden. Bei einer Wasseraktivität von 0,98 wurde im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit ein annähernd gleiches Wachstum festgestellt, jedoch waren die Keimzahlen beider Ansätze mit Nitrit nach 24 h ca. 1 Zehnerpotenz niedriger. Dies konnte ebenfalls durch die Messung des relativen Redoxpotentials bestätigt werden. So sanken die Potentiale in den Röhren mit Nitrit auf ca. – 300 mV, in denen ohne Nitrit wurden zum selben Zeitpunkt – 600 mV gemessen (vgl. Abb. 81). Da die Veränderung des Redoxpotentials durch nach außen abgegebene Stoffwechselprodukte beeinflusst wird, in diesem Fall vor allem durch Säuren (Rödel und Scheuer, 2003a/b), erlaubt diese Methode einen sehr schnellen Rückschluss auf die mögliche negative oder positive Beeinflussung des Stoffwechsels durch geänderte Umweltbedingungen bzw. Zusatzstoffe. Natriumnitrit führte unter diesen Bedingungen zu einer leichten Hemmung des mikrobiellen Stoffwechsels von *L. monocytogenes*. Dies wird auch indirekt durch die Messung des pH-Wertes im Medium bestätigt. Dieser sank in den Ansätzen mit Nitrit nicht ganz so stark wie in denen ohne Zusatzstoff (vgl. Anhang Abb. 84).

Wurde der a_w -Wert auf 0,97, 0,955 und 0,94 gesenkt, wurde jedoch der genau gegenteilige Effekt beobachtet. In den Röhren mit Nitrit konnten die Zellen nun z.T. deutlich besser wachsen als bei der Kontrolle ohne Nitrit. Es wird vermutet, dass dies ein indirekter Effekt infolge der a_w -Wert-Absenkung sein könnte. Durch die Reduktion des a_w -Wertes werden in *L. monocytogenes* Gene der generellen Stressantwort induziert. Unter den Genen, deren

Transkription induziert wird, befinden sich Gene für Regulatoren, die an der oxidativen Stressantwort beteiligt sind, wie z.B. *ohrR*, *perR* (Rea et al., 2004), *ctsR* (Derre et al., 1999) und *spxA* und Gene, deren Produkte an der allgemeinen Stressresistenz beteiligt sind. Diese umfassen z.B. Clp-Proteasen, die für den ATP-abhängigen Abbau von fehlgefalteten Proteinen verantwortlich sind (Kress et al., 2009; Stanne et al., 2007; Zellmeier et al., 2006), oder auch Proteine, die an der Aufrechterhaltung des Redox-Status in der Zelle beteiligt sind, wie z.B. eine Glutathion-Reduktase (Kazmierczak et al., 2003). In Kombination mit der Aktivierung der Gene, die infolge des Nitritstresses bei pH 7 induziert bzw. reprimiert werden (Kaspar et al., unveröffentlicht), führt dies eventuell zu einer kürzeren Generationszeit. In Microarray-Analysen und beim Screening einer Mutantenbank (Kaspar, mündliche Mitteilung) konnten dafür jedoch keine Anhaltspunkte gefunden werden.

Wurde der pH-Wert von 7 auf 6 und später auf 5 abgesenkt, wurde unabhängig von der Inkubationstemperatur, in den Ansätzen mit Natriumnitrit eine deutliche Wachstumshemmung bzw. ein schnelleres Absterben der Mikroorganismen im Vergleich zur Kontrolle ohne Nitrit festgestellt (vgl. 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.3). Diese Beobachtung kann auch durch molekularbiologische Arbeiten von Kaspar (mündliche Mitteilung) und Krementowski (mündliche Mitteilung) bestätigt werden. Weiterhin wird in der Literatur häufig beschrieben, dass nicht Nitrit der eigentliche wachstumshemmende Faktor ist, sondern Derivate, die während der Ansäuerung durch chemische Reaktionen gebildet werden (Kaspar, mündliche Mitteilung; Cammack et al., 1999). Nimmt der pH-Wert ab, katalysieren unter diesen Bedingungen die Protonen der Säure die Umwandlung des Nitrits zur salpetrigen Säure (Säure-Base-Reaktion, vgl. Abb. 5) und anschließend weiter zu NO*-Radikalen (Disproportionierung) wie Peroxynitrit, S-Nitrosothiol, Stickstoffdioxid, Di-Stickstoffdioxid und Tri-Stickstoffdioxid (Cammack et al., 1999; Fang, 1997; Honikel, 2008; Hoagland, 1914).

Als unpolares und nicht geladenes Molekül mit einem kleinen hydrodynamischen Radius (Stokes Radius) können NO*-Radikale die Zellmembran einfach durchqueren (Denicola et al., 1996/1998) und in das Cytoplasma gelangen. Verbindungen wie Peroxynitrit, welches aus der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit einem Hyperoxid-Anion hervorgeht, dringen dagegen in Form ihrer Säure in das Zellinnere ein (Fang, 1997).

Die NO*-Radikale sind sehr zelltoxisch und führen zu Schäden an Proteinen und der Zellwandumhüllung (siehe 2.3.1.4). Des Weiteren reagieren die NO*-Radikale, aber auch Peroxynitrit oder Distickstofftrioxid, mit den Bestandteilen der DNA (vgl. Abb. 6) und können zu einer Desaminierung (Wink et al., 1991) und zu Strangbrüchen (oxidativer Schaden) führen (Wink et al., 1991; Juedes und Wogan, 1996; Cammack et al., 1999). Roy et al. (1995) und Haskin et al. (1995) konnten zeigen, dass die Ribonukleotid-Reduktase, welche

für die Bildung der DNA essentiell ist, durch Stickstoffmonoxid inhibiert wurde und dies eine mögliche Erklärung für die beobachtete bakteriostatische Wirkung sein könnte. Weiterhin konnte in *in-Vitro* Studien gezeigt werden, dass NO^{*}-Radikale bzw. NO-Intermediate für die Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich sind (vgl. Abb. 6). Somit können auftretende oxidative DNA Schäden nicht repariert werden und Mutationen zunehmen (DeGroot und Fang, 1995; Fang, 1997; Kaspar, mündliche Mitteilung).

Neben Schäden auf molekularer Ebene können auch Proteine modifiziert und so verändert werden (vgl. Abb. 6), dass sie ihre Funktion verlieren (Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995). Bevorzugte Reaktionspartner sind die Häm- (Hentze, 1996) und Thiolgruppen (S-Nitrosylation) der Proteine (Stammler und Slivka, 1996; Morris und Hansen, 1981), hier vor allem Enzyme, die als reaktives Zentrum ein Eisen-Schwefelcluster tragen (Fang, 1997, siehe 2.3.1.4).

Neben den genannten Wirkungen gegen DNA und Proteine sind auch Schäden an Zellmembranen beschrieben wurden (Cammack et al., 1999; Halliwell et al., 1992; Rubbo et al., 1994). Durch die Oxidation von Lipiden durch z.B. Peroxynitrit oder Stickstoffdioxid kann es zu einer deutlich reduzierten elektrophoretischen Beweglichkeit der Lipidmembran und zum Abbau lipidlöslichen Ubiquinols und α -Tocopherols (Halliwell et al., 1992; Rubbo et al., 1994) kommen. In den durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden bei *Salmonella* spp. und den shigatoxinbildenden *E. coli* keine Schäden an den Zellumhüllungen beobachtet (vgl. 4.1.4). Beide Mikroorganismen scheinen also unter den getesteten Bedingungen (6,57 log₁₀ KbE/ml, pH 7-5, a_w-Werte von 0,99 und 0,975, sowie 0 bzw. 200 mg/l Natriumnitrit) NO-detoxifizierende Systeme zu exprimieren (Bang et al., 2006; Gardner und Gardner, 2002; Mills et al., 2005; Mills et al., 2008; van Wonderen et al., 2008). Die Expression der Proteine HmpA (Flavohämoglobin), NorV (Flavorubredoxin) und NrfA (Cytochrom C abhängige periplasmatische Nitrit Reduktase) wird durch mehrere Transkriptionsregulatoren strikt reguliert (Spiro, 2007). Daten über die Expressionsregulation dieser NO-detoxifizierenden Proteine sind vor allem im Bereich der medizinischen Forschung zum besseren Verständnis des Überlebens dieser Erreger in Makrophagen erhoben worden (Fang, 1997; Laver et al., 2010; Priyanka et al., 2009). So sorgt die periplasmatische Nitrit Reduktase dafür, dass Nitrit nicht zu NO zerfallen kann, da dieses vorher durch NrfA zu Ammoniak reduziert wird. HmpA wiederum oxidiert NO zu Nitrat und stellt dieses somit als alternative Energiequelle zur Verfügung. Das Flavorubredoxin wandelt NO zu Distickstoffmonoxid (N₂O) um, welches die Zelle anschließend gasförmig verlässt (Priyanka et al., 2009). Durch diese drei bekannten Nitrit-/NO-Resistenzmechanismen könnten die

Zellen von *Salmonella* spp. und STEC/EHEC in den vorgenommenen Untersuchungen Schäden an Zellmembranen verhindert haben.

Im Vergleich dazu wurden bei Inkubation mit *Listeria monocytogenes* bei einem pH-Wert von 7 und einer Wasseraktivität von 0,98 in den Röhrcchen mit Nitrit strukturelle Schäden an der Zelloberfläche festgestellt (vgl. Abb. 137). Dass Nitrit bzw. Nitritderivate zu Schäden an der Oberfläche führen könnten, wurde schon von Kaspar (mündliche Mitteilung) dargestellt. In der genannten Arbeit konnte festgestellt werden, dass in Anwesenheit von Nitrit Gene herunterreguliert werden, die an der Peptidoglycan-Synthese beteiligt sind. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die beobachteten Schäden.

Wurde die Wasseraktivität bei pH 7 auf 0,955 gesenkt, konnten im elektronenmikroskopischen Bild sogenannte Superzellen (Vail et al., 2012; Giotis et al., 2007; Bereksi et al., 2002) beobachtet werden. Diese filamentartigen Zellen waren mit 4 bis 6 µm deutlich größer als die zuvor bei $a_w = 0,98$ vermessenen Stäbchen mit 0,5 - 2 µm (vgl. Abb. 138). Auch Vail et al. (2012) und Giotis et al. (2007) konnten unter angesäuerten Bedingungen bzw. bei einem erhöhten osmotischen Druck filamentöse Superzellen nachweisen. Es wird vermutet, dass es durch den Umweltstress zu DNA-Schäden kommen kann. Diese wiederum aktivieren die SOS-Antwort in *Listeria monocytogenes* (Walk, 1996) deren in Folge das Protein SulA exprimiert wird, welches dann die Zellteilung stoppt (Trusca et al., 1998). Ob ein Zusammenhang zwischen der Bildung der filamentösen Zellen und dem deutlich verbesserten Wachstum der Listerien in Anwesenheit von Nitrit bei pH 7 besteht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Bei einer weiteren Absenkung des pH-Wertes auf 6 bzw. 5 wurden *Listeria* Zellen ohne Oberflächenschäden und mit einer normalen Zellgröße von 1 – 2 µm festgestellt (vgl. Abb. 139).

Vergleicht man mit den Inkubationstemperaturen von 17 °C und 25 °C einen weiteren Aspekt der Untersuchungen, so war festzustellen, dass vor allem bei niedrigeren pH-Werten die Mikroorganismen bei 25 °C zügiger abstarben, als bei 17 °C. Während bei einer Temperatur von 17 °C die Keimzahl nur um eine bzw. eine halbe Zehnerpotenz im Untersuchungszeitraum sank, starben die Mikroorganismen, die bei 25 °C inkubiert wurden, ab (vgl. 4.1).

Dies könnte auf ein Phänomen zurückzuführen sein, das als „Metabolic Exhaustion“ beschrieben wurde (Leistner, 2000). Nach dieser Theorie wird durch höhere Temperaturen der Stoffwechsel der Organismen gesteigert. Die Bakterien wachsen durch die erhöhte Stoffwechselaktivität. Sie können in diesem Fall nicht, wie andere Mikroorganismen (vgl. 4.1.2) bei niedrigeren Temperaturen, in einem Zustand der Bakteriostase schlechte Umweltbedingungen im Medium überdauern. Sie sterben letztendlich an dem Stress, der

durch a_w -Wert, pH-Wert und Nitritkonzentration ausgeübt wird. Um diesen Effekt auszunutzen und die Produkte sicherer zu machen, werden deshalb vielfach bestimmte fermentierte Rohwürste im Einzelhandel nicht mehr in der Kühltheke gelagert, sondern im Verkaufsraum bei moderaten Temperaturen um 22 °C angeboten. Das Phänomen „Metabolic Exhaustion“ wird unter 5.2. nochmals ausführlicher dargestellt.

Eine weitere Beobachtung, die bereits von Rödel und Scheuer (2003 b) beschrieben wurde, konnte ebenfalls bestätigt werden. So entfaltet Natriumnitrit bei pH-Werten um 7 erst bei hohen Keimzahlen seine antimikrobielle Wirkung im Medium. Bei einem Inokulum von 6,9 log KbE/ml konnte nur innerhalb der ersten 24 Stunden eine leichte Zunahme der Keimzahl auf 7 log KbE/ml im Medium beobachtet werden. Die Keimzahl blieb anschließend, mit kleineren Schwankungen, über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant auf einem hohen Niveau. Dies erklärt auch, warum bei ähnlichen Versuchen mit geringeren Inokula die Mikroorganismen ungehemmt wachsen konnten, jedoch ohne dabei die Keimzahlen der Negativkontrollen zu erreichen. Es wird angenommen, dass diese Beobachtung auf die steigende Trefferwahrscheinlichkeit eines Nitritmoleküls bzw. deren reaktiver Zerfallsprodukte mit einer Bakterienzelle zurückzuführen ist. Somit scheint auch die Keimzahl bei der Betrachtung der Wirkung des Zusatzstoffes Natriumnitrit eine Rolle zu spielen.

5.2. In-Situ Untersuchungen

5.2.1. *Salmonella* spp.

In den Challengeuntersuchungen konnte mit Ausnahme der GdL-gereiften Rohwurst eine deutliche Zunahme der Keimzahl in den Würsten ohne Nitrit festgestellt werden. Hier wurde z.T. ein Anstieg der Keimzahl auf 6 log₁₀ KbE/g in einer kurzggereiften streichfähigen Rohwurst festgestellt (vgl. 4.2.1). Im Vergleich dazu konnte in allen Nitritchargen eine Abnahme der Keimzahl von *Salmonella* spp. beobachtet werden.

In langgereiften Rohwürsten und in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (mit entsprechender Reifezeit) sanken die Keimzahlen in den Chargen mit Nitrit im Schnitt nach 14 Tagen unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g und nach Tag 28 waren die Keime auch nach Anreicherung nicht mehr nachzuweisen. Nur in den Ansätzen ohne Nitrit konnten die Keime länger im Produkt festgestellt werden, was jedoch auf die anfängliche Erhöhung der Keimzahl im Brät zurückzuführen war. Auch in diesen Chargen waren die Keime im Schnitt nach dem Tag 42 nicht mehr nachzuweisen. Somit war eine sichere Produktion von Rohwürsten auch ohne den Zusatzstoff, jedoch mit Beachtung einer längeren Reifezeit, möglich.

Salmonella spp. reagierte im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Mikroorganismen sehr empfindlich auf die in der Rohwurst vorherrschenden Bedingungen. So konnten die Erreger in einer GdL-gereiften und in den langgereiften Rohwürsten mit Natriumnitrit sehr schnell und effektiv abgetötet werden. In den nitritfreien Chargen konnte zwar anfänglich eine Vermehrung der pathogenen Keime beobachtet werden, die jedoch mit beginnender Ansäuerung, aber vor allem mit einsetzender Abtrocknung des Produktes, zu einem Absterben der Mikroorganismen führte. Bei Beachtung einer entsprechenden Verlängerung der Reifezeit kann auch hier ein hygienisch und mikrobiologisch stabiles Produkt ohne den Einsatz von Nitrit hergestellt werden.

Zwischen den edelschimmelpilzgereiften und den langgereiften Rohwürsten konnten keine charakteristischen Unterschiede festgestellt werden. Trotz der deutlichen Erhöhung des pH-Wertes in den schimmelpilzgereiften Produkten konnte keine Zunahme der Zahl der Salmonellen beobachtet werden. Dies war auf die kontinuierliche Abtrocknung des Produktes zurückzuführen und stimmt mit den Ergebnissen anderer Publikationen überein (Nightingale et al., 2006; Nissen und Holck, 1998).

Eine Ausnahme stellte erneut die kurzgereifte streichfähige Rohwurst dar. Auf Grund der fehlenden Abtrocknung des Produktes konnten die Keime bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes mit mehr als 10 KbE/g nachgewiesen werden. Jedoch konnte bei Verwendung eines alternativen Reifeprogramms die Keimzahl durch einen Temperaturerhöhungsschritt deutlicher gesenkt werden als mit einem Standardreifeprogramm (vgl. 4.2.1). Dieser Effekt ließ sich auch bei schnellgereiften Rohwurst mit einem an die metabolische Erschöpfung angepassten Reifeprogramm erkennen (vgl. 4.2.2). Die Erhöhung der Reifetemperatur zum richtigen Zeitpunkt bewirkte wie auch bei *L. monocytogenes* und STEC/EHEC eine schnellere Absenkung der Dichte pathogener Keime im Produkt. Damit die Temperaturerhöhung sinnvoll und zügig wirkt, müssen jedoch in der Rohwurst bestimmte Bedingungen vorherrschen: So sollte der pH-Wert kleiner 5,2 sein und die Starter- und Schutzkulturen sich auf Keimzahlen von 8 log₁₀ KbE/g vermehrt haben. Sind diese Parameter noch nicht erfüllt, kann eine Temperaturerhöhung zu einem zu frühen Zeitpunkt gegenteilig wirken. Hinter dieser Beobachtung ist ein Effekt zu vermuten, der in der Literatur als metabolische Erschöpfung beschrieben ist (Leistner, 1992; Sun-Young, 2004). Nach dieser Theorie erzwingt die gleichzeitige Einwirkung verschiedener Stressoren die gleichzeitige Aktivierung unterschiedlicher Stressschutzmechanismen. Dies soll zu einer Erschöpfung der metabolischen Reserven sowie zu einer Störung des intrazellularen Gleichgewichts und somit zum Absterben der Erreger führen. Allerdings ist über die an diesem Phänomen

beteiligten intrazellulären Vorgänge derzeit nichts bekannt. Bei ambienten Temperaturen sind die Bakterien anfälliger gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie niedrigen pH-, a_w -Werten und Nitrit, während sich bei Kühltemperaturen die Keime als widerstandsfähiger erweisen (Uyttendaele et al., 2001). Somit könnte eine Kühlung von Rohwurstprodukten – während oder nach der Reifung – ein erwünschtes Absterben von Pathogenen verhindern und damit kontraproduktiv für ein mikrobiologisch einwandfreies Produkt sein.

Eine solche Temperaturerhöhung kann die mikrobiologische und hygienische Stabilität eines typischen Rohwurstproduktes deutlich erhöhen.

Die in den Challengeversuchen zugesetzte Natriumnitritmenge war zweitrangig, denn ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen hinsichtlich der Keimzahlabnahme konnte nicht festgestellt werden. Wie auch schon die Untersuchungen mit *L. monocytogenes* und STEC/EHEC zeigten, war ein Zusatz von 100 mg/kg ausreichend, um eine Vermehrung der pathogenen Bakterien effektiv zu verhindern.

Dass sich ein Zusatz von Nitrit positiv auf die mikrobielle Stabilität auswirkt, konnte schon in einer künstlich mit Salmonellen beimpften Zwiebelmettwurst gezeigt werden (Birzele et al., 2005). Hier verhinderte die Zugabe sowohl eines 0,4-0,5 % -igen als auch eines 0,9 % -igen Nitritpökelsalzes das Anfangswachstum der zugesetzten pathogenen Keime.

5.2.2. Shigatoxinbildende *Escherichia coli*

In den Untersuchungen wurde für die Produkte neben einem Standardprogramm ein Reifeprogramm mit einer Temperaturerhöhung getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Effekt der metabolischen Erschöpfung bei STEC/EHEC vor allem bei Produkten mit einer kontinuierlichen Abtrocknung stärker ausgeprägt war (siehe 4.2.1. und 4.2.2). Grundsätzlich wurden mit dem angepassten Reifeprogramm bessere Ergebnisse erzielt als mit einem Standardreifeprogramm. Somit wäre der Einsatz von angepassten Reifeprogrammen zu empfehlen, da z.T. deutlich schneller ein mikrobiologisch einwandfreies Produkt erreicht werden konnte (Rödel et al., 2006; Uyttendaele et al., 2001). Die pathogenen Keime in den Nitritchargen wurden bei schnellgereiften schnittfähigen Rohwurst bereits nach 13 Tagen unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g gesenkt. Dies war bei einem herkömmlichen Reifeprogramm erst nach 20 Tagen der Fall.

Etwas schwächer trat dieser Effekt bei den schnellgereiften streichfähigen Produkten auf. Hier konnte die Keimzahl von STEC/EHEC in keiner Charge unter die Nachweisgrenze von 10 KbE/g gesenkt werden. Im Vergleich zu einem herkömmlichen Reifeprogramm konnten jedoch ein bis zwei Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahlen erreicht werden (siehe 4.2.1). Diese Beobachtung ist auf eine fehlende Abtrocknung des Produktes zurückzuführen.

Shigatoxinbildende *E. coli* reagieren im Vergleich zu *L. monocytogenes* sehr empfindlich auf eine a_w -Wert Erniedrigung (Rödel et al., 2006). So bewirkt bereits die Absenkung des Wasseraktivitätswertes um 0,01 Einheiten eine Verminderung der Keimzahl um eine Zehnerpotenz (Rödel und Scheuer, 2001). Auch Rödel und Scheuer (2001) konnten keine starke Abnahme der *E. coli* Keimzahl in kurzgereiften streichfähigen Produkten feststellen. Vielmehr blieb die Keimzahl in den mit Nitrit hergestellten Rohwürsten über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant oder nahm leicht ab.

In Produkten, in denen auf Grund des verwendeten Reifeprogrammes bzw. des wasserdurchlässigen Darmes eine Abtrocknung gewährleistet wurde, konnte z.T. eine sehr deutliche Abnahme der Keimzahl von STEC/EHEC erfasst werden. So wurden STEC/EHEC in langgereiften und Edelschimmelpilzgereiften Rohwurstprodukten relativ zügig und vollständig abgetötet. Hier wie auch in anderen Forschungsarbeiten zeigte sich deutlich, wie die einzelnen Hürden ineinander greifen und eine Vermehrung der pathogenen Bakterien verhindern (Nissen und Holck, 1998; Pichner et al., 2006, Holck et al., 2011). Somit könnte auch bei einer relativ hohen initialen Keimzahl und Beachtung der Reifezeit ein sicheres EHEC-freies Rohwurstprodukt ohne Nitrit hergestellt werden (Lahti et al., 2001).

Hinsichtlich der antimikrobiellen Effektivität konnten in allen getesteten Produkten, sowohl zwischen Ansätzen mit als auch ohne Nitrit, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Vermehrung von STEC/EHEC ist in den Produkten durch den bereits erniedrigten pH-Wert von 5,8 und einem a_w -Wert von unter 0,97 gehemmt. Dadurch ist auch die letztendlich eingesetzte Nitritkonzentration nicht entscheidend, da das Wachstum der Organismen zu erst durch chemisch-physikalische Parameter und nach zwei Tagen durch die beginnende Vermehrung der Starterkulturen verhindert wird.

Ein Zusatz von Nitrit war damit nicht erforderlich und steht im Gegensatz zu den *in Vitro* Versuchen, in denen eine antimikrobielle Wirkung des Zusatzstoffes bei pH-Werten kleiner gleich 6 nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist, dass *Escherichia coli* im Produkt ein ganz anderes Verhalten als in einer Bouillon zeigt. So wäre zum Beispiel denkbar, dass die Organismen auf Grund der räumlichen Ungleichverteilung nicht mit den reaktiven Nitritmolekülen bzw. deren Zerfallsprodukten in Kontakt kommen. Im Gegensatz dazu ist in Bouillon von einer Gleichverteilung der Nitritspaltprodukte auszugehen.

Andererseits wäre es aber auch denkbar, dass *E. coli* durch Fett- oder Fleischbestandteile geschützt wird, da diese mit Nitritmolekülen reagieren. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass sich der Metabolismus der Organismen auf Grund der geänderten äußeren Umstände dem komplexen Medium Fleisch anpasst und somit möglicherweise die generelle Stressantwort von STEC/EHEC (Durfee et al., 2008; Thammavongs et al., 2008) auch

Schutz vor der Wirkung des Nitrits bietet. Dies sollte in weiteren Studien unter Einbeziehung der beteiligten Gen-Regulatoren untersucht werden.

5.2.3. *Listeria monocytogenes*

In den Challengeversuchen erwies sich *L. monocytogenes* im Vergleich zu STEC/EHEC und *Salmonella* spp. als ein sehr robuster Keim. Auch unter sehr schwierigen Umweltbedingungen war es kaum möglich, eine Reduktion der Keimzahl durch herkömmliche Reifebedingungen (Nightingale et al., 2006) herbeizuführen (vgl. 4.2.).

In allen untersuchten Produkten konnten die pathogenen Erreger bis zum Ende des Versuchszeitraumes nachgewiesen werden. Nur selten lag dann die Keimzahl unter der gesetzlich geforderten Höhe von 100 KbE/g. Vor allem in den kurzgereiften streichfähigen Rohwurstprodukten zeigte sich, dass eine Reduzierung der Keimzahl im Produkt mit einem Standardreifeprogramm nicht möglich war. Jedoch konnte durch die Zugabe von Natriumnitrit ein Wachstum der Zellen von *Listeria monocytogenes* verhindert werden. Im Vergleich dazu nahm in den Chargen ohne Nitrit die Keimzahl im Schnitt um eine Zehnerpotenz zu und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende des Versuchszeitraumes. Eine Reduktion der Keime um eine Zehnerpotenz in diesem Produkt war nur durch die alternative Verwendung eines Reifeprogramms mit einem Temperaturerhöhungsschritt möglich (metabolische Erschöpfung).

Ähnliche Ergebnisse wurden in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst schon von Albert et al. (2003) erzielt. Auch hier war es nicht möglich, *Listeria monocytogenes* aus dem Produkt zu entfernen, jedoch konnte mit einem alternativen Reifeprogramm die Keimzahl im Produkt leicht gesenkt werden. Die kurzgereifte streichfähige Rohwurst bedarf daher hinsichtlich der Herstellungshygiene einer besonderen Aufmerksamkeit.

In den langgereiften schnittfesten Produkten konnten in Bezug auf eine Reduktion der Keime bessere Ergebnisse erzielt werden, so nahm die Keimzahl im Produkt im Verlauf der Untersuchungen um zwei Zehnerpotenzen ab. Hier konnte vor allem zu Ende der Reifung festgestellt werden, dass die Produkte, die mit 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit hergestellt wurden, im Vergleich zu denen mit 100 mg/kg deutlich niedrigere Keimzahlen aufwiesen. Dieser Effekt kann jedoch nicht direkt auf die Wirkung des Nitrits zurückgeführt werden, da ein Nachweis des Zusatzstoffes mit den verwendeten Methoden bereits nach sechs Tagen nicht mehr möglich war. Ob bereits zum Beginn der Reifung in den Organismen durch Nitrit entscheidende Weichen für das weitere Überleben im Produkt gestellt werden, müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen klären.

Die edelschimmelpilzgereiften Erzeugnisse stellen auf Grund der Anhebung des pH-Wertes im äußeren Randbereich eine besondere Gefahrengruppe dar. In Folge des Wachstums der Kulturen von *Penicillium nalgiovense* werden alkalische Stoffwechselprodukte gebildet, die der von den Starterkulturen produzierten Milchsäure entgegenwirken und somit zu einer Erhöhung des pH-Wertes im Produkt beitragen. Somit könnte potentiell die Gefahr bestehen, dass es dadurch im Produkt zu einer Vermehrung von pathogenen Erregern kommt.

Jedoch konnte eine Zunahme der *Listeria monocytogenes* Keimzahl im Produkt mit steigendem pH-Wert nicht festgestellt werden. Dies ist vor allem auf die dynamischen Prozesse im Produkt zurückzuführen (Uyttendaele et al., 2001), an die sich die Mikroorganismen ständig neu adaptieren müssen (Leistner, 1992; Leistner, 2000).

So verhindert zuerst der Zusatz von Nitrit ein Wachstum der Organismen in den kritischen ersten zwei Reifungstagen. Innerhalb dieser 48 Stunden hat der pH-Wert durch das erst beginnende Wachstum der Starterkulturen noch keinen wachstumshemmenden Bereich erreicht. Erst nach zwei Tagen ist der pH-Wert bei Werten um 5,2 – 5,3. Durch den erniedrigten pH-Wert wird nun ein weiteres Wachstum der Mikroorganismen nach dem Verbrauch des Nitrts verhindert. Neben der Senkung des pH-Wertes im Produkt setzt nun nach zwei Tagen auch eine verstärkte Abtrocknung des Produktes ein. Der Wasseraktivitätswert beginnt kontinuierlich zu sinken und erreicht nach acht Tagen Werte unter 0,95. Ab hier ist ein mögliches Wachstum der pathogenen Erreger bereits stark gehemmt und wird durch die weitere Abnahme des a_w -Wertes weiter erschwert bzw. verhindert. Damit kann auch ein ansteigender pH-Wert die Zellen von *L. monocytogenes* nicht mehr in die Lage versetzen, sich zu vermehren.

Die Bakterien gehen in einen bakteriostatischen Zustand über und harren aus. Eine Zunahme der Keimzahl war im Produkt anschließend nicht mehr zu beobachten. Im Gegensatz zur langgereiften Rohwurst fiel auf, dass eine Reduktion der Keimzahl im Produkt um zwei Zehnerpotenzen nicht möglich war. Dies ist wahrscheinlich auf den wieder ansteigenden pH-Wert zurückzuführen. Denn mit jedem zusätzlichen Stress, mit dem sich die Mikroorganismen auseinandersetzen müssen, benötigt die Zelle mehr Energie zum Aufrechterhalten des inneren Gleichgewichts (Homöostase). Je schneller diese Stoffwechselenergie verbraucht ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Organismus abstirbt. Dies zeigt ganz deutlich, wie wichtig das Zusammenspiel der einzelnen konservierenden Faktoren ist. Ein Weglassen einer Hürde kann wie im Fall einer Rohwurstherstellung ohne Nitrit bedeuten, dass *L. monocytogenes* sich auch innerhalb des kurzen Zeitraumes von zwei Tagen vermehren kann. Wie in diesen Untersuchungen gezeigt, werden konnte, ist es sehr schwierig *L. monocytogenes* auf Keimzahlen unterhalb der

geforderten 100 KbE/g zu senken. Daher sollte sowohl auf die Auswahl bzw. Kontrolle des Rohmaterials als auch auf eine gute Betriebshygiene besondere Aufmerksamkeit gelegt werden. In fleischverarbeitenden Betrieben muss mit einer Kontamination des Rohmaterials mit *Listeria monocytogenes* gerechnet werden, welcher über desinfektionsmittelresistente Biofilme eingetragen wird (Lebert et al., 2007).

5.3. Nitritersatzstoffe auf pflanzlicher Basis

Neben der traditionellen Rohwurstherstellung werden unter ökologischen Gesichtspunkten hergestellte Rohwürste produziert, bei denen anstelle von Nitrat- oder Nitritpökelsalz Pflanzenextrakte eingesetzt werden. Über die inhibitorische Wirkung solcher Pflanzenextrakte auf Überleben und Wachstum pathogener Bakterien im Rohwurstprodukt existieren kaum wissenschaftliche Daten.

Grundlegende Kenntnisse über die Wirkung von Nitrit auf pathogene Lebensmittelinfektionserreger sind entscheidend, um sichere Rohwürste mit reduziertem Nitritgehalt bzw. mit Nitritersatzstoffen herstellen zu können. Rohwurstherzeugnisse stabilisieren sich ausschließlich über einen geeigneten Fermentationsprozess. Ablauf und Bedingungen dieses Prozesses sowie Zusatzstoffe und Qualität der Ausgangsmaterialien entscheiden dabei letztlich über die Sicherheit des Endproduktes. Bei Reduktion bzw. Ersatz von Nitrit müssen die Herstellungsparameter an die neuen Bedingungen angepasst werden, um die Sicherheit der Produkte nicht zu gefährden.

Mit zunehmender Tendenz werden von den Verbrauchern Produkte mit zugelassenen, chemischen Konservierungsstoffen wie Nitrit/Nitrat weniger akzeptiert als ökologisch hergestellte Erzeugnisse mit Zusätzen auf pflanzlicher Basis wie Gewürze oder Pflanzenextrakte. Gewürzextrakte bzw. -öle enthalten als antimikrobielle Komponente die verschiedensten ätherischen Öle. Obwohl diese unter *in Vitro* Bedingungen eine sehr gute Keim hemmende Wirkung zeigen (Bajpai et al., 2008; Friedly et al., 2009; Munoz et al., 2009), müssten die ätherischen Öle für eine effektive Wirkung dem Produkt in hohen und somit in sensorisch nicht akzeptablen Konzentrationen zugesetzt werden.

In der Praxis werden daher nitrathaltige Pflanzenextrakte bevorzugt. Die mikrobiologische Stabilität solcher Produkte kann derzeit nicht ausreichend bewertet werden, da entsprechende wissenschaftliche Studien fehlen und die bislang vorhandenen Daten nur erste Hinweise geben (Kabisch et al., 2009). Die rechtliche Situation der Verwendung solcher Extrakte ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Der Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie empfiehlt daher bei Einsatz alternativer Zutaten wie Gemüsepulvern eine korrekte Deklaration dieser Zutaten (BVDF, 2010).

Auf Grund der zurzeit kontrovers geführten Diskussion um nitrathaltige Pflanzensäfte als Nitritersatzstoffe, auch was die mikrobiologische Sicherheit betrifft, wurde das Verhalten von *Salmonella* spp., STEC/EHEC und *L. monocytogenes* in grober Mettwurst überprüft.

5.3.1 Konventionelle Starterkultur

In den Versuchsansätzen zeigte sich, dass der zugegebene Pflanzensaft keinen Einfluss auf den Verlauf des pH- und a_w -Wertes in der Rohwurst hatte. Vielmehr waren die Verläufe mit denen der Originalrezeptur vergleichbar (vgl. Abb. 206). Hinsichtlich der Nitrat- und Nitritkonzentrationen unterschieden sich die beiden Chargen jedoch deutlich. So nahm die Nitritkonzentration in den Würsten der Originalrezeptur zügig ab und lag am Tag 6 unter der Nachweisgrenze von 20 mg/kg. In den Rohwürsten mit dem Pflanzensaft konnte über den gesamten Zeitraum von 42 Tagen kein Nitrit nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass entweder die Nitratreduktase-Aktivität der eingesetzten Starterkultur nicht ausreichend war bzw. die Starterkultur nicht optimal für den Fermentationsprozess vom Hersteller ausgewählt wurde. Durch eine zu geringe Aktivität der Nitratreduktase wird das Nitrat nur sehr langsam zu Nitrit reduziert und es bilden sich nur geringe Mengen an Nitrit die dann wiederum sehr schnell mit Fleischbestandteilen weiterreagieren (Honikel, 2008; Wirth, 1991) und zur Umrötung führen oder auf chemischem Wege weiterreagieren (Honikel, 2008). Demzufolge wird vermutet, dass die Nitritkonzentration, die aus dem Nitrat des Pflanzensaftes gebildet wurde unterhalb der Nachweisgrenze (20 mg/kg) des verwendeten Testsystems lag. Um dies zu überprüfen, sollte in zukünftigen Challengetests ein enzymatisches Nachweissystem mit einer deutlich niedrigeren Grenze verwendet werden. Die Nitratkonzentration in den Würsten mit dem Pflanzensaft NATASY S507 nahm im Vergleich zur Nitritkonzentration nur sehr langsam ab und erreicht nach 42 Tagen Werte von 45 mg/kg. In anderen Arbeiten nahm die Nitratkonzentration über einen vergleichbaren Zeitraum schneller ab (Leistner, 1986; Wesierska et al., 2013). Jedoch soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die in der Literatur verwendeten Produkte sich zum Teil deutlich von dem in dieser Arbeit verwendeten regionalen Produkt unterschieden. So wurden z.T. andere Rohmaterialien, Reifetemperaturen, Luftgeschwindigkeiten und Starterkulturen verwendet. Diese Parameter haben jedoch eine wichtige Bedeutung für die Fermentation des Produktes, da sie die mikrobiologischen Vorgänge wie Wachstum und Aktivität der Starterkultur beeinflussen und daher zu einer unterschiedlich schnellen Abnahme der Nitratkonzentration beitragen können. Dies zeigt noch einmal, dass der gesamte Fermentationsprozess aufeinander abgestimmt werden muss und die Hersteller zu ihren Produkten die entsprechende Starterkultur austesten sollten.

In inokulierten Rohwürsten, die mit NATASY hergestellt wurden, konnte mit Ausnahme der STEC/EHEC Chargen, eine deutliche Vermehrung von *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* beobachtet werden. Der Anstieg der Keimzahl war mit dem der Kontrolle ohne Zusatzstoff vergleichbar (vgl. Abb. 210 und 213) und lässt den Schluss zu, dass der eingesetzte Nitritersatzstoff keine hemmende Wirkung auf die genannten Pathogenen hatte.

Die Keimzahl von *Salmonella* spp. nahm in den Ansätzen mit dem Pflanzensaft erst mit zunehmender Abtrocknung und der damit verbundenen a_w -Wertabsenkung ab (vgl. 5.1. und 5.2.). In den Würsten mit dem Zusatzstoff Natriumnitrit wurde keine Zunahme der *Salmonella*-Zahl beobachtet. Vielmehr sank die Keimzahl deutlich, so dass am Tag 42 nur noch ein qualitativer Nachweis mittels PCR möglich war (vgl. Abb. 210 und 211). In den mit Pflanzensaft hergestellten Produkten, die mit *L. monocytogenes* inokuliert wurden, blieb die Keimzahl nach der anfänglichen Vermehrung konstant und nahm bis zum Tag 42 nur minimal ab. Diese Beobachtung ist auf die bessere Anpassung der Gram-positiven Mikroorganismen an niedrigere Wasseraktivitätswerte zurückzuführen (Gutierrez et al., 1995; Notermans und van Hoeij de Boer, 2008; Sleator et al., 2003). So sind diese auf Grund des unterschiedlichen Aufbaus der Zellwand und Zellmembran im Vergleich zu den Gram-negativen Mikroorganismen in der Lage einem höheren Turgordruck standzuhalten (vgl. 5.1. und 5.2.) und durch die kontinuierliche Produktion von osmoprotektiven Substanzen bzw. durch die Aufnahme dieser aus dem umgebenden Milieu sich einem ändernden a_w -Wert anzupassen (Verheul et al., 1997; Bergholz et al., 2010).

In den Chargen, die mit STEC/EHEC kontaminiert wurden, konnte in allen Ansätzen ein ähnliches Verhalten beobachtet werden. Eine Zunahme der Keimzahl war weder in der Kontrolle ohne Zusatzstoff noch in den Ansätzen mit NATASY und Natriumnitrit zu beobachten (vgl. Abb. 212). Die Zahl der shigatoxinbildenden *Escherichia coli* sank im Laufe der Fermentation und Lagerung bis zum Tag 42 unter die mikrobiologische Nachweisgrenze von 10 KbE/g. Im Vergleich zu den Untersuchungen die mit *Salmonella* spp. durchgeführt wurden, zeigten die STEC/EHEC Bakterien hier ein grundsätzlich anderes Verhalten (vgl. Abb. 210 und 212). Dieser Unterschied ist erstaunlich, weil beide Bakteriengattungen relativ nahe miteinander verwandt sind und Nitrat bzw. Nitrit verstoffwechseln können (Contreras et al., 1997; Reinhart et al., 2008). Nitrat und auch Nitrit kann in Abwesenheit von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette fungieren und somit an der Energiegewinnung beteiligt sein (Cole, 1996). Das kann unter diesen Bedingungen ein Vorteil sein. Allerdings gibt es keine Arbeiten, die die Expression der beteiligten Gene unter verschiedenen, für die Rohwurstherstellung relevanten Parametern analysieren. Unterschiede in der Expression der Systeme zwischen *Salmonella* spp. und *E. coli* könnten

Kenntnisse über die möglicherweise unterschiedlichen bakteriellen Verteidigungssysteme gegen Nitrat bzw. Nitrit unter praxisrelevanten Parametern (z.B. verschiedene pH-Werte, a_w -Werte, Sauerstoffverfügbarkeit) und somit für das unterschiedliche Verhalten der Keime in den Versuchen liefern.

5.3.2 Optimierte Starterkultur

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in einer mit einem pflanzlichen Nitritersatzstoff (NATASY S507) hergestellten Mettwurst eine Vermehrung pathogener Keime nicht ausgeschlossen werden kann. Vor allem in den Chargen, die mit den Gram-positiven Vertretern *L. monocytogenes* beimpft wurden, ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Abnahme der Keimzahl im Produkt beobachten (vgl. 4.3.1).

Um ein hinsichtlich der Listerienproblematik (siehe 5.3.1) sicheres Produkt herzustellen, wurde statt der handelsüblichen Starterkultur (SM 181) eine stark ansäuernde Starterkultur (Tradi 302 Bactoferm) mit einer antilisteriellen Schutzkultur (B-LC-20 Safe Pro) kombiniert.

Analog zu den vorangegangenen Versuchen mit einem nitrathaltigen Pflanzensaft nahm der Wasseraktivitätswert bis zum Verpacken (Tag 14) auf Werte zwischen 0,87 und 0,85 ab (vgl. Abb. 206 und 214). Nach der Verpackung in Schutzgas blieb der a_w -Wert bedingt durch den behinderten Wasseraustausch bis zum Tag 42 nahezu unverändert. Ein Einfluss des Pflanzensaftes bzw. der unterschiedlichen Starterkulturen auf die Abnahme war nicht festzustellen.

Im Gegensatz zur a_w -Wert-Abnahme konnten jedoch beim pH-Wert Unterschiede zwischen den Chargen festgestellt werden. So sank der pH-Wert in den Würsten mit der Standardstarterkultur SM 181 bis zum Tag 6 auf Werte zwischen 5,25 und 5,3 (vgl. Abb. 215). Die pH-Werte in den Produkten mit den Starterkulturen Tradi 302/B-LC-20 fielen auf Werte zwischen 5,08 und 5,18 am Tag 6. Diese Beobachtung wird auch durch die gleichzeitige Erfassung der aerobe mesophilen Keimzahl und der Milchsäurebakterienzahl bestätigt (vgl. Abb. 217 und Anhang Abb. 218). So stieg die Zahl der Laktobazillen in den Produkten mit der Starterkultur Tradi 302/B-LC-20 auf 8,5 \log_{10} KbE/g am Tag 1. Im Vergleich dazu nahm die Keimzahl in den Produkten mit der Starterkultur SM 181 auf Werte zwischen 7,6 – 7,9 \log_{10} KbE/g am Tag 1 zu. Durch die schnellere Ansäuerung infolge einer ausgewählten Starterkultur konnte in den Arbeiten von Holck et al. 2011 und Kröckel et al. (2011) eine schnellere mikrobiologische Stabilisierung des Produktes erreicht werden. Wie unter 4.2. bereits beschrieben sind die ersten drei Tage der Reifung die entscheidenden. Gerade wenn auf den Zusatz von Pökelsalz verzichtet wird, ist es notwendig dafür zu

sorgen, dass die lebensmittelmikrobiologischen Hürden wie pH- und a_w -Wert so schnell wie möglich zum Tragen kommen, um eine Vermehrung von pathogenen Keimen zu verhindern.

Dies konnte in den anschließenden Beimpfungsversuchen mit *Listeria monocytogenes* beobachtet werden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen mit einer konventionellen Starterkultur und einem nitrathaltigen Pflanzensaft, stieg die Keimzahl der Listerien in den ersten drei Reifetagen nur leicht von $2,2 \log_{10}$ KbE/g auf $2,53 \log_{10}$ KbE/g (vgl. Abb. 219). Dagegen konnte in den Chargen mit der herkömmlichen Starterkultur SM 181 ein Anstieg von $2,26 \log_{10}$ KbE/g auf $3 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen werden.

Durch den schnelleren Abfall des pH-Wertes infolge der zügigen Vermehrung der Starterkultur Tradi 302 B-LC-20 vermehrten sich die inokulierten Listerien deutlich langsamer in den nitritfreien Würsten als in den vergleichbaren mit der Starterkultur SM 181.

Um zu überleben, müssen die Listerien eine Anpassung des Stoffwechsels an den abfallenden pH-Wert vornehmen. Dazu wird unter anderem Energie in Form von ATP bzw. ATP-Äquivalenten benötigt um Protonen aus dem Cytoplasma zu entfernen (Bowman et al., 2012). Das Herauspumpen der Protonen wird von einem Glutamat-Decarboxylase-System übernommen (Cotter, 2001a/b). Hierbei wird Glutamat unter Aufnahme eines Protons in γ -Aminobutyrat umgewandelt und mittels eines Antiporter-Systems gegen ein Molekül Glutamat nach außen geschleust. Das aufgenommene Glutamat kann dann erneut mit einem Proton reagieren (Cotter, 2001a/b; Cotter et al., 2005). Durch die Anpassung des Stoffwechsels an die sich ändernden Umweltbedingungen kommt es dann zu einer Verlangsamung bzw. zu einem Stopp der Vermehrung. So berichten Bowman et al. (2012), dass bei Zellen von *L. monocytogenes* Scott A bei einer kontinuierlichen Ansäuerung des Mediums eine Verlängerung der Wachstumsrate um 55 % bis 98 % zu beobachten war. Bowman et al., 2012 konnte mittels Proteomanalysen zeigen, dass sich in den Zellen ein Shift der Proteine hin zu denen vollzog die an der Aufrechterhaltung der pH-Homöostase und weg von denen die an der Zellwandbildung bzw. an der Biomasseproduktion beteiligt waren.

Demzufolge könnte das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Listerien in den Produkten mit den verschiedenen Starterkulturen auf eine Anpassung auf den stark abnehmenden pH-Wert zurückzuführen sein. Da der pH-Wert in den Würsten mit Tradi-B-LC 20 deutlich schneller sank (vgl. Abb. 215) wurde in diesen Produkten zuerst ein Vermehrungstopp beobachtet. Neben der schnelleren pH-Wert-Abnahme die zu einem Wachstumstopp führte wird auch vermutet, dass unter den genannten Bedingungen der chemische Zerfall (Säure-Disproportionierung) von Nitrit zur nitrosen Säure und später weiter zu NO-Radikalen (Cammack et al., 1999; Honikel, 2008) zügiger ablief. Wie bereits beschrieben (vgl. 5.1.) nimmt mit zunehmender pH-Wert-Abnahme der chemische Abbau von Nitrit zu. Unter diesen

Bedingungen entstehen unter anderem NO-Radikale (siehe Abb. 5 und 6), die das Wachstum bzw. den Stoffwechsel von Bakterien stören (vgl. 2.3.1.4 und 5.1.). Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die Abnahme der Nitritkonzentration in den Würsten, so fällt auf, dass diese in den Produkten mit der Starterkultur Tradi-B-LC 20 deutlich schneller sinkt als in denen mit der Kultur SM 181. Somit führte sowohl der schnelle pH-Wertabfall als auch der chemische Zerfall des Nitrits, entweder direkt als Pökelsalz zugesetzt oder entstanden aus dem Nitrat des Pflanzensaftes, zu einem schnellen Vermehrungsstopp der Listerien. Dass die Vermehrung von *L. monocytogenes* durch ein angesäuertes Medium in Kombination mit Nitrit gestoppt wird, konnte bereits durch molekularbiologische Daten von Kaspar et al., (unveröffentlicht) gezeigt werden. Gene, die an der Zellwandbildung und der Zellteilung beteiligt sind, wurden unter diesen Bedingungen runterreguliert. Dies konnte auch in der Arbeit von Vail et al. (2012) beobachtet werden. Unter angesäuerten Milieubedingungen wurden an Stelle von Zellen, die sich normal teilen, filamentartige „Superzellen“ (Vail et al., 2012) festgestellt.

5.3.3 Verwendung eines alternativen Reifeprogramms für die Herstellung einer langgereiften schnittfesten Salami

In der vorangegangenen Untersuchung (vgl. 4.3.2 und 5.3.2) konnte gezeigt werden, dass auch eine stark absäuernde Starterkultur die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* in einem Nitritpökelsalz-freien Rohwurstprodukt nicht ganz verhindern konnte. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse konnte in den ersten drei Reifetagen eine Vermehrung nicht ausgeschlossen werden.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es daher, das Verhalten bzw. die Absterbekinetiken von *L. monocytogenes* in einem schnittfesten Rohwurstprodukt (Typ Salami), das ohne Nitritzusatz unter optimierten Reifetemperaturen hergestellt wurde, zu überprüfen. Als Ersatz diente erneut ein kommerziell erhältlicher Pflanzenextrakt (NATASY S507). In den Challengeuntersuchungen wurde ein herkömmliches Reifeprogramm (A) mit einer Anfangstemperatur von 24 °C mit einem alternativ entwickelten Reifeverfahren (B) mit einer Starttemperatur von 20 °C verglichen.

Im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen mit einer Mettwurst, die nach 14 Tagen verpackt wurde, nahm der Wasseraktivitätswert durch die fehlende Schutzgasverpackung kontinuierlich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes ab. Ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Zusatzstoffen war wie bei den vorangegangenen Untersuchungen nicht zu erkennen (vgl. Abb. 206, 214 und 220). Jedoch konnten leichte Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Reifeprogrammen A und B festgestellt werden. So nahm die Wasseraktivität in den Würsten des Reifeprogramm B (alternatives

Reifeverfahren) etwas stärker ab als der a_w -Wert in den Produkten des Standardreifeprogrammes A. Beide Reifeprogramme unterschieden sich zunächst in der Wahl der Anfangsreifetemperaturen (24 °C und 20 °C) und ab Tag 4 auch in der relativen Luftfeuchtigkeit. Durch die etwas niedrigere Luftfeuchte von 85 % und später 83 % im alternativen Reifeprogramm (B) gaben die Rohwürste mehr Wasser nach außen ab und sorgten für eine stärkere Abnahme des a_w -Wertes im Vergleich zum Programm A. Im Programm A lag die relative Luftfeuchte ab Tag 4 bei 88 % und später bei 85 %. Durch diesen Unterschied in der Luftfeuchte konnten am Tag 42 in den beiden Reifeprogrammen a_w -Werte zwischen 0,858 und 0,864 (Programm A) und zwischen 0,843 und 0,848 (Programm B) gemessen werden. Ein Zusammenhang zwischen der gewählten Luftfeuchte und dem resultierenden a_w -Wert wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Rödel und Klettner, 1981; Stiebing und Rödel, 1985).

Im Vergleich zum Wasseraktivitätswert nahm der pH-Wert in den Produkten des Reifeprogrammes A tendenziell etwas schneller und stärker ab und erreichte am Tag 3 Werte zwischen 5,04 und 5,09 (siehe Abb. 221). Im Reifeverfahren B dagegen wurden am Tag 3 pH-Werte zwischen 5,15 und 5,19 gemessen. Diese Beobachtung ist auf die unterschiedlichen Anfangsreifetemperaturen von 24 °C im Programm A und 20 °C im Verfahren B zurückzuführen. Durch die etwas niedrigeren Anfangstemperaturen vermehrten sich die eingesetzten Milchsäurebakterien nicht ganz so schnell wie im Programm A (siehe Anhang Abb. 224). Infolge dessen wird auch im Vergleich zum Verfahren A die Bildung der Milchsäure etwas verzögert gewesen sein, was zu einer etwas langsameren Abnahme des pH-Wertes führte. Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des pH-Wertes und unterschiedlichen Reifetemperaturen ist hinlänglich bekannt und wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Gareis et al., 2010; Klettner und Rödel, 1979; Stiebing und Rödel, 1985).

Über die Abhängigkeit der Nitritkonzentration vom pH-Wert wurde bereits ausführlich berichtet (vgl. 2.3.1.4., 5.1. und 5.2.). Demzufolge nahm in den Produkten mit Nitritpökelsalz die Nitritkonzentration am schnellsten ab in denen die Ansäuerung am stärksten war (vgl. Abb. 221 und 222). Im Vergleich zu den mit Nitrit gepökelten Erzeugnissen nahm die Nitratkonzentration in den mit NASTASY hergestellten Würsten gleichmäßig ab und ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Reifeprogrammen war nicht festzustellen (vgl. Abb. 222).

Im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen (vgl. 4.3.1. und 4.3.2.) wurde in den nitritfreien Produkten im Reifeprogramm B (Anfangsreifetemperatur 20 °C) nur eine minimale Zunahme der Listerienzahl festgestellt (vgl. Abb. 225). Im direkten Vergleich zum

Reifeprogramm A (Anfangstemperatur 24 °C), bei dem eine Vermehrung um mehr als eine halbe Zehnerpotenz beobachtet wurde, stellte dies eine deutliche Verbesserung dar. Durch die Absenkung der Anfangstemperaturen verlängerte sich die Generationszeit von *Listeria monocytogenes* und gleichzeitig nahm die Vermehrungsgeschwindigkeit ab. Dass die Absenkung der Temperatur zu einer längeren Generationszeit führte, konnte auch von anderen Autoren für *L. monocytogenes* beschrieben werden (Zhang et al., 2012; Robinson et al., 1998). Parallel zu diesem Effekt wirkte sich die Auswahl der Starterkultur Tradi-B-LC 20 positiv aus. Obwohl diese im Vergleich zu den Untersuchungen bei 24 °C minimal langsamer wuchs und die pH-Wert Abnahme nicht ganz so stark war, war diese unter den genannten Bedingungen deutlich besser geeignet als die bereits getestete Kultur SM 181. Durch die Kombination von schnell absinkendem pH-Wert und niedrigen Anfangsreifetemperaturen konnte das Produkt bereits nach einem Tag mikrobiologisch stabilisiert werden.

Eine höhere Reifetemperatur würde zwar bedeuten, dass die Umrötung des Produktes durch die höhere Nitratreduktaseaktivität der Staphylokokken schneller von statten geht, jedoch ist dies gerade bei langgereiften Produkten nicht notwendig. Diese Produkte reifen üblicherweise mindestens 14 Tage und gehen erst anschließend in den Verkauf. Die Umrötung ist auch bei Würsten, die bei 20 °C gereift werden, nach 48 Stunden abgeschlossen. Ein erhöhtes mikrobiologisches Risiko, welches in nitritfreien Produkten durch die Reifung bei Temperaturen von 24 °C besteht, ist somit gar nicht notwendig. In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Prinzip des „indirect-curing“ (Sebrank und Bacus, 2007; Terns et al., 2011) durch nitrathaltige Pflanzensäfte funktioniert. Es konnten sensorisch akzeptable Produkte erzeugt werden, die zwar kein ausgeprägtes Pökelaroma hatten, jedoch gut umgerötet waren. Allerdings wurde festgestellt, dass unter den überprüften Bedingungen nur sehr wenig Nitrit aus dem Nitrat-Reservoir des Pflanzensaftes mikrobiell erzeugt wurde. Ein direkter Nachweis des Nitrits mit dem verwendeten Testsystem war nicht möglich. Die vermutlich nur sehr geringe Menge des freien Nitrits führte dann auch dazu, dass die Produkte in den ersten Reifetagen mikrobiologisch sehr instabil waren (vgl. 4.3.1. und 4.3.2.) und eine Vermehrung der pathogenen Keime zuließen. Vor allem jedoch sind genau diese ersten drei Reifetage die entscheidenden bei der Rohwurstreifung (Kabisch et al., 2008b), da hier weder der pH-Wert noch der absinkende a_w -Wert zu einer Stabilisierung des Produktes beitragen. Im Lauf der Untersuchungen mit den nitritfreien Produkten wurde durch die Wahl einer schnellabsäuernden Starterkultur und Anfangsreifetemperaturen von 20 °C ein verbessertes Ergebnis erzielt. Um eine Vermehrung der pathogenen Keime in solchen Rohwürsten ganz zu verhindern, sollten weitere Untersuchungen folgen.

Somit konnte in den Untersuchungen gezeigt werden, dass durch die Auswahl einer schnellabsäuernden Starterkultur und durch die Anpassung des Reifeverfahrens, insbesondere durch die Wahl einer niedrigeren Anfangstemperatur, ein nitritfreies Rohwurstprodukt mikrobiologisch stabilisiert werden konnte (vgl. 4.3.2. und 4.3.3.).

6 Literaturverzeichnis

- Abram,F., Starr,E., Karatzas,K.A.G., Matlawska-Wasowska,K., Boyd,A., Wiedmann,M., Boor,K.J., Connally,D.und O'Byrne,C.P. (2008) Identification of components of the Sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6848-6858.
- Agafonov,D.E., Kolb,V.A. und Spirin,A.S. (2001) Ribosome-associated protein that inhibits translation at the aminoacyl-tRNA binding stage. *EMBO Research* **2**, 399-402.
- Agafonov,D.E. und Spirin,A.S. (2004) The ribosome-associated inhibitor A reduces translation errors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**, 354-358.
- Agrarmarkt Informations-Gesellschaft (AMI) (2012) Fleischwarenkonsum. <http://www.ami-informiert.de/ami-maerkte>
- Ahamad,N. und Marth,E.H. (1989) Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35-Degrees-C in Tryptose Broth acidified with acetic, citric, or lactic-acid. *Journal of Food Protection* **52**, 688-698.
- Albert,T., Gareis,M. und Kröckel,L. (2003) Microbiological quality of organically produced meat products. *Fleischwirtschaft* **83**, 147-150.
- Albihn,A., Eriksson,E., Wallen,C. und Aspan,A. (2003) Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7 a nationwide Swedish survey of bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica* **44**, 43-52.
- Aldick,T., Bielaszewska,M., Zhang,W., Brockmeyer,J., Schmidt,H., Friedrich,A.W., Kim,K.S., Schmidt,M.A. und Karch,H. (2007) Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes and Infection* **9**, 282-290.
- Alexander,E.R., Boase,J., Davis,M., Kirchner,L., Osaki,C., Tanino,T., Samadpour,M., Tarr,P., Goldoft,M., Lankford,S., Kobayashi,J., Stehr-Green,P., Bradley,P., Hinton,B., Tighe,P., Pearson,B., Flores,G.R., Abbott,S., Bryant,R., Werner,S.B. und Vugia,D.J. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami - Washington and California, 1994. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **44** (9), 157-160.
- Al-Ghazali,M.R. und Alazawi,S.K. (1990) *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage-sludge cake. *Journal of Applied Bacteriology* **69**, 642-647.
- Alvarez-Ordóñez,A., Fernández,A., Bernardo,A. und López,M. (2010a) Acid adaptation sensitizes *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to osmotic and oxidative stresses. *Archiv für Lebensmittelhygiene* **61**, 148-152.
- Alvarez-Ordóñez,A., Fernández,A., Bernardo,A. und López,M. (2010b) Acid tolerance in *Salmonella* Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology* **27**, 44-49.
- Ambrosiadis,A. und Klettner,P. (1981) Effect on Brühwurst of processing in the cutter. *Fleischwirtschaft* **61**, 1621-1703.
- Ammendolia,M.G., Superti,F., Bertuccini,L., Chiarini,F., Conte,M.P., Cipriani,D., Seganti,L. und Longhi,C. (2007) Invasive pathway of *Listeria ivanovii* in human amnion-derived wish cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **20**, 509-518.

- Ammon,A., Petersen,L.R. und Karch,H. (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. *Journal of Infectious Diseases* **179**, 1274-1277.
- Amreeta,D. und Fatt,Q. (2009) Non-typhoidal *Salmonella* bacteraemia: epidemiology, clinical characteristics and its' association with severe immunosuppression. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **8**, doi:10.1186/1476-0711-8-15.
- Anaraki,S., Giraudon,I. und Cathcart,S. (2005) Large outbreak of *Salmonella* Enteritidis in north east London. *Eurosurveillance* **10**, 2664.
- Antal,E.A., Hogasen,H.R., Sandvik,L. und Maehlen,J. (2007) Listeriosis in Norway 1977-2003. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **39**, 398-404.
- Arends,S., Kustusch,R.J. und Weiss,D.S. (2009) ATP-Binding site lesions in FtsE impair cell division. *Journal of Bacteriology* **191**, 3772-3784.
- Arneth,W. (2001) Chemistry of curing meat flavour. *Fleischwirtschaft* **81**, 85-87.
- Ashkenazi,S., Cleary,T.G., Murray,B.E., Wanger,A. und Pickering,L.K. (1988) Quantitative-Analysis and Partial Characterization of cyto-toxin production by *Salmonella* Strains. *Infection and Immunity* **56**, 3089-3094.
- Asplund,K. und Nurmi,E. (1991) The growth of *salmonellae* in tomatoes. *International Journal of Food Microbiology* **13**, 177-181.
- Baker,R.C., Qureshi,R.A. und Hotchkiss,J.H. (1986) Effect of an elevated Level of Carbon-Dioxide containing atmosphere on the growth of spoilage and pathogenic bacteria at 2-C, 7-C, and 13-C. *Poultry Science* **65**, 729-737.
- Bakkali,F., Averbeck,S., Averbeck,D. und Waomar,M. (2008) Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446-475.
- Bacciu,D., Falchi,G., Spazziani,A., Bossi,L., Marogna,G., Leori,G.S., Rubino,S. und Uzzau,S. (2004) Transposition of the heat-stable toxin *astA* gene into a Gifsy-2-related prophage of *Salmonella enterica* serovar Abortusovis. *Journal of Bacteriology* **186**, 4568-4574.
- Baez,A., Flores,N., Bolivar,F. und Ramirez,O.T. (2009) Metabolic and Transcriptional Response of Recombinant *Escherichia coli* to Elevated Dissolved Carbon Dioxide Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* **104**, 102-110.
- Bajpai,V., Rahman,A., Dung,N., Huh,M. und Kang,S. (2008) In Vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Journal of Food Science* **73**, 314-320.
- Balaban,N. und Rasooly,A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* **61**, 1-10.
- Balakireva, L. M., Kantere, V. M. und Rabotnova, J. L. (1974) The redox potential in microbiological media. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* **4**, 769-780.
- Baljer,G. und Wieler,L.H. (1999) Tiere als Infektionsquelle für den Menschen – durch EHEC hervorgerufene Erkrankungen. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **106**, 339-343.

- Bang, I.S., Lee, I.S., Lee, Y.N. und Park, Y.K. (1995) Identification of the genes involved in stationary-phase specific acid resistance of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Microbiology* **33**, 21-27.
- Bang, I.S., Liu, L.M., Vazquez-Torres, A., Crouch, M.L., Stamler, J.S. und Fang, F.C. (2006) Maintenance of nitric oxide and redox homeostasis by the *Salmonella* flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 28039-28047.
- Barbosa, W.B., Cabedo, L., Wederquist, H.J., Sofos, J.N. und Schmidt, G.R. (1994) Growth Variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. *Journal of Food Protection* **57**, 765-769.
- Barlow, R. und Mellor, G. (2010) Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes in Australian beef cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* **7**, 1239-1245.
- Barnes, D., Fitzgerald, P.A., McFarland, R., Swan, H. und Schulz, T. (1985) Redox Potential - Basis of measurement and application. *Effluent & Water Treatment Journal* **25**, 232-236.
- Batterson, M. und Boddie, W.W. (1972) Salt, the mysterious necessity. 1st Ed., Midland: Dow Chemical Co.
- Baysinger, G. (2012) Thermochemistry, electrochemistry, and kinetics. In *Handbook of Chemistry & Physics* ed. Haynes, W.M. pp. 5-1-5-205. Boca Raton: CRC Press.
- Bearson, B.L., Wilson, L. und Foster, J.W. (1998) A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* Typhimurium against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology* **180**, 2409-2417.
- Bereksi, N., Gavini, F., Benezech, T. und Faille, C. (2002) Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 556-565.
- Bergholz, T.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Boor, K.J. und Wiedmann, M. (2010) Salt stress Phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne Pathogens and Disease* **7**, 1537-1549.
- Bertin, Y., Boukhors, K., Livrelli, V. und Martin, C. (2004) Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 61-68.
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C. und Meile, L. (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 526-532.
- Beutin, L., Zimmermann, S. und Gleier, K. (1998) Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* other than Serogroup O157 in Germany. *Emerging Infectious Diseases Journal*. **4**, 635-639.
- BfR (2013) Erreger von Zoonosen in Deutschland 2011. 1-285.
- BGVV (2000). Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland für 1999. *BgVV-Heft 8*.
- Bielaszewska, M., Stoewe, F., Fruth, A., Zhang, W.L., Prager, R., Brockmeyer, J., Mellmann, A., Karch, H. und Friedrich, A.W. (2009) Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 2061-2066.

Binkerd,E.F. und Kolari,O.E. (1975) History and use of nitrate and nitrite in curing of meat. *Food and Cosmetics Toxicology* **13**, 655-661.

Birzele,B., Djordjevic,S. und Kramer,J. (2005) A study of the role of different nitrite concentrations on human pathogenic bacteria in fresh spreadable ham and onion sausage. *Food Control* **16**, 695-699.

Bjorne,H., Petersson,J., Phillipson,M., Weltzberg,E., Holm,L. und Lundberg,J.O. (2004) Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 106-114.

Blasi,R.S., Freitas de Macedo,R.E., Scaranello Malaquias,M.A. und Franchin,P.R. (2011) Prevalence, strain identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered pig carcasses in Brazil. *Food Control* **22**, 702-707.

BMEL (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft) (2014) Verkaufserlöse der Landwirtschaft nach Erzeugnissen. Bonn. Online unter: <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-3130200-0000.pdf>.

Bohaychuk,V.M., Gensler,G.E. und Barrios,P.R. (2011) Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne* **52**, 1095-1100.

Böhler, G. (2007) Erfolgsfaktoren der Rohwurstherstellung. *Lebensmittel Industrie* **1/2**, 6-7.

Bolton,D.J., Byrne,C.M., Sheridan,J.J., McDowell,D.A. und Blair,I.S. (1999) The survival characteristics of a non-toxicogenic strain of *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 407-411.

Bolton,D.J., Monaghan,A., Byrne,B., Fanning,S., Sweeney,T., McDowell,D.A. (2011) Incidence and survival of non-O157 verocytotoxigenic *Escherichia coli* in soil. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 484-490.

BÖLW – Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft (2011) Zahlen, Daten und Fakten: Die Biowirtschaft 2011, http://www.boelw.de/uploads/media/pdf/Dokumentation/Zahlen__Daten__Fakten/ZDF2011.pdf

BÖLW – Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft (2013) Zahlen, Daten und Fakten: Die Bio-Branche 2013, http://www.boelw.de/uploads/media/pdf/Dokumentation/Zahlen__Daten__Fakten/ZDF_2013_Endversion_01.pdf

BÖLW – Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft (2014) Zahlen, Daten und Fakten: Die Bio-Branche 2014, http://www.biohandel-online.de/wp-content/uploads/2014/02/BOELW_Zahlen_Daten_Fakten_14_Web.pdf

Borezee,E., Pellegrini,E. und Berche,P. (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infection and Immunity* **68**, 7069-7077.

Böttger,E.C. und Kayser,F.H. (2010) Bakterien als Krankheitserreger - *Salmonella* In.: Medizinische Mikrobiologie. edd Kayser,F.H.; Böttger, E.C.; Zinkernagel,R.M.; Haller,O.; Eckert,J. und Deplazes,P., pp. 296-299 Stuttgart, Thieme Verlag.

Bourret,T.J., Porwollik,S., McClelland,M., Zhao,R., Greco,T., Ischiropoulos,H. und Vazquez-Torres,A. (2008) Nitric oxide antagonizes the acid tolerance response that protects *Salmonella* against innate gastric defenses. *Plos One* **3**, DOI: 10.1371/journal.pone.0001833.

- Bowman,A.S., Glendening,C., Wittum,T.E., LeJeune,J.T., Stich,R.W. und Funk,J.A. (2007) Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms. *Journal of Food Protection* **70**, 11-16.
- Bowman,J.P., Hages,E., Nilsson,R.E., Kocharunchitt,C. und Ross,T. (2012) Investigation of the *Listeria monocytogenes* Scott A acid tolerance response and associated physiological and phenotypic features via whole proteome analysis. *Journal of Proteom Research* **11**, 2409-2426.
- Bremer,V., Leitmeyer,K., Jensen,E., Metzler,U., Meczulat,H., Weise,E., Werber,D., Tschaepe,H., Kreienbrock,L., Glaser,S. und Ammon,A. (2004) Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiology and Infection* **132**, 881-887.
- Brenner,F.W., Villar,R.G., Angulo,F.J., Tauxe,R. und Swaminathan,B. (2000) *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2465-2467.
- Briones,V., Tellez,S., Goyache,J., Ballesteros,C., Lanzarot,M.D., Dominguez,L. und Fernandez-Garayzabal,J.F. (2004) *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. *Environmental Microbiology* **6**, 868-871.
- Bruningfann,C.S. und Kaneene,J.B. (1993) The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Veterinary and Human Toxicology* **35**, 237-253.
- Bruno,V.M., Hannemann,S., Lara-Tejero,M., Flavell,R.A., Kleinstein,S.H. und Galan,J.E. (2009) *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *Plos Pathogens* **5**, doi:10.1371/journal.ppat.1000538.
- Buchanan,R.L., Golden,M.H. und Whiting,R.C. (1993) Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic-acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection* **56**, 474-478,484.
- Buchanan,R.L. und Bagi,L.K. (1997) Effect of water activity and humectant identity on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* **14**, 413-123.
- Buchman,G.W. und Hansen,J.N. (1987) Modification of membrane sulfhydryl groups in bacteriostatic action of nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 79-82.
- Buckenhueskes,H.J. (1991) Starterkulturen für die Rohwurstproduktion – eine Standortbestimmung. *Fleisch* **45**, 163-167.
- Buckenhueskes,H.J. und Gehring,U. (2000) Present-day aspects of fresh Mettwurst manufacture. *Fleischwirtschaft* **80**, 123-128.
- Bülte,M., Montenegro,M.A., Helmuth,R., Trumpf,T. und Reuter,G. (1990) Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **103**, 380-384.
- Bülte M. und Goll M. (2006): Pathogene Mikroorganismen. *Escherichia coli* und Shigellen. edd.1 Hamburg: Behr's Verlag.
- Bürk,C., Dietrich, R., Acar,G., Moravek,M. und Bülte,M. (2003) Identification and Characterization of a new variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2106-2112.
- Butler,A.R., Glidewell,C., Hyde,A.R. und Walton,J.C. (1985) Nitrosylation of 2Fe-2S and 4Fe-4S models for iron sulfur redox proteins. *Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry* **106**, 7-8.

BVDF (2010) Nitrat aus Gemüse deklarieren - BVDF-Position zum Einsatz alternativer Zutaten. www.bvdf.de

BVDF (2011) Umsatzanteile der Branchen der Ernährungsindustrie 2011. www.bvdf.de

Cabellos,C., Viladrich,P.F., Ariza,J., Maiques,J.M., Verdaguer,R. und Gudiol,F. (2008) Community-acquired bacterial meningitis in cirrhotic patients. *Clinical Microbiology and Infection* **14**, 35-40.

Cain,D.B. und McCann,V.L. (1986) An unusual case of cutaneous Listeriosis. *Journal of Clinical Microbiology* **23**, 976-977.

Cammack,R., Joannou,C.L., Cui,X.Y., Martinez,C.T., Maraj,S.R. und Hughes,M.N. (1999) Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1411**, 475-488.

Campanini,M. (1978) Effect of water activity on the growth and survival of *Salmonellae* and *Staphylococci*. *Industria Conserve* **53**, 270-276.

Camps,N., Dominguez,A., Company,M., Perez,M., Pardos,J., Llobet,T., Usera,M.A. und Salleras,L. (2005) A foodborne outbreak of *Salmonella* infection due to overproduction of egg-containing foods for a festival. *Epidemiology and Infection* **133**, 817-822.

Carpenter,C.E., Reddy,D.S.A. und Cornforth,D.P. (1987) Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium-nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 549-552.

Casaburi,A., Blaiotta,G., Maurilleo,G., Pepe,I. und Villani,F. (2005) Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Science* **71**, 643-650.

Casey,P. und Condon,S. (2000) Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of *Escherichia coli* O157. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 255-258.

Castanie-Cornet,M.P., Penfound,T.A., Smith,D., Elliott,J.F. und Foster,J.W. (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **181**, 3525-3535.

(Centers of Disease Control And Prevention (1983) International notes outbreak of hemorrhagic colitis - Ottawa, Canada. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **32**, 133-134.

Centers for Disease Control and Prevention (2011) Summary of Notifiable Diseases - UnitedStates, 2011. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **58** (53), 1-100.

Centers for Disease Control and Prevention (2011) Enteric (Intestinal) diseases. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **60** (4), 4-7.

Cebula, T. A., Payne, W. L. und Feng, P. (1995) Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 248-250.

Cergole-Novella,M.V., Nishimura,L.S. und Irino,K. (2006) Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiological Letters* **259**, 234-239.

Chakravorty,D. und Hensel,M. (2003) Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection* **5**, 621-627.

- Chapman,P.A., Siddons,C.A., Malo,A.T.C. und Harkin,M.A. (1997) A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection* **119**, 245-250.
- Chiu,C.H., Tang,P., Chu,C.S., Hu,S.N., Bao,Q.Y., Yu,J., Chou,Y.Y., Wang,H.S. und Lee,Y.S. (2005) The genome sequence of *Salmonella* enterica serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Research* **33**, 1690-1698.
- Chorianopoulos,N., Giaouris,E., Skandamis,P., Haroutounian,S. und Nychas,G. (2008) Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 1586-1596.
- Choudhury,S.A., Berthaud,V. und Weitkamp,J.H. (2006) Meningitis caused by *Salmonella* Panama in infants. *Journal of the National Medical Association* **98**, 219-222.
- Chung,H.J., Bang,W. und Drake,M.A. (2006) Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5**, 52-64.
- Chung,K.C. und Goepfert,J.M. (1970) Growth of *Salmonella* at low pH. *Journal of Food Science* **35**, 326-328.
- Cole,J. (1996) Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: Redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? *FEMS Microbiology Letters* **1**, 1-11.
- Coldewey,S.M., Hartmann,M., Schmidt,D.S., Engelking,U., Ukena,S.N. und Gunzer,F. (2007) Impact of the rpoS genotype for acid resistance patterns of pathogenic and probiotic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* **7**, doi:10.1186/1471-2180-7-21.
- Collazo,C.M. und Galan,J.E. (1997) The invasion-associated type III system of *Salmonella* Typhimurium directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Molecular Microbiology* **24**, 747-756.
- Collazo,C.M., Zierler,M.K. und Galan,J.E. (1995) Functional-Analysis of the *Salmonella* Typhimurium invasion genes *InvI* and *InvJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *Inv* locus. *Molecular Microbiology* **15**, 25-38.
- Conner,D.E., Scott,V.N. und Bernard,D.T. (1990) Growth, inhibition, and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *Journal of Food Protection* **53**, 652-655.
- Conte,M.P., Fabozzi,G., Longhi,C., Orsi,N., Seganti,L., Superti,F. und Visca,P. (2003) Molecular aspects of acid resistance in food-borne bacterial pathogens: cues from *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. In: Recent research developments in infection & immunity ed. Pandalai, C.G. pp. 537-553. Trivandrum: Transworld Research Network.
- Contreras,I., Toro,C.S., Troncoso,G. und Mora,G.C. (1997) *Salmonella* Typhi mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiology* **143**, 2665-2672.
- Corbin,B.D., Wang,Y.P., Beuria,T.K. und Margolin,W. (2007) Interaction between cell division proteins *FtsE* and *FtsZ*. *Journal of Bacteriology* **191**, 3026-3035.
- Corker,H. und Pole,R.K. (2003) Nitric oxide formation by *Escherichia coli* - Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator FNR, and flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31584-31592.

- Cotter,P.D., O'Reilly,K. und Hill,C. (2001a) A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. *Journal of Food Protection* **64**, 1362-1368.
- Cotter,P.D., Gahan,C.G.M. und Hill,C. (2001b) Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *Molecular Microbiology* **40**, 465-475.
- Cotter,P.D., Ryan,S., Gahan,C.G.M. und Hill,C. (2005) Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2832-2839.
- Csonka,L.N. (1981) Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella*-Typhimurium. *Molecular & Genetics* **182**, 82-86.
- Csonka,L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic-stress. *Microbiological Reviews* **53**, 121-147.
- Csonka,L.N und Epstein,W. (1996) Osmoregulation. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology.* edd Neidhard, F.C., pp 1210–1223 Washington, DC: ASM Press
- Cui,H., Gabriel,A.A. und Nakano,H. (2010) Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control* **21**, 1030-1036.
- Culham,D.E., Lu,A., Jishage,M., Krogfelt,K.A., Ishihama,A. und Wood,J.M. (2001) The osmotic stress response and virulence in pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*: contributions of RpoS, Prop, ProU and other systems. *Microbiology* **147**, 1657-1670.
- Cunningham,E., O'Byrne,C. und Oliver,J.D. (2009) Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* **20**, 1141-1144.
- D'Aoust,J.Y. (1991) Pathogenicity of Foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* **12**, 17-40.
- D'Aoust,J.Y. (2001) *Salmonella*. In *Guide to foodborne pathogens* ed. Labbe,R.G. and Garcia,S. pp. 163-191. New York: John Wiley and Sons.
- David,O.M., Wandili,S., Kakai,R. und Waindi,E.N. (2009) Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya. *Journal of Infection in Developing Countries* **3**, 99-104.
- DeBiase,D., Tramonti,A., John,R.A. und Bossa,F. (1996) Isolation, overexpression, and biochemical characterization of the two isoforms of glutamic acid decarboxylase from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **8**, 430-438.
- Dechet,A.M., Scallan,E., Gensheimer,K., Hoekstra,R., Gunderman-King,J., Lockett,J., Wrigley,D., Chege,W. und Sobel,J. (2006) Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Definitive Type 104 infection linked to commercial ground beef, northeastern United States, 2003-2004. *Clinical Infectious Diseases* **42**, 747-752.
- Dedie, K., Bockemühl, J., Kühn, H., Volkmer, K.J. und Weinke, T. (1993) *Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch*. Stuttgart: Enke Verlag.
- Degroote,M.A. und Fang,F.C. (1995) No Inhibitions - Antimicrobial properties of nitric-oxide. *Clinical Infectious Diseases* **21**, 162-165.

Denicola,A., Freeman,B.A., Trujillo, M. und Radi,R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **333**, 49-54.

Denicola,A., Souza,J.M. und Radi,R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3566-3572.

Derre,I., Rapoport,G., Devine,K., Rose,M. und Msadek,T. (1999) ClpE, a novel type of HSP100 ATPase, is part of the CtsR heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **32**, 581-593.

Deutsches Lebensmittelbuch (2010) Deutsches Lebensmittelbuch – Leitsätze 2010. Preuß,A., Hamburg, Behr´s Verlag

Dijkstra,R.G. (1982) The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface-water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage-treatment plant. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Serie B-Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Preventive Medizin* **176**, 202-205.

Domann,E., Wehland,J., Rohde,M., Pistor,S., Hartl,M., Goebel,W., Leimeisterwachter,M., Wuenscher,M. und Chakraborty,T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host-cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO Journal* **11**, 1981-1990.

Doran,G.F. (1917) Art of curing meat. U.S. Patent 1,212,614.

Dorman,H.J.D. und Deans,S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 308-316.

Dostbil,N. (2007) An investigation of antimicrobial activity of celery (*Apium graveolensis* L.). *Asian Journal of Chemistry* **19**, 5518-5522.

Droffner,M.L. und Yamamoto,N. (1992) Role of nalidixic-acid in isolation of *Salmonella* Typhimurium strains capable of growth at 48-degrees-C. *Current Microbiology* **25**, 257-260.

Duche,O., Tremoulet,F., Glaser,P. und Labadie,J. (2002) Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1491-1498.

Durfee,T., Hansen,A.M., Zhi,H., Blattner,F.R. und Jin,D.J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**, 1084-1096.

DFV (2011) Verzehr von Fleischerzeugnissen. <http://www.fleischerhandwerk.de/medien--und-presseservice/daten-und-fakten/geschaeftsbericht/verzehr-von-fleischerzeugnissen>

Dykhuizen,R.S., Frazer,R., Duncan,C., Smith,C.C., Golden,M., Benjamin,N. und Leifert,C. (1996) Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: Importance of dietary nitrate in host defense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1422-1425.

Dykhuizen,R.S., Fraser,A., McKenzie,H., Golden,M., Leifert,C. und Benjamin,N. (1998) *Helicobacter pylori* is killed by nitrite under acidic conditions. *Gut* **42**, 334-337.

EFSA (2003) The effects of Nitrites/Nitrates on the microbiological safety of meat products. *The EFSA Journal* **14**, 1-31.

EFSA (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2010* **9**, 1-378.

Eichholzer, M. und Gutzwiller, F. (1998) Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: A review of the epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews* **56**, 95-105.

Emberland, K.E., Nygard, K., Heier, B.T., Aavitsland, P., Lassen, J., Stavnes, T.L. und Gondrosen, B. (2006) Outbreak of *Salmonella* Kedougou in Norway associated with salami, April-June 2006. *Eurosurveillance*: **11** (7).

Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. und Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Molecular Microbiology* **21**, 823-837.

Escartin, E.F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A. und Saldana-Lozano, J. (1999) Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiology* **16**, 479-486.

Esteban, J.I., Oporto, B., Aduriz, G., Juste, R.A. und Hurtado, A. (2009) Faecal shedding and strain diversity of *Listeria monocytogenes* in healthy ruminants and swine in Northern Spain. *Bmc Veterinary Research* **5**, doi:10.1186/1746-6148-5-2.

Fang, F.C. (1997) Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 2818-2825.

Falkow, S., Isberg, R.R. und Portnoy, D.A. (1992) The interaction of bacteria with Mammalian-Cells. *Annual Review of Cell Biology* **8**, 333-363.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. und Elbaroty, G.S.A. (1989) Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* **52**, 665-667.

Farber, J.M., Sanders, G.W. und Johnston, M.A. (1989) A survey of various Foods for the presence of *Listeria* Species. *Journal of Food Protection* **52**, 456-458.

Farber, J.M. und Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, A Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews* **55**, 476-511.

Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B. und Gotz, F. (2002) The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC. *Journal of Bacteriology* **184**, 6624-6634.

Ferens, W. und Hovde, C. (2011) *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease* **8**, 465-487.

Finlay, B. (1994) Cell biology of *Salmonella* pathogenesis. In *Molecular genetics of bacterial pathogenesis: A tribute to Stanley Falkow* ed. Miller, V.L., Kaper, J.B., Portnoy, D.A. and Isberg, R.R. pp. 249-261. Washington DC: American Society for Microbiology.

Florentini, A.M., Sawitzki, M.C., Bertol, T.M., Angonesi, B., Fabio, C., Pelisser, M.R., Maisonnave, A.A.C. und Sant'Anna, E.S. (2009) Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosum*: technological potential for use in fermented sausage. **52**, 737-746.

Fischer, A. (2005) Reddening of emulsion type sausage without nitrite curing salt - Part 1: colour, colour stabilisation, nitrite and nitrate concentrations, sensory properties. *Fleischwirtschaft* **85**, 110-115.

- Foster, J.W. und Hall, H.K. (1991) Inducible pH Homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **173**, 5129-5135.
- Franco, A., Hendriksen, R.S., Lorenzetti, S., Onorati, R., Gentile, G., Dell'Omo, G., Aarestrup, F.M. und Battisti, A. (2011) Characterization of *Salmonella* occurring at high prevalence in a population of the land Iguana *Conolophus subcristatus* in Galapagos Islands, Ecuador. *Plos One* **6**, doi:10.1371/journal.pone.0023147.
- Frank, C. und Alpers, K. (2003) Infektionen mit EHEC beim Menschen In: Hartung, M. (Hrsg.): Bericht über die epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland 2002 – Übersicht über die Meldungen der Bundesländer, zusammengestellt vom Nationalen Referenzlaboratorium für die Epidemiologie der Zoonosen S. 161 -164, Berlin: BfR Pressestelle.
- Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Stark, K. und Krause, G. (2011). Epidemic profile of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany – preliminary report. *New England Journal of Medicine* **365**, 1771–1780.
- Fraser, K.R., Harvie, D., Coote, P.J. und O'Byrne, C.P. (2000) Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4696-4704.
- Friedly, E., Crandall, P., Ricke, S., Roman, M., O'Bryan, C. und Chalova, V., I (2009) In Vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science* **74**, 67-72.
- Friedrich, A.W. (2002) Variabilität der Shiga Toxine in *Escherichia coli*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* **6**, 99-104.
- Fujii, M., Shibata, S. und Aizawa, S. (2008) Polar, peritrichous, and lateral flagella belong to three distinguishable flagellar families. *Journal of Molecular Biology* **379**, 273-283.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. und Cossart, P. (1991) Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by Internalin, a repeat protein reminiscent of surface-antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**, 1127-1141.
- Galan, J.E. und Zhou, D. (2000) Striking a balance: Modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8754-8761.
- Galan, S.R., Kann, P.H., Gress, T.M. und Michl, P. (2011) *Listeria monocytogenes*-induced bacterial Peritonitis caused by contaminated cheese in a patient with haemochromatosis. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **49**, 832-835.
- Garcia-del-Portillo, F. und Finlay, B.B. (1994) *Salmonella* invasion of nonphagocytic cells induces formation of Macropinosomes in the Host-Cell. *Infection and Immunity* **62**, 4641-4645.
- Gareis, M., Kabisch, J., Pichner, R. und Hechelmann, H. (2009) Occurrence and behaviour of food borne pathogens in minisalami. Part 1. Results of a market study on the occurrence of *Salmonella* spp., shiga toxin producing/enterohaemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC), *Listeria monocytogenes* and coagulase-positive *staphylococci* in minisalami. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* **48**, 215-224.
- Gareis, M., Pichner, R. und Hechelmann, H. (2010) Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in minisalami. *Fleischwirtschaft* **90**, 103-109.

- Gardner,A.M. und Gardner,P.R. (2002) Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, *Escherichia coli* - Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 8166-8177.
- Gellin,B.G. und Broome,C.V. (1989): Listeriosis. *Journal of the American Medical Association* **261**, 1313-1320.
- Giammanco,G.M., Pignato,S., Mammina,C., Grimont,F., Grimont,P.A.D., Nastasi,A. und Giammanco,G. (2002) Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z(35):- in southern Italy: Molecular characterization of human, animal, and environmental isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3502-3505.
- Gianfranceschi,M., Gattuso,A., Fiore,A., D'Ottavio,M.C., Casale,M., Palumbo,A. und Aureli,P. (2006) Survival of *Listeria monocytogenes* in uncooked Italian dry sausage (Salami). *Journal of Food Protection* **69**, 1533-1538.
- Gibson,A.M. und Roberts T.A. (1986) The effect of pH, water activity, sodium-nitrite and storage-temperature on the growth of Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellae* in a laboratory medium. *International Journal of Food Microbiology* **3**, 183-194.
- Gilberthorpe,N.J. und Poole,R.K. (2008) Nitric oxide homeostasis in *Salmonella* Typhimurium - Roles of respiratory nitrate reductase and flavohemoglobin. *Journal of Bacterology Chemistry* **283**, 11146-11154.
- Gill,A.O. und R.A. Holley (2003) Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 251-259.
- Gill,C.J., Keene,W.E., Mohle-Boetani,J.C., Farrar,J.A., Waller,P.L., Hahn,C.G. und Cieslak,P.R. (2003) Alfalfa seed decontamination in a *Salmonella* outbreak. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 474-479.
- Ginocchio,C., Pace,J. und Galan,J.E. (1992) Identification and molecular characterization of Aa *Salmonella* Typhimurium gene involved in triggering the internalization of *salmonellae* into cultured epithelial-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5976-5980.
- Giotis,E.S., Blair,I.S. und McDowell,D.A. (2007) Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sublethal alkaline stress. *International Journal of Food Microbiology*, **120**, 250-258.
- GlaaskerE., Konings W.N. und Poolman,B. (1996) Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper-and hypo-osmotic shock. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10060–10065.
- Glage, M. (1909) Die Konservierung der roten Fleischfarbe. *Blutspetra: Arbeiten an dem Kaiserlichen Gesundheitsamt* **32**, 223.
- Glass,K.A., Loeffelholz,J.M., Ford,J.P. und Doyle,M.P. (1992) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium-chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2513-2516.
- Gobat,P.F. und Jemmi,T. (1990) Epidemiologic Studies on *Listeria* spp. in Slaughterhouses. *Fleischwirtschaft* **70**, 1448-1450.

Göhmann,S., Leimeister-Waechter,M., Schiltz,E., Goebel,W. und Chakraborty,T. (1990) Characterization of a *Listeria monocytogenes*-specific protein capable of inducing delayed hypersensitivity in *Listeria*-Immune Mice. *Molecular Microbiology* **4**, 1091-1100.

Gomes,C.S., Izar,B., Pazan,F., Mohamed,W., Abu Mraheil,M., Mukherjee,K., Billion,A., Aharonowitz,Y., Chakraborty,T. und Hain,T. (2011) Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e *In Vitro* and *In Vivo*. *Plos One* **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0024965.

Gong,H., Su,J., Bai,Y., Miao,L., Kim,K., Yang,Y., Liu,F. und Lu,S. (2009) Characterization of the expression of *Salmonella* Type III secretion system factor PrgI, SipA, SipB, SopE2, SpaO, and SptP in cultures and in mice. *BMC Microbiology* **9**, doi:10.1186/1471-2180-9-73.

Gotterup,J., Olsen,K., Knochel,S., Tjener,K., Stahnke,L.H. und Moller,J.K. (2008) Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. *Meat Science* **78**, 492-501.

Goulet,V., Hebert,M., Hedberg,C., Laurent,E., Vaillant,V., De Valk,H. und Desenclos,J.C. (2012) Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* **54**, 652-660.

Graves,L.M., Helsel,L.O., Steigerwalt,A.G., Morey,R.E., Daneshvar,M.I., Roof,S.E., Orsi,R.H., Fortes,E.D., Milillo,S.R., den Bakker,H.C., Wiedmann,M., Swaminathan,B. und Sauders,B.D. (2010) *Listeria marthii* sp nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 1280-1288.

Gray,J.I., Macdonald,B., Pearson,A.M. und Morton,I.D. (1981) Role of nitrite in cured meat flavor - A Review. *Journal of Food Protection* **44**, 302-315.

Guerin,P.J., De Jong,B., Heir,E., Hasseltvedt,V., Kapperud,G. und Styrn,K. (2004) Outbreak of *Salmonella* Livingstone infection in Norway and Sweden due to contaminated processed fish products. *Epidemiology and Infection* **132**, 889-895.

Guillet,C., Join-Lambert,O., Monnier,A., Leclercq,A., Mechai,F., Mamzer-Bruneel,M., Bielecka,M., Scorrti,M., Disson,O., Berche,P., Vasquez-Boland,J., Lortholary,O. und Lecuit,M. (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* **16**, DOI: 10.3201/eid1601.091155.

Guina,T., Yi,E.C., Wang,H.L., Hackett,M. und Miller,S.I. (2000) A *PhoP*-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *Journal of Bacteriology* **182**, 4077-4086.

Gunn,J.S. und Miller,S.I. (1996) *PhoP-PhoQ* activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella* Typhimurium antimicrobial peptide resistance. *Journal of Bacteriology* **178**, 6857-6864.

Gutierrez,C., Abee,T. und Booth, I.R. (1995) Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 233-244.

Haas,A., Brehm,K., Kreft,J. und Goebel,W. (1991) Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding *Listeria seeligeri* catalase, a bacterial enzyme highly homologous to mammalian catalases. *Journal of Bacteriology* **173**, 5159-5167.

Haas,A. und Göbel,W. (1992) Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radical Research Communications* **16**, 137-157.

- Halabi,M., Orth,D., Grif,K., Wiesholzer-Pittl,M., Kainz,M., Schoberl,J., Dierich,M.P., Allerberger,F. und Wurzner,R. (2008) Prevalence of Shiga toxin-, intimin- and haemolysin genes in *Escherichia coli* isolates from drinking water supplies in a rural area of Austria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **211**, 454-457.
- Haldane,J. (1901) The red colour of salted meat. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **1**, 115-122.
- Halliwell,B., Hu,M.L., Louie,S., Duvall,T.R., Tarkington,B.K., Motchnik,P. und Cross,C.E. (1992) Interaction of nitrogen-dioxide with human plasma - Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS Letters* **313**, 62-66.
- Halter,E.L., Neuhaus,K. und Scherer,S. (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**, 641-647.
- Hammer, P. (2000) Infektions-/Intoxikationskrankheiten und Parasitosen. In: Handbuch Lebensmittelhygiene, Heeschen, W., Meyer, Zschaler, R.; Behr's Verlag, Hamburg, S. 5-17.
- Hamm,U. und Rippin,M. (2009) Bio-Branche in Deutschland wächst um 10 Prozent. <http://www.abzonline.de/fokus/bio-branche-in-deutschland-waechst-um-prozent,7069285498.html>
- Haskin,C.J., Ravi,N., Lynch,J.B., Munck,E. und Que,L. (1995) Reaction of NO with the reduced R2 protein of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 11090-11098.
- Hauschild,A.H.W., Hilsheimer,R., Jarvis,G. und Raymond,D.P. (1982) Contribution of nitrite to the control of *Clostridium botulinum* in Liver Sausage. *Journal of Food Protection* **45**, 500-506.
- Hauser,E., Hebner,F., Tietze,E., Helmuth,R., Junker,E., Prager,R., Schroeter,A., Rabsch,W., Fruth,A. und Malorny,B. (2011) Diversity of *Salmonella enterica* serovar Derby isolated from pig, pork and humans in Germany. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 141-149.
- Hechelmann,H. (1974) Microorganisms of the *Klebsiellae* tribe in refrigerated meat and products. *Fleischwirtschaft* **54**, 1515-1517.
- Hechelmann,H. (1985) Defects of microbiological origin in raw sausage and raw ham. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach* 6629-6634.
- Hecker,M., Pane-Farre,J. und Völker,U. (2007) SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* **61**, 215-237.
- Heir,E., Holck,A.L., Omer,M.K., Alvseike,O., Hoy,M., Mage,I. und Axelsson,L. (2010) Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* by process and recipe optimisation in dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* **141**, 195-202.
- Hentze,M.W. (1996) Iron-sulfur clusters and oxidant stress responses. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 281-281.
- Hervas,J.A., Rosell,A., Hervas,D., Rubio,R., Duenas,J. und Mena,A. (2012) Reptile Pets-associated *Salmonella enterica* Subspecies *diarizonae* Gastroenteritis in a Neonate. *Pediatric Infectious Disease Journal* **31**, 1102-1103.
- Hew,C.M., Hajmeer,M.N., Farver,T.B., Glover,J.M. und Cliver,D.O. (2005) Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in chorizos. *Journal of Food Protection* **68**, 2039-2046.

Hirschfelder,G. (2001) Europäische Esskultur. Geschichte der Ernährung in Europa von der Steinzeit bis heute. Campus Verlag.

Hoagland,R. (1908) The action of salpeter upon the color of meat. In: *25th Annual Report of the Bureau of Animal Industry*, pp. 301-314, Washington D.C.: U.S. Department of Agriculture. Government Printing Office.

Hoagland, R. (1914). Coloring matter of raw and cooked salted meats. *Journal of Agricultural Research* **3**, 211–225.

Hof,H. und Hefner,P. (1988) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* **16**, 141-144.

Holck,A.L., Axelsson,L., Rode,T.M., Hoy,M., Mage,I., Alvseike,O., L'Abée-Lund,T.M., Omer,M.K., Granum,P.E. und Heir,E. (2011) Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat Science* **89**, 286-295.

Holley,R., Jui,P., Wittmann,M. und Kwan,P. (1988) Survival of *S. aureus* and *S. Typhimurium* in raw ripened dry sausages formulated with mechanically separated chicken meat. *Fleischwirtschaft* **68**, 194-215.

Holley,R.A. und Proulx,M. (1986) Use of egg washwater pH to prevent survival of *Salmonella* at moderate temperatures. *Poultry Science* **65**, 922-928.

Honikel,K.O. (2008) The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science* **78**, 68-76.

Hoque,M., Burgess,G., Greenhil,A., Hedlefs,R. und Skerratt,L. (2012) Causes of morbidity and mortality of wild aquatic birds at Billabong Sanctuary, Townsville, North Queensland, Australia. *Avian Diseases* **56**, 249-256.

Huber,H.C., Kugler,R. und Liebl,B. (1998) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections - results from an epidemiologic study in Bavaria for the period April 1996 to March 1997. *Gesundheitswesen*: **60**, 159-165.

Hübsch, H. (2009) <http://www.rp-online.de/wirtschaft/unternehmen/studie-boom-der-biobranche-gebremst-aid-1.2325682>

Hughes,L.A., Shopland,S., Wigley,P., Bradon,H., Leatherbarrow,A., Williams,N.J., Bennett,M., de Pinna,E., Lawson,B., Cunningham,A.A. und Chantrey,J. (2008) Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005-2006. *Bmc Veterinary Research* **4**, doi:10.1186/1746-6148-4-4.

Huhtanen,C.N. (1975) Use of pH gradient plates for increasing acid tolerance of *Salmonellae*. *Applied Microbiology* **29**, 309-312.

Indarso,F., Harianto,A., Nada,A. und Aly,H. (2008) Outbreak of neonatal cellulites and septicemia caused by *Salmonella* Worthington. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* **3**, 241-244.

Ischiropoulos,H. und Al-Mehdi,A.B. (1995) Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Letters* **364**, 279-282.

Ishida,A., Otsuka,N., Nagata,S., Adachi,K. und Sano,H. (1996) The effect of salinity stress on the accumulation of compatible solutes related to the induction of salt-tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology* **42**, 331-336.

- Ishii,S., Meyer,K.P. und Sadowsky,M.J. (2007) Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5703-5710.
- Ita,P.S. und Hutkins,R.W. (1991) Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott-A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric, and hydrochloric acids. *Journal of Food Protection* **54**, 15-19.
- Iyer,R., Williams,C. und Miller,C. (2003) Arginine-agmatine antiporter in extreme acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **185**, 6556-6561.
- Iyoda,S., Honda,N., Saitoh,T., Shimuta,K., Terajima,J., Watanabe,H. und Ohnishi,M. (2011) Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **79**, 4628-4637.
- Jacquet,C., Catimel,B., Brosch,R., Buchrieser,C., Dehaumont,P., Goulet,V., Lepoutre,A., Veit,P. und Rocourt,J. (1995) Investigations related to the epidemic strain involved in the French Listeriosis Outbreak in 1992. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2242-2246.
- Jansen,A., Frank,C., Prager,R., Oppermann,H. und Stark,K. (2005) Nation-wide outbreak of *Salmonella* Give in Germany, 2004. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **43**, 707-713.
- Jensen,L.B. (1954) *Microbiology of Meats*, 3rd ed. pp. 42-51, Champaign Ill, Garrard Press.
- Ji,X.B. und Hollocher,T.C. (1988) Reduction of nitrite to nitric-oxide by enteric bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **157**, 106-108.
- Jira,W. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in smoked meat products and liquid smokes. *Fleischwirtschaft* **83**, 160-163.
- Jones,B.D., Paterson,H.F., Hall,A. und Falkow,S. (1993) *Salmonella* Typhimurium induces membrane ruffling by a growth factor-receptor-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10390-10394.
- Joseph,T.C., Rajan,T.C., Thampuran,N. und James,R. (2010) Functional Characterization of Trehalose Biosynthesis Genes from *E. coli*: An Osmolyte Involved in Stress Tolerance. *Molecular Biotechnology* **46**, 20-25.
- Juedes,M.J. und Wogan,G.N. (1996) Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **349**, 51-56.
- Kabisch,J., Pichner,R. und Gareis,M. (2008a) Die ersten Reifetage sind entscheidend: Wirkung von Pökelsalz auf pathogene Keime in Rohwurstprodukten. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* **89**, 409-413.
- Kabisch,J., Scheuer,R., Rödel,W. und Gareis,M. (2008b) Influence on the microbial effect of sodium nitrite in raw fermented sausage. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* **47**, 99-105.
- Kabisch,J., Pichner,R., Kaspar,D., Wuestner,S., Mueller,S., Scherer,S. und Gareis,M. (2011) Impact of nitrite on Gram positive food pathogens in raw sausage products. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* **50**, 215-228.
- Kamber,U., Gokce,H.I. und Elmali,M. (2007) *Clostridium perfringens* and its toxins in minced meat from Kars, Turkey. *Food Additives and Contaminants* **24**, 673-678.

Kapperud,G., Gustavsen,S., Hellesnes,I., Hansen,A.H., Lassen,J., Hirn,J., Jahkola,M., Montenegro,M.A. und Helmut,R. (1990) Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-Megadalton virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 2597-2601.

Karakolev,R. (2009) Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria. *Food Control* **20**, 953-955.

Karch,H., Schmidt,H. und Schwarzkopf,A. (1996) Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Die gelben Hefte* **36**, 125-135.

Karch,H. und Kohler,B. (1999) Neue Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157. *Gesundheitswesen* **61**, 46-51.

Karmali,M. A. (1989): Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **2**, 15-38.

Kaspar, D. mündliche Mitteilung

Katurahara,M., Kobayashi,Y., Iwasa,M., Ma,N., Inoue,H., Fujita,N., Tanaka,K., Horiki,N., Gabazza,E.C. und Takei,Y. (2009) Reactive nitrogen species mediate DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Helicobacter* **14**, 552-558.

Kauffmann, F. (1966) Zur Klassifizierung und Nomenklatur der *Salmonella* Sub-Genera I-IV. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. **102**, 482-483

Kaufmann, F. (1978): Das Fundament: zur Geschichte und Bedeutung der *Salmonella*- und *Escherichia*-Forschung: Zur Geschichte und Bedeutung der *Salmonella*- und *Escherichia*-Forschung. Munksgaard Verlag.

Kawano,K., Okada,M., HagaT., Maeda,K. und Goto,Y. (2008). Relationship between pathogenicity for humans and *stx* genotype in shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **27**, 227-232.

Kazmierczak,M.J., Mithoe,S.C., Boor,K.J. und Wiedmann,M. (2003) *Listeria monocytogenes* sigma(B) regulates stress response and virulence functions. *Journal of Bacteriology* **185**, 5722-5734.

Keene,W., Hedberg,K., Cieslak,P., Schafer,S. und Dechet,A. (2004) *Salmonella* serotype Typhimurium outbreak associated with commercially processed egg salad - Oregon, 2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **53**, 1132-1134.

Kerr,M., Marsh, R. Schroeder, F. und Boyer,S. (1926) The use of sodium nitrite in the curing of meat. *Journal of Agriculture Research* **33**, 541.

King,T., Lucchini,S., Hinton,J.C. und Gobius,K. (2010) Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant- and strain-specific acid tolerance responses. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 6514-6528.

Kiranmayi,C., Krishnaiah,N. und Mallika,E. (2010) *Escherichia coli* O157:H7 - An emerging pathogen in foods of animal origin. *Veterinary World* **3**, 382-389.

Kirsch,P., Jores,J. und Wieler,L.W. (2004) Plastizität bakterieller Genome: Pathogenitätsinseln und der locus of enterocyte effacement (LEE). *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **117**, 116-129.

- Kisskalt, K. (1899) Beiträge zur Kenntnis der Ursachen des Rothwerdens des Fleisches beim Kochen, nebst einigen Versuchen über die Wirkung der schwefligen Säure auf die Fleischfarbe. *Archiv für Hygiene und Bacteriologie* **85**, 11-18.
- Kivi, M., van Pelt, W., Notermans, D., van de Giessen, A., Wannet, W. und Bosman, A. (2005) Large outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT104, the Netherlands, September–November 2005. *Eurosurveillance* **10** (48).
- Klettner, P.G. und Rödel, W. (1978) Überprüfung und Steuerung wichtiger Parameter bei der Rohwurstreifung. *Fleischwirtschaft* **58**, 57-66.
- Klettner, P.G. und Rödel, W. (1979) Temperature significance in raw sausage aging. *Fleischerei* **30**, 907-908.
- Klettner, P.G. und List, D. (1980) The effect of type of carbohydrate on loss of dry sausage ripening. *Fleischwirtschaft* **60**, 1589-1596.
- Klettner, P.G. und Träger, K. (2000) Technology of processing fermented sausage and cooked sausage with reduced nitrite addition. *Fleischwirtschaft* **80**, 82-85.
- Ko, R. und Smith, L.T. (1999) Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4040-4048.
- Koch, J. und Stark, K. (2006) Significant increase of listeriosis in Germany - epidemiological patterns 2001-2005. *Eurosurveillance* **11**, 85-88.
- Koch, K., Kristensen, B., Holt, H., Ethelberg, S., Molbak, K. und Schonheyder, H. (2011) International travel and the risk of hospitalization with non-typhoidal *Salmonella* bacteremia. A Danish population-based cohort study, 1999-2008. *BMC Infectious Diseases* **11**, doi:10.1186/1471-2334-11-277.
- Köhler, W., Eggert, H., Fleischer, B., Marre R., Pfister H. und Pulverer, G. (2001) Medizinische Mikrobiologie, , edd. 8., S. 299 München-Jena: Urban & Fischer Verlag.
- Koo, F.C.W., Peterson, J.W., Houston, C.W. und Molina, N.C. (1984) Pathogenesis of experimental salmonellosis - inhibition of protein-synthesis by cyto-toxin. *Infection and Immunity* **43**, 93-100.
- Koutsoumanis, K.P. und Sofos, J.N. (2004) Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 321-326.
- Krementowski, A., mündliche Mitteilung
- Kress, W., Maglica, Z. und Weber-Ban, E. (2009) Clp chaperone-proteases: structure and function. *Research in Microbiology* **160**, 618-628.
- Kröckel, L., Dederer, I. und Träger, K. (2011) Starter and protective cultures for meat products. *Fleischwirtschaft*, **91**, 93-98.
- Kroncke, K.D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, F.T., Dasting, I., Wesener, J.R., Bettermann, H., Breunig, K.D. und Kolbachofen, V. (1994) Nitric-Oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator Lac9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **200**, 1105-1110.
- Kuhn, M. und Göbel, W. (1989) Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian-cells. *Infection and Immunity* **57**, 55-61.

- Kusian,B., Sultemeyer,D. und Bowien,B. (2002) Carbonic anhydrase is essential for growth of *Ralstonia eutropha* at ambient CO₂ concentrations. *Journal of Bacteriology* **184**, 5018-5026.
- Lahti,E., Johansson,T., Honkanen-Buzalski,T., Hill,P. und Nurmi,E. (2001) Survival and detection of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiology*, **18**, 75-85.
- Lamont,R.F., Sobel,J., Mazaki-Tovi,S., Kusanovic,J.P., Vaisbuch,E., Kim,S.K., Uldbjerg,N. und Romero,R. (2011) Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine* **39**, 227-236.
- Lapuz,R., Tani,H., Sasai,K., Shiota,K., Katoh,H. und Baba,E. (2008) The role of roof rats (*Rattus rattus*) in the spread of *Salmonella* Enteritidis and *S. Infantis* contamination in layer farms in eastern Japan. *Epidemiology and Infection* **136**, 1235-1243.
- Laver,J.R., Stevanin,T.M., Messenger,S.L., Lunn,A.D., Lee,M.E., Moir,J.W.B., Poole,R.K. und Read,R.C. (2010) Bacterial nitric oxide detoxification prevents host cell S-nitrosothiol formation: a novel mechanism of bacterial pathogenesis. *The FASEB Journal* **24**, 286-295.
- Lebert,I., Leroy,S. und Talon,R. (2007) Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiology* **24**, 281-287.
- Leclercq,A., Clermont,D., Bizet,C., Grimont,P.A.D., Le Fleche-Mateos,A., Roche,S.M., Buchrieser,C., Cadet-Daniel,V., Le Monnier,A., Lecuit,M. und Allerberger,F. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2210-2214.
- Lee,G.Y., Jang,H.I., Hwang,I.G. und Rhee,M.S. (2009) Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology* **134**, 196-200.
- Lee,I.S., Lin,J.S., Hall,H.K., Bearson,B. und Foster,J.W. (1995) The Stationary-Phase sigma-factor Sigma(S) (Rpos) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology* **17**, 155-167.
- Lee,I.S., Slonczewski,J.L. und Foster,J.W. (1994) A low-pH-inducible, Stationary-Phase acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **176**, 1422-1426.
- Lehmann,K.B. (1899) Über das Haemorrhodin, ein neues weitverbreitetes Blutfarbstoffderivat. *Sitzung der physikalisch-medizinischen Gesellschaft in Würzburg* **48**, 57-61.
- Lehmann, S., Timm, M., Steinbrück, H. und Gallien, P. (2003) Shiga Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) in Kot von Hochwild und Wildfleischproben Nationales Veterinärmedizinisches Referenzlabor *E. coli* (NRL-Ec), Dessau.
- Leistner,L. (1984) Hurdle technology for manufacture of stable meat products. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 5882-5889.
- Leistner,L. (1985) General aspects of raw sausage and raw ham. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 6606-6611.
- Leistner,L. (1986) Nitrate (salpêtre) and meat products - Situation in West Germany. *Fleischerei* **37**, 14-16.
- Leistner,L. (1992) Food Preservation by combined methods. *Food Research International* **25**, 151-158.

- Leistner,L. (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181-186.
- Leistner,L. und Gould,G.W. (2002) Hurdle technologies: combination treatment for food stability, safety and quality. edd.1, Dordrecht Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Le Minor,L. und Popoff,M.Y. (1987) Designation of *Salmonella* Enterica sp-nNov, nom rev, as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 465-468.
- Leroy,F. und De Vuyst,L. (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67-78.
- Leszczynska,T. (1994) Nitrate and nitrite content of selected herbs. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* **24**, 323-325.
- Leyer,G.J. und Johnson,E.A. (1993) Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1842-1847.
- Lianou,A. und Sofos,J.N. (2007) A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection* **70**, 2172-2198.
- Lim,S.K., Nam,H.M., Park,H.J., Lee,H.S., Choi,M.J., Jung,S.C., Lee,J.Y., Kim,Y.C., Song,S.W. und Wee,S.H. (2010) Prevalence and characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**, 775-778.
- Lin,J.S., Smith,M.P., Chapin,K.C., Baik,H.S., Bennett,G.N. und Foster,J.W. (1996) Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 3094-3100.
- Linke,H. (1985) Quality standards for raw ham and raw sausage. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 6612-6616.
- Lissner,E. (1939) Wurstologia oder Es geht um die Wurst. Eine Monographie über die Wurst. Frankfurt am Main, Hauserpresse Hans Schaefer.
- Liteplo,R.G. und Meek,M.E. (2001) N-nitrosodimethylamine: Hazard characterization and exposure-response analysis. *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* **19**, 281-304.
- Lomonaco,S., Decastelli,L., Bianchi,D.M., Nucera,D., Grassi,M.A., Sperone,V. und Civera,T. (2009) Detection of *Salmonella* in finishing pigs on farm and at slaughter in Piedmont, Italy. *Zoonoses and Public Health* **56**, 137-144.
- Lopez-Malo,A., Alzamora,S.M. und Palou,E. (2005) *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* **99**, 119-128.
- Lucht,J.M. und Bremer,E. (1994) Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments - Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport-system *proU*. *Fems Microbiology Reviews* **14**, 3-20.

Lücke,F und Roberts,T.A. (1993) Control of *Clostridium botulinum* in meat and meat products. In: *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods* (A.H.W. Hauschild & K.L. Dodds, eds.), pp. 177-207. Dekker, New York.

Lücke,F. (1999) Assessment of the technological necessity of the use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. *Fleischwirtschaft* **79**, 96-98.

Lücke,F. (2003) Use of nitrite and nitrate in the processing of meat from organic production - benefits and risks. *Fleischwirtschaft* **83**, 138-142.

Lundberg,J.O., Weitzberg,E., Cole,J.A. und Benjamin,N. (2004) Opinion - Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 593-602.

Lyautey,E., Hartmann,A., Pagotto,F., Taylor,K., Lapen,D.R., Wilkes,G., Piveteau,P., Rieu,A., Robertson,W.J., Medeiros,W.T., Edge,T.A., Gannon,V. und Topp,E. (2007a) Characteristics and frequency of detection of fecal *Listeria monocytogenes* shed by livestock, wildlife, and humans. *Canadian Journal of Microbiology* **53**, 1158-1167.

Lyautey,E., Lapen,D.R., Wilkes,G., McCleary,K., Pagotto,F., Tyler,K., Hartmann,A., Piveteau,P., Rieu,A., Robertson,W.J., Medeiros,D.T., Edge,T.A., Gannon,V. und Topp,E. (2007b) Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5401-5410.

Lyytikäinen,O., Autio,T., Majjala,R., Ruutu,P., Honkanen-Buzalski,T., Miettinen,M., Hatakka,M., Mikkola,J., Anttila,V.J., Johansson,T., Rantala,L., Aalto,T., Korkeala,H. und Siitonen,A. (2000) An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1838-1841.

Madoroba,E., Van Driessche,E., De Greve,H., Mast,J., Ncube,I., Read,J. und Beeckmans,S. (2009) Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes from scouring piglets in Zimbabwe. *Tropical Animal Health and Production* **41**, 1539-1547.

Magrinya,N., Magrinya,N., Bou,R., Tres,A., Rius,N., Codony,R. und Guardiola,F. (2009) Effect of tocopherol extract, *Staphylococcus carnosus* culture, and celery concentrate addition on quality parameters of organic and conventional dry-cured sausages. *Journal of agricultural and Food Chemistry* **57**, 8963-8972.

Massa,S., Goffredo,E., Altieri,C. und Natola,K. (1999) Fate of *Escherichia coli* O157 : H7 in unpasteurized milk stored at 8 degrees C. *Letters in Applied Microbiology* **28**, 89-92.

Martin,H., Garriga,M. und Aymerich,T. (2011) Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection* **74**, 812-815.

Marucci,P.L., Olivera,N.L., Brugnoli,L.I., Sica,M.G. und Cubitto,M.A. (2011) The occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bathing water of the Sierra de la Ventana region, Buenos Aires Province, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* **175**, 1-8.

McClelland,M., Sanderson,K.E., Clifton,S.W., Latreille,P., Porwollik,S., Sabo,A., Meyer,R., Bieri,T., Ozersky,P., McLellan,M., Harkins,C.R., Wang,C.Y., Nguyen,C., Berghoff,A., Elliott,G., Kohlberg,S., Strong,C., Du,F.Y., Carter,J., Kremizki,C., Layman,D., Leonard,S., Sun,H., Fulton,L., Nash,W., Miner,T., Minx,P., Delehaunty,K., Fronick,C., Magrini,V., Nhan,M., Warren,W., Florea,L., Spieth,J. und Wilson,R.K. (2004) Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics* **36**, 1268-1274.

- McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F.Y., Hou, S.F., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. und Wilson, R.K. (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-856.
- McClure, P.J. und Hall, S. (2000) Survival of *Escherichia coli* in foods. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 61-70.
- McMindes, M.K. und Siedler, A.J. (1988) Nitrite mode of action - Inhibition of yeast pyruvate decarboxylase (EC 4.1.1.1) and clostridial pyruvate - ferredoxin oxidoreductase (EC 1.2.7.1) by nitric-oxide. *Journal of Food Science* **53**, 917-921.
- Mellefont, L.A., McMeekin, T.A. und Ross, T. (2003) The effect of abrupt osmotic shifts on the lag phase duration of foodborne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 281-293.
- Mengaud, J., Braunbreton, M. und Cossart, P. (1991) Identification of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase-C activity in *Listeria monocytogenes* - A novel type of virulence factor. *Molecular Microbiology* **5**, 367-372.
- Merle, R., Kusters, S., May, T., Ports, U., Blaha, T. und Kreienbrock, L. (2011) Serological *Salmonella* monitoring in German pig herds: Results of the years 2003-2008. *Preventive Veterinary Medicine* **99**, 229-233.
- Messelhäußer, U., Schreiner, H., Schulze, G., Sing, A. und Busch, U. (2007) Nachweis von STEC/EHEC in Fleisch und Fleischerzeugnissen sowie in Umgebungsproben: Untersuchungen im Rahmen der Amtlichen Überwachung. *Fleischwirtschaft* **87**, 115-118.
- Mian, M.F., Pek, E.A., Chenoweth, M.J., Coombes, B.K. und Ashkar, A.A. (2011) Humanized mice are susceptible to *Salmonella typhi* infection. *Virulence* **2**, 248-252.
- Migros, (2011) Zusatzstoffe in Lebensmitteln. <http://www.migros.ch/mediaObject/GenM/docs/de/ZusatzstoffinfosDneu/original/ZusatzstoffinfosDneu.pdf>
- Miko, A., Dorn, C., Schroeter, A. und Helmuth, R. (2000) *Salmonella*. *BgVVHefte* **2**, 143-165.
- Miller, A.J. (1992) Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott-A. *Journal of Food Protection* **55**, 414-418.
- Mills, P.C., Rowley, G., Spiro, S., Hinton, J.C.D. und Richardson, D.J. (2008) A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiology* **154**, 1218-1228.
- Mills, P.C., Richardson, D.J., Hinton, J.C.D. und Spiro, S. (2005) Detoxification of nitric oxide by the flavorubredoxin of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical Society Transactions* **33**, 198-199.
- Milkowski, A., Garg, H.K., Coughlin, J.R. und Bryan, N.S. (2010) Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **22**, 110-119.
- Milner, J.L., Grothe, S. und Wood, J.M. (1988) Proline porter-li is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane-vesicles of *Escherichia coli*-K12. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 14900-14905.

- Misic,D., Zizovic,I., Stamenic,M., Asanin,R., Ristic,M., Petrovic,S.D. und Skala,D. (2008) Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. *Biochemical Engineering Journal* **42**, 148-152.
- Monfort,S., Sagarzazu,N., Gayan,E., Raso,J. und Alvarez,I. (2012) Heat resistance of *Listeria* species to liquid whole egg ultrapasteurization treatment. *Journal of Food Engineering* **11**, 478-481.
- Morris,S.L. und Hansen,J.N. (1981) Bacterial spore components which enhance the bacteriostatic effectiveness of S-Nitrosothiol. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 958-962.
- Mourey,A. und Cannilac,N. (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* **13**, 289-292.
- Much,P., Pichler,J. und Allerberger,F. (2007) Food borne infectious outbreaks, Austria 2005. *Wiener Klinische Wochenschrift* **119**, 150-157.
- Munoz,M., Guevara,L., Palop,A., Tabera,J. und Fernandez,P. (2009) Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *Lwt-Food Science and Technology* **42**, 220-227.
- Neidhardt, F. C. (1996) Genome analysis of global regulation in *Escherichia coli*. In Genome Analysis of global regulation in *Escherichia coli* ed. Collado-Vides,J., Magasanik,B. and Smith,T.F. pp. 147-165. Cambridge (USA): MIT Press.
- Nesbakken,T., Kapperud,G. und Caugant,D.A. (1996) Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 161-171.
- Nightingale,K.K., Thippareddi,H., Phebus,R.K., Marsden,J.L., und Nutsch,A.L. (2006) Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **69**, 794-800.
- Nissen,H. und Holck,A. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* **15**, 273-279.
- Nkogwe,C., Raletobana,J., Stewart-Johnson,A., Suepaul,S. und Adesiyun,A. (2011) Frequency of detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp. in the faeces of wild rats (*Rattus* spp.) in Trinidad and Tobago. *Veterinary Medicine International* **2011**, doi:10.4061/2011/686923.
- Notermans,S. und van Hoesel-de Boer K.A. (2008) The Food Safety File. Ed. 2008, Woerden NL, Food Doctors.
- Nygaard,K., Lindstedt,B.A., Wahl,E., Jensvoll,L., Kjelso,C., Molbak,K., Torpdahl,M. und Kapperud,G. (2007) Outbreak of *Salmonella* Typhimurium infection traced to imported cured sausage using MLVA-subtyping. *Eurosurveillance*: **12**, 1-2
- O'Brien,A.D. und LaVeck,G.D (1983) Purification and characterization of a Shigella-Dysenteriae 1-Like Toxin produced by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **40**, 675-683.
- O'Gara,E.A., Hill,D.J. und Maslin,D.J. (2000) Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2269-2273.
- Ogawa,H., Tokunou,H., Sasaki,M., Kishimoto,T. und Tamura,K. (1991) An outbreak of bacterial food poisoning caused by roast cuttlefish (yaki-ika) contaminated with *Salmonella* spp. (1) Champaign. *Japanese Journal of Food Microbiology* **7**, 151-157.

- Ogden, I.D., Hepburn, N.F., MacRae, M., Strachan, N.J.C., Fenlon, D.R., Rusbridge, S.M. und Pennington, T.H. (2002) Long-term survival of *Escherichia coli* O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp. *Letters in Applied Microbiology* **34**, 100-104.
- OhAiseadha, C., Dunne, O., Desmond, F. und O'Connor, M. (2010) *Salmonella* meningitis and septicaemia in a non-immunocompromised adult, associated with a cluster of *Salmonella* Enteritidis PT 14b, Ireland, November 2009. *Eurosurveillance* **15**, 9-11.
- Olesen, I., Vogensen, F.K. und Jespersen, L. (2009) Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 669-680.
- Olson, E.R. (1993) Influence of pH on bacterial gene-expression. *Molecular Microbiology* **8**, 5-14.
- Olsvik, O., Wasteson, Y., Lund, A. und Hornes, E. (1991) Pathogenic *Escherichia coli* found in Food. *International Journal of Food Microbiology* **12**, 103-113.
- Oroojalian, F., Kasra-Kermanshahi, R. und Azizi, M., Bassami, M. (2010) Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry* **120**, 765-770.
- Oses, S.M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Jaime, I. und Rovira, J. (2010) Prevalence and quantification of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* along the lamb food chain by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* **141**, 163-169.
- Oztekin, N., Nutku, M.S. und Erim, F.B. (2002) Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* **76**, 103-106.
- Owen, C.R., Meis, A., Jackson, J.W. und Stoenner, H.G. (1960) A case of primary cutaneous listeriosis. *New England Journal of Medicine* **262**, 1026-1028.
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R. und Schuldiner, S. (1989). Deletion of *ant* in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative Na⁺/H⁺ antiporter systems. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 20297-20302.
- Papaevangelou, V., Syriopoulou, V., Charissiadou, A., Pangalis, A., Mostrou, G. und Theodoridou, M. (2004) *Salmonella* bacteraemia in a tertiary children's hospital. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **36**, 547-551.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T.G., Sebaihia, M., Baker, S., Basham, D., Brooks, K., Chillingworth, T., Connor, P., Cronin, A., Davis, P., Davies, R.M., Dowd, L., White, N., Farrar, J., Feltwell, T., Hamlin, N., Haque, A., Hien, T.T., Holroyd, S., Jagels, K., Krogh, A., Larsen, T.S., Leather, S., Moule, S., O'Gaora, P., Parry, C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S. und Barrell, B.G. (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848-852.
- Paulsen, P., Smulders, F. und Hilbert, F. (2012) *Salmonella* in meat from hunted game: A Central European perspective. *Food Research International* **45**, 609-616.
- Paton, A.W. und Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 598-602.

Pearson,A.M., Chen,C.H., Gray,J.I. und Aust,S.D. (1992) Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition. *Free Radical Biology and Medicine* **13**, 161-167.

Perna,N.T., Plunkett III,G., Burland,V., Mau,B., Glasner,J. D., Rose,D.J., Mayhew,G.F., Evans,P.S., Gregor,J., Kirkpatrick,H.A., Posfal,G., Hackett,J., Klink,S., Boutin,A., Shao,Y., Miller,L., Grotbeck,E.J., Davis,N.W., Lim,A., Dimalanta,E.T., Pottamousis,K.D., Apodaca,J., Anatharaman,T.S., Lin,J., Galex,Y., Schwartz,D.C., Welch,R.A. und Blattner,F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. *Nature* **409**, 529-533.

Peters,J.M., Preston-Martin,S., London,S.J., Bowman,J.D., Buckley,J.D. und Thomas,D.C. (1994) Processed meats and risk of childhood leukemia (California, USA). *Cancer Causes & Control* **5**, 195-202.

Phillips,A.D. und Frankel,G. (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with woman intestinal organ cultures. *Journal of Infectious Diseases* **181**, 1494-1500.

Pichler,J., Much,P., Kasper,S., Fretz,R., Auer,B., Kathan,J., Mann,M., Huhulescu,S., Ruppitsch,W., Pietzka,A., Silberbauer,K., Neumann,C., Gschiel,E., de Martin,A., Schuetz,A., Gindl,J., Neugschwandtner,E. und Allerberger,F. (2009) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with jellied pork contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Wiener Klinische Wochenschrift* **121**, 149-156.

Pichner,R., Hechelmann,H., Gareis,M. und Steinrueck,H. (2006) Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in conventionally and organically produced salami products. *Fleischwirtschaft* **86**, 112-114.

Portnoy,D.A., Chakraborty,T., Goebel,W. und Cossart,P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes*. *Pathogenesis* **60**, 1263-1267.

Preston-Martin,S., Pogoda,J.M., Mueller,B.A., Holly,E.A., Lijinsky,W. und Davis,R.L. (1996) Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **5**, 599-605.

Priyanka,D., Lahiri,A. und Chakravorty,D. (2009) Novel role of the nitrite transporter NirC in *Salmonella* pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. *Microbiology* **155**, 2476-2489.

Purvis,J.E., Yomano,L.P. und Ingram,L.O. (2005) Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3761-3769.

Quiroz-Santiago,C., Rodas-Suarez,O.R., Vazquez,C.R., Fernandez,F.J., Quinones-Ramirez,E.I. und Vazquez-Salinas,C. (2009) Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection* **72**, 1279-1282.

Raengpradub,S., Wiedmann,M. und Boor,K.J. (2008) Comparative analysis of the sigma(B)-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 158-171.

Rahn,K., Degrandis,S.A., Clarke,R.C., McEwen,S.A., Galan,J.E., Ginocchio,C., Curtiss,R. und Gyles,C.L. (1992) Amplification of an *invA* Gene Sequence of *Salmonella* Typhimurium by Polymerase Chain Reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes* **6**, 271-279.

Ram,S., Vaipayee,P. und Shanker,R. (2008) Contamination of potable water distribution systems by multi-antimicrobial-resistant enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Environmental and Health Perspectives* **116**, 448-452.

- Ramarathnam, N., Rubin, L.J. und Diosady, L.L. (1991a) Studies on meat flavor .1. Qualitative and quantitative differences in uncured and cured pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39** (10), 1839-1847.
- Ramarathnam, N., Rubin, L.J. und Diosady, L.L. (1991b) Studies on meat flavor .2. A quantitative investigation of the volatile carbonyls and hydrocarbons in uncured and cured beef and chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39** (2), 344-350.
- Ramarathnam, N. (1998). The flavour of cured meat. In: Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods, 2nd edition. Ed. F. Shahidi, pp, 290-319, London: Blackie Academic & Professional.
- Rasmussen, M.A., Cray, W.C., Casey, T.A. und Whipp, S.C. (1993) Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters* **114**, 79-84.
- Ray, C.J. und Marshall, J.M. (2005) Measurement of nitric oxide release evoked by systemic hypoxia and adenosine from rat skeletal muscle in vivo. *Journal of Physiology-London* **568**, 967-978.
- Rea, R.B., Gahan, C.G.M. und Hill, C. (2004) Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for fur and PerR in virulence. *Infection and Immunity* **72**, 717-727.
- Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. und Farmer, J.J. (1989) Clonal Nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella* Bongori Comb Nov. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 313-320.
- Reinhart, F., Aschebach, S., Koch, T. und Uden, G. (2008) Reduced apo-fumarate nitrate reductase regulator (ApoFNR) as the major form of FNR in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **190**, 879-886.
- Reuter, G. (1967) Atypische Streptobakterien als dominierende Flora in reifender und gelagerter Rohwurst. *Fleischwirtschaft* **47**, 397-402.
- Rice, K.M. und Pierson, M.D. (1982) Inhibition of *Salmonella* by sodium-nitrite and potassium sorbate in Frankfurters. *Journal of Food Science* **47**, 1615-1617.
- Richard, H. und Foster, J. (2004) *E. coli* acid-resistance systems reverse transmembrane potential during acid stress. *Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology* **104**, 382.
- Riordan, D.C.R., Duffy, G., Sheridan, J.J., Eblen, B.S., Whiting, R.C., Blair, I.S. und McDowell, D.A. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 during the manufacture of pepperoni. *Journal of Food Protection* **61**, 146-151.
- RKI (2000) Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland - zur Situation im Jahr 1999, Teil 1: Darminfektionen (Gastroenteritiden) - 2. Folge: Enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Infektionen (EHEC) *Epidemiologisches Bulletin* **34**, 271 – 275.
- RKI (2001) Ratgeber Infektionskrankheiten - 6. Folge: Infektionen durch Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Epidemiologisches Bulletin* **31**, 5-12.
- RKI (2009) Salmonellose. *Epidemiologisches Bulletin* **13**, 117-121.
- RKI (2010) Aus der Arbeit des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger. *Epidemiologisches Bulletin* **15**, 1-12.

- RKI (2011) Prävalenz von Enteropathogenen. *Epidemiologisches Bulletin* **20**, 170-175.
- Roberts, T.A. und Smart, J.L. (1974) Inhibition of spores of *Clostridium* spp. by sodium nitrite. *Journal of Applied Bacteriology* **37**, 261-264.
- Robinson, T.P, Ocio, M.J, Kaloti, A. und Mackey, B.M. (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 83-92.
- Rocourt, J. und Grimont, P.A.D (1983) *Listeria welshimeri* sp-nov and *Listeria seeligeri* sp-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**, 866-869.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C. und Piffaretti, J.C. (1992) Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 171-174.
- Rödel, W. (1973) Measuring water activity under practical conditions. *Fleischwirtschaft* **53**, 27-31.
- Rödel, W. und Klettner, P. (1981) Effects of casing diameter on ripening of raw dry sausages. *Fleischerei* **32**, 803-804.
- Rödel, W. (1985) Ripening of raw sausage, climatic and other factors. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 6617-6624.
- Rödel, W., Scheuer, R. und Wagner, H. (1989) A new method of determining water activity in meat-products. *Fleischwirtschaft* **69**, 1396-1399.
- Rödel, W., Scheuer, S., Stiebing, A. und Klettner, P. (1992) Measurement of the oxygen content in meat products. *Fleischwirtschaft* **72**, 969-1010.
- Rödel, W. und Scheuer, R. (1998) Redox potential of meat and meat products. I. Physico-chemical basis, determination and evaluation of the redox potential. *Fleischwirtschaft* **78**, 975-976.
- Rödel, W., und Scheuer, R. (1999) Redox potential of meat and meat products. III. Control of redox potential during meat processing and effects of pH value, sodium nitrite, sodium ascorbate, sodium lactate and atmospheric oxygen. *Fleischwirtschaft* **79**, 78-81.
- Rödel, W., und Scheuer, R. (2001) The production of safe products. I. Research into the stop of microorganisms of Teewurst by the example of *Escherichia coli*. *Fleischwirtschaft* **81**, 81-84.
- Rödel, W. und Scheuer, R. (2003a) On the relationship between redox potential and bacterial growth. Part 1. *Fleischwirtschaft* **83**, 98-101.
- Rödel, W. und Scheuer, R. (2003b) On the relationship between redox potential and bacterial growth. Part 2. *Fleischwirtschaft* **83**, 127-131.
- Rödel, W., Scheuer, R. und Albert, T. (2006) Behaviour of pathogenic *Escherichia coli* in short fermented spreadable raw sausage. 2. Influence of ripening programs and additives. *Fleischwirtschaft* **86**, 110-115.
- Rolle, M. und Mayr, A. (1993) Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten. Stuttgart: Enke Verlag.

- Roy,B., Lepoivre,M., Henry,Y. und Fontecave,M. (1995) Inhibition of Ribonucleotide Reductase by nitric-oxide derived from thionitrites - reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* **34**, 5411-5418.
- Rubbo,H., Denicola,A. und Radi,R. (1994) Peroxynitrite inactivates Thiol-containing enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **308**, 96-102.
- Russo,M., Galletti,G.C., Bocchini,P. und Carnacini,A. (1998) Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) *letsvaart*): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 3741-3746.
- Rywotycki,R. (1997) The occurrence of nitrosamines in meat. *Medycyna Weterynaryjna* **53**, 726-729.
- Rywotycki,R. (2007) The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. *Food Chemistry* **101**, 540-548.
- RZ-consult (2000) Gutachten zur Gefährdungslage durch den Verzehr von nitrit-/ nitratgepökelten Fleischwaren beim Menschen; <http://www.nitrat.de/Gesundheit/AGutachten-Ziegler.pdf>
- Saitoh,M., Tanaka,K., Nishimori,K., Makino,S., Kanno,T., Ishihara,R., Hatama,S., Kitano,R., Kishima,M., Sameshima,T., Akiba,M., Nakazawa,M., Yokomizo,Y. und Uchida,I. (2005) The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology-Sgm* **151**, 3089-3096.
- Salamina,G., Donne,E.D., Niccolini,A., Poda,G., Cesaroni,D., Bucci,M., Fini,R., Maldini,M., Schuchat,A., Swaminathan,B., Bibb,W., Rocourt,J., Binkin,N. und Salmaso,S. (1996) A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. *Epidemiology and Infection* **117**, 429-436.
- Santamaria,P. (2006) Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC-regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**, 10-17.
- Sarasua,S. und Savitz,D.A. (1994) Cured and broiled meat consumption in relation to childhood-cancer - Denver, Colorado (United-States). *Cancer Causes & Control* **5**, 141-148.
- Sarkinas,A. und Jasutiene,I. (2007) Antimicrobial properties of plant and berries extracts. *Food Chemistry and Technology* **41**, 80-88.
- Sartz,L., De Jong,B., Hjertqvist,M., Plym-Forshell,L., Asterlund,R., Loefdahl,S., Osterman,B., Stahl,A., Eriksson,E., Hansson,H.B. und Karpman,D. (2008) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection* **136**, 370-380.
- Sasaki,Y., Usui,M., Murakami, M., Haruna,M., Kojima,A., Asai,T. und Yamada,Y. (2011) Antimicrobial Resistance in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and O26 Isolates from Beef Cattle. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **65**, 117-121.
- Sauders,B.D., Overdevest,J., Fortes,E., Windham,K., Schukken,Y., Lembo,A. und Wiedmann,M. (2012) Diversity of *Listeria* Species in urban and natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 4420-4433.
- Scheelings,T.F., Lightfoot,D. und Holz,P. (2011) Prevalence of *Salmonella* in Australian Reptiles. *Journal of Wildlife Diseases* **47**, 1-11.

- Schmidt, H., Russman, H., Schwarzkopf, A., Aleksic, S., Heesemann, J. und Karch, H. (1994) Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. *Zentralblatt für Bakteriologie - International Journal of Medical Microbiology Virology Parasitology and Infectious Diseases* **281**, 201-213.
- Schmidt,H., Beutin,L. und Karch,H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157-H7 Strain Edl-933. *Infection and Immunity* **63**, 1055-1061.
- Schmidt,H. und Karch,H. (1996) Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 2364-2367.
- Schmidt,K.L., Peterson,N.D., Kustusch,R.J., Wissel,M.C., Graham,B., Phillips,G.J. und Weiss,D.S. (2004) A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**, 785-793.
- Schnackel,W., Kleiner,U., Wiegand,D. und Schnackel,D. (2003) Stabilization of colour of raw dried fermented sausages without nitrit with spices - 2. Microbiological aspects. *Fleischwirtschaft* **83**, 96-100.
- Schobert,B. und Tscheche,H. (1978) Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **541**, 270-277.
- Schroeter,M., Roggentin,P., Hofmann,J., Speicher,A., Laufs,R. und Mack,D. (2004) Pet snakes as a reservoir for *Salmonella enterica* subsp *diarizonae* (serogroup IIIb): a prospective study. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 613-615.
- Schüppel,H. und Krüger,G. (1986) Behavior of Gram-negative bacteria towards sodium nitrite and sodium chloride. *Fleisch* **40**, 57-58.
- Sebranek,J.G. und Bacus,J.N. (2007) Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* **77**, 136-147.
- Seeliger,H.P.R. und Potel,J. (1969): Listeriose In: Grumbach, A., Bonin,O.; Die Infektion des Menschen und ihre Erreger, 2. Auflage, pp 1023- 1032, Stuttgart, Georg Thieme Verlag,
- Seeliger,H.P.R. (1984) Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clinical and Investigative Medicine* **7**, 217-221.
- Seeliger, H.P.R. und Jones, D. (1986): Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Hrsg.), S. 1235-1245
- Selbitz,H.J. and Sinell, AM. (1995) Das Salmonellen-Problem. Jena: Gustav-Fischer Verlag.
- Shelef,L.A. (1983) Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* **6**, 29-44.
- Shelef,L.A. (1989) Listeriosis and its transmission by Food. *Progress in Food and Nutrition Science* **13**, 363-382.
- Shukla,Y. und Kalra,N. (2007) Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Letters* **247**, 167-181.
- Shum,D.T. und Galsworthy,S.B. (1982) Stimulation of monocyte production by an endogenous mediator induced by a component from *Listeria monocytogenes*. *Immunology* **46**, 343-351.

- Sindelar,J., Cordray,J., Sebranek,J., Love,J. und Ahn,D. (2007) Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science* **6**, 388-395.
- Singh,R.V., Bhilegaonkar,K.N. und Agarwal,R.K. (2005) Studies on occurrence and characterization of *Clostridium perfringens* from select meats. *Journal of Food Safety* **25**, 146-156.
- Skovgaard,N. (1992) Microbiological aspects and technological need - Technological needs for nitrates and nitrites. *Food Additives and Contaminants* **9**, 391-397.
- Sleator,R.D., Gahan,C.G.M., Abee,T. und Hill,C. (1999) Identification and disruption of BetL, a secondary glycine betaine transport system linked to the salt tolerance of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology* **65**, 2078-2083.
- Sleator,R.D., Francis,G.A., O'Beirne,D., Gahan,C.G.M. und Hill,C. (2003) Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 839-846.
- Smith,D.K., Kassam,T., Singh,B. und Elliott,J.F. (1992) *Escherichia coli* has 2 homologous glutamate-decarboxylase genes that map to distinct loci. *Journal of Bacteriology* **174**, 5820-5828.
- Sonntag,A.K., Bielaszewska,M., Mellmann,A., Dierksen,N., Schierack,P., Wieler,L.H., Schmidt,M.A. und Karch,H. (2005) Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8855-8863.
- Sorrells,K.M., Enigl,D.C. und Hatfield,J.R. (1989) Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **52**, 571-573.
- Spiro,S. (2007) Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiology Reviews* **31**, 193-211.
- Standefer,J.C., Jones,A.M., Street,E. und Inserra,R. (1979) Death associated with nitrite ingestion - Report of a case. *Journal of Forensic Sciences* **24**, 768-771.
- Stanne,T.M., Pojidaeva,E., Andersson,F.I. und Clarke,A.K. (2007) Distinctive types of ATP-dependent Clp proteases in cyanobacteria. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 14394-14402.
- Stiebing,A. und Rödel,W. (1985) Effect of various climatic conditions on ripening of raw sausages. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 6394-6398.
- Stimeling,K.W., Graham,J.E., Kaenjak,A. und Wilkinson,B.J. (1994) Evidence for feedback (trans) regulation of, and two systems for, glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **140**, 3139-3144.
- Strom,A.R. und Kaasen,I. (1993) Trehalose metabolism in *Escherichia coli* - Stress protection and stress regulation of gene-expression. *Molecular Microbiology* **8**, 205-210.
- Sun-Young, L. (2004) Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. *Internet Journal of Food Safety*, **4**, 21-32.
- Switt,A.I., den Bakker,H.C., Cummings,C.A., Rodriguez-Rivera,L.D., Govoni,G., Raneiri,M.L., Degoricija,L., Brown,S., Hoelzer,K., Peters,J.E., Bolchacova,E., Furtado,M.R. und Wiedmann,M. (2012) Identification and characterization of novel *Salmonella* mobile elements involved in the

dissemination of genes linked to virulence and transmission. *Plos One* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0041247.

Talon,R., Lebert,I., Lebert,A., Leroy,S., Garriga,M., Aymerich,T., Drosinos,E.H., Zanardi,E., Ianieri,A., Fraqueza,M.J., Patarata,L. und Laukova,A. (2007) Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science* **77**, 570-579.

Tarawneh,K.A., Al-Tawarah,N.M., Abdel-Ghani,A.H., Al-Majali,A.M. und Khleifat,K.M. (2009) Characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolates from faeces of small ruminants and environmental samples in Southern Jordan. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 310-317.

Tasara,T., Bielaszewska,M., Nitzsche,S., Karch,H., Zweifel,C. und Stephan,R. (2008) Activatable Shiga toxin 2d (Stx2d) in STEC strains isolated from cattle and sheep at slaughter. *Veterinary Microbiology* **131**, 199-204.

Tassou,C.C., Drosinos,E.H. und Nychas,G.J.E. (1995) Effects of essential oil from mint (*Mentha-Piperita*) on *Salmonella-Enteritidis* and *Listeria-monocytogenes* in model food systems at 4-degrees and 10-degrees-C. *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 593-600.

Terentjeva,M. und Berzins, A (2010) Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in slaughter pigs in Latvia. *Journal of Food Protection* **73**, 1335-1338.

Terns,M., Milkowski,A., Rankin,S. und Sindelar,J. (2011) Determining the impact of varying levels of cherry powder and starter culture on quality and sensory attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science* **88**, 311-313.

Teuteberg,H.J. (1986) Der Fleischverzehr in Deutschland und seine strukturellen Veränderungen. In: Teuteberg,H.J. und Wiegelmann,H.G.; Unsere tägliche Kost. Geschichte und regionale Prägung, 2. Auflage, pp S. 63-73, Münster, Franz Steiner Verlag.

Thammavongs,B., Denou,E., Missous,G., Gueguen,M. und Panoff,J.M. (2008) Response to environmental stress as a global phenomenon in biology: The example of microorganisms. *Microbes and Environment*, **23**, 20-23.

Thevenot,D., Dernburg,A. und Vernozy-Rozand,C. (2006) An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 7-17.

Thiemig,F., Buhr,H. und Oelker,P. (2000): Gibt es Alternativen zum Pökeln mit Nitrit? *Fleischwirtschaft* **1**, 106-110.

Thomas,C., Prior,O. und O'Beirne,D. (1999) Survival and growth of *Listeria* species in a model ready-to-use vegetable product containing raw and cooked ingredients as affected by storage temperature and acidification. *International Journal of Food Science and Technology* **34**, 317-324.

Tilden,J., Young,W., McNamara,A.M., Custer,C., Boesel,B., LambertFair,M., Majkowski,J., Vugia,D., Werner,S.B., Hollingsworth,J. und Morris,J.G. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: Infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health* **86**, 1142-1146.

Timm,M., Klie,H., Richter,H., Gallien,P., Perlberg,K.W., Lehmann,S. und Protz,D. (1999) Detection and prevalence of Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in raw sausages. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **112**, 385-389.

- Tompkin,R.B., Christiansen,L.N. und Shaparis,A.B. (1978) Enhancing nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* with isoascorbate in perishable canned cured meat. *Applied and Environmental Microbiology* **35**, 59-61.
- Troxell,B., Fink,R.C., Porwollik,S., McClelland,M. und Hassan,H.M. (2011) The Fur regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: identification of new Fur targets. *Bmc Microbiology* **11**, doi:10.1186/1471-2180-11-236.
- Trusca,D., Scott,S., Thompson, C. und Bramhill,D. (1998) Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerisation of purified FtsZ cell division protein. *Journal of Bacteriology*, **180**, 3946–3953.
- Tsao,S.M. und Yin,M.C. (2001) In-Vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 646-649.
- Tschaep,H. und Bockemuehl,J. (2002) Foodborne Salmonellosis in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **45**, 491-496.
- Ultee,A. & Smid,E.J. (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 373-378.
- Underwood,S.A., Buszko,A.L., Shanmugam,K.T. und Ingram,L.O. (2004) Lack of protective osmolytes limits final cell density and volumetric productivity of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 during xylose fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2734-2740.
- Uyttendaele,M., Vankeirsbilck,S., und Debevere,J. (2001) Recovery of heat-stressed *E.coli* O157:H7 from ground beef and survival of *E. coli* O157:H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7 degrees C and 22 degrees C. *Food Microbiology* **18**, 511–519.
- Vail,K.M., McMullen,L.M. und Jones,T.H. (2012) Growth and filamentation of cold-adapted, log-phase *Listeria monocytogenes* exposed to salt, acid, or alkali stress at 3°C. *Journal of Food Protection*, **75**, 2142-2150.
- van Loon,A.J.M., Botterweck,A.A.M., Goldbohm,R.A., Brants,H.A.M., van Klaveren,J.D. und van den Brandt,P.A. (1998) Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *British Journal of Cancer* **78**, 129-135.
- Van Wonderen,J.H., Burlat,B., Richardson,D.J., Cheesman,M.R. und Butt,J.N. (2008) The nitric oxide reductase activity of cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **15**, 9587-9594.
- VDF (2011) Fleischmarktentwicklung in Deutschland. www.food-monitor.de/2011/05/positive-marktentwicklung-fuer-fleisch-und-fleischwaren/themenfelder/markt-und-produkte
- Verheul,A., Rombouts,F.M., Beumer,R.R. und Abee,T. (1995) An *Atp*-dependent L-Carnitine transporter in *Listeria monocytogenes* Scott-A is involved in osmoprotection. *Journal of Bacteriology* **177**, 3205-3212.
- Verheul,A., Glaasker,E., Poolman,B. und Abee,T. (1997) Betaine and L-carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. *Journal of Bacteriology* **179**, 6979-6985.
- Viala,J.P., Meresse,S., Pocachard,B., Guilhon,A.A., Aussel,L. und Barras,F. (2011) Sensing and adaptation to low pH mediated by inducible amino acid decarboxylases in *Salmonella*. *Plos One* **6**. doi: 10.1371/journal.pone.0022397.

- Walk, G.C. (1996) The SOS response of *E. coli*. Neidhart, F.C., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. and Umbarger, H.E. (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press, Washington (1996), pp. 1400–1416.
- Walker, R. (1990) Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: A review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives and Contaminants* **7**, 717-768.
- Wallis, T.S., Starkey, W.G., Stephen, J., Haddon, S.J., Osborne, M.P. und Candy, D.C.A. (1986) Enterotoxin production by *Salmonella* Typhimurium strains of different virulence. *Journal of Medical Microbiology* **21**, 19-23.
- Weagant, S.D., Bryant, J.L. und Bark, D.H. (1994) Survival of *Escherichia coli* O157-H7 in Mayonnaise and Mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection* **7**, 629-631.
- Weinstein, D.L., Jackson, M.P., Samuel, J.E., Holmes, R.K. und O'Brien, A.D. (1988): Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin typ II variant from *Escherichia coli* strains responsible for edema disease of swine. *Journal of Bacteriology* **170**, 4223-4230.
- Weis, J. und Seeliger, H.P.R. (1975) Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Applied Microbiology* **30**, 29-32.
- Welinder-Olsson, C., Stenqvist, K., Badenfors, M., Brandberg, A., Floren, K., Holm, M., Holmberg, L., Kjellin, E., Marild, S., Studahl, A. und Kaijser, B. (2004) EHEC outbreak among staff at a children's hospital - use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. *Epidemiology and Infection* **132**, 43-49.
- Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., Hauri, A.M., Roggentin, P., Prager, R., ST Fisher, I., Behnke, S.C., Bartelt, E., Weise, E., Ellis, A., Siitonen, A., Andersson, Y., Tschape, H., Kramer, M.H. und Ammon, A. (2005) International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infectious Diseases* **5**, doi:10.1186/1471-2334-5-7.
- Wesierska, E., Korzekwa, K., Foks, S. und Mickowska, B. (2013) Influence of microflora composition on safety and colour parameters of „kumpia wieprzowa“ during ripening. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **16**, 299-305.
- Whatmore, A.M. und Reed, R.H. (1990) Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *Journal of General Microbiology* **136**, 2521-2526.
- White P.B. (1926) Further studies of the *Salmonella* group. *Great Britain Medical Research Council* **103**, 3-160.
- Wieneke, A.A., Roberts, D. und Gilbert, R.J. (1993) Staphylococcal food poisoning in the United-Kingdom, 1969-90. *Epidemiology and Infection* **110**, 519-531.
- Wijnker, J.J., Koop, G. und Lipman, L.J.A. (2006) Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* **23**, 657-662.
- Wild, D. (2003) Cancer from nitrite-cured meat products? *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach* **42**, 361-367.
- Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S. und Keefer, L.K. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**, 1001–1003.

Wirth,F., Leistner,L. und Rödel,W. (1975) Recommended physical parameters for meat technology. III. 7. Raw sausages, 8. Raw cured meat products. *Fleischwirtschaft* 55, 1516-1518.

Wirth,F. (1984) Water binding, fat binding and structure formation. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach* 6132-6139.

Wirth,F. (1991) Restricting and dispensing with curing agents in meat-products. *Fleischwirtschaft* **71**, 1051-1054.

Woods,L.F.J., Wood,J.M. und Gibbs,P.A. (1981) The involvement of nitric-oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium-nitrite. *Journal of General Microbiology* **125**, 399-406.

Woods,L.F.J. und Wood,J.M. (1982) A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *Journal of Applied Bacteriology* **52**, 109-110.

Wooldridge,K.G. und Williams,P.H. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 325-348.

Xi,Y., Sullivan,G., Jackson,A., Zhou,G. und Sebranek,J.G. (2011) Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. *Meat Science* **88**, 503-511.

Xu,Y.S., Xia,W.S., Yang,F., Kim,J.M. und Nie,X.H. (2010) Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. *Food Chemistry* **118**, 512-518.

Yancey,P.H., Clark,M.E., Hand,S.C., Bowler,R.D., und Somero, G.D. (1982) Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1212-1222.

Zaika,L.L., Kim,A.H. und Ford,L. (1991) Effect of sodium-nitrite on growth of *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection* **54**, 424-428.

Zeegers,M.P., Selen,R.F., Kleinjans,J.C., Goldbohm,R. und van den Brandt,P. A. (2006) Nitrate intake does not influence bladder cancer risk: The Netherlands Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* **114**, 1527-1531.

Zellmeier,S., Schumann,W. und Wiegert,T. (2006) Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* sigma(W) stress response. *Molecular Microbiology* **61**, 1569-1582.

Zhang,L., Moosekian,S.R., Todd,E.C.D. und Ryser,E.T. (2012) Growth of *Listeria monocytogenes* in different retail delicatessen meats during simulated home storage. *Journal of Food Protection* **75**, 896-905.

Zhang,W. L., Bielaszewska,M., Kuczius,T. und Karch, H. (2002) Identification, characterization and distribution of a Shiga Toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1441-1446.

Gesetze und Verordnungen

Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB (2005).

NitritGDV RP - Landesverordnung zur Durchführung des Gesetzes über die Verwendung salpetriger Salze im Lebensmittelverkehr (Nitritgesetz vom 19. Juni 1934, RGBl. I S. 513).

Richtlinie Nr. 95/2/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 20. Februar 1995 über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel.

Richtlinie 2006/52/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 5. Juli 2006 zur Änderung der Richtlinie 95/2/EG über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel sowie der Richtlinie 94/35/EG über Süßungsmittel, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen (2006).

Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (1991).

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 (2002).

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (2005).

Verordnung (EG) Nr. 780/2006 der Kommission vom 24. Mai 2006 zur Änderung des Anhangs VI der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (2006).

Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates vom 28. Juni 2007 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 2092/91.

Verordnung (EG) Nr. 889/2008 der Kommission vom 5. September 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen hinsichtlich der ökologischen/biologischen Produktion, Kennzeichnung und Kontrolle.

Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe.

Verordnung (EU) Nr. 1129/2011 der Kommission vom 11. November 2011 zur Änderung des Anhangs II der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates im Hinblick auf eine Liste der Lebensmittelzusatzstoffe der Europäischen Union.

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZZuLV) (1998).

7 Anhang

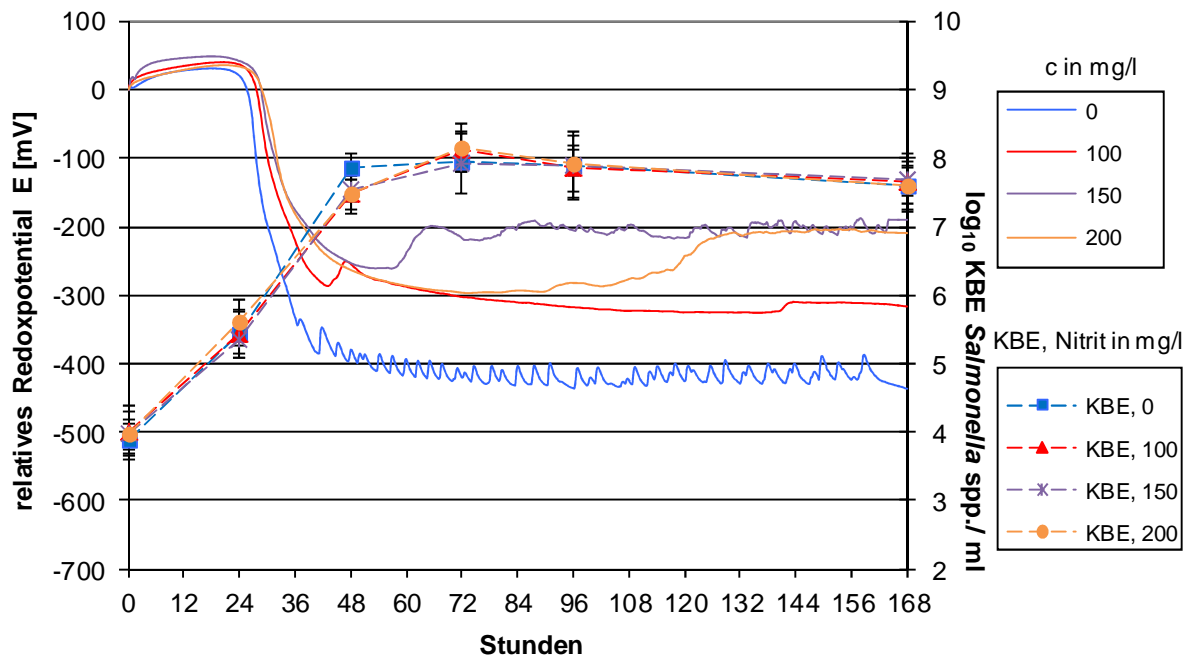


Abb.8: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

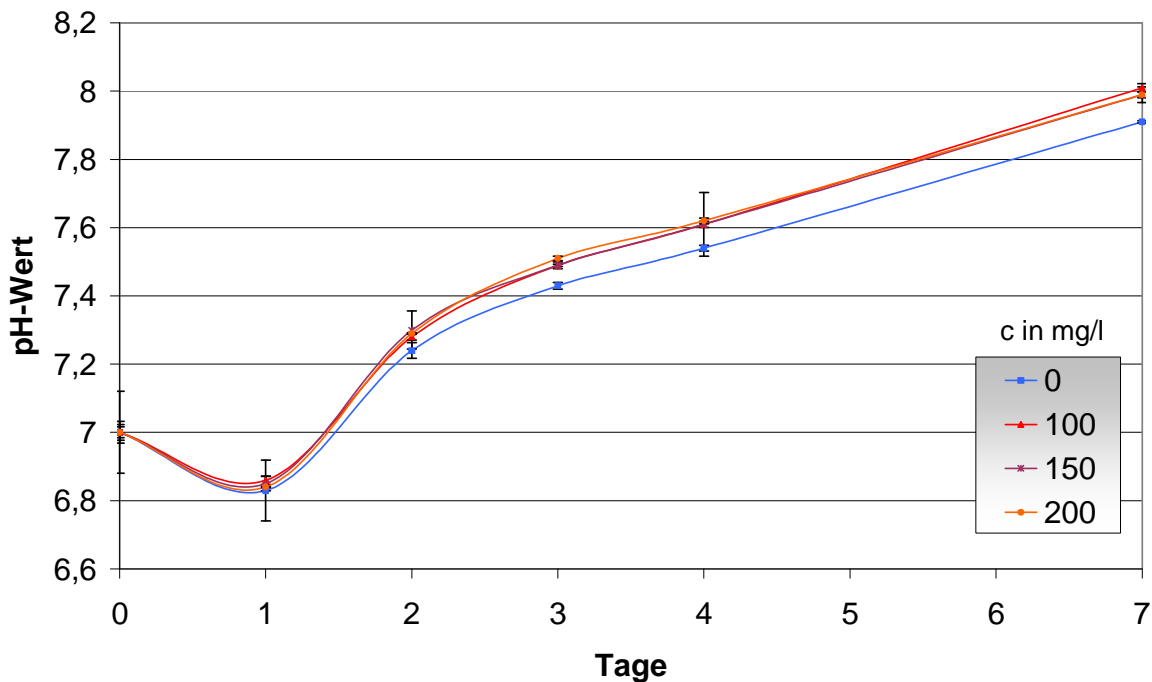


Abb.10: Verlauf der pH-Werte in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, a_w : 0,975, pH 7 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

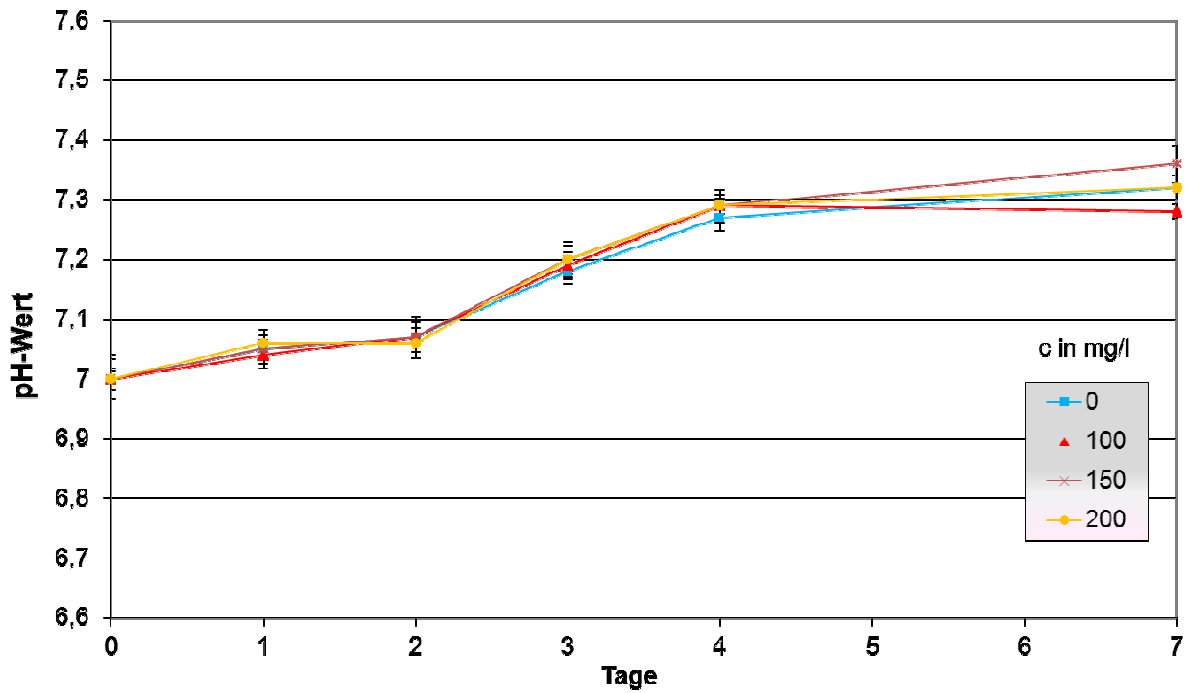


Abb.11:Verlauf der pH-Werte in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, a_w : 0,965, pH 7 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

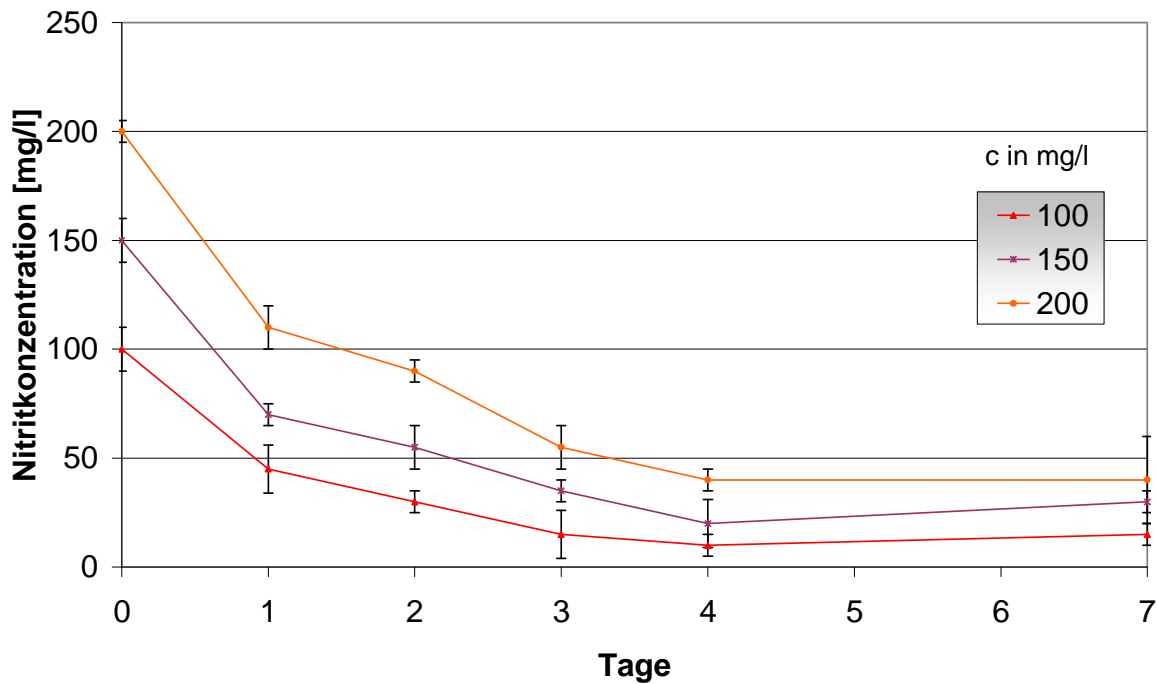


Abb.12:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C und a_w : 0,975. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

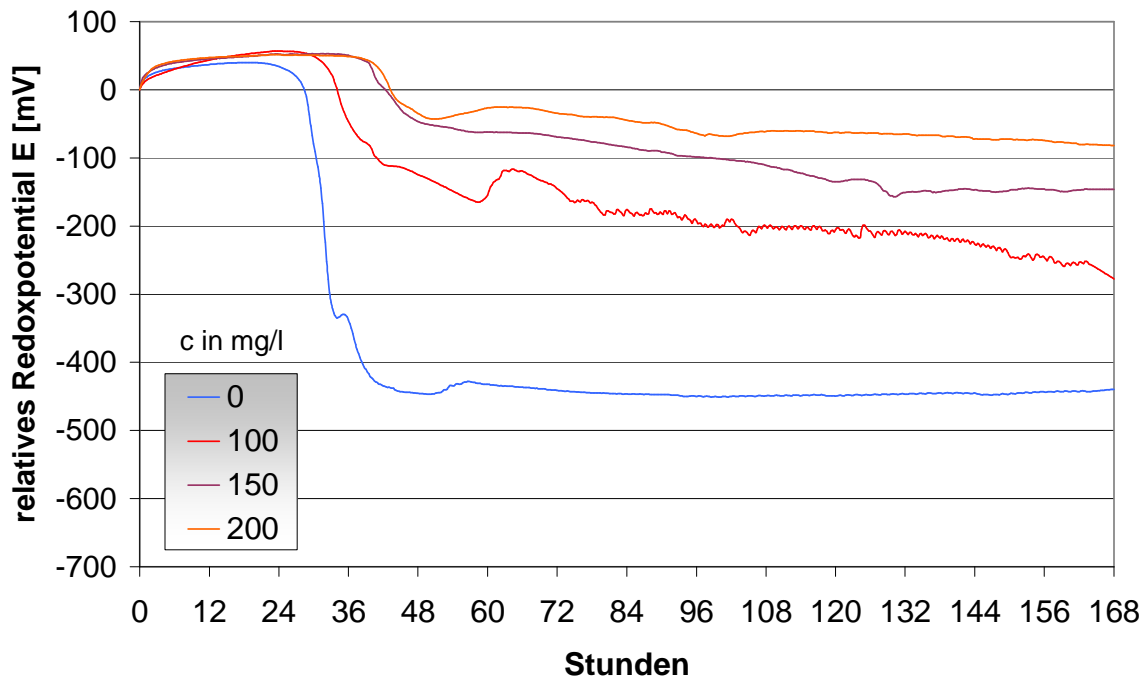


Abb.14: Einfluss verschiedener Konzentrationen von Natriumnitrit c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf bei *Salmonella* spp. bei pH 6, a_w : 0,965, 25 °C in Peptonwasser; Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus der Messung von Dreifachansätzen.

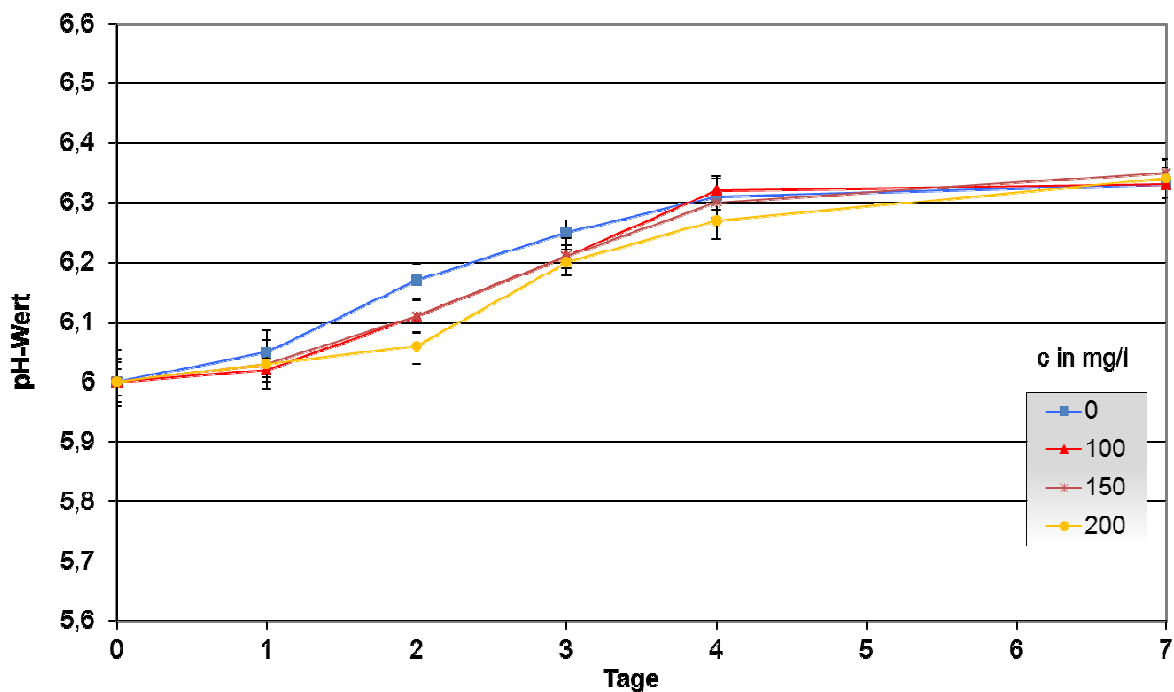


Abb.15: Verlauf der pH-Werte in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, a_w : 0,965, pH 6 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

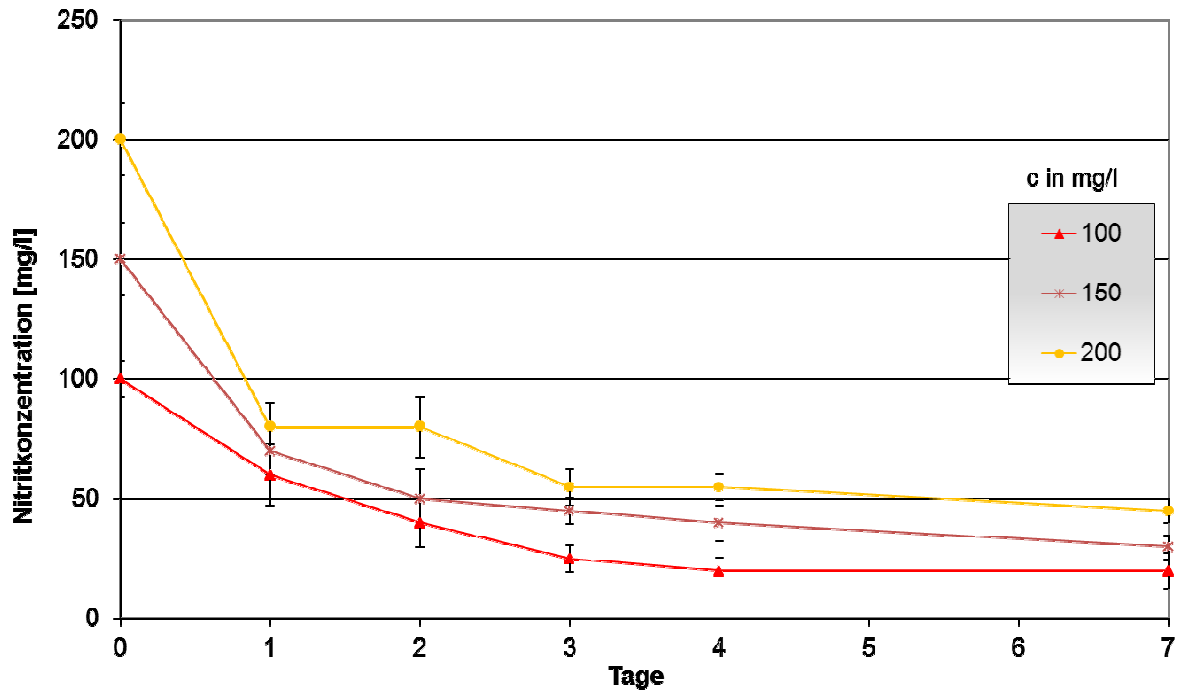


Abb.16:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

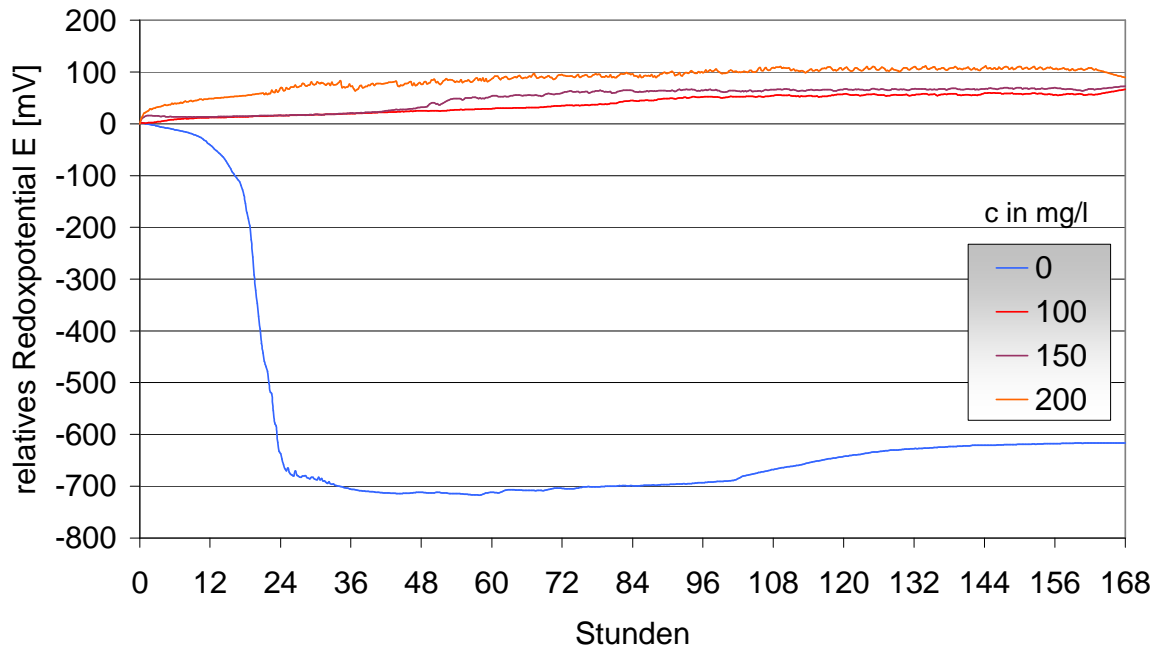


Abb.18:Einfluss verschiedener Konzentrationen von Natriumnitrit c (0, 100, 150 und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf bei *Salmonella* spp. bei pH 5, a_w : 0,99, 25 °C in Peptonwasser; Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus der Messung von Dreifachansätzen.

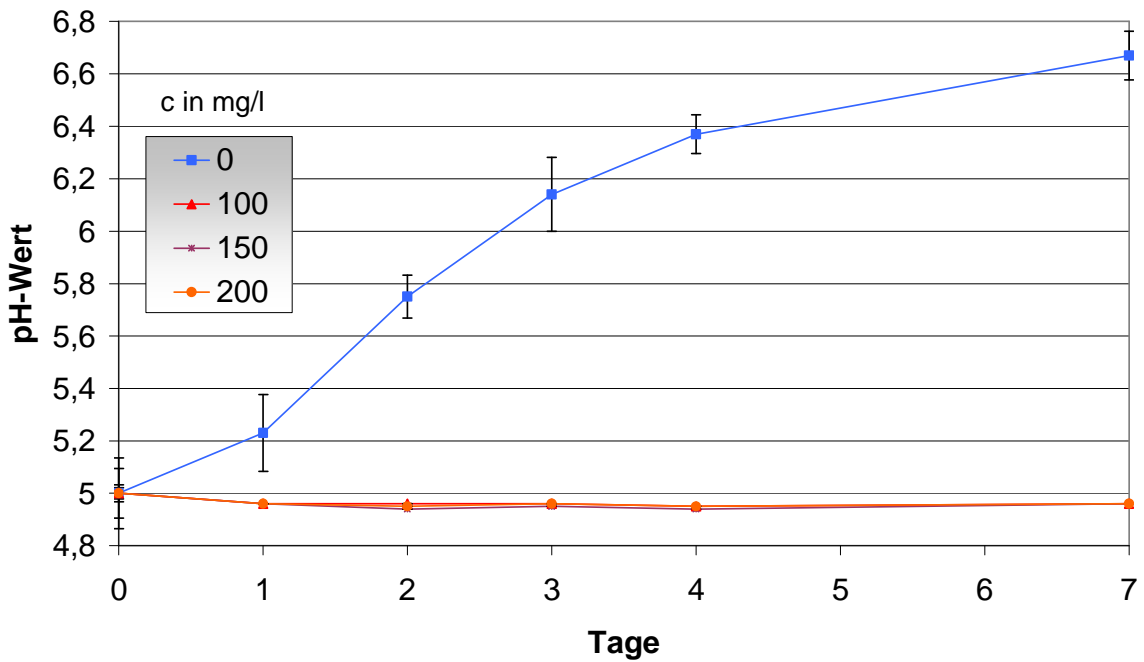


Abb.19:Verlauf der pH-Werte in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, a_w : 0,99, pH 5 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

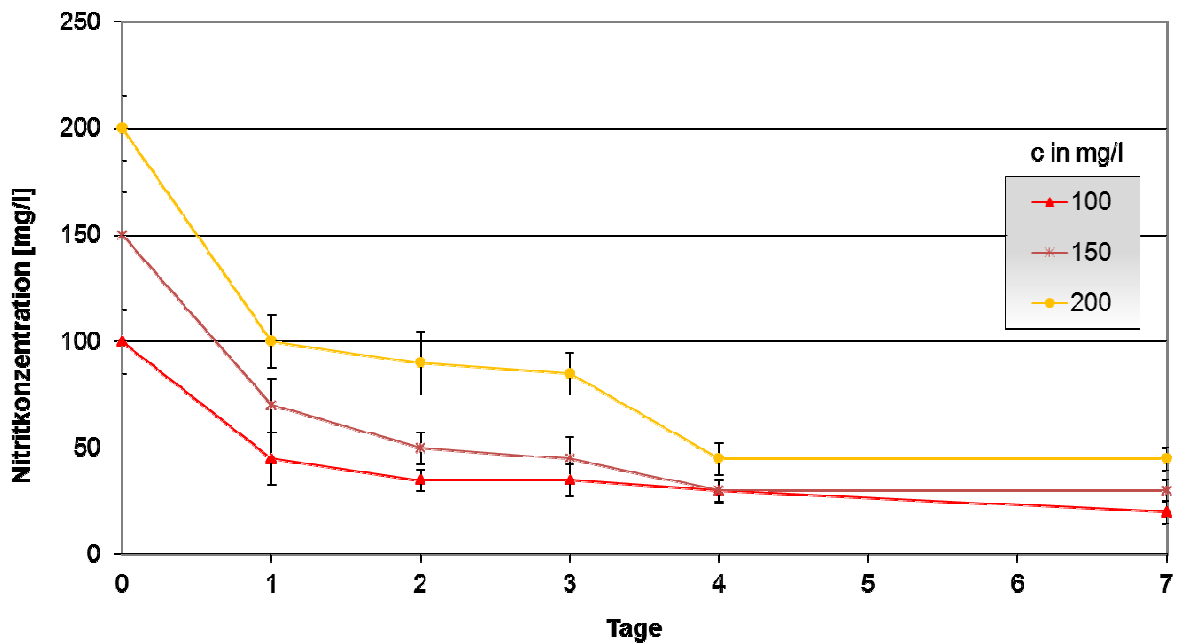


Abb.20:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Peptonwasser (inokuliert mit *Salmonella* spp.) bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

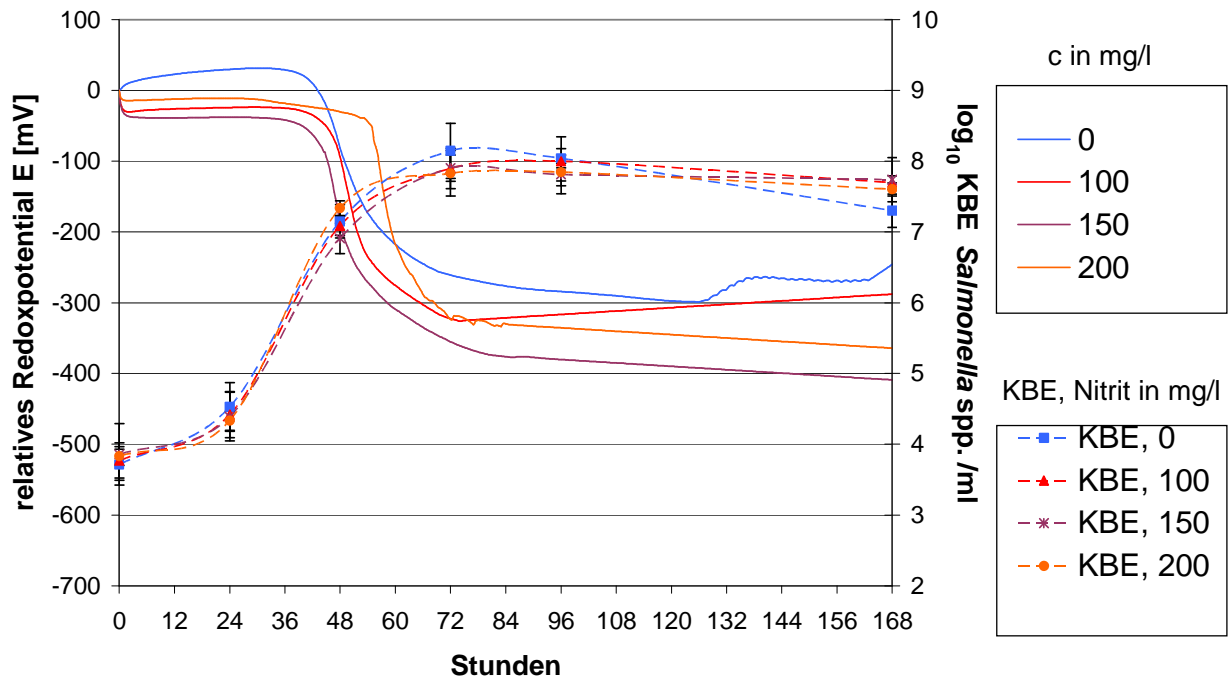


Abb.21: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

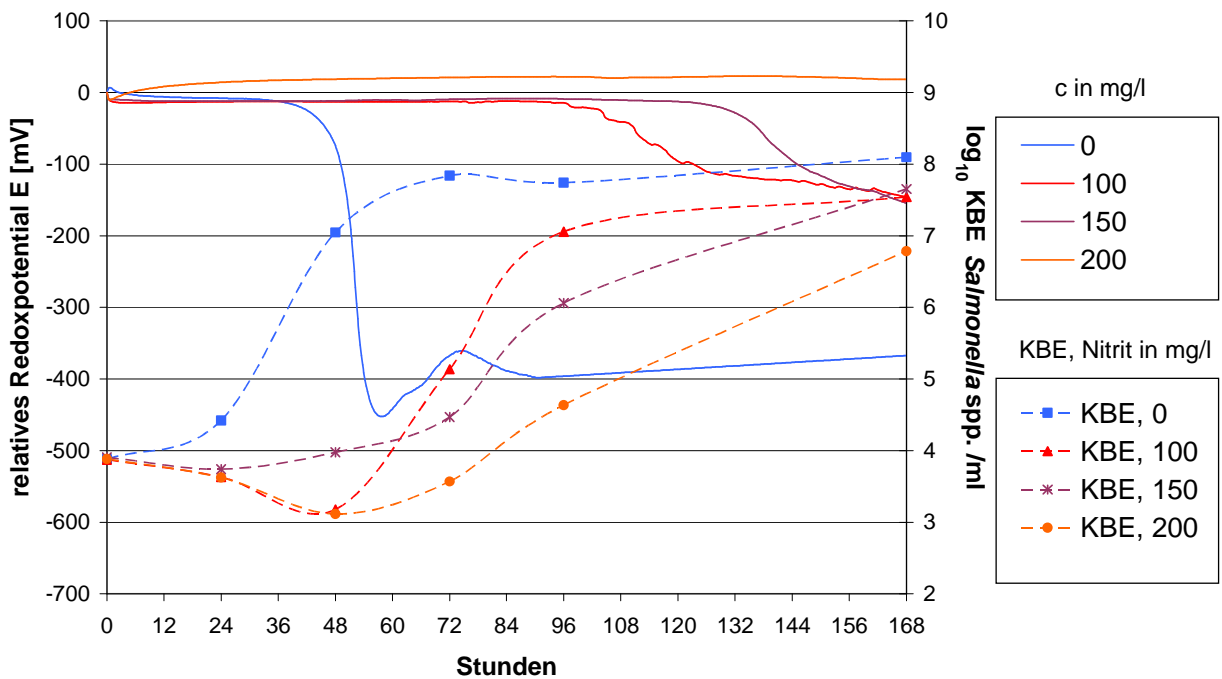


Abb.22: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

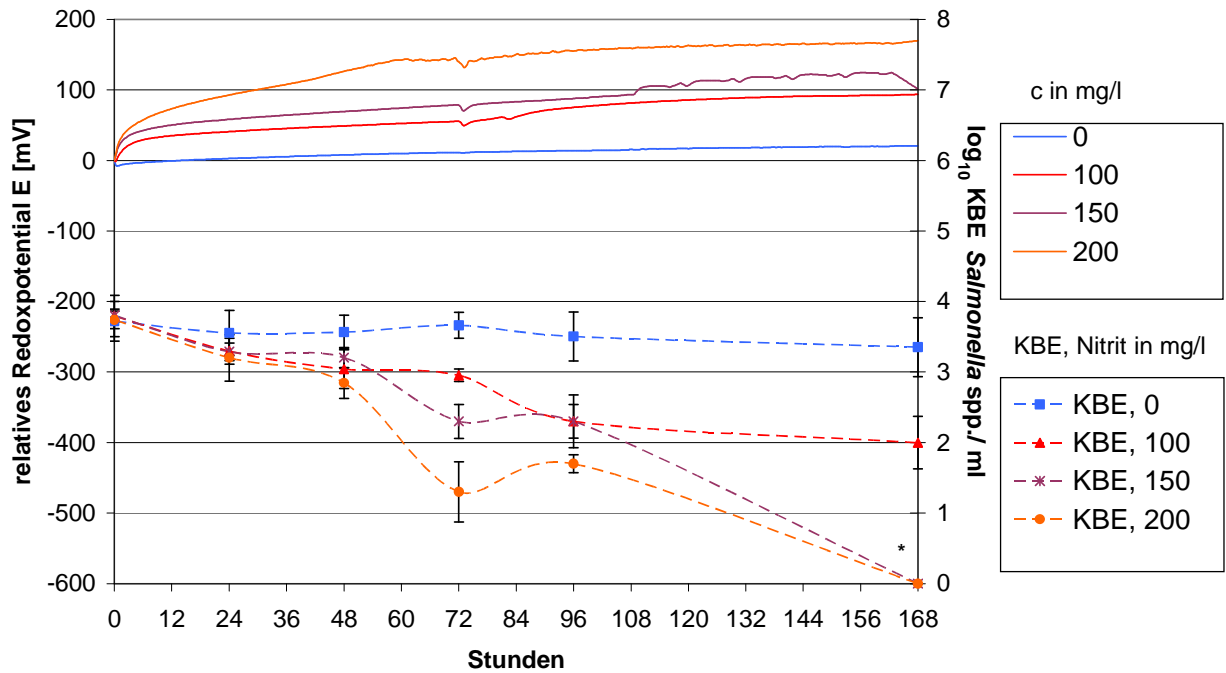


Abb.25: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Keime mehr möglich

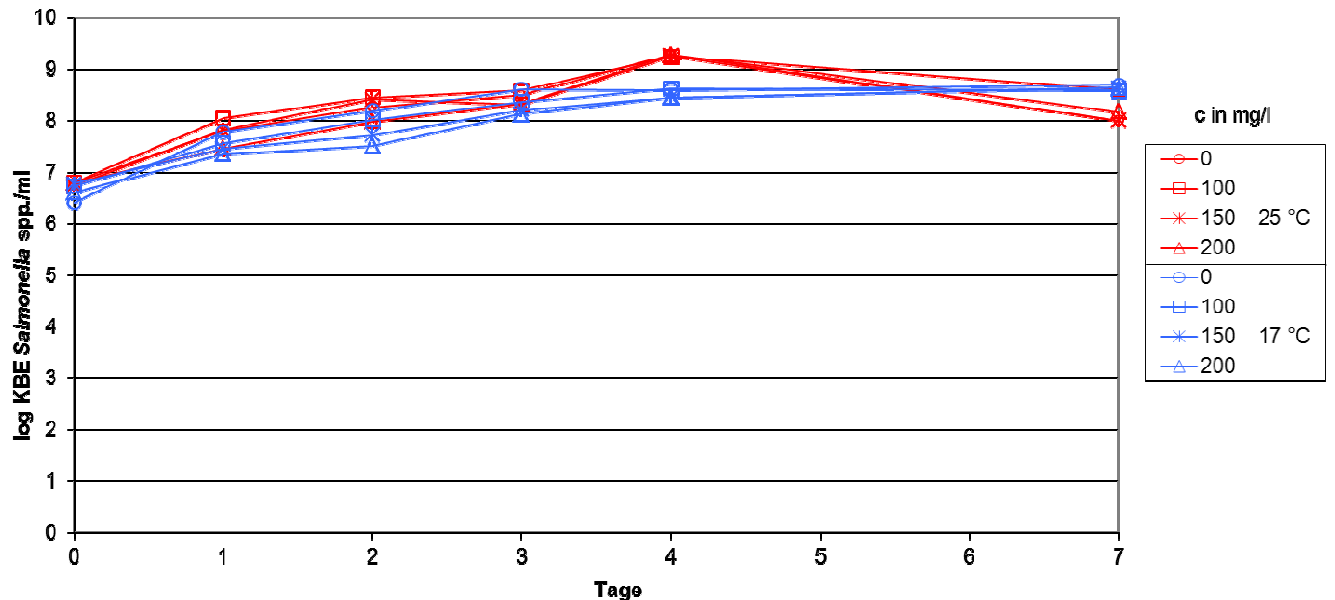


Abb.28: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei pH 6, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

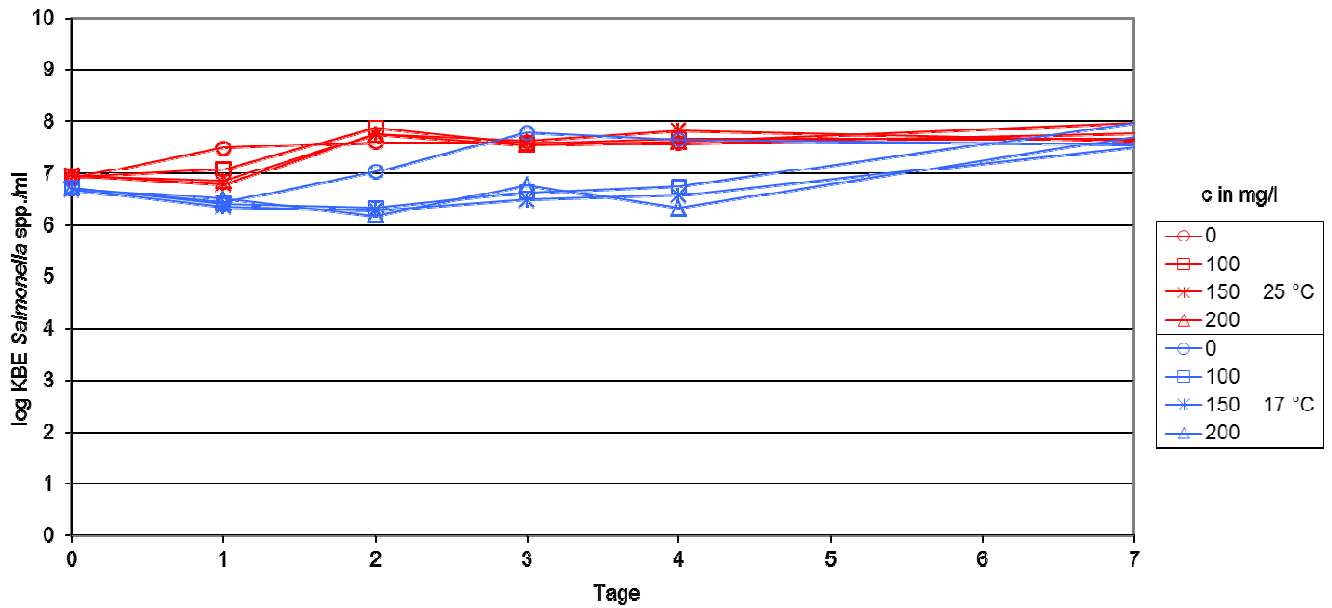


Abb.29: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei pH 6, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

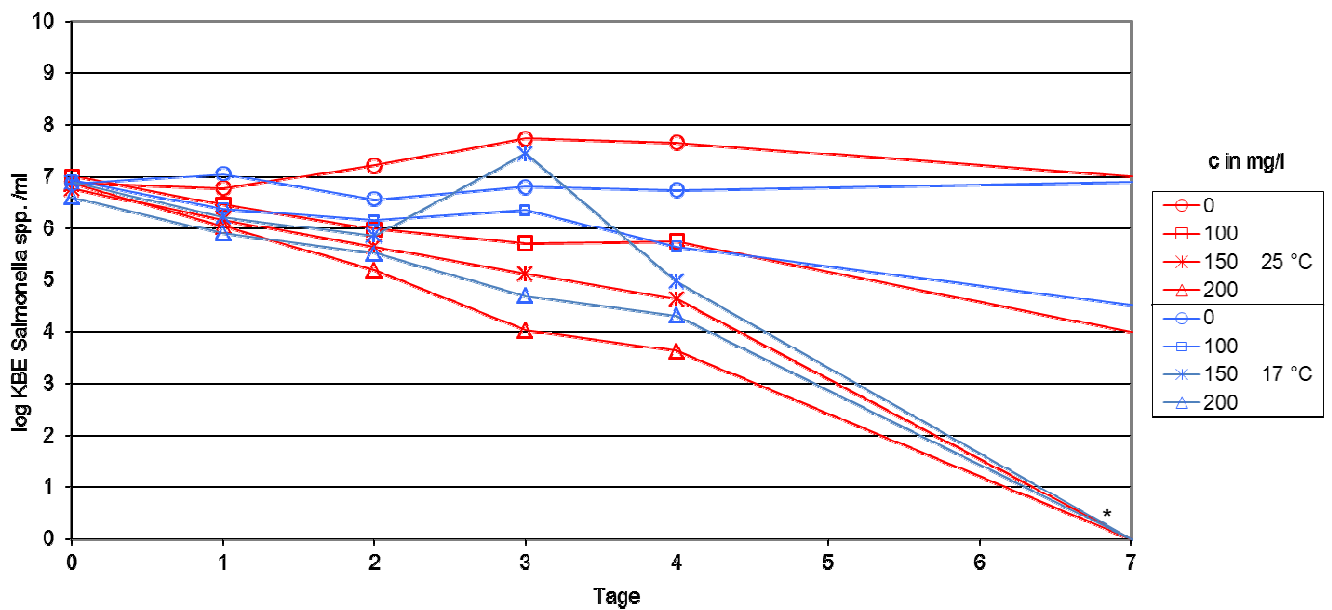


Abb.31: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Salmonella* spp. in Peptonwasser bei pH 5, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Keime mehr möglich

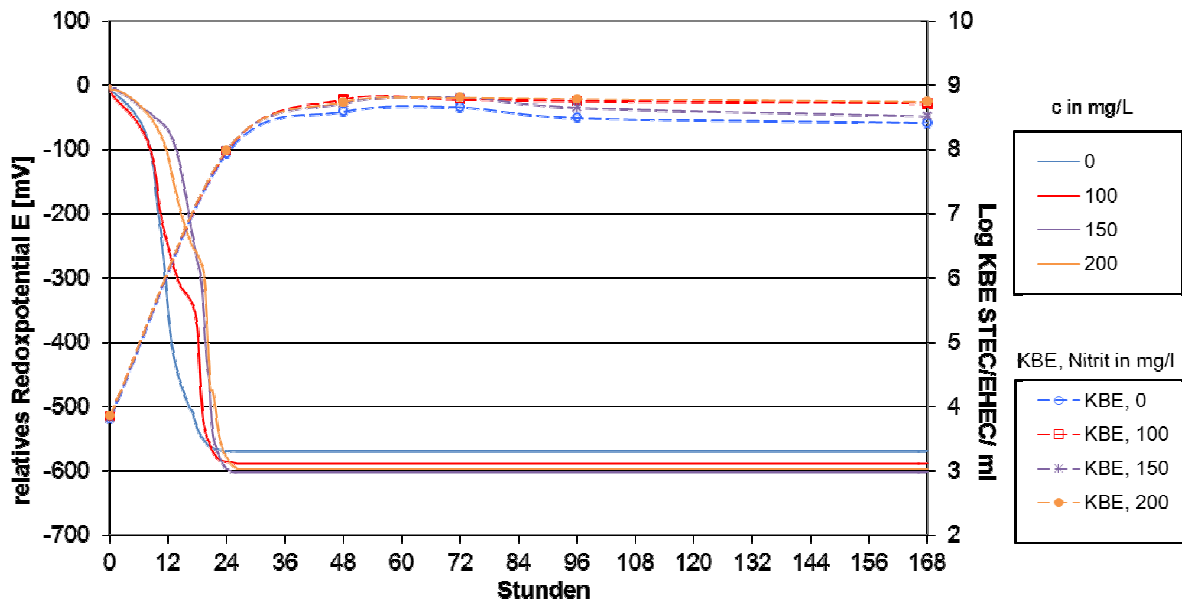


Abb.32: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_W : 0,99; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

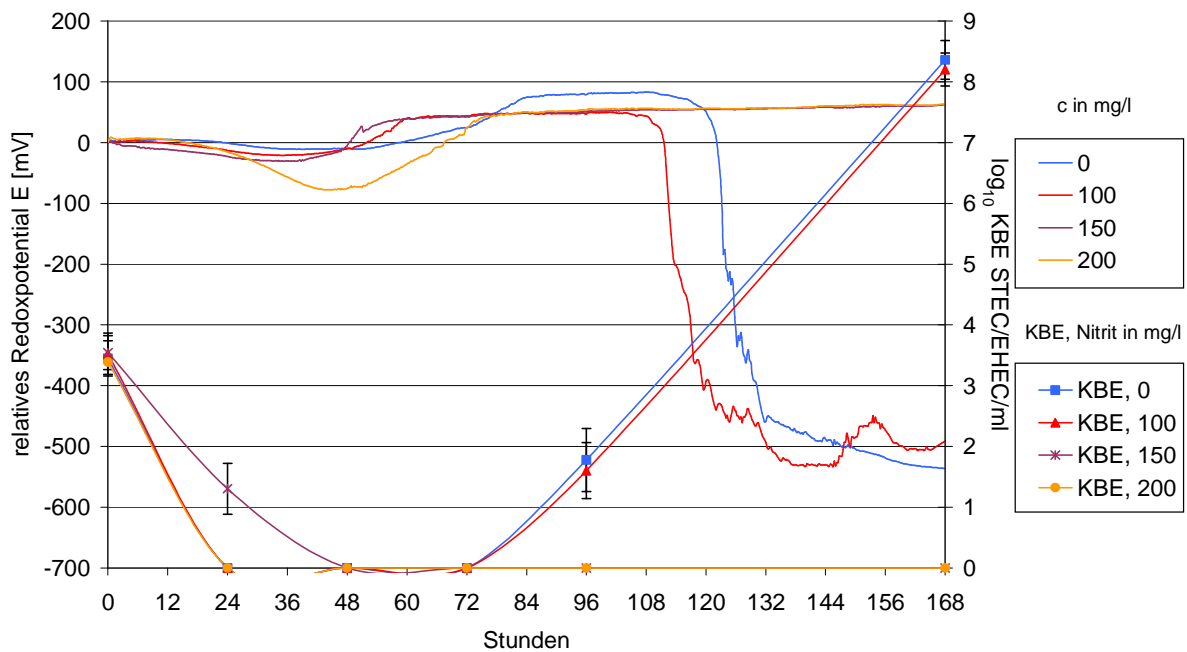


Abb.34: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_W : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

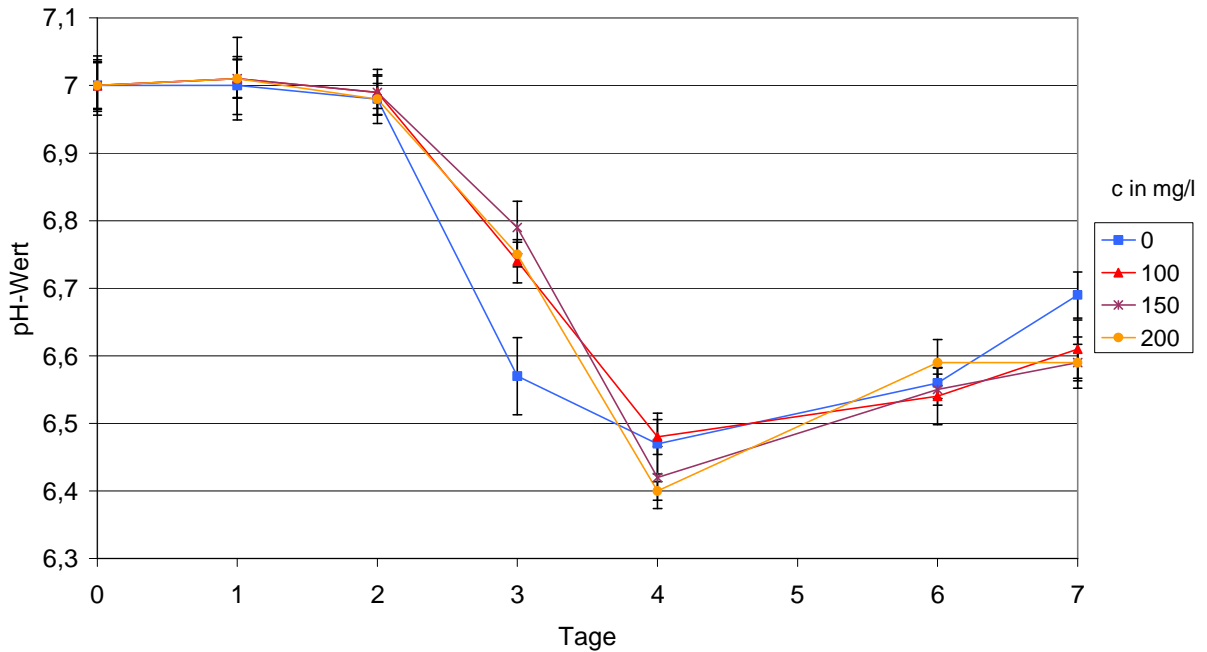


Abb.35:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, a_w : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

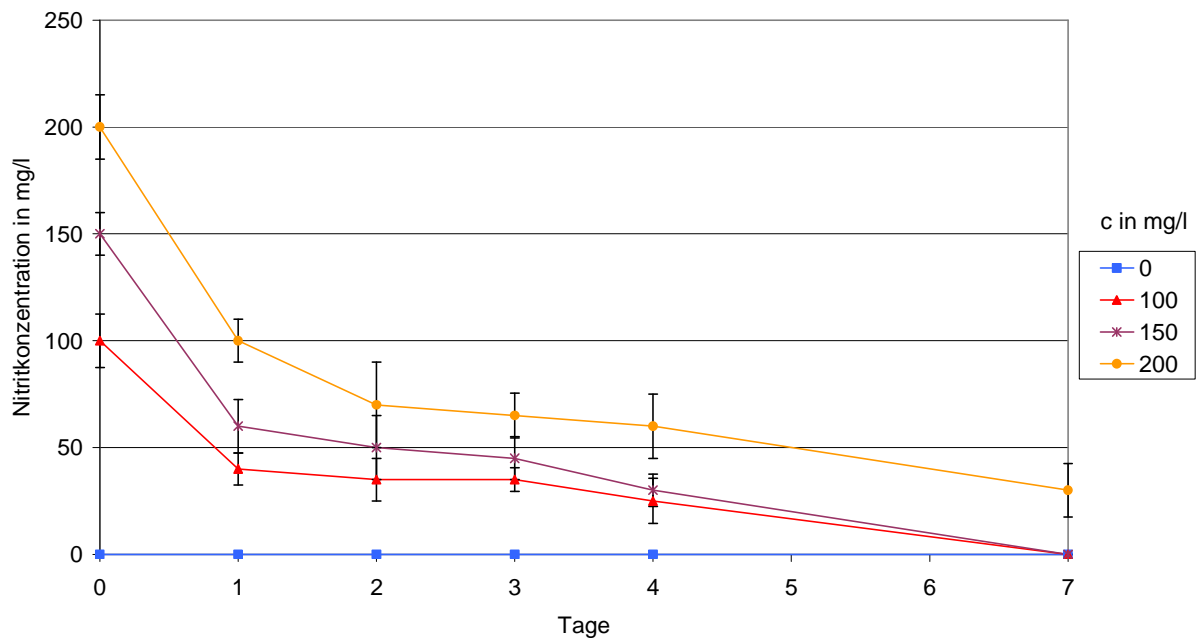


Abb.36:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

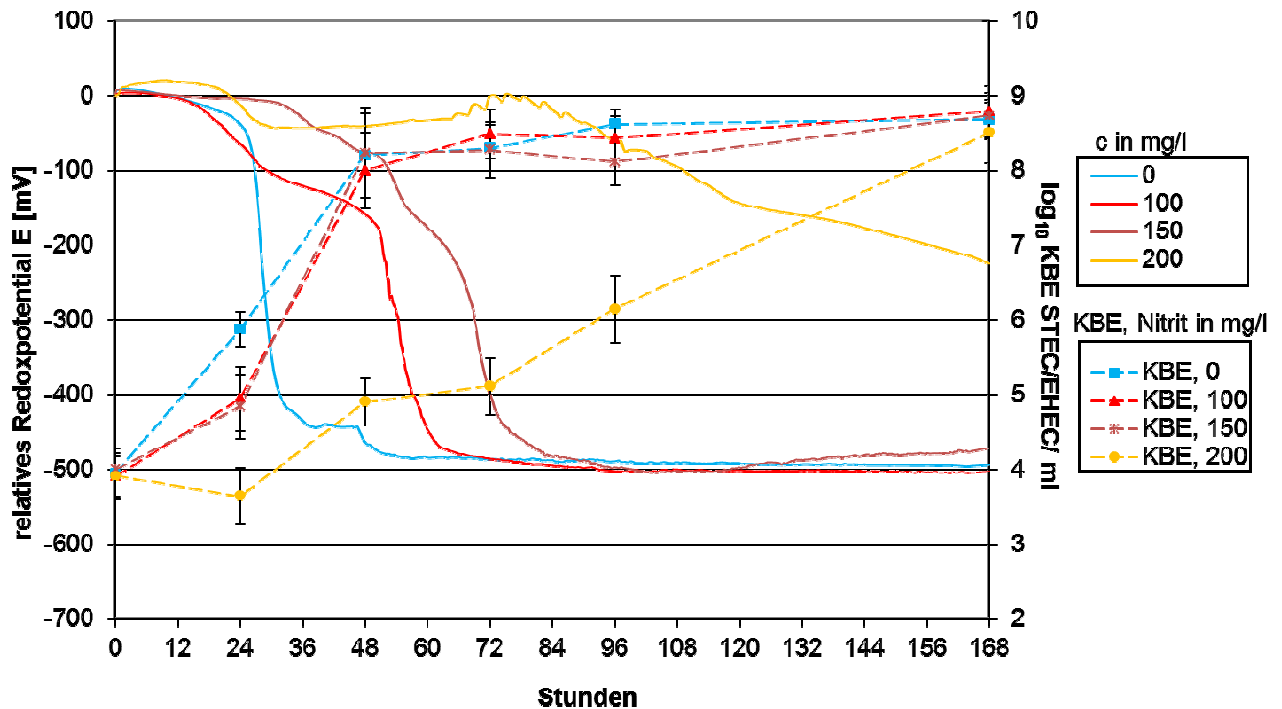


Abb.38: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

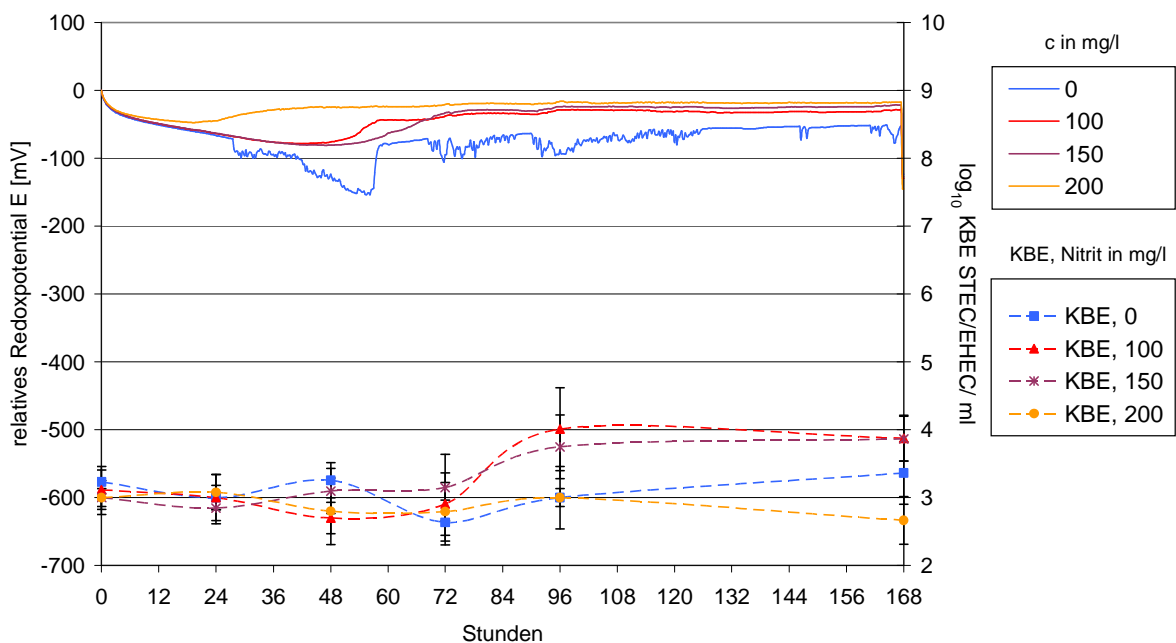


Abb.39: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

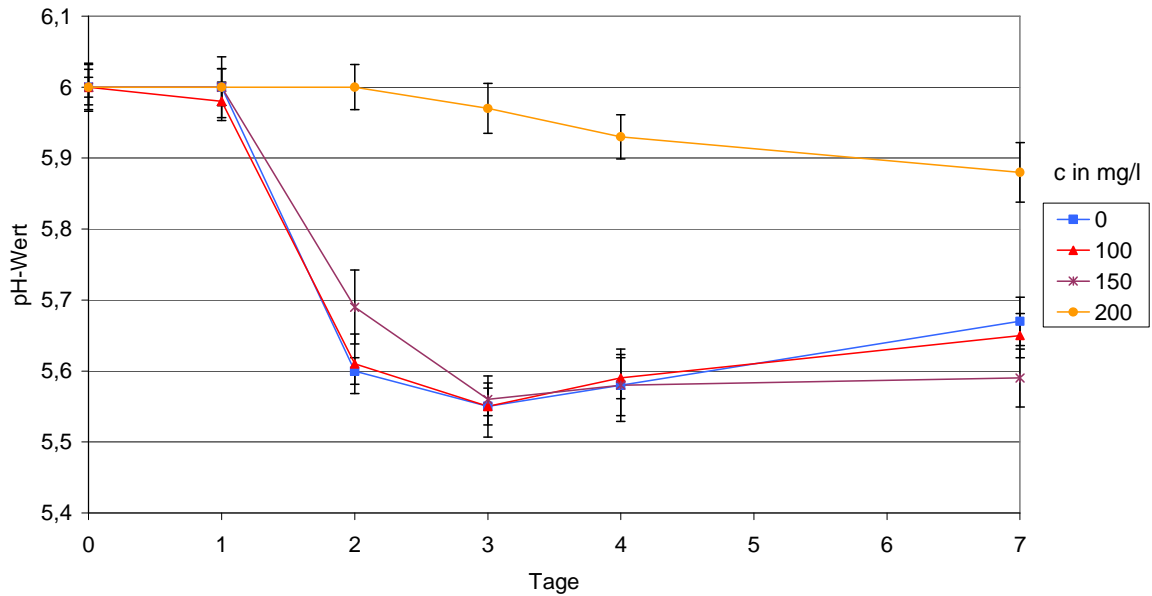


Abb.40:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 6, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

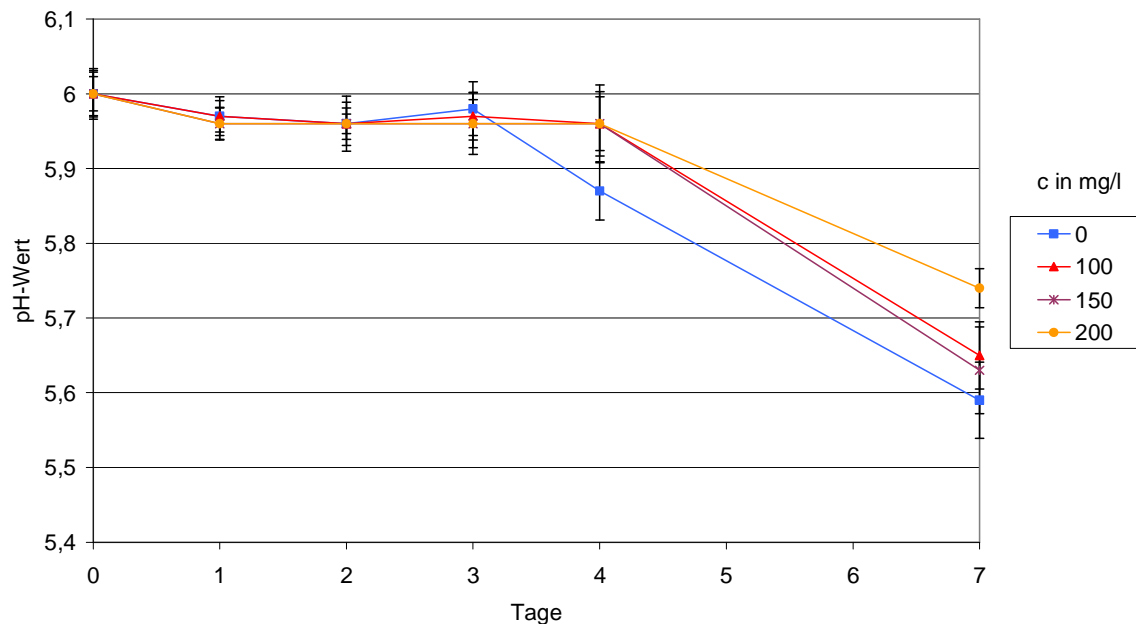


Abb.41:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 6, a_w : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

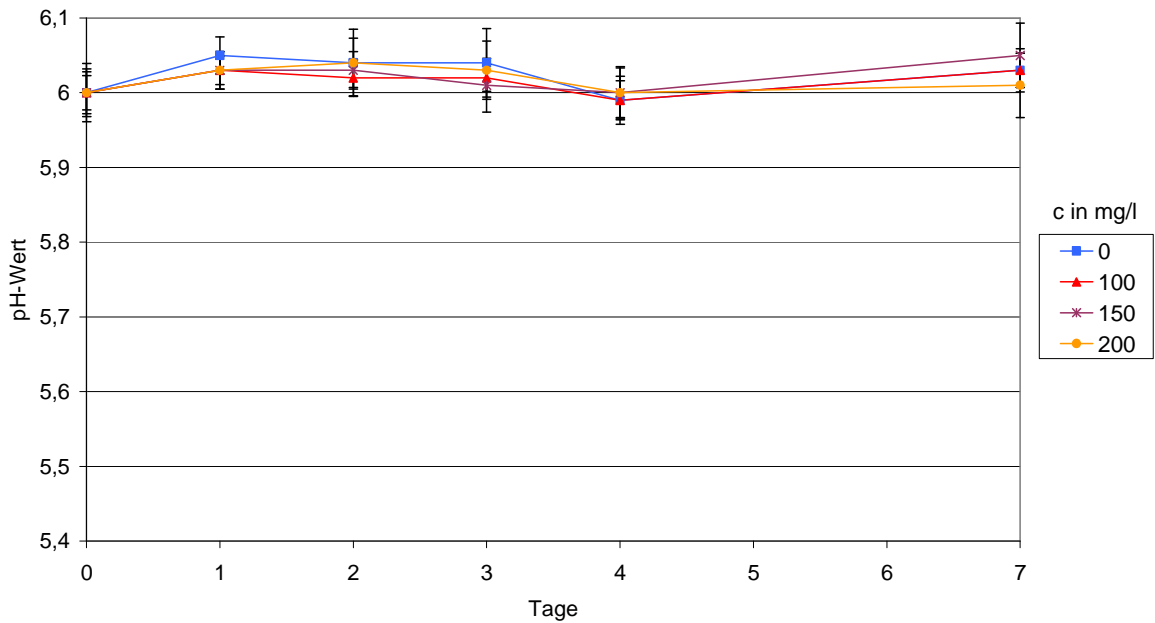


Abb.42:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 6, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

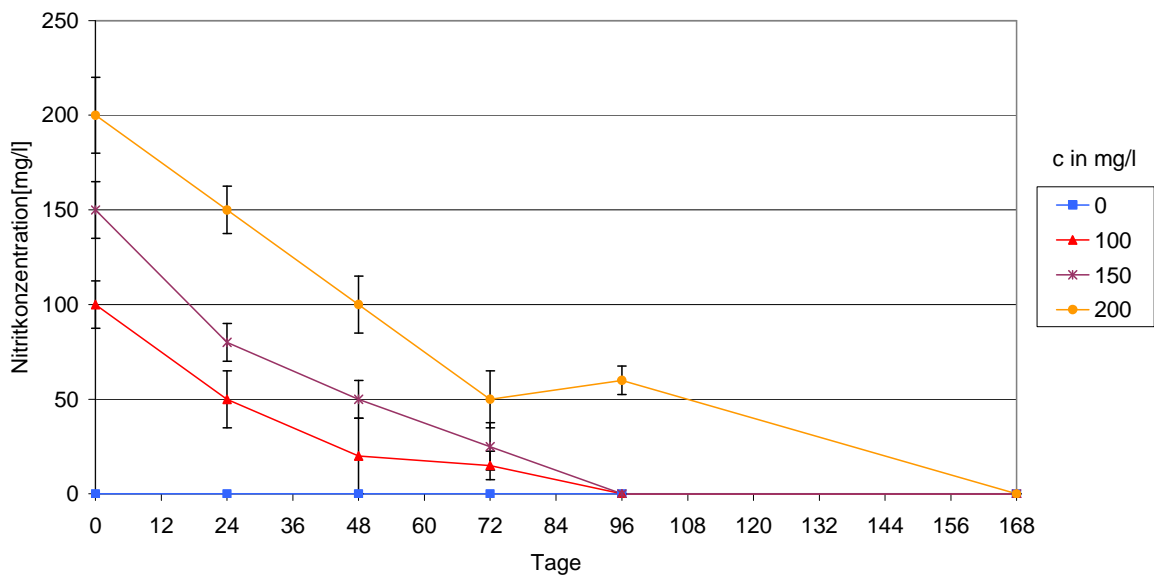


Abb.43:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,975. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

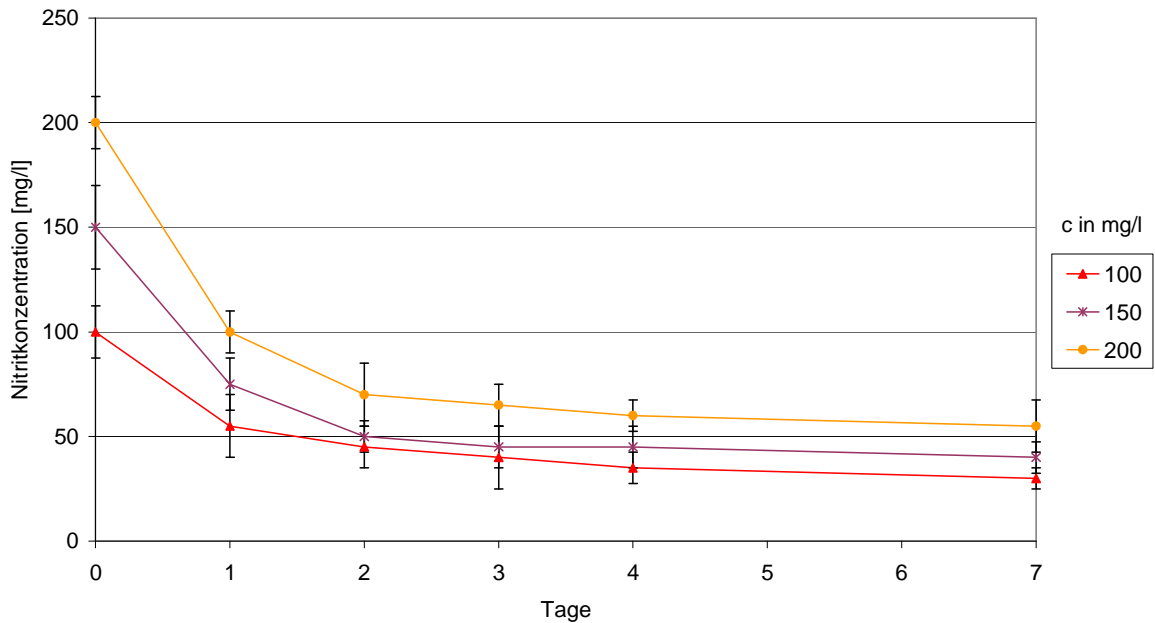


Abb.44:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

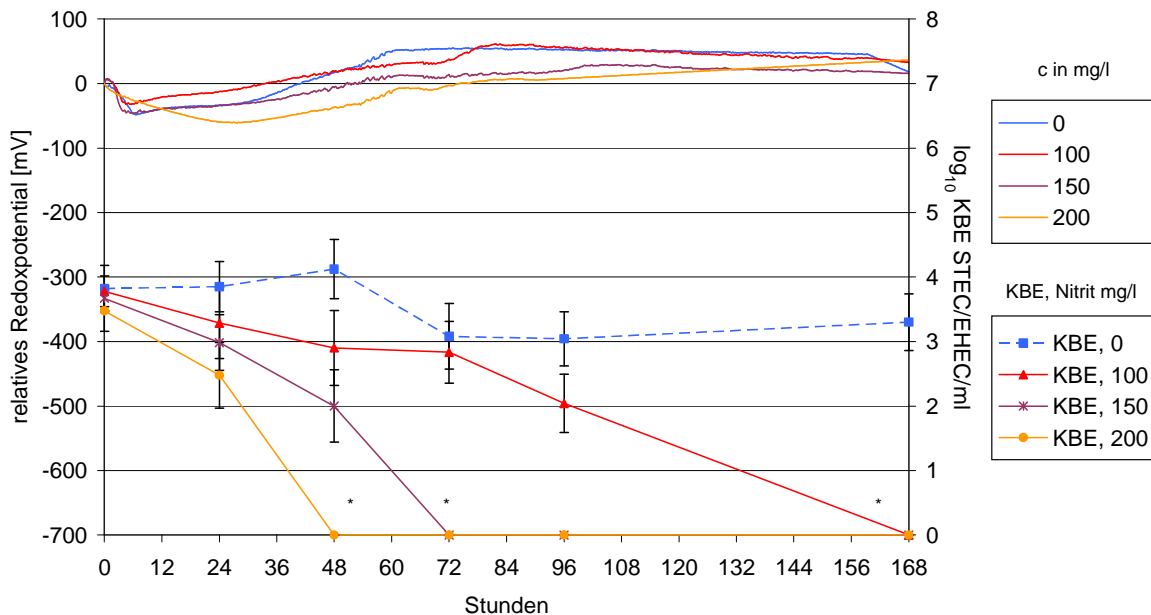


Abb.46:Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Keime mehr möglich

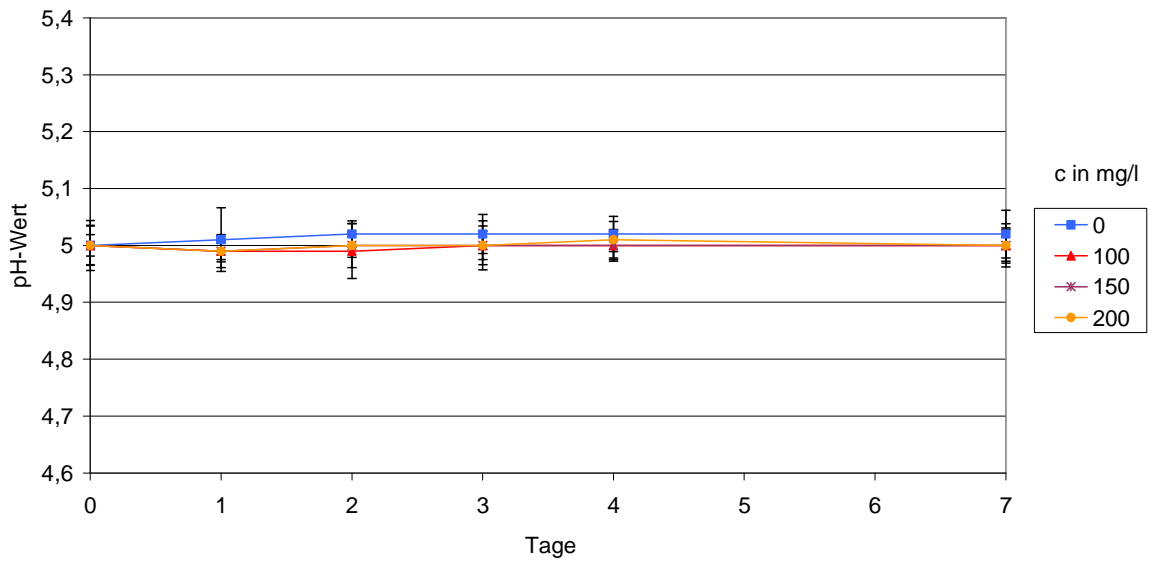


Abb.47:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 5, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

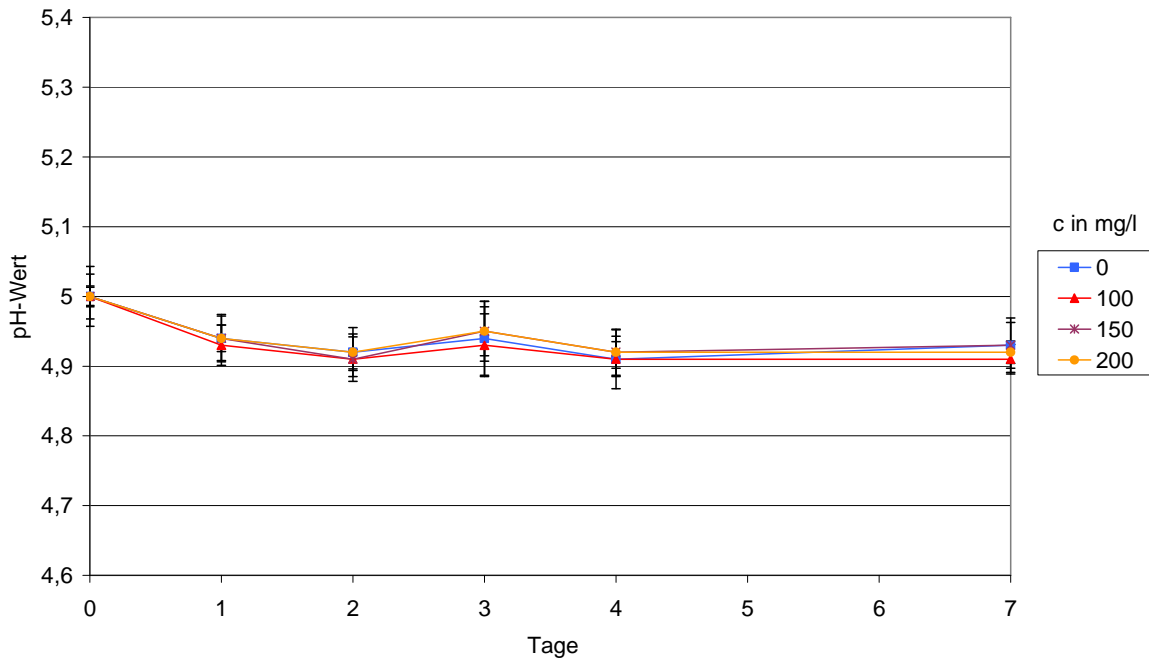


Abb.48:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 5, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

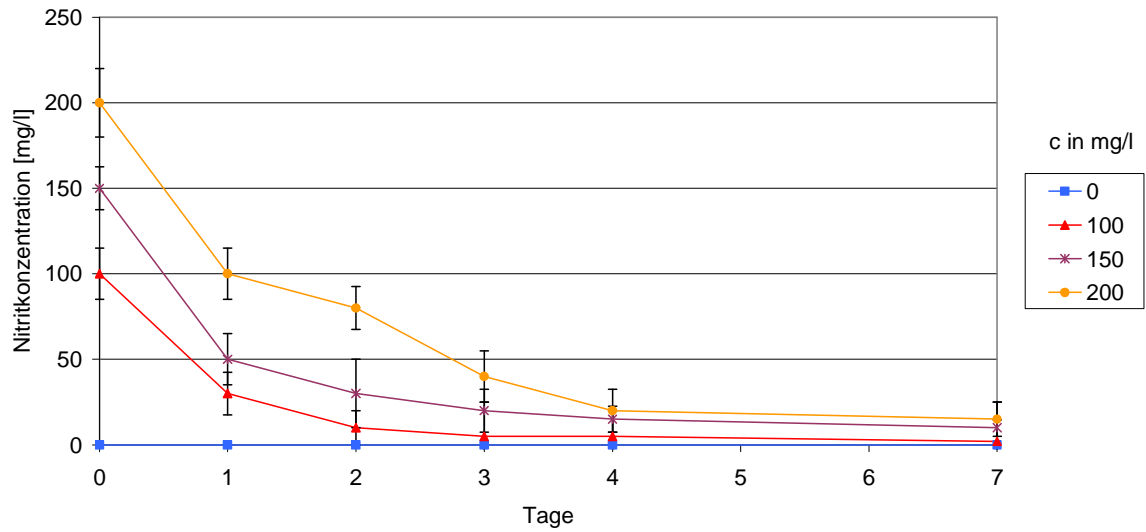


Abb.49:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,99. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

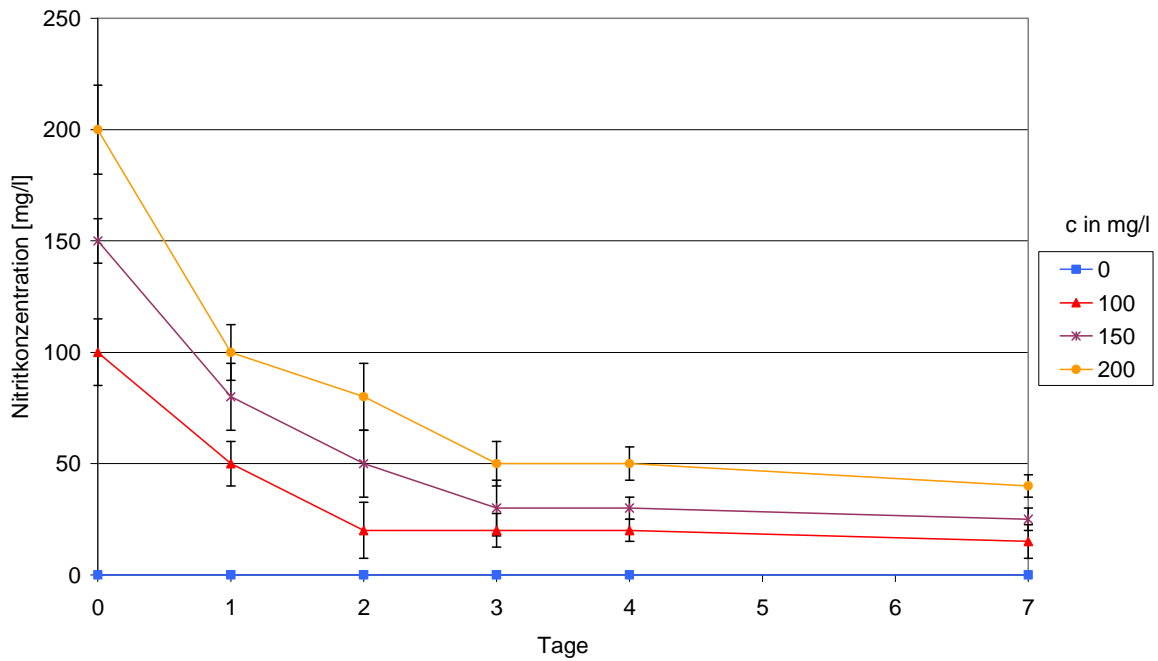


Abb.50:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

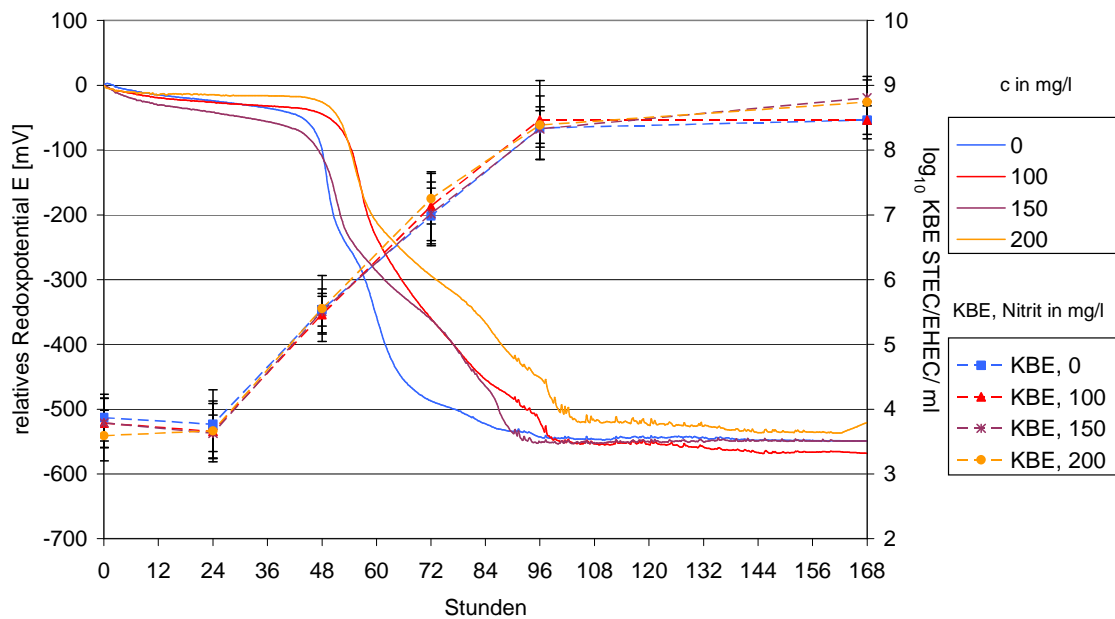


Abb.52: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

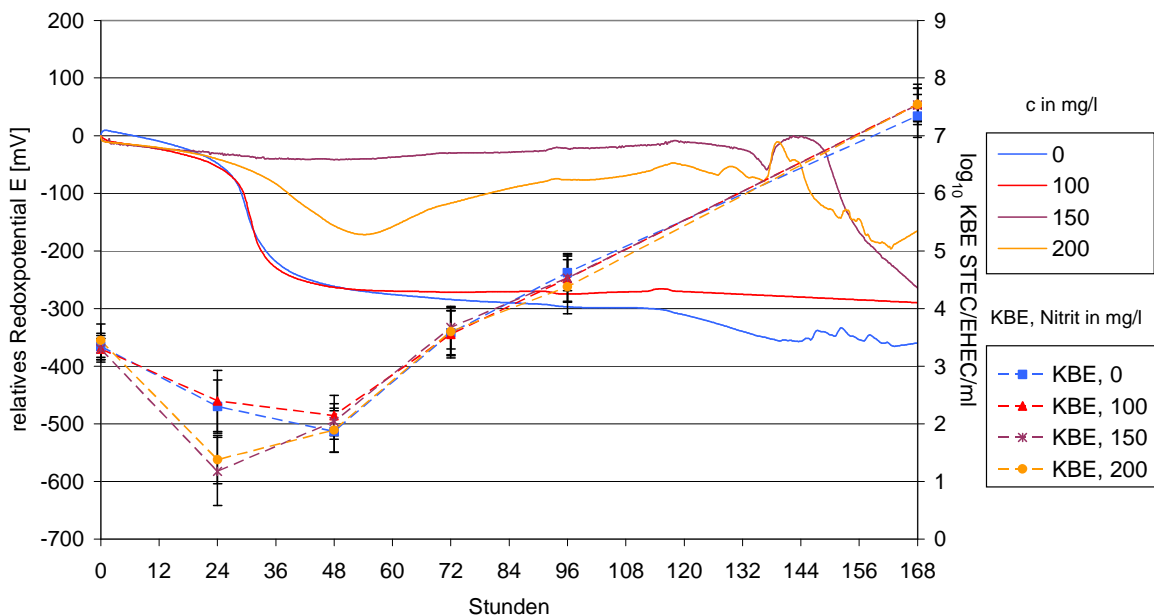


Abb.53: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

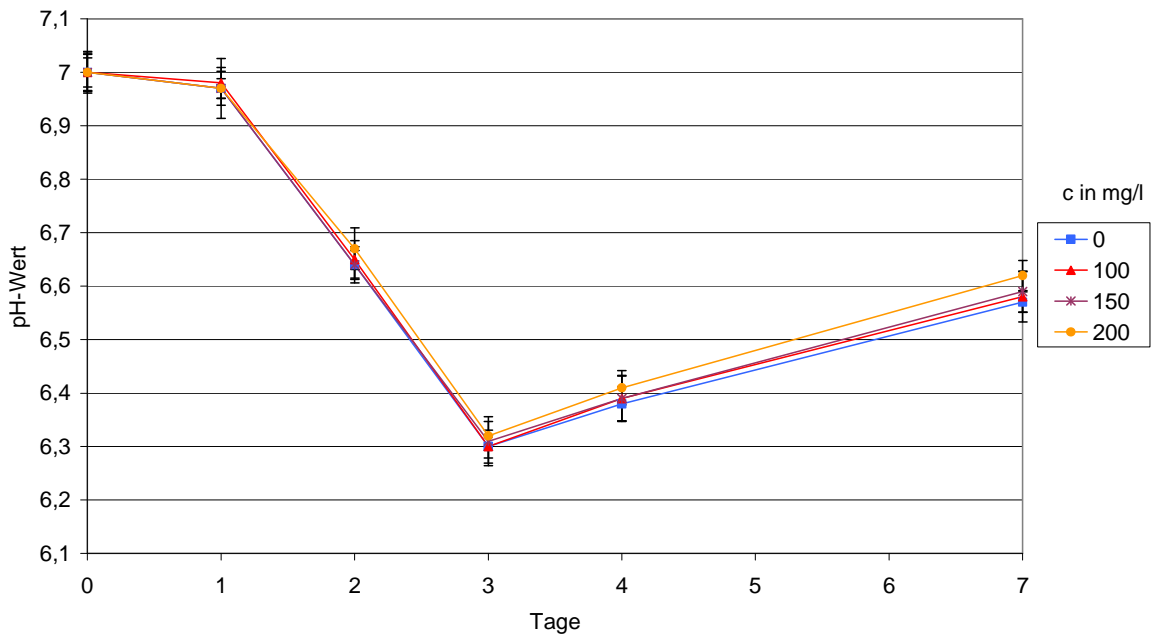


Abb.54:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

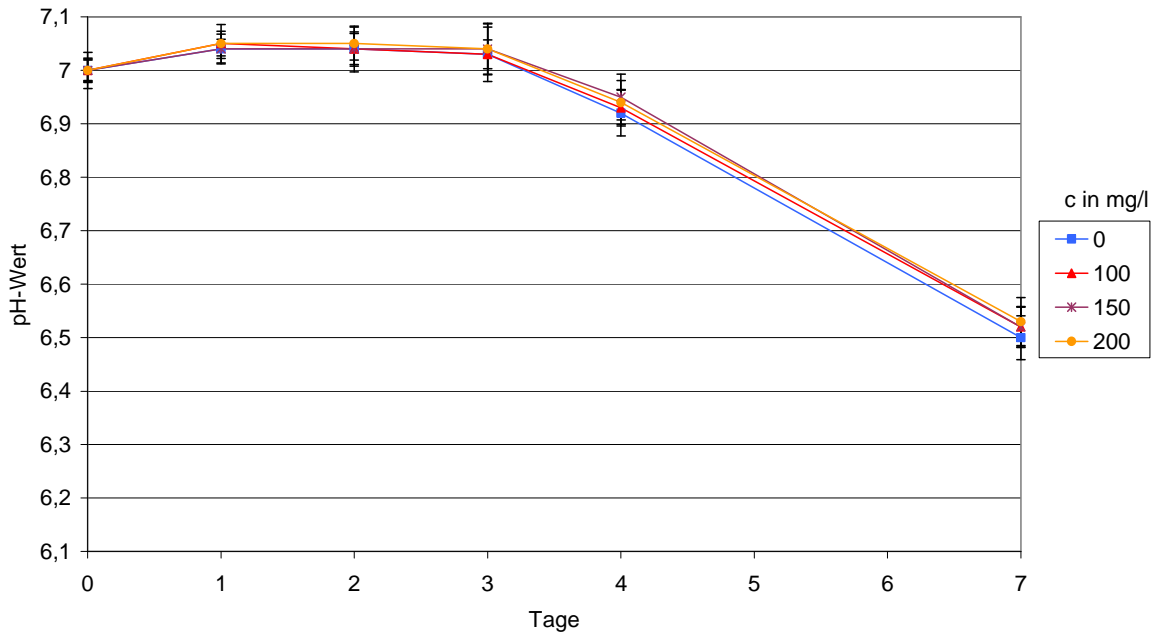


Abb.55:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

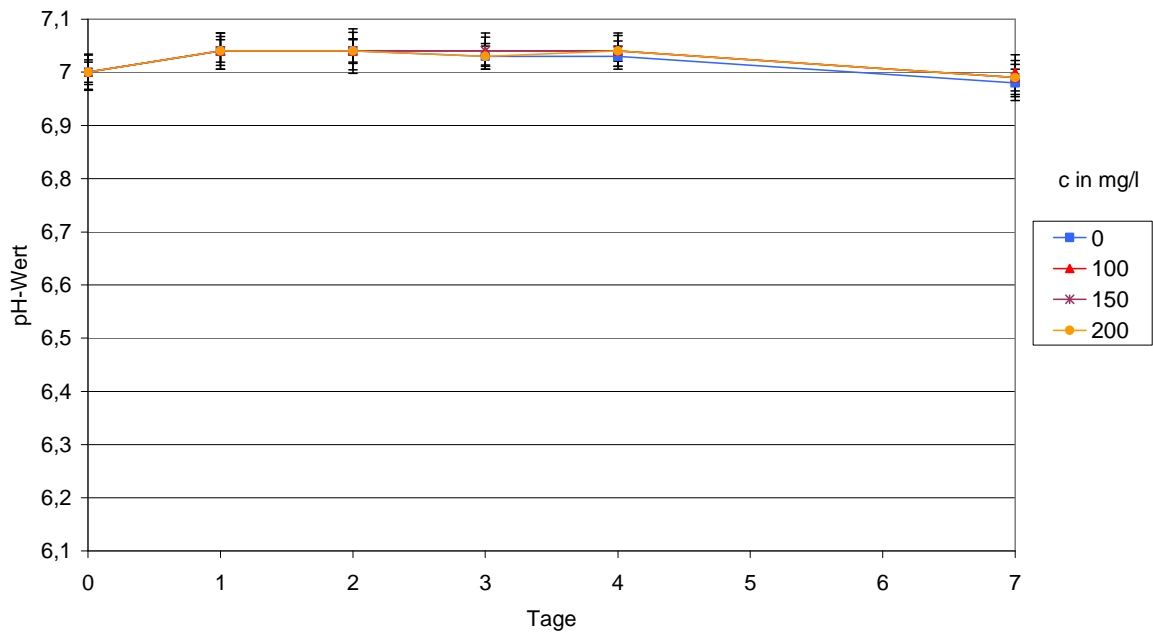


Abb.56: Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

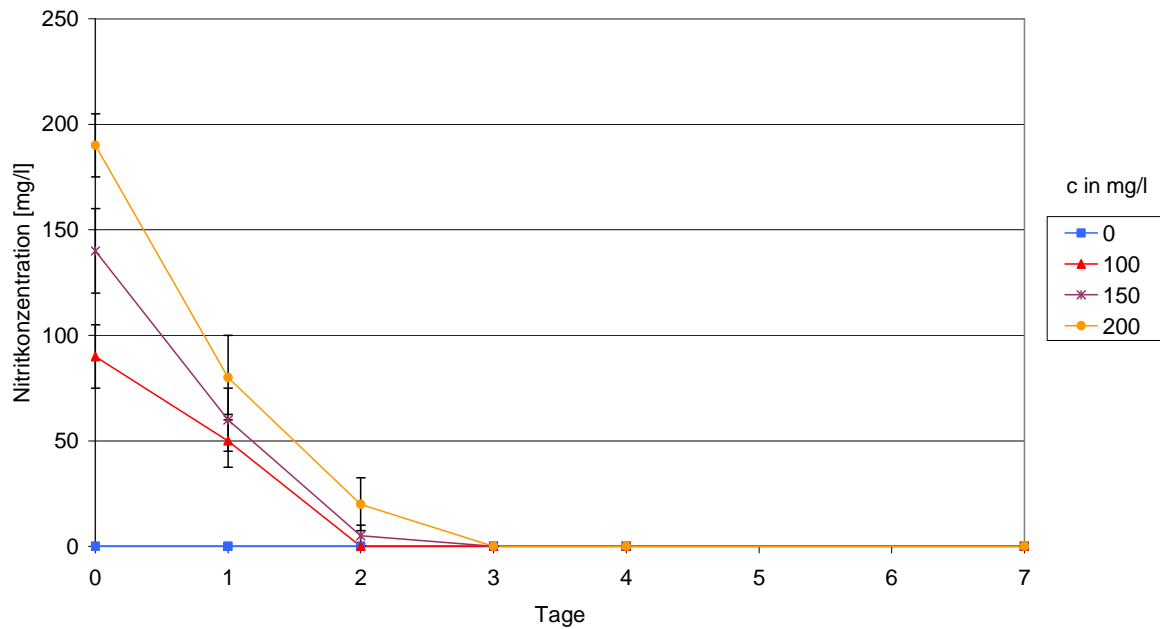


Abb.57: Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,99. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

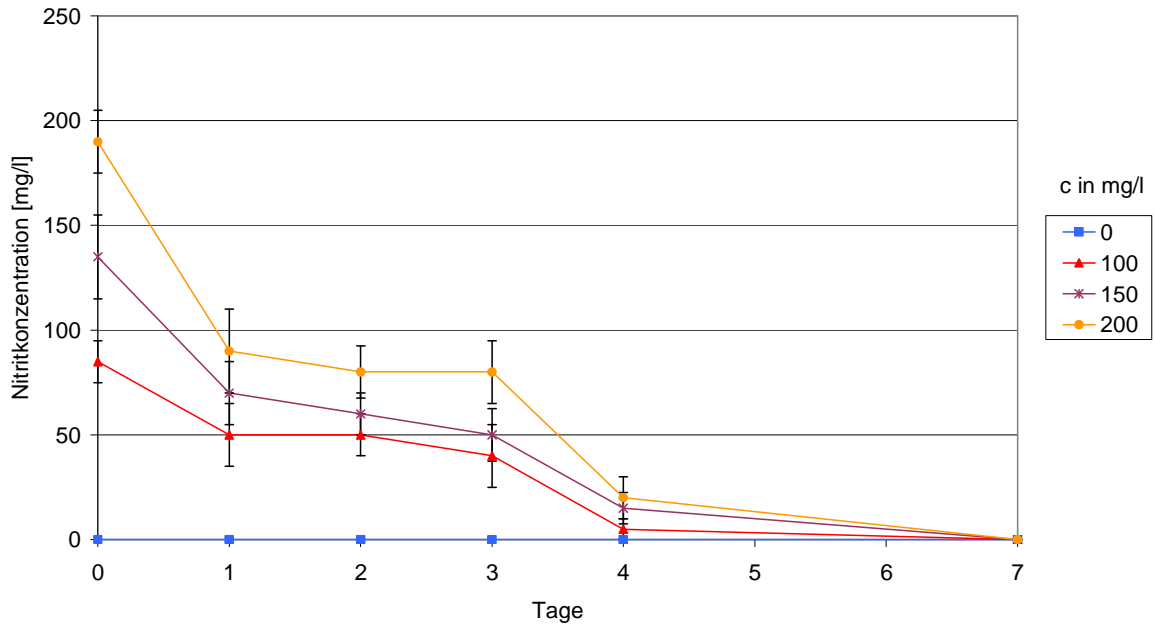


Abb.58:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,975. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

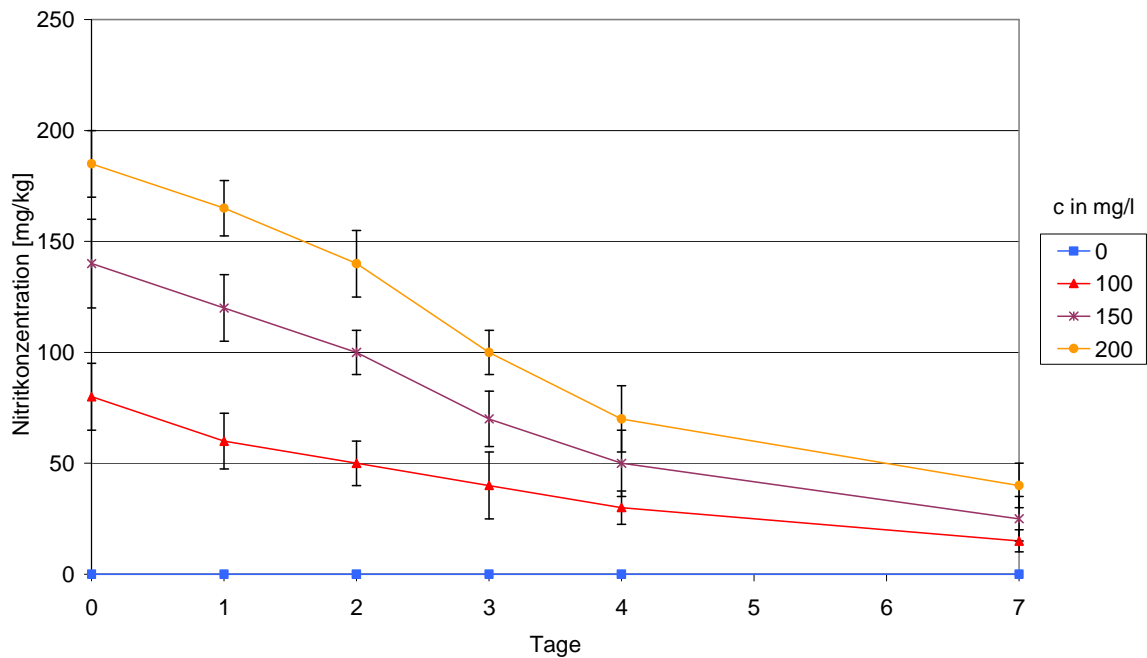


Abb.59:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

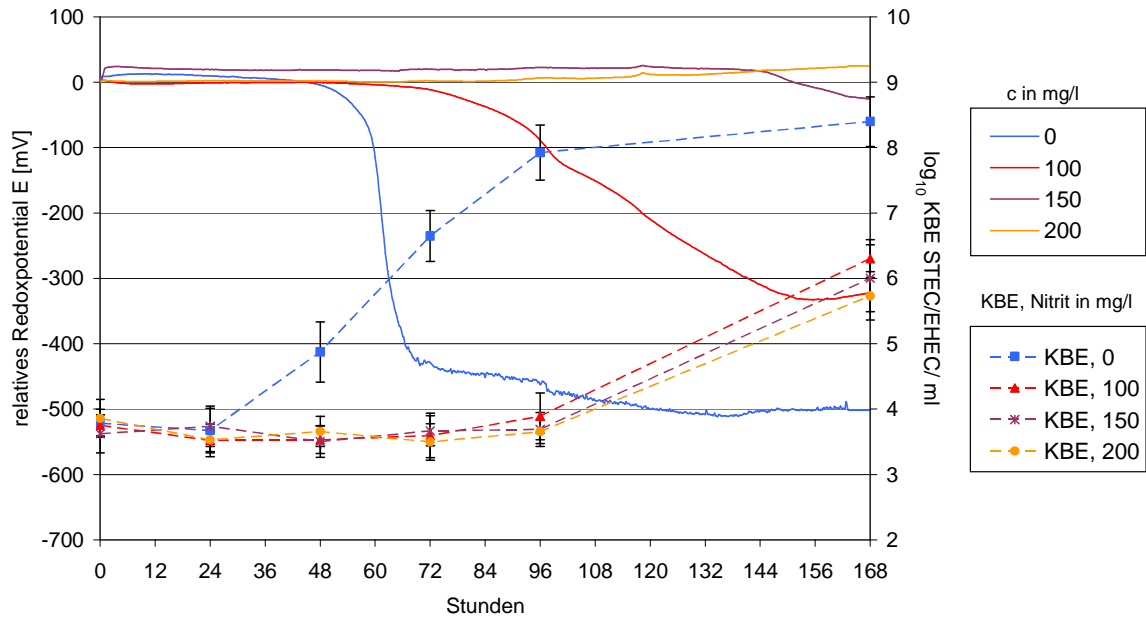


Abb.61: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

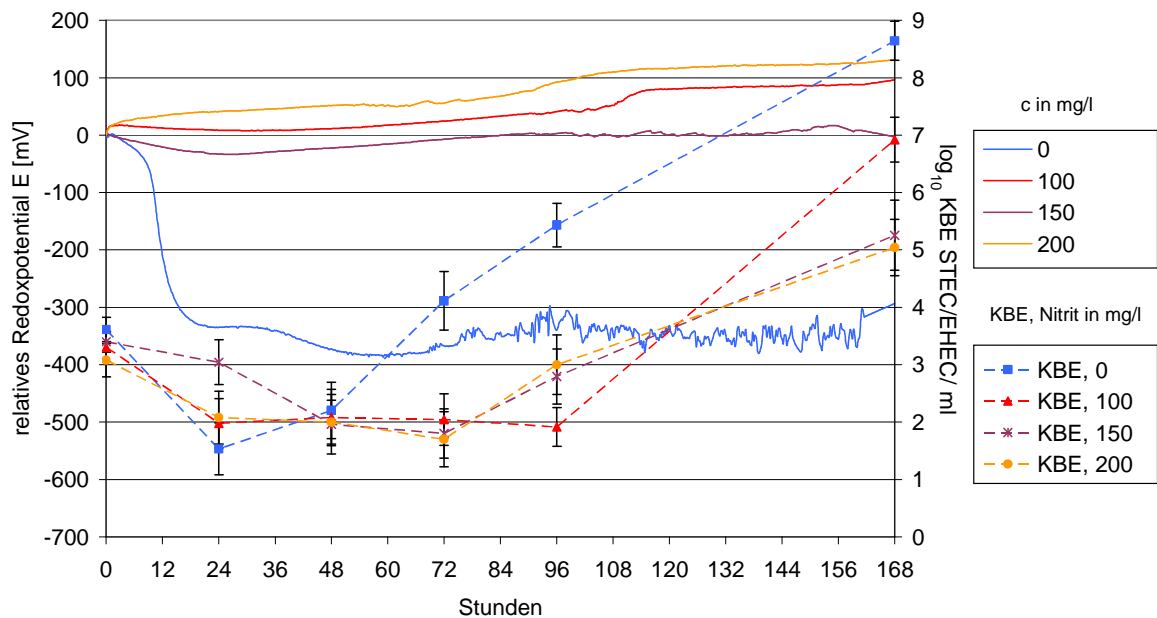


Abb.62: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.C.-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

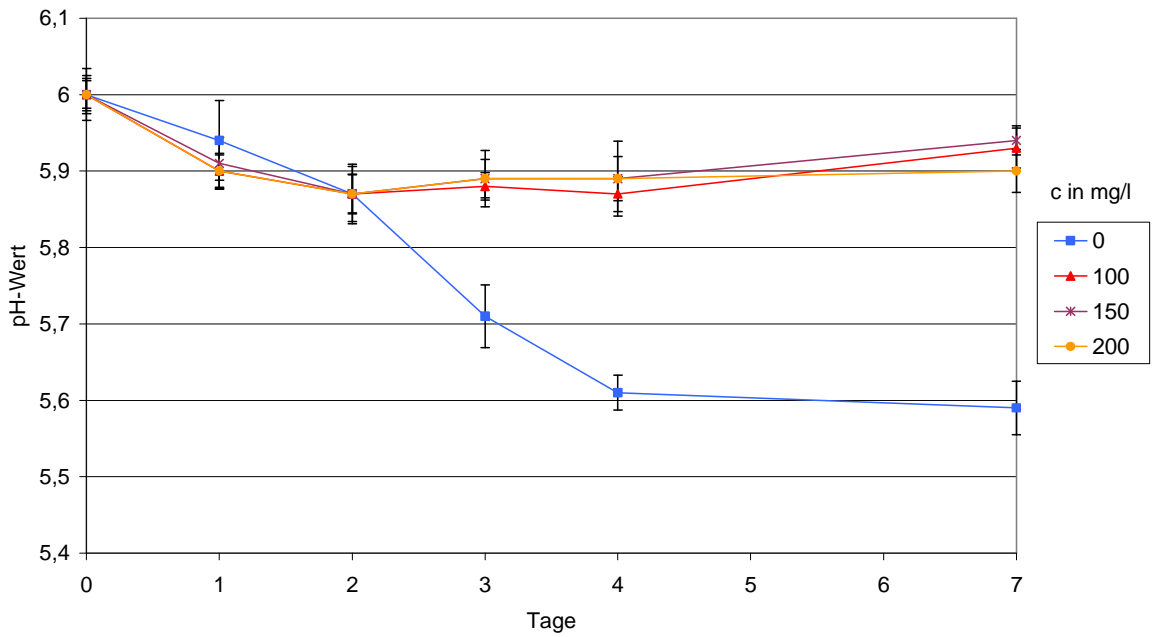


Abb.63:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

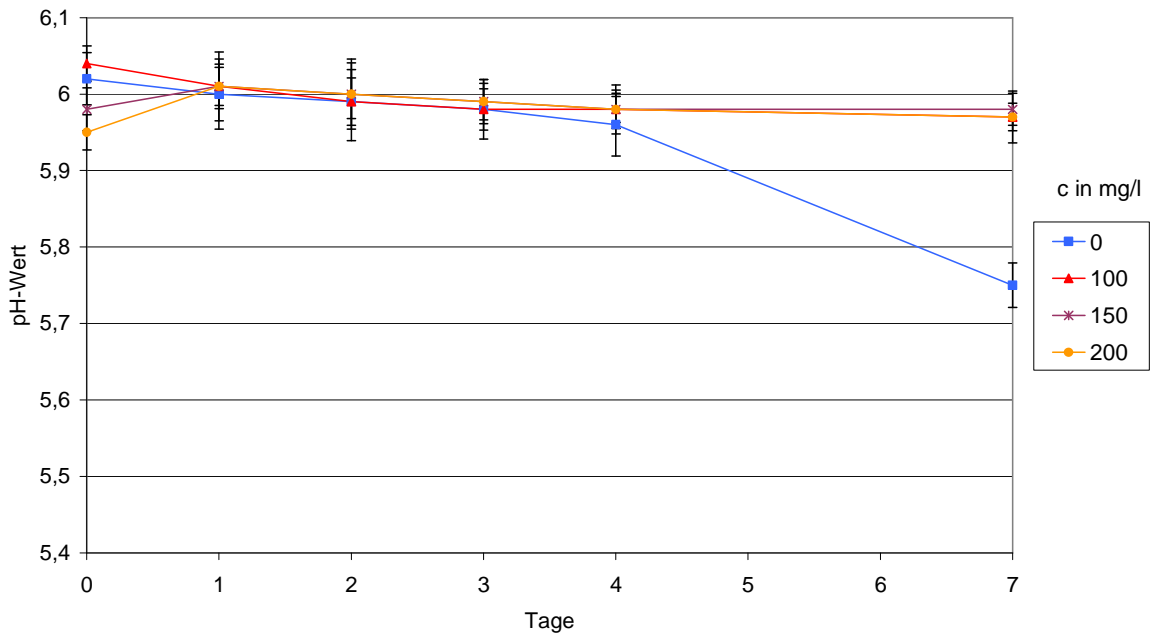


Abb.64:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6, a_w : 0,975 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

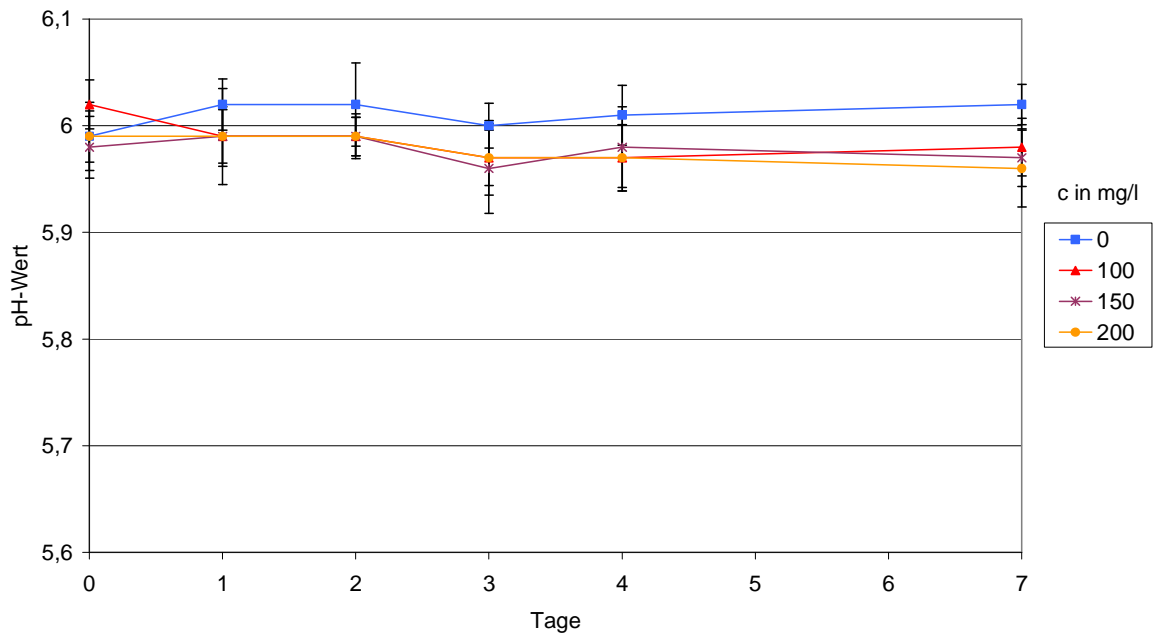


Abb.65:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

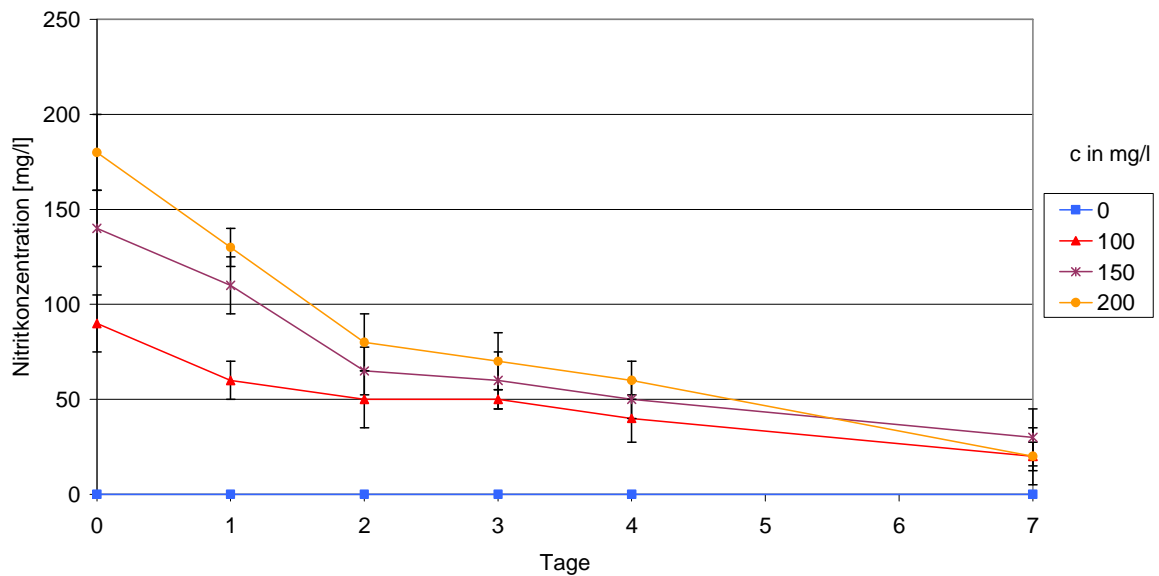


Abb.66:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,99. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

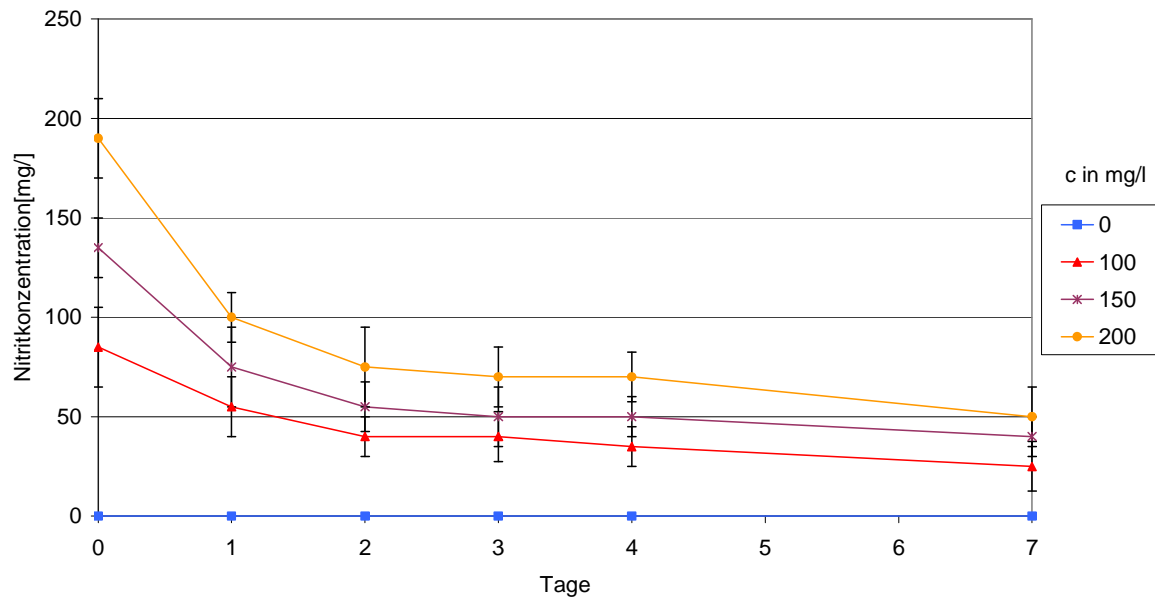


Abb.67:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,975. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

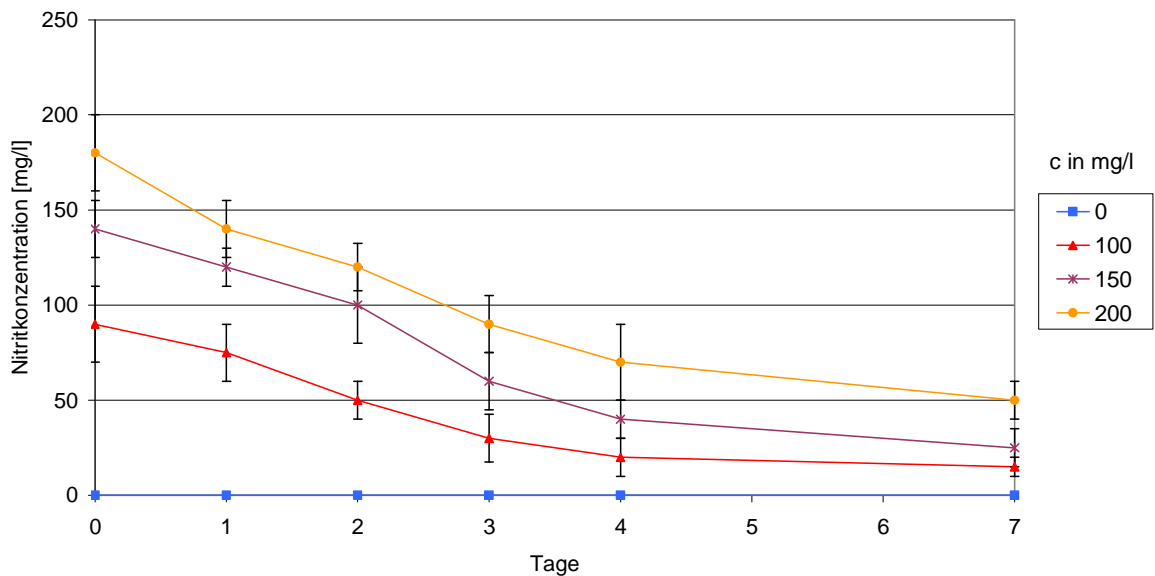


Abb.68:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

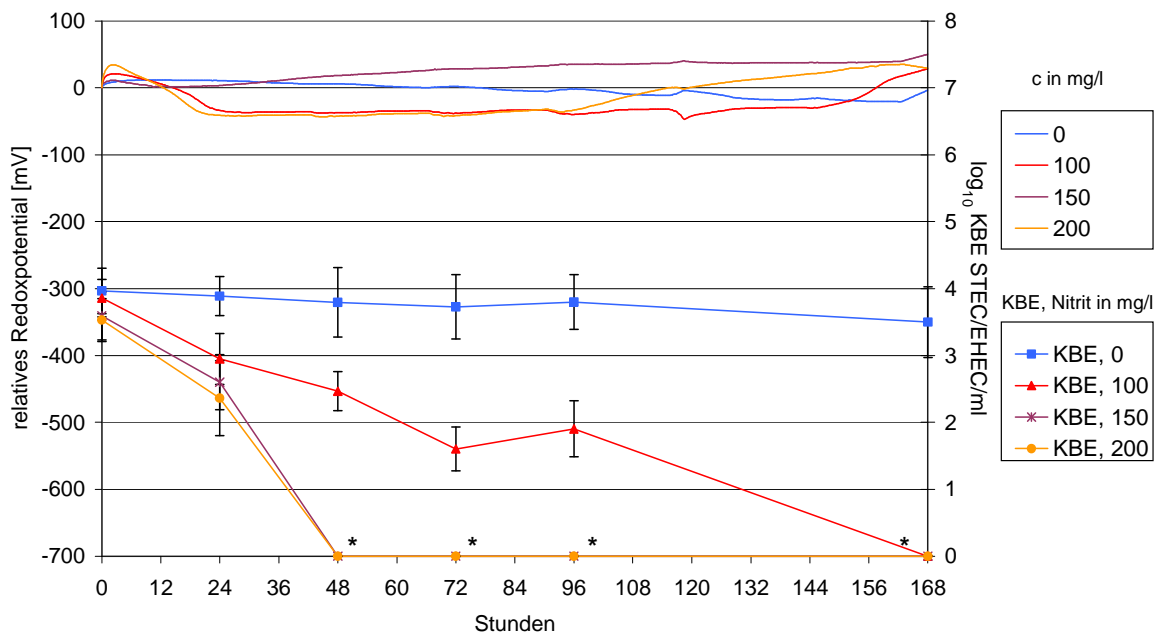


Abb.70: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,965; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Keime mehr möglich

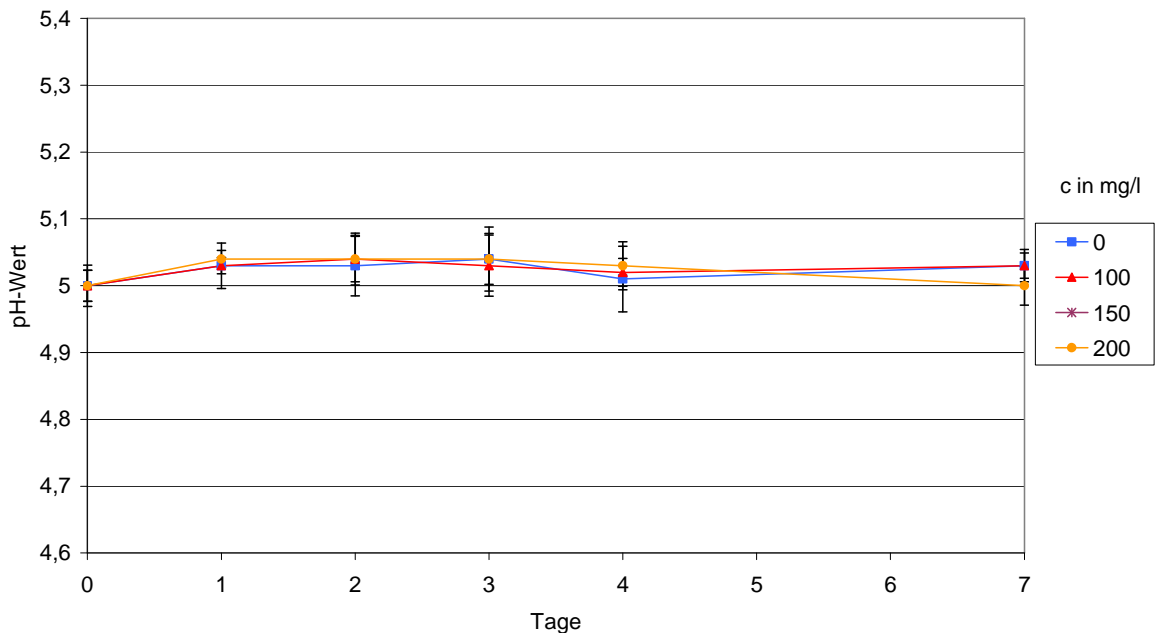


Abb.71: Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 5, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

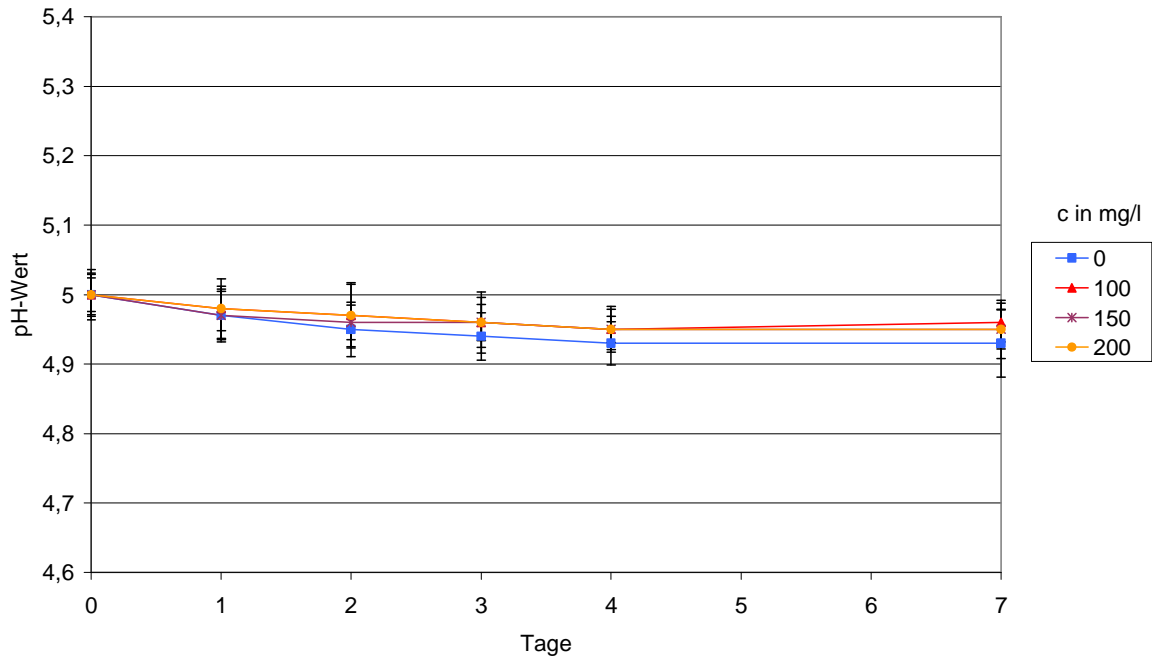


Abb.72:Verlauf der pH-Werte in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 5, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

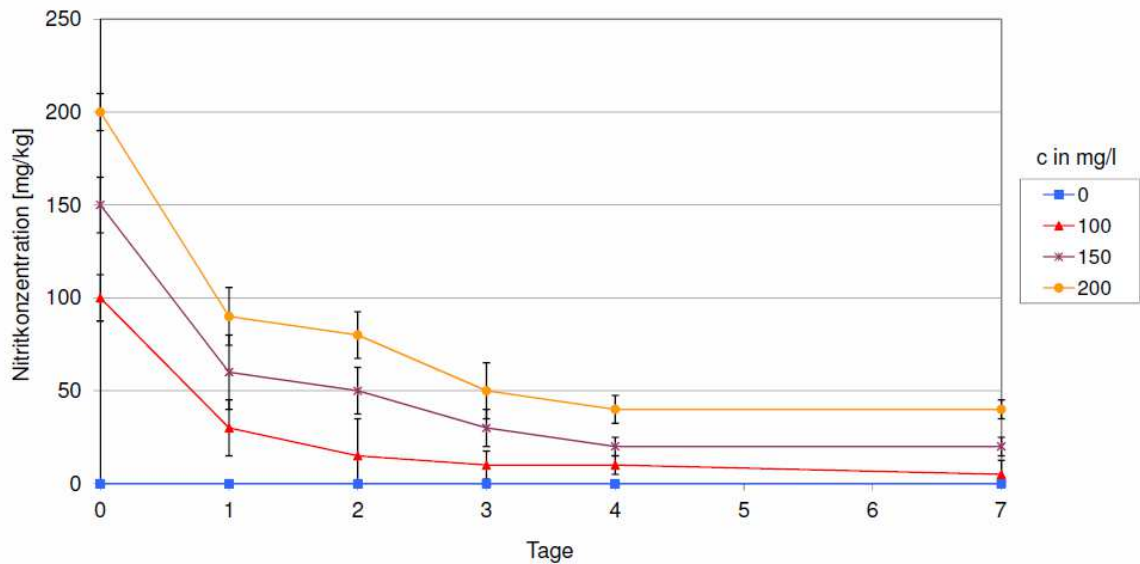


Abb.73:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,99. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

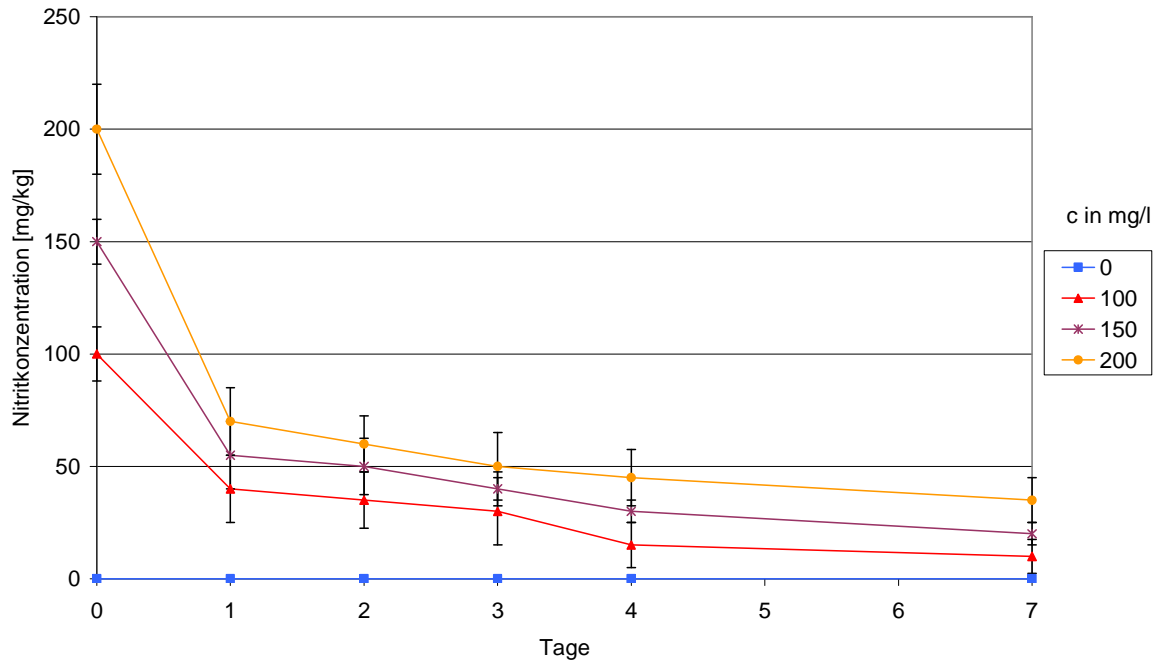


Abb.74:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in E.-C.-Bouillon (inokuliert mit STEC/EHEC) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,965. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

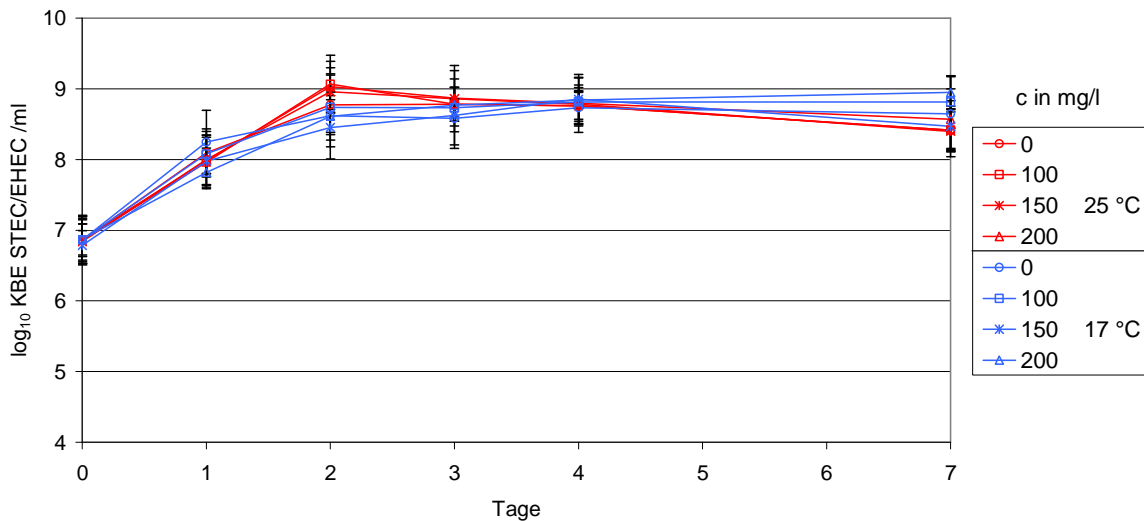


Abb.75:Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei pH 7, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

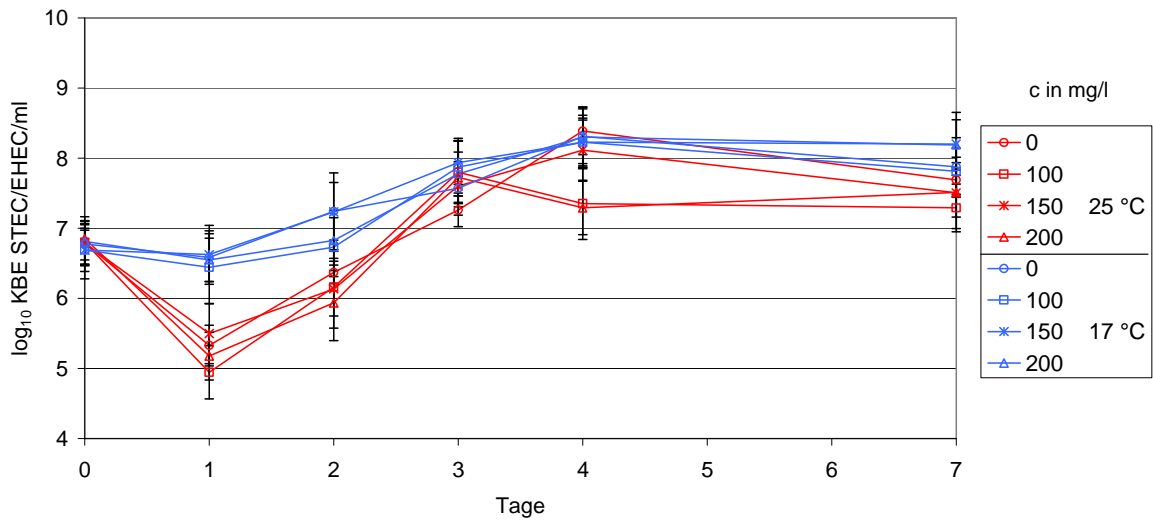


Abb.76: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei pH 7, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

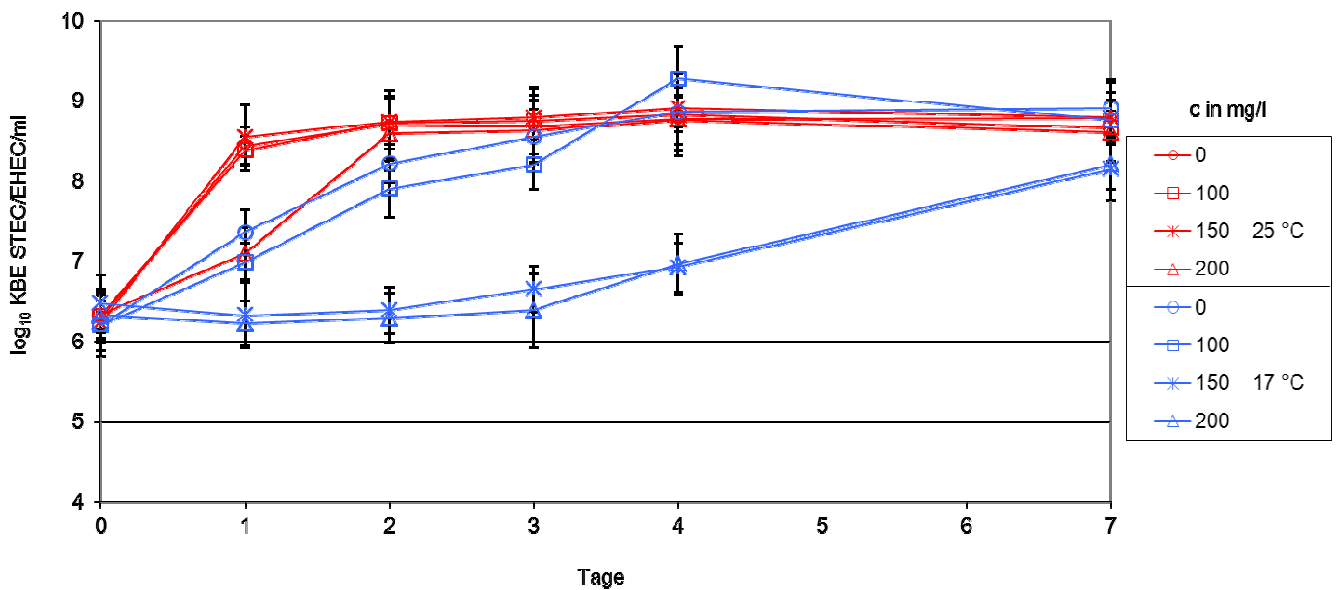


Abb.77: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei pH 6, a_w : 0,99 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

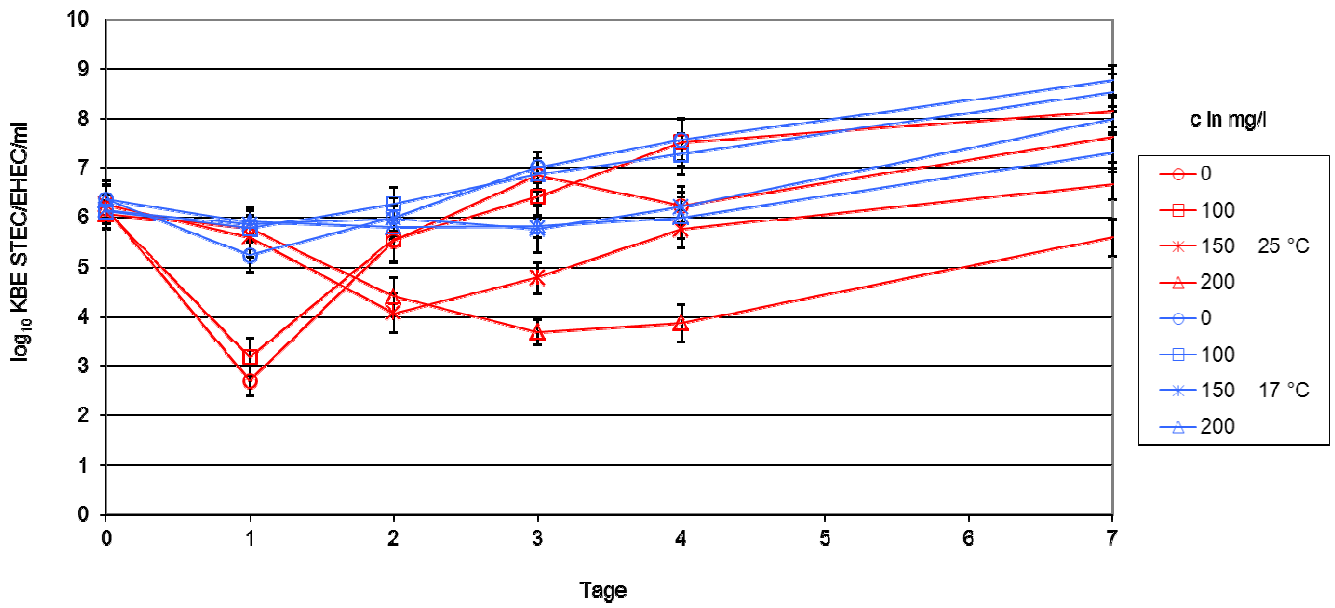


Abb.78: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei pH 6, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

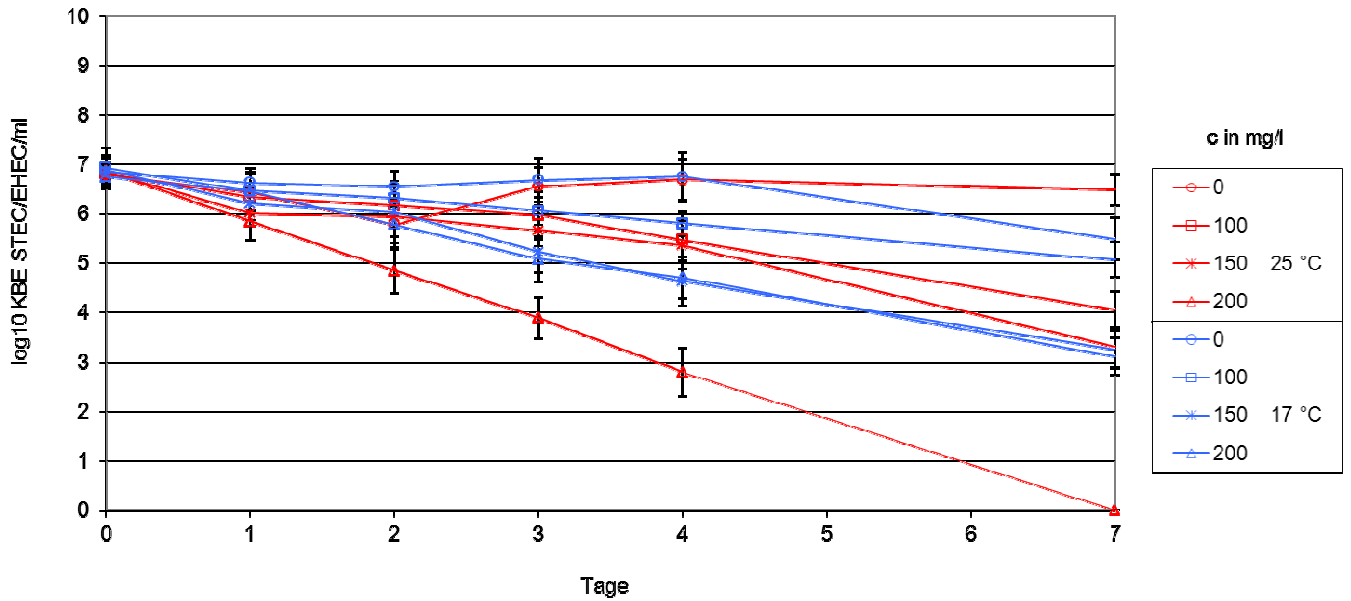


Abb.80: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von STEC/EHEC in E.-C.-Bouillon bei pH 5, a_w : 0,965 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

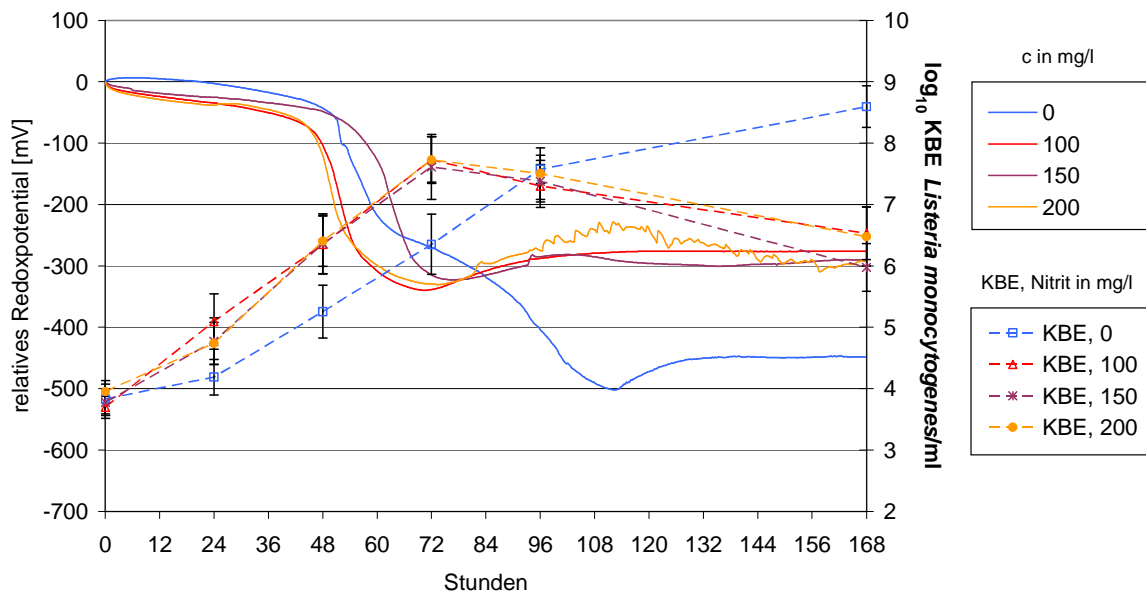


Abb.82: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,975; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

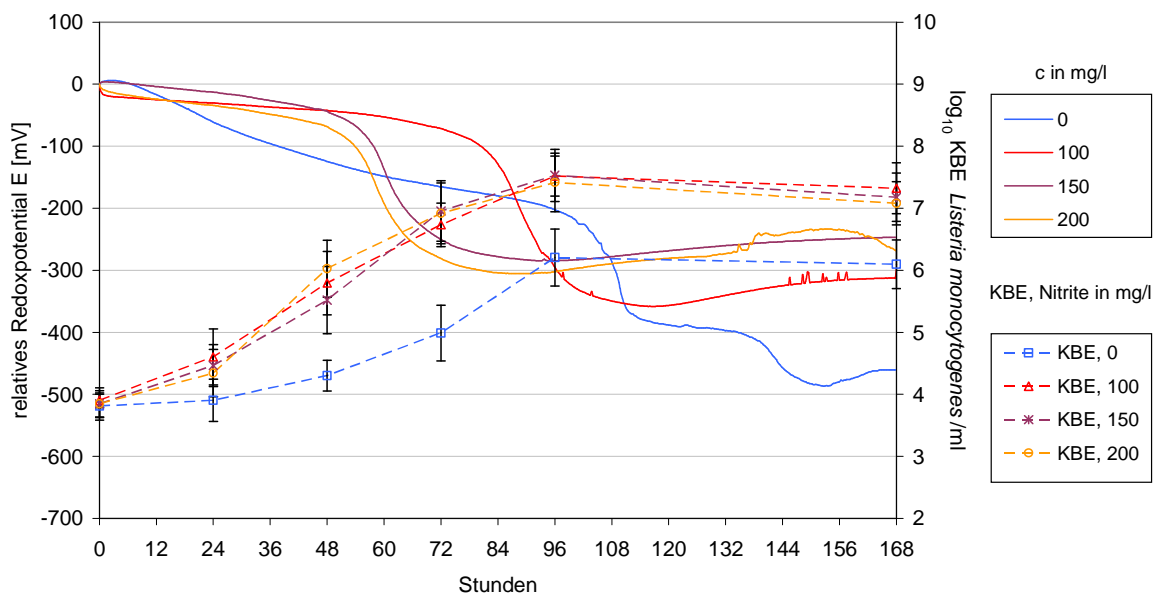


Abb.83: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

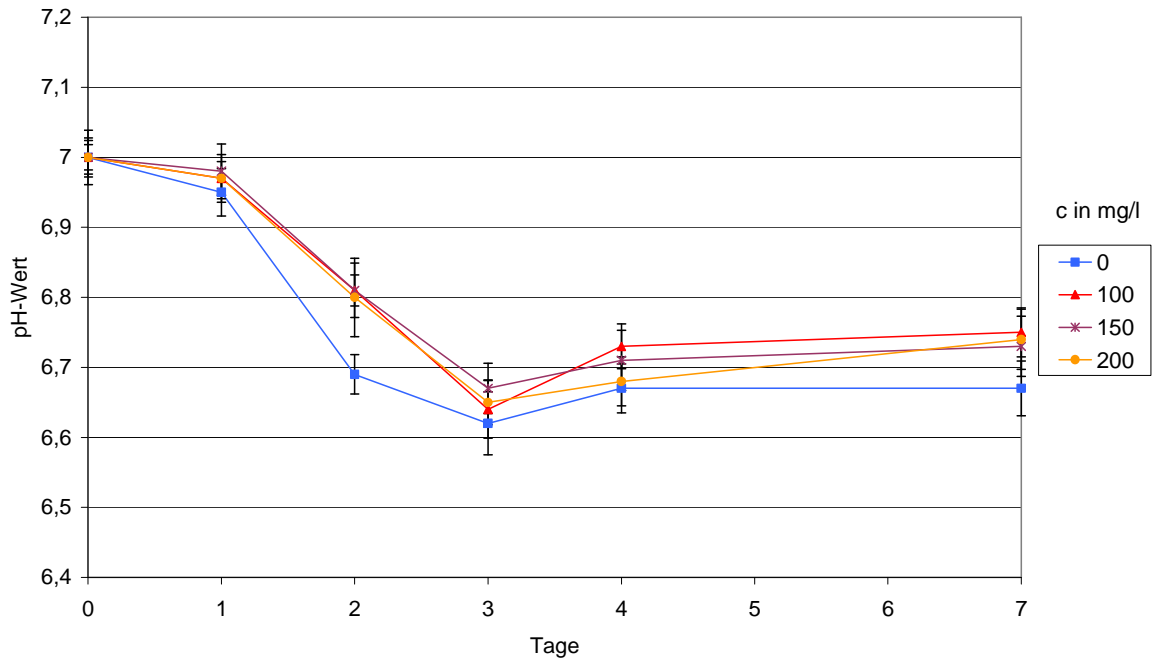


Abb.84:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 7, a_w: 0,97 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

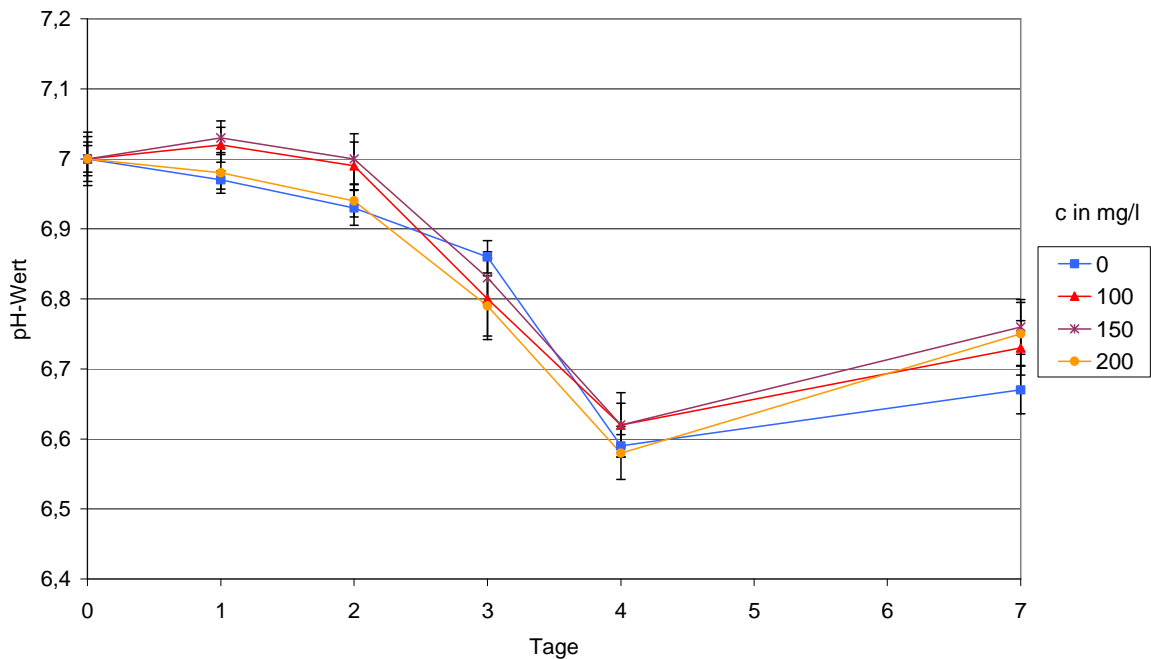


Abb.85:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 7, a_w: 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

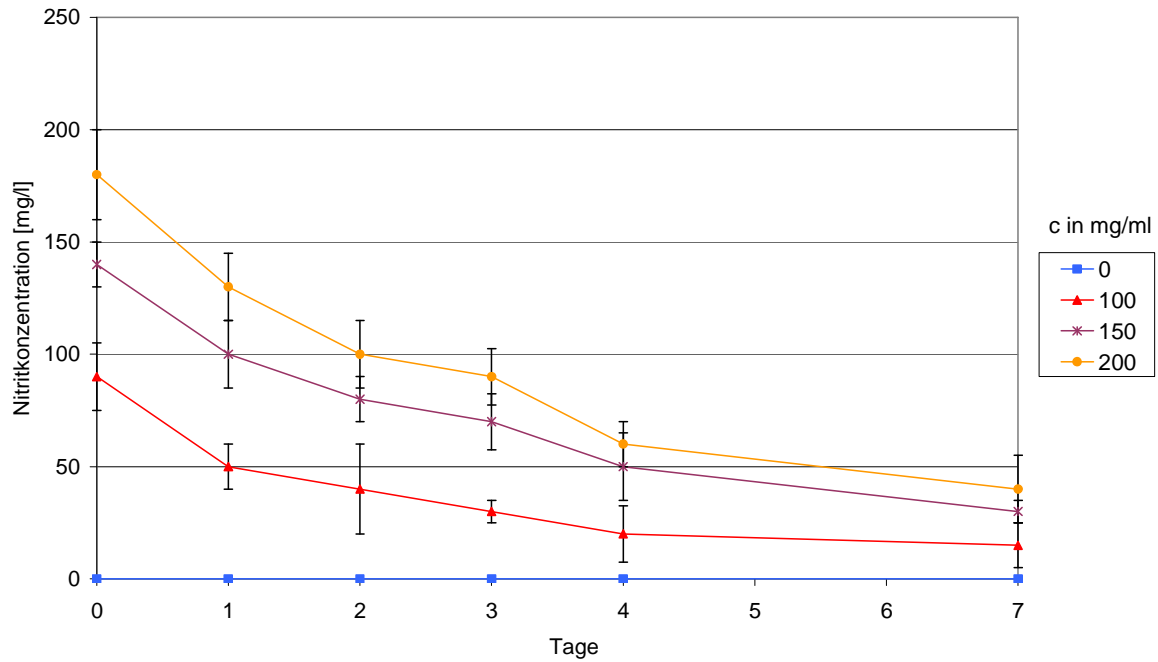


Abb.86:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,98. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

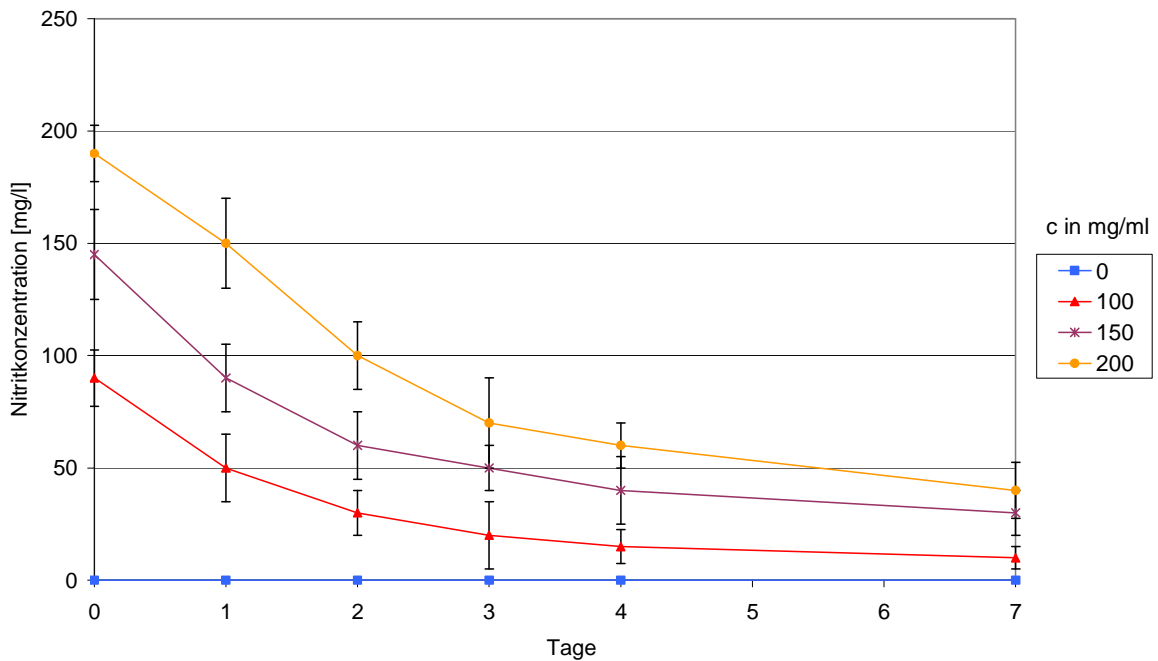


Abb.87:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 7 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

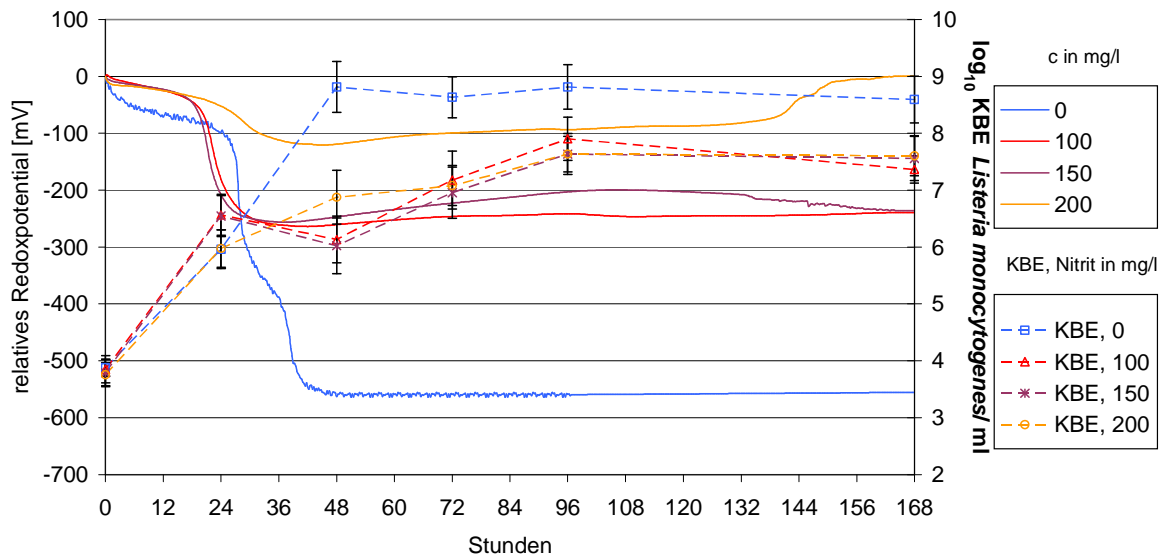


Abb.88: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,98; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

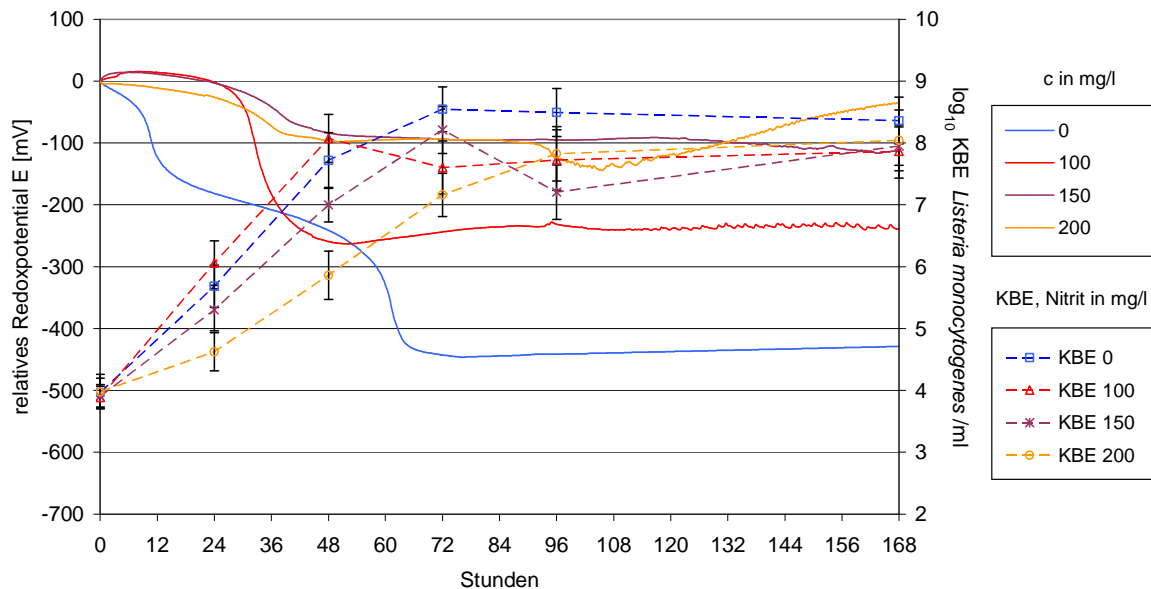


Abb.90: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,955; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

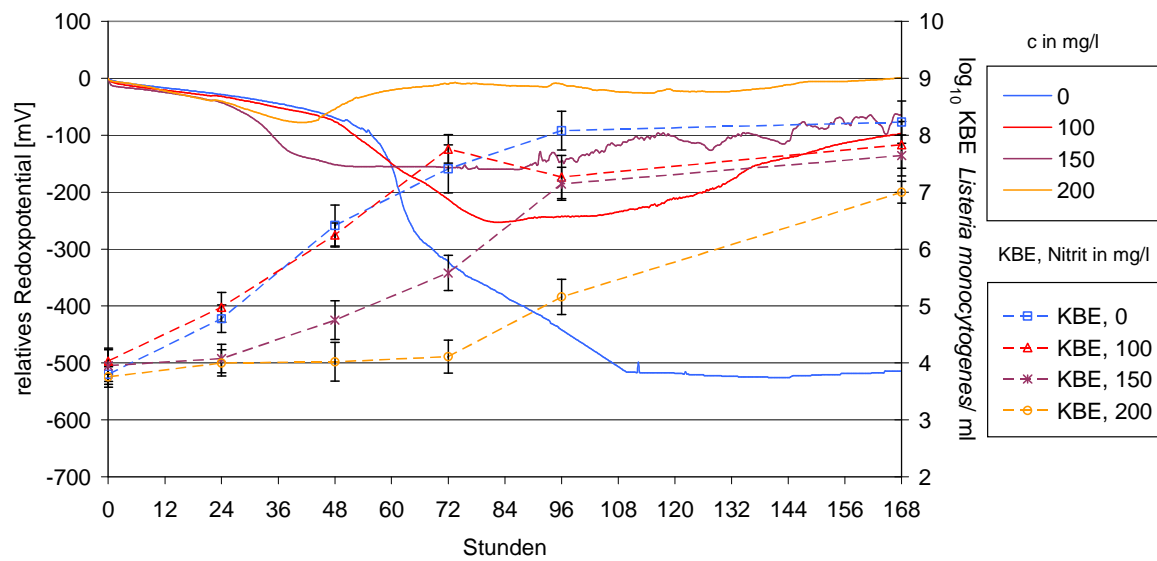


Abb.91: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

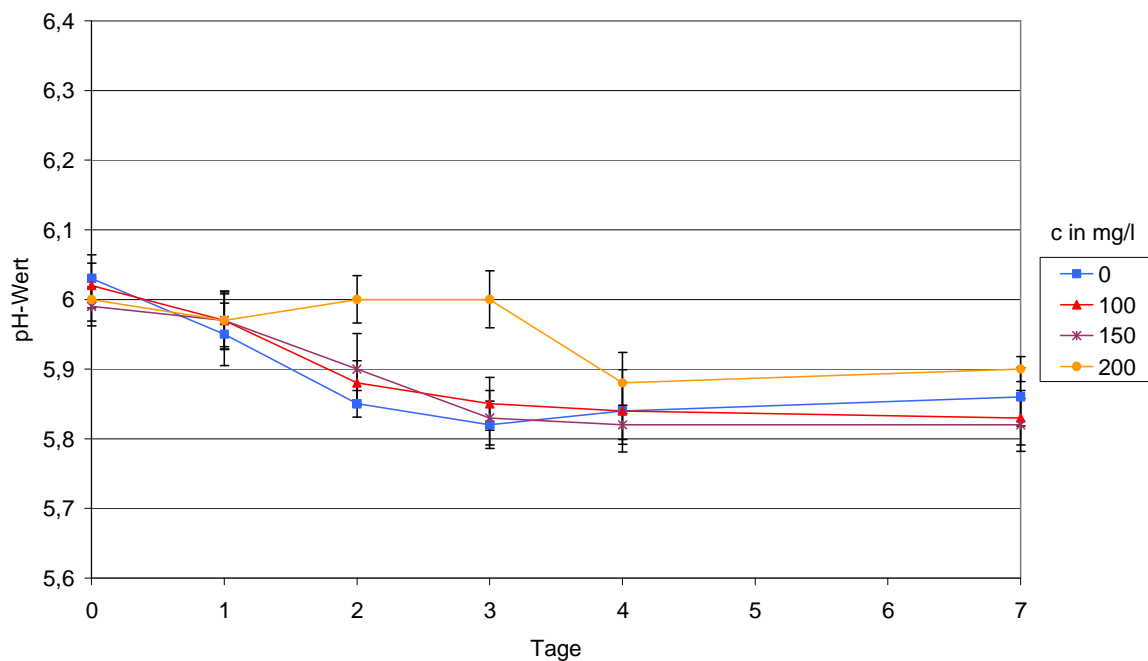


Abb.92: Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 6, a_w : 0,97 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

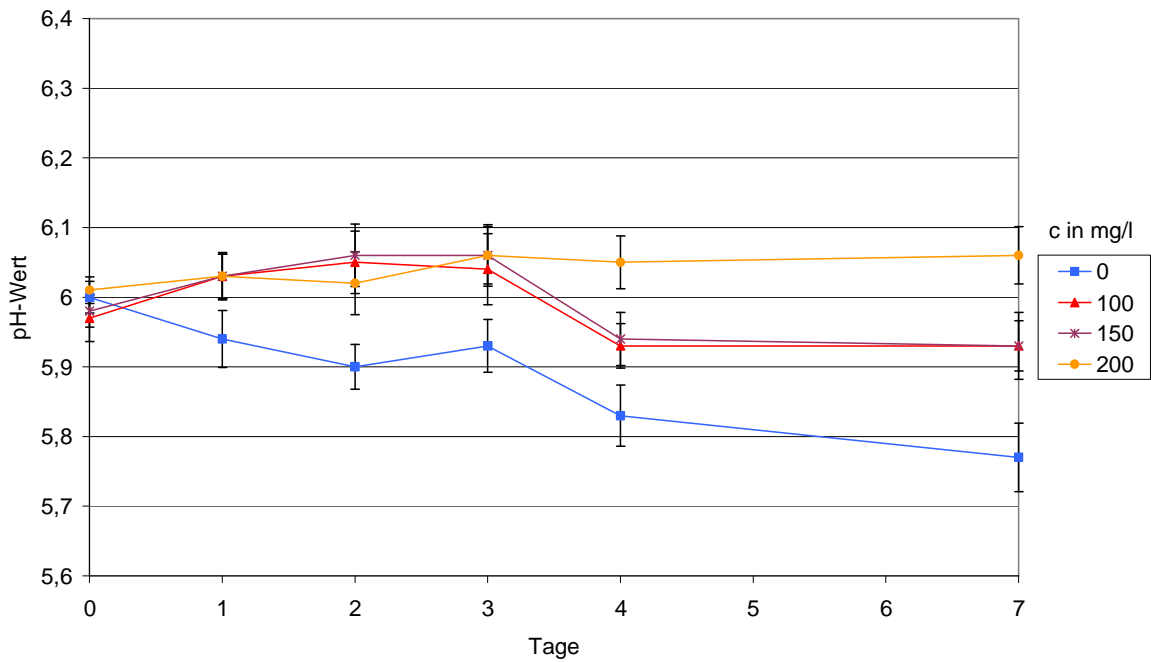


Abb.93:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 6, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

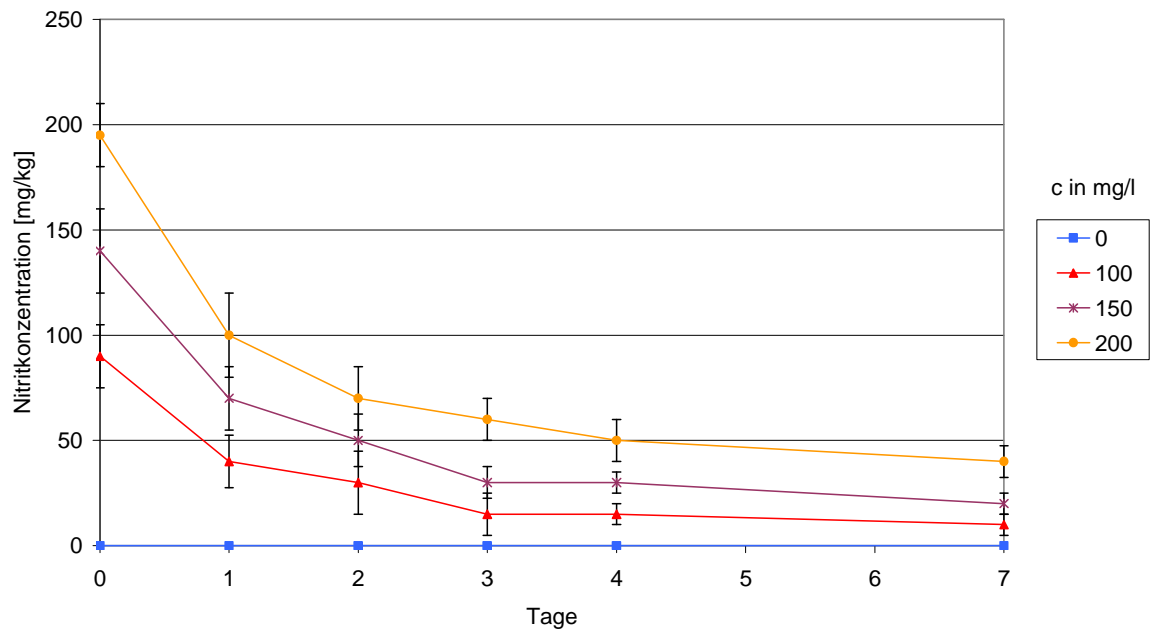


Abb.94:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,97. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

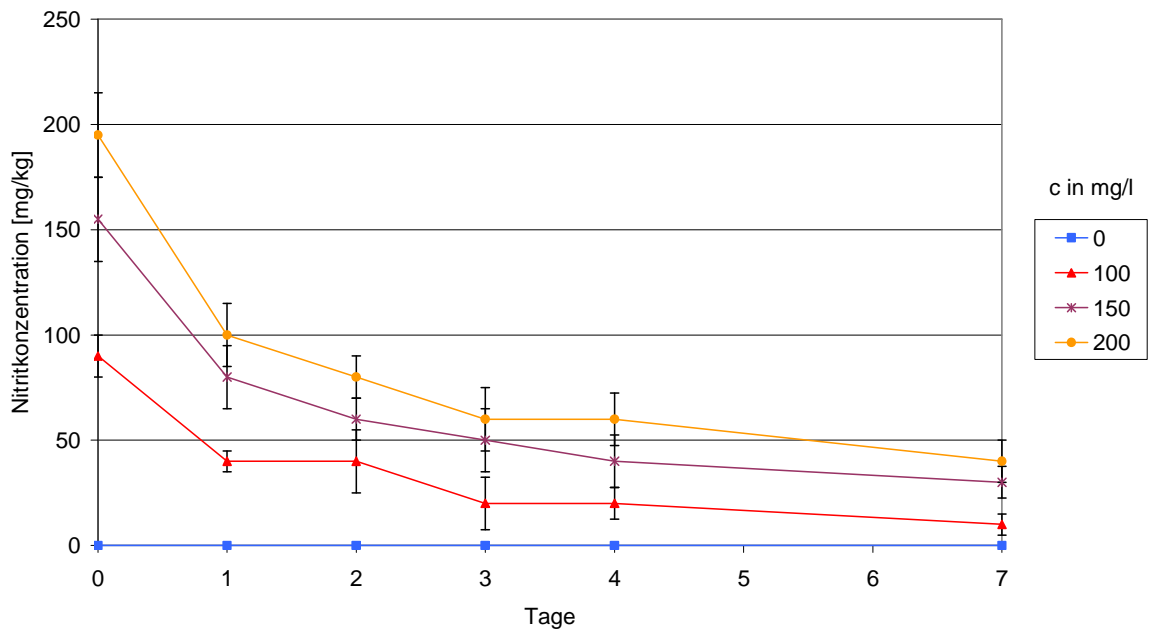


Abb.95:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 6 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

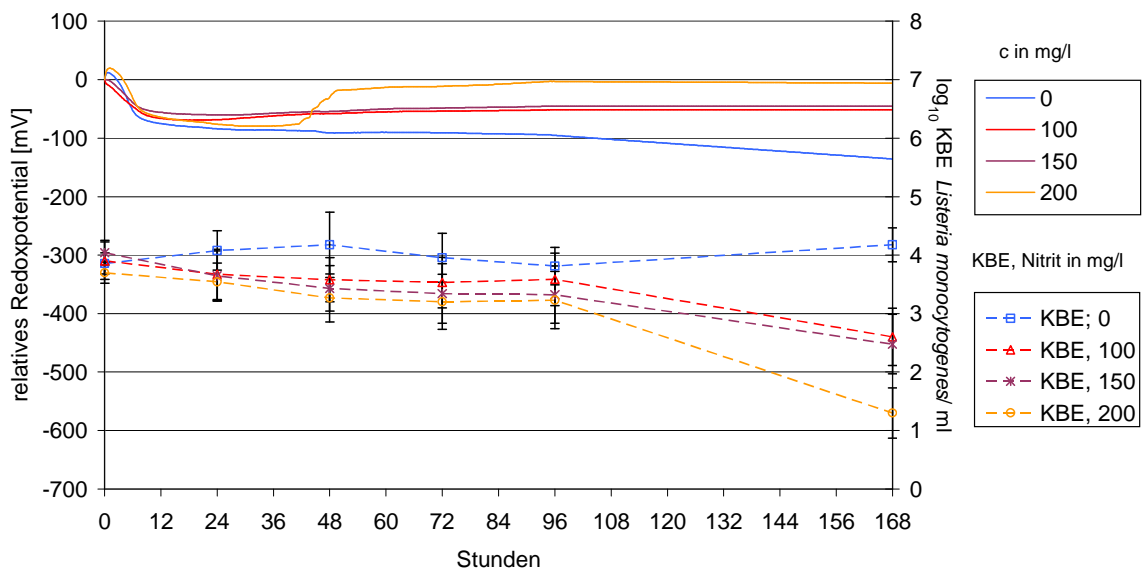


Abb.97:Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,97; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

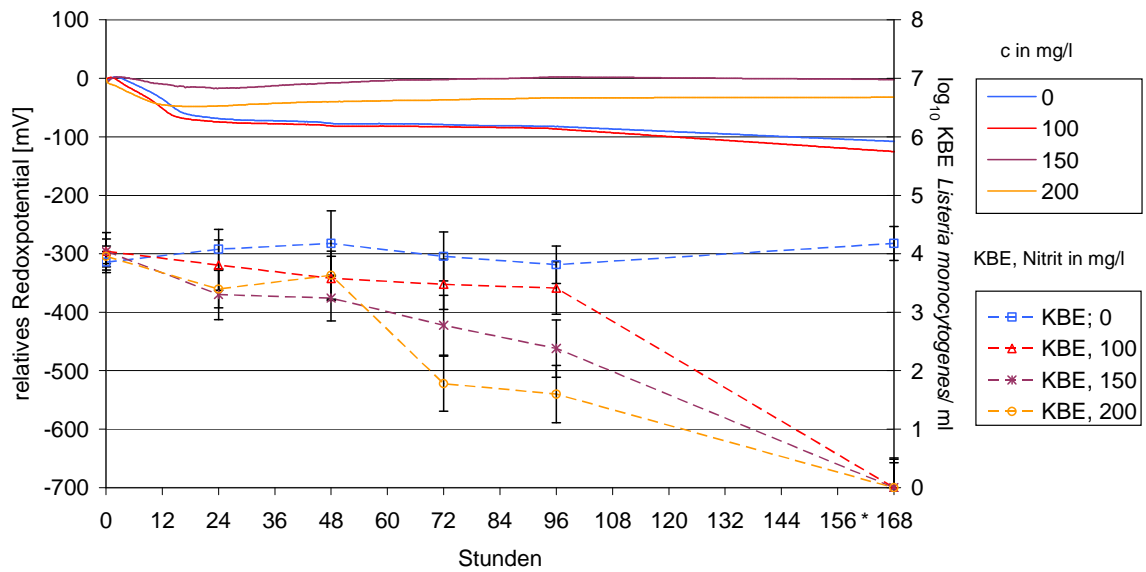


Abb.98: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* auch nach Anreicherung kein Nachweis der Keime mehr möglich

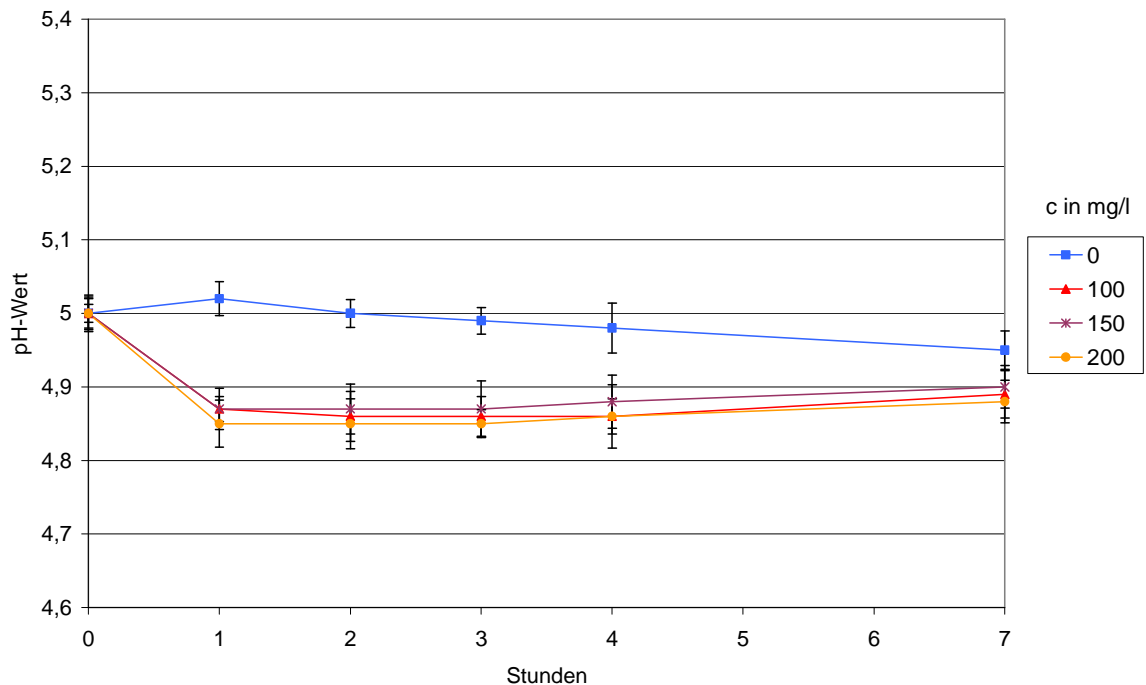


Abb.99: Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 5, a_w : 0,97 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

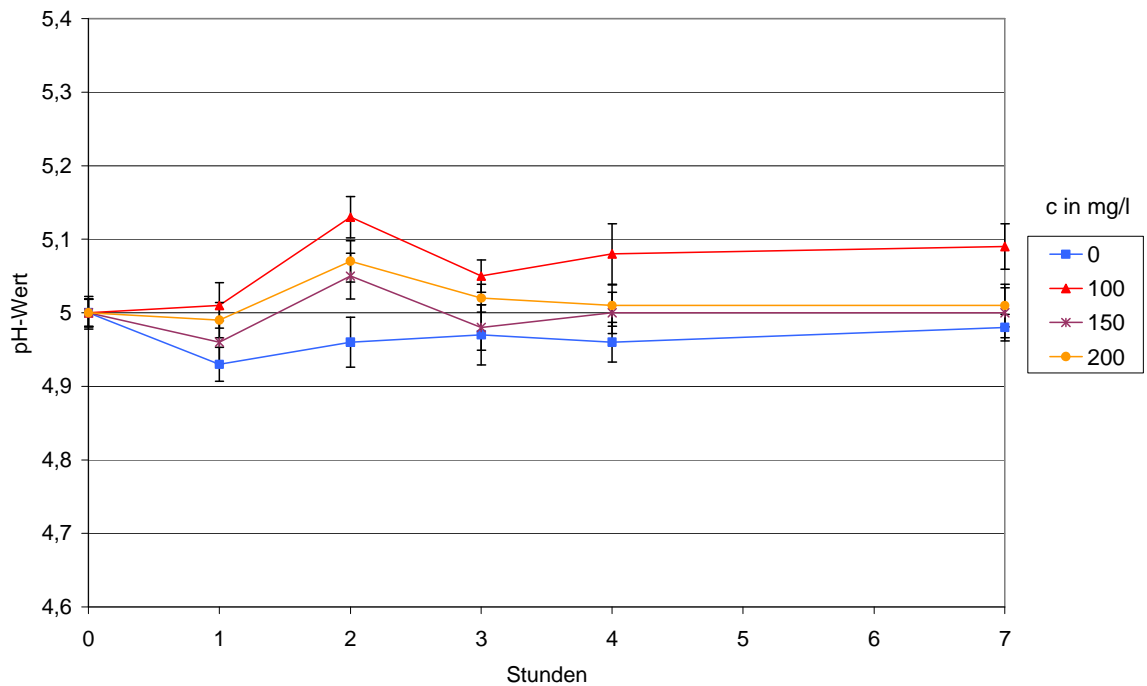


Abb.100:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 5, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

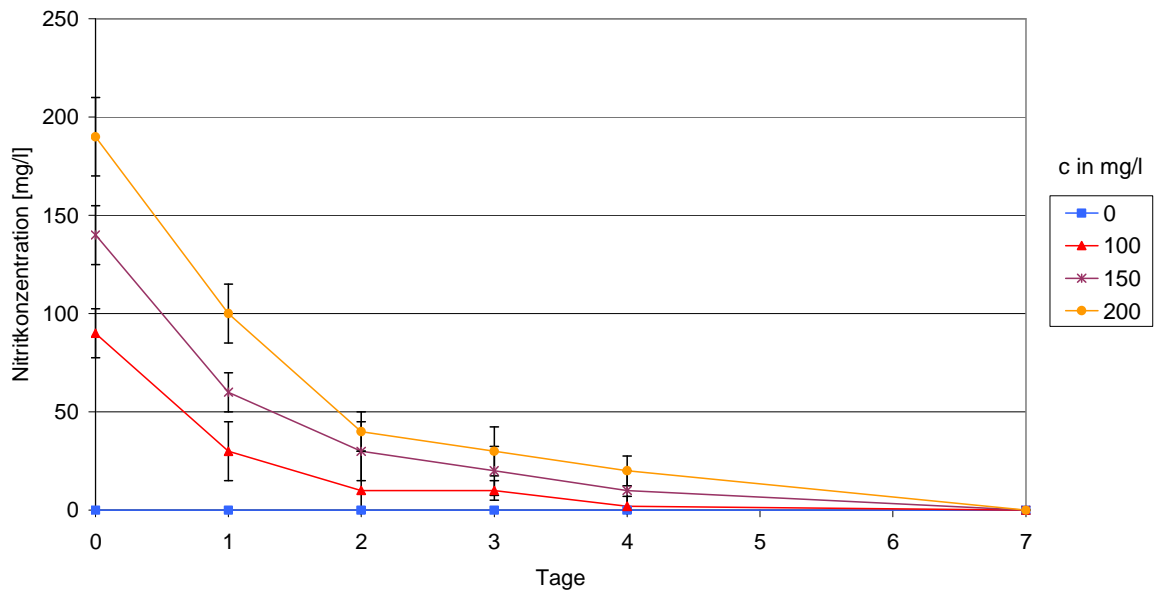


Abb.101:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,97. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

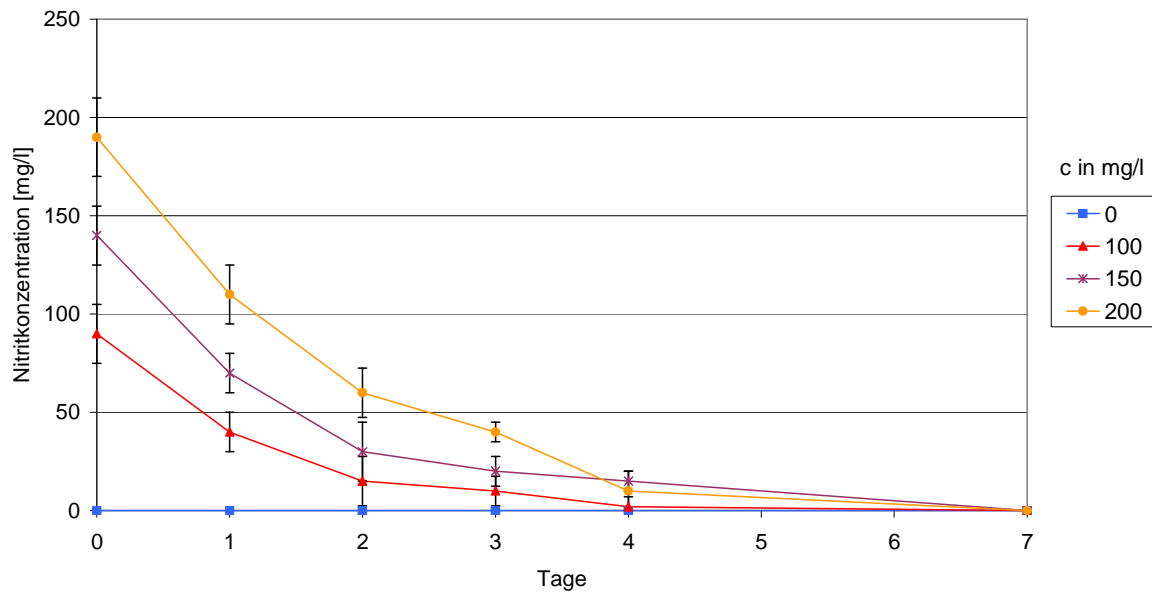


Abb.102:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 25 °C, pH 5 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

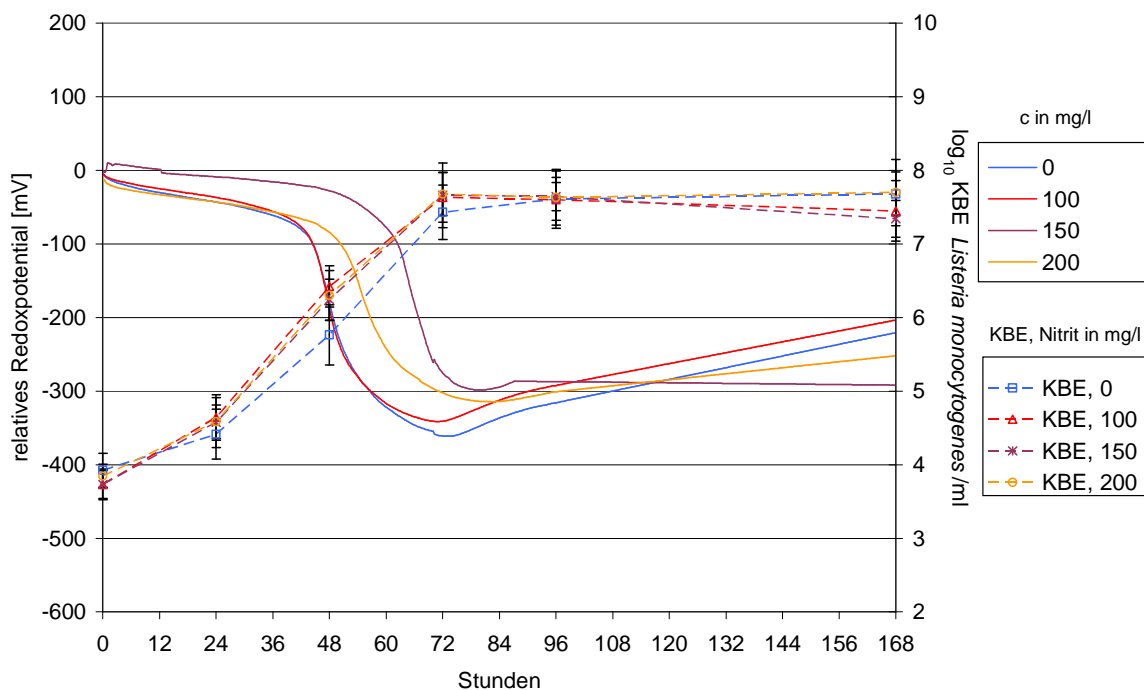


Abb.103:Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,98; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

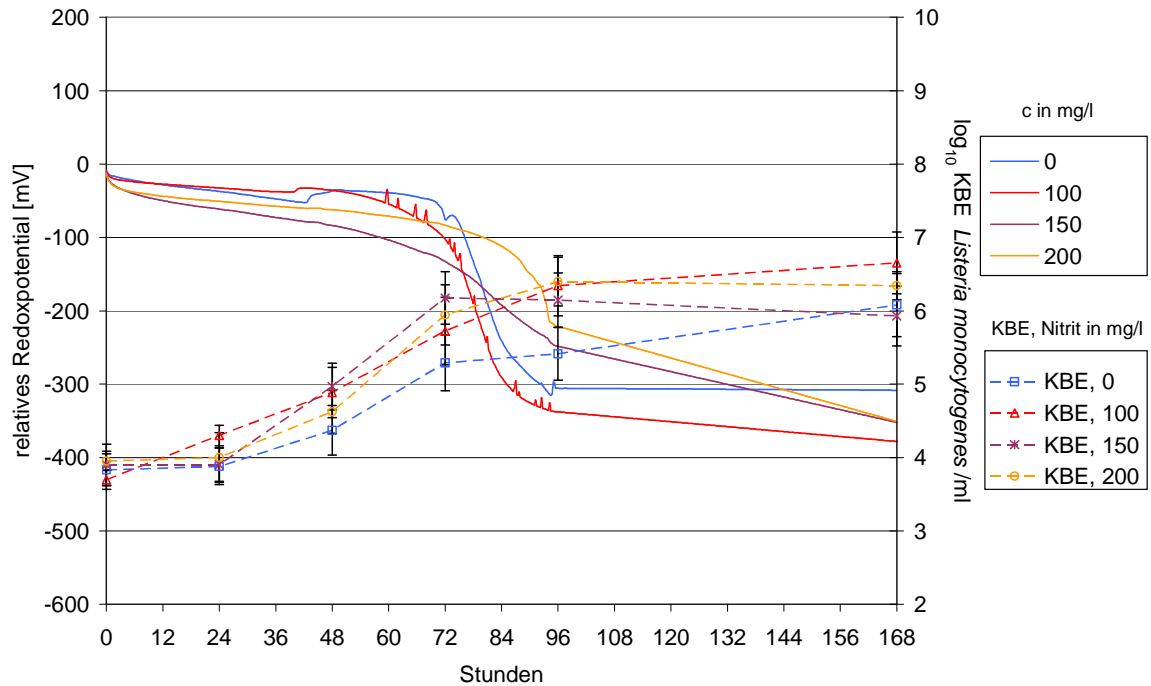


Abb.105: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

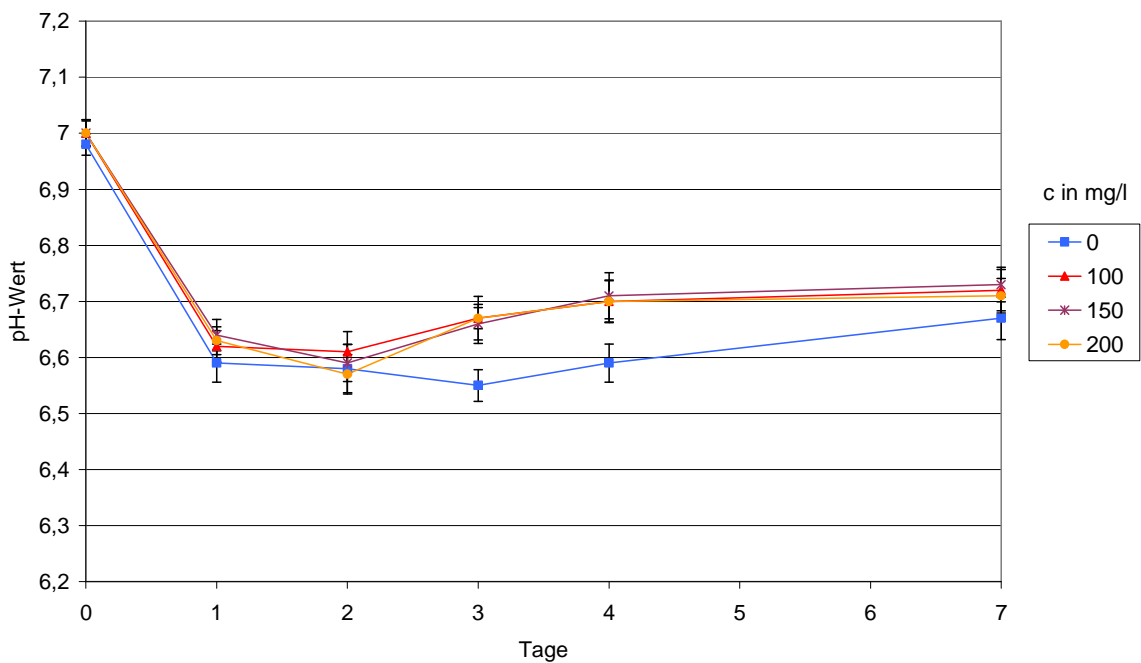


Abb.106: Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

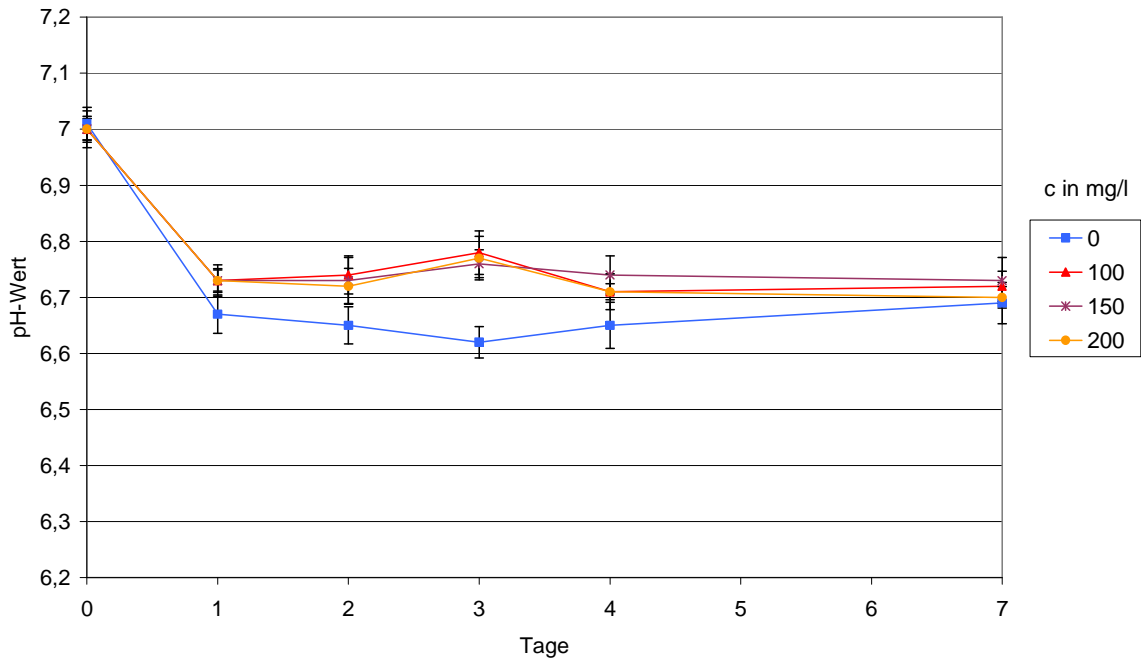


Abb.107:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,97 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

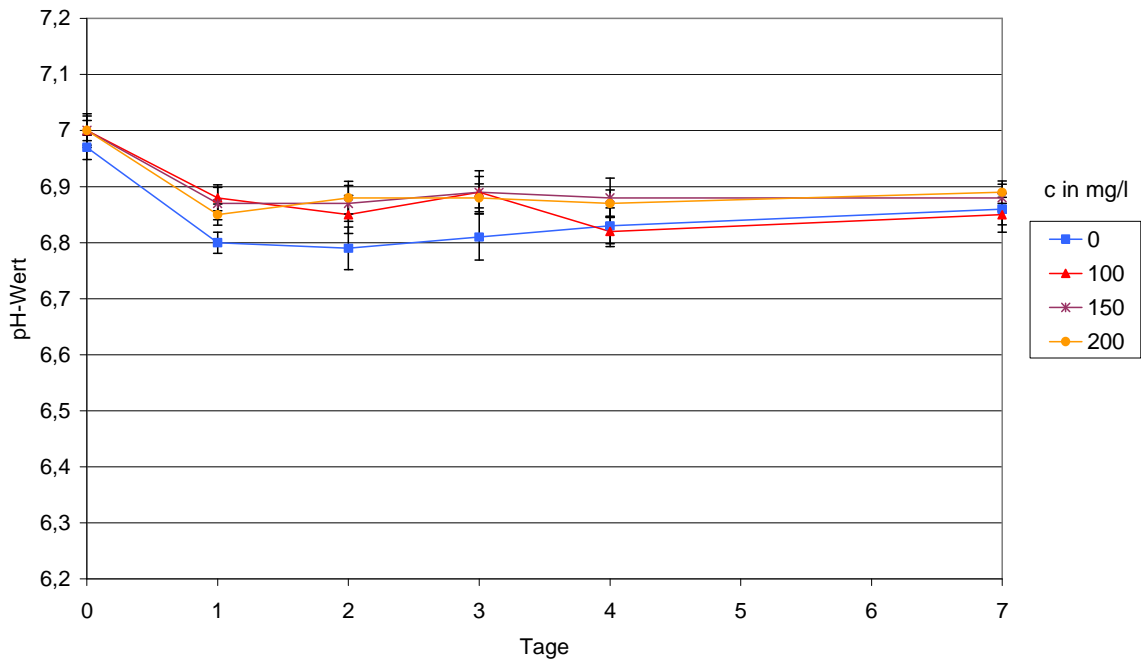


Abb.108:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 7, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

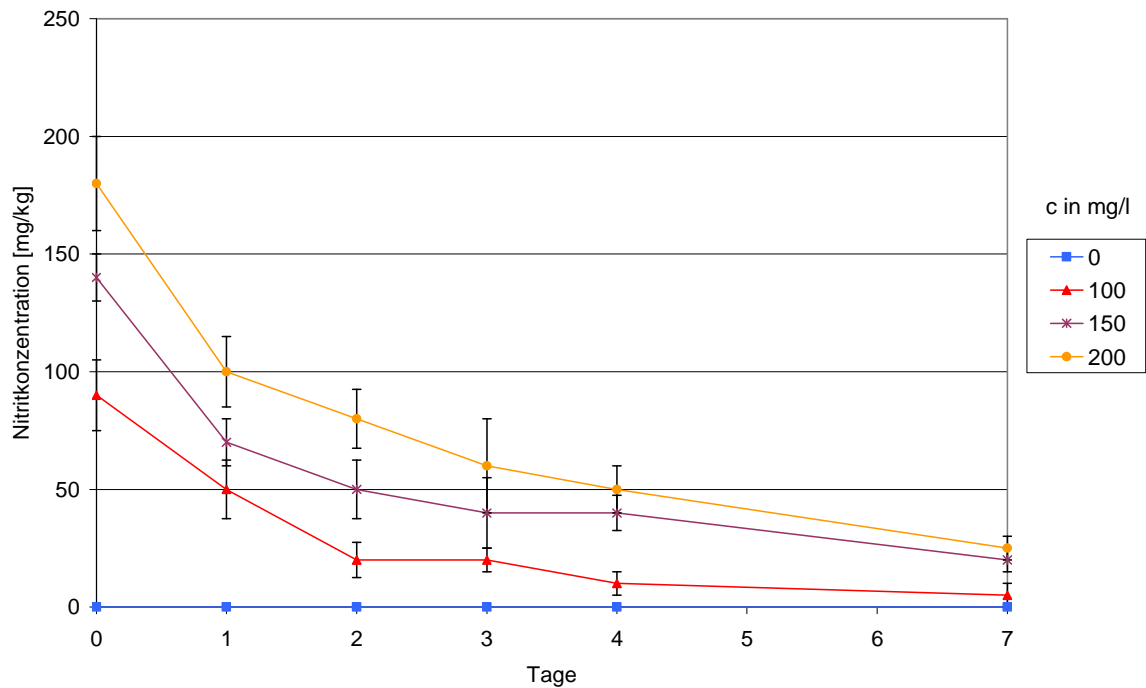


Abb.109:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,98. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

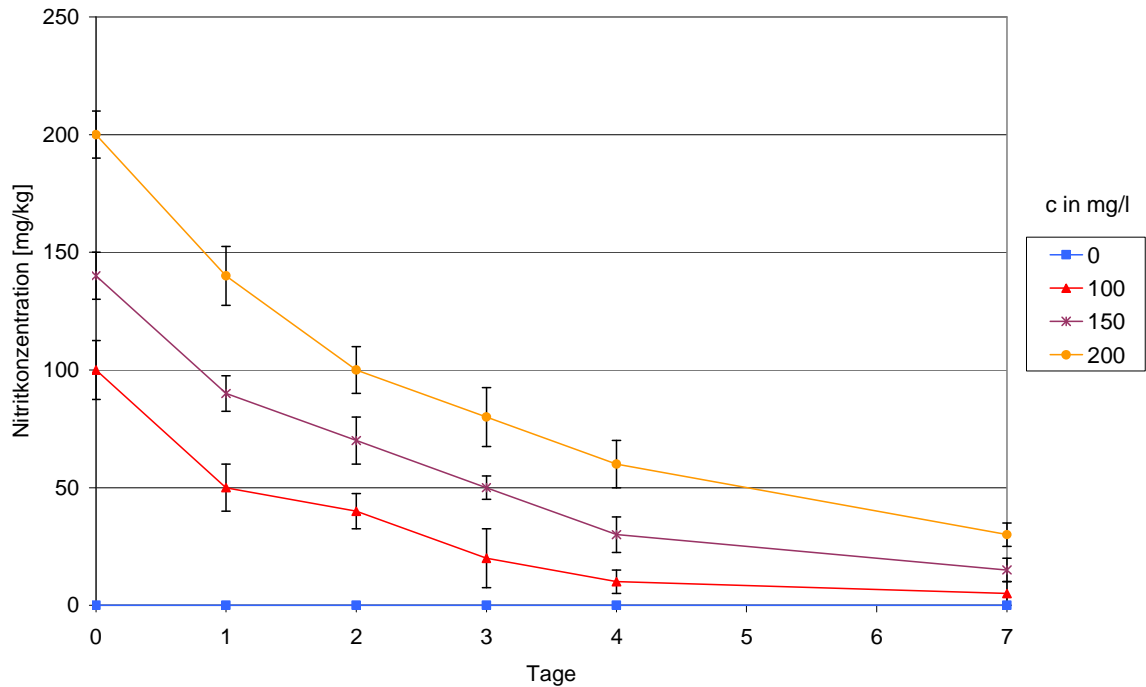


Abb.110:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 7 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

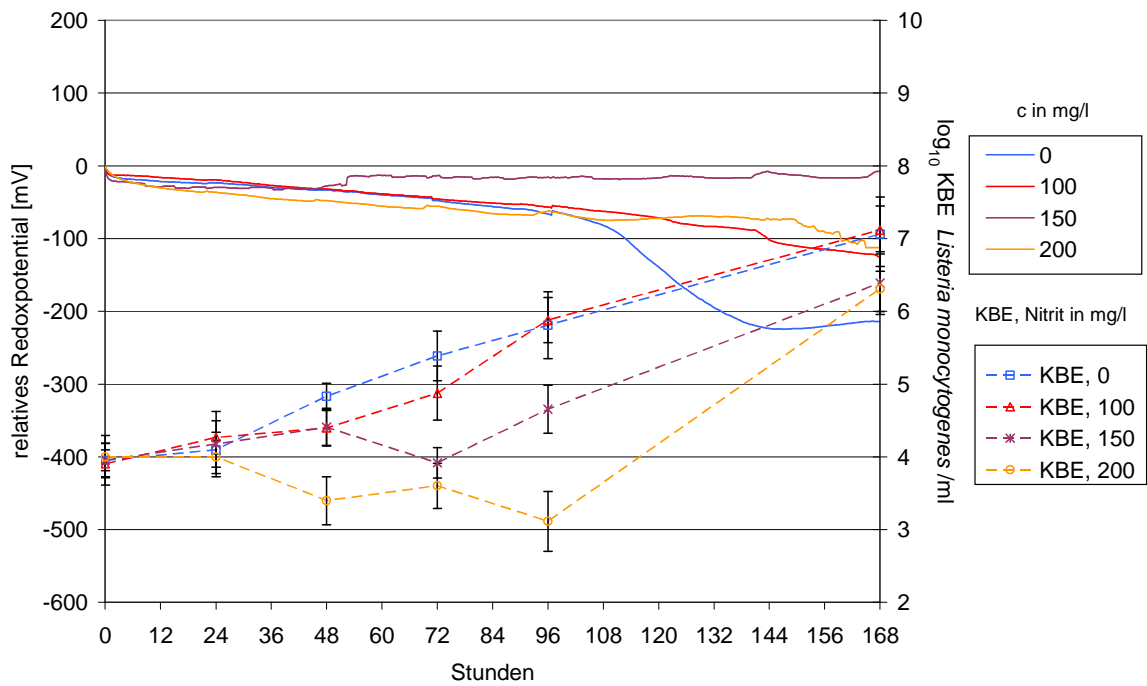


Abb.112: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,97; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

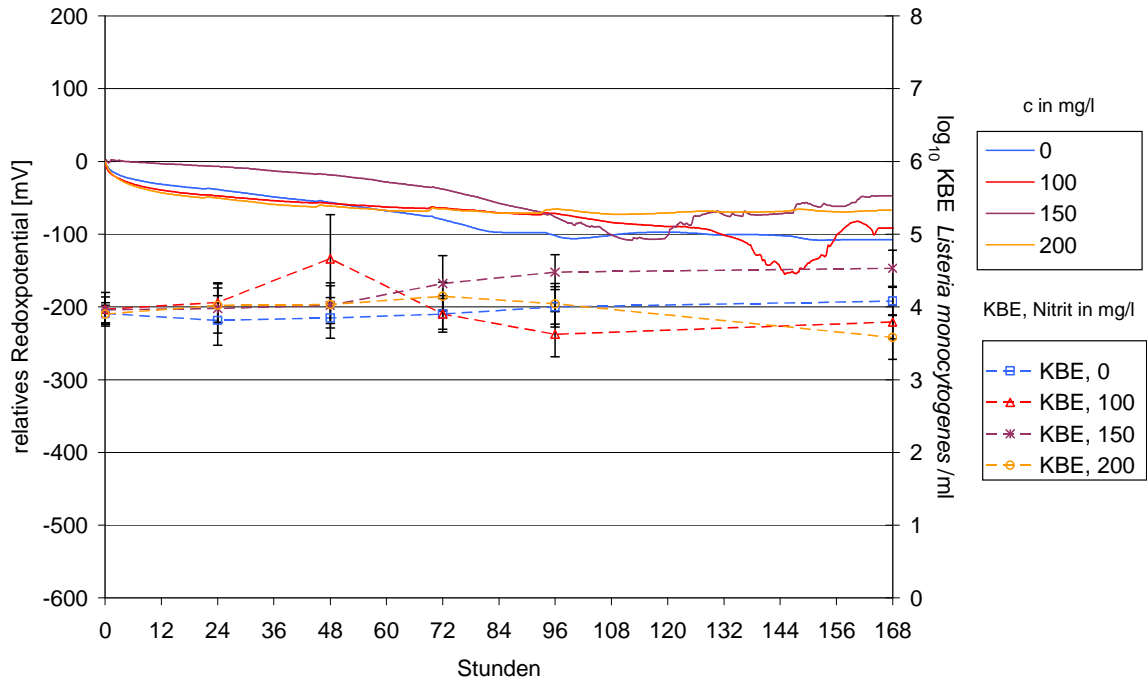


Abb.113: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

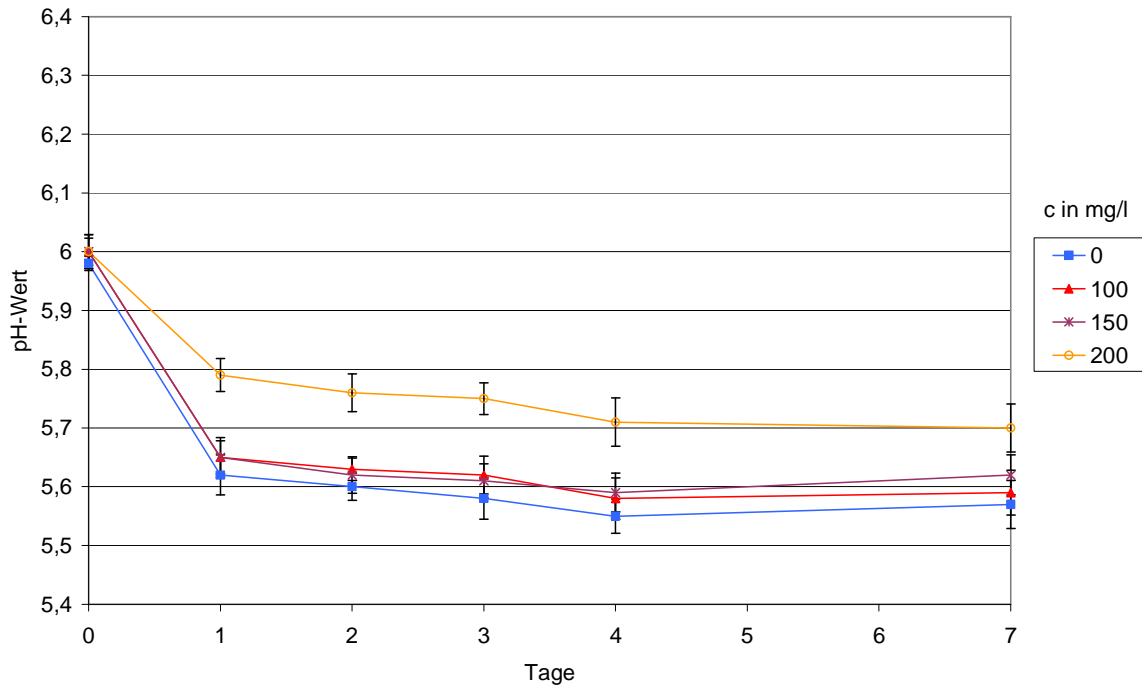


Abb.114:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 6, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

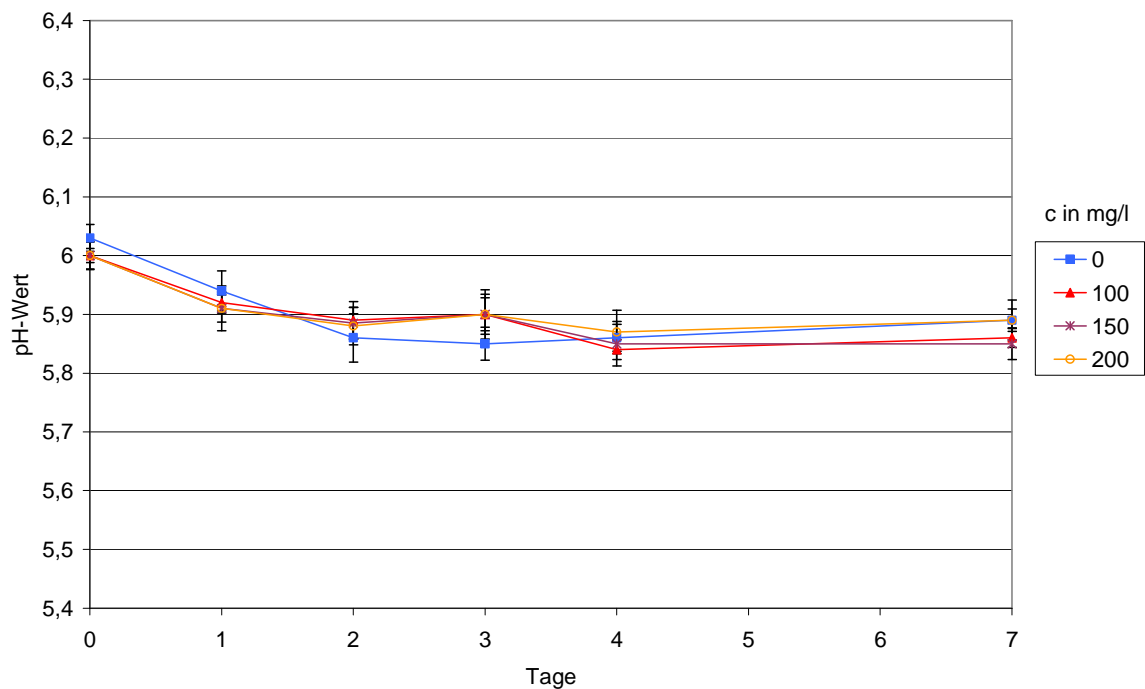


Abb.115:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 6, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

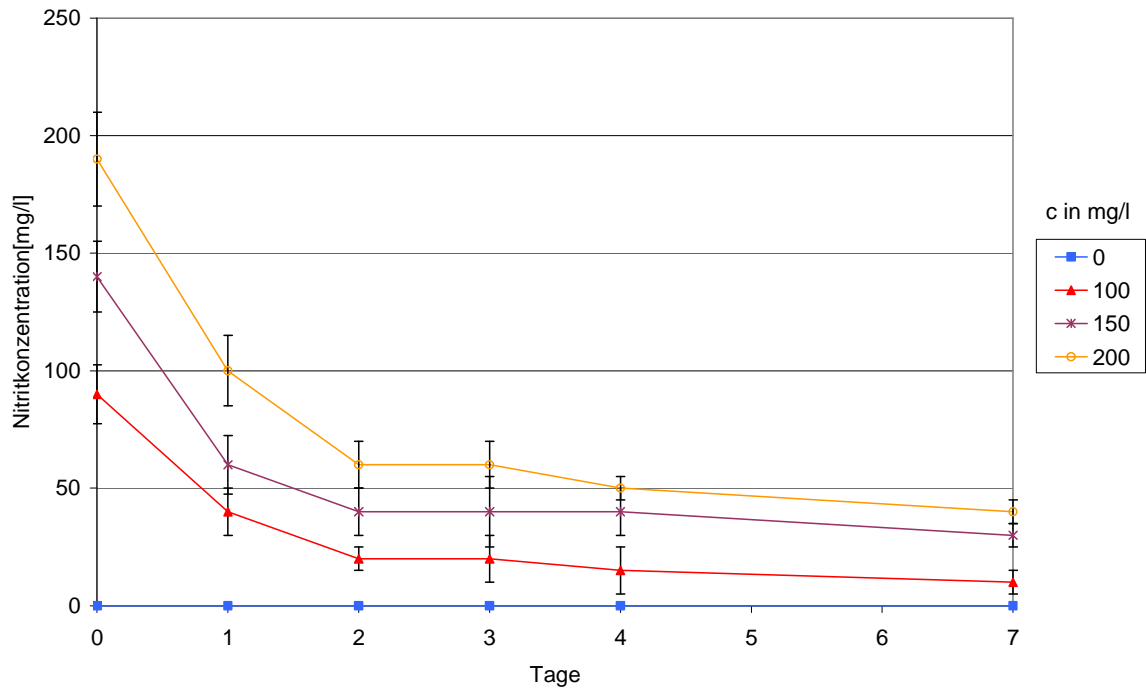


Abb.116:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,98. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

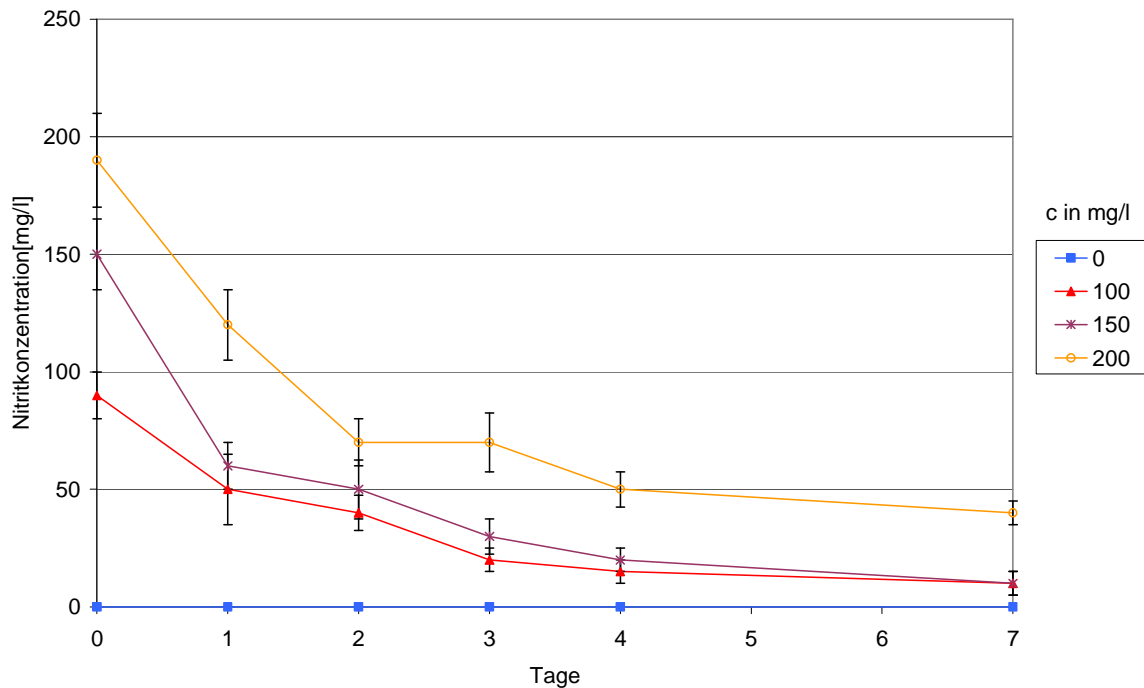


Abb.117:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 6 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

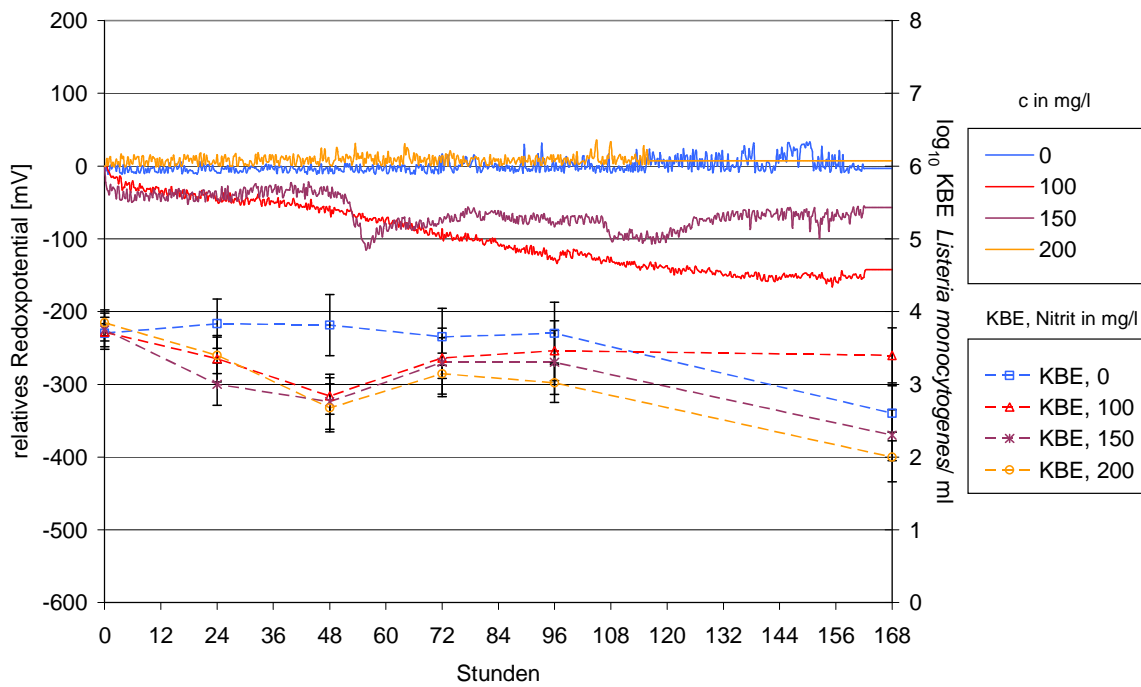


Abb.118: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Boullion bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,98; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

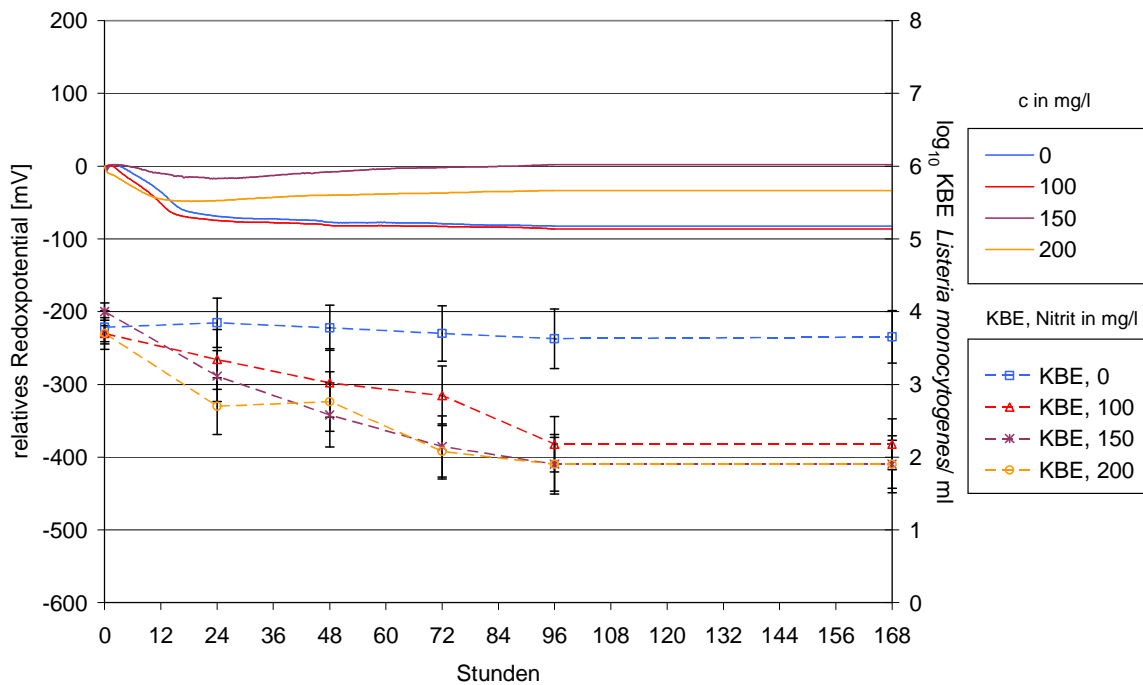


Abb.120: Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen c (0mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l und 200 mg/l) auf den Redoxpotentialverlauf und auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Boullion bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,94; Die Datenpunkte repräsentieren Mittel- bzw. Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

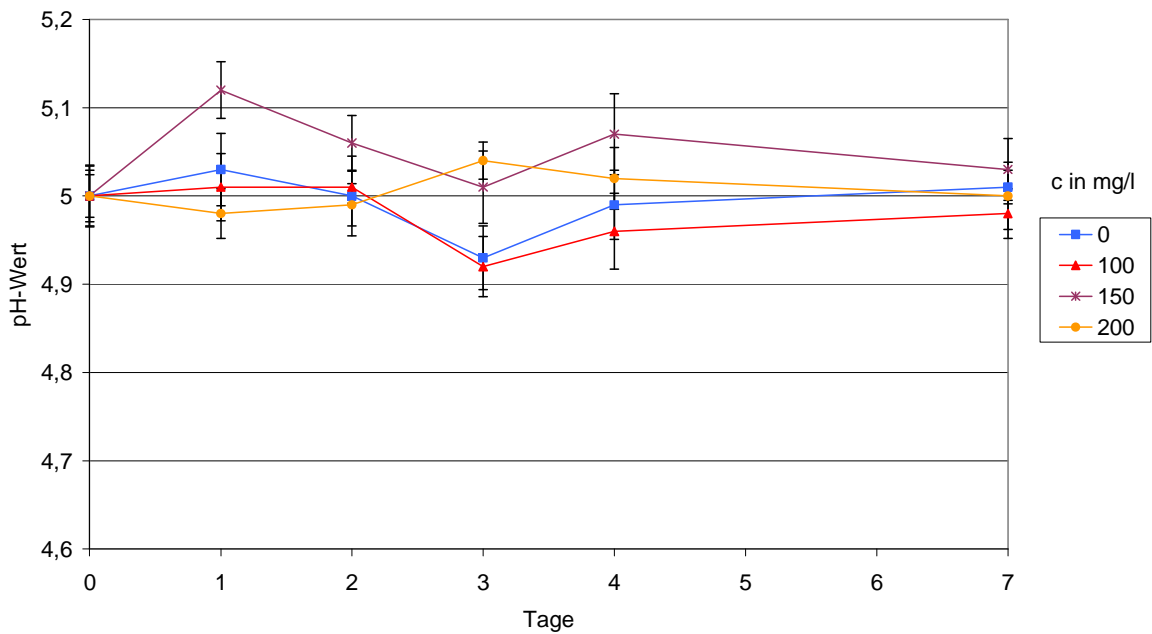


Abb.121:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 5, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

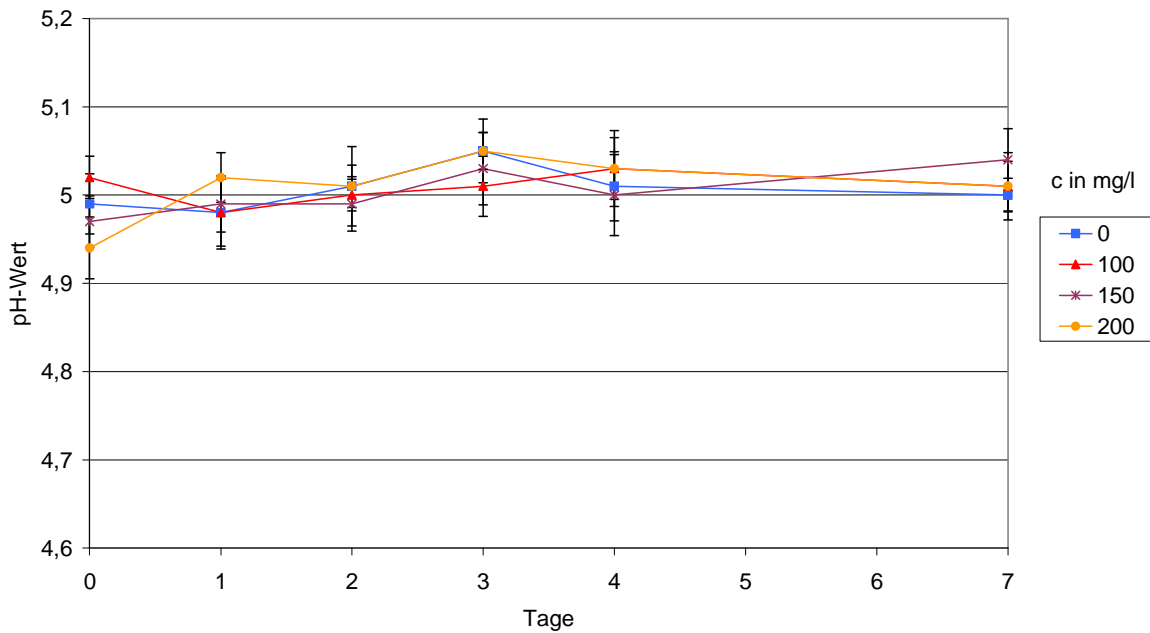


Abb.122:Verlauf der pH-Werte in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 5, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

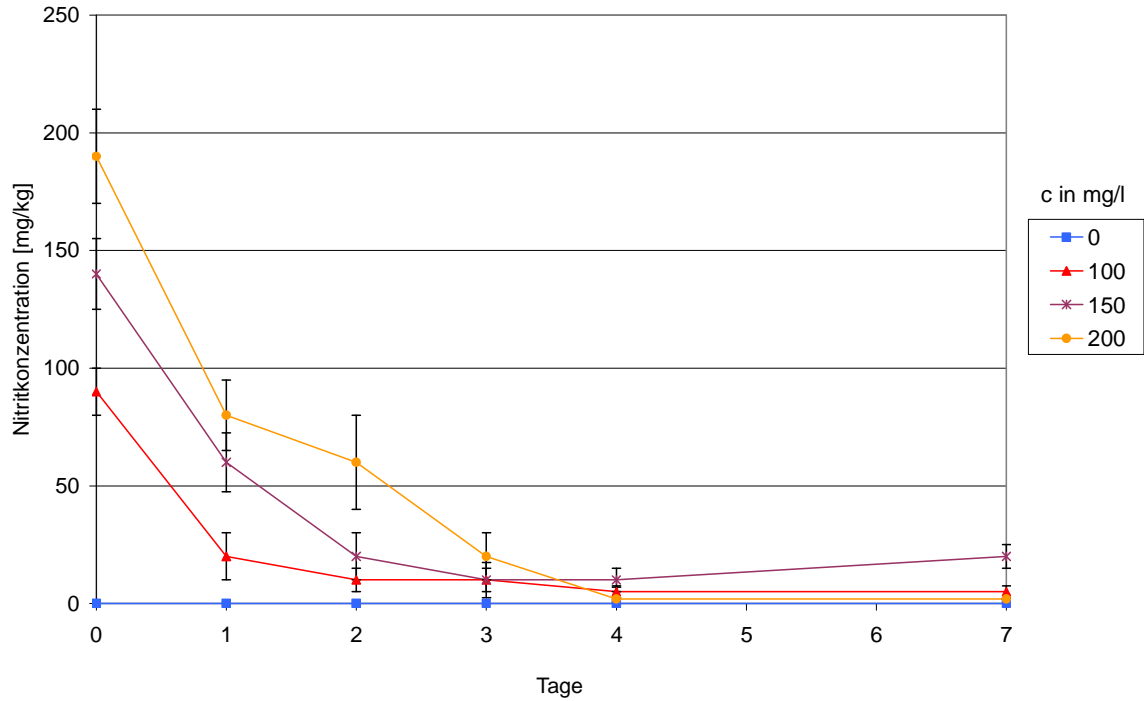


Abb.123:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,97. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

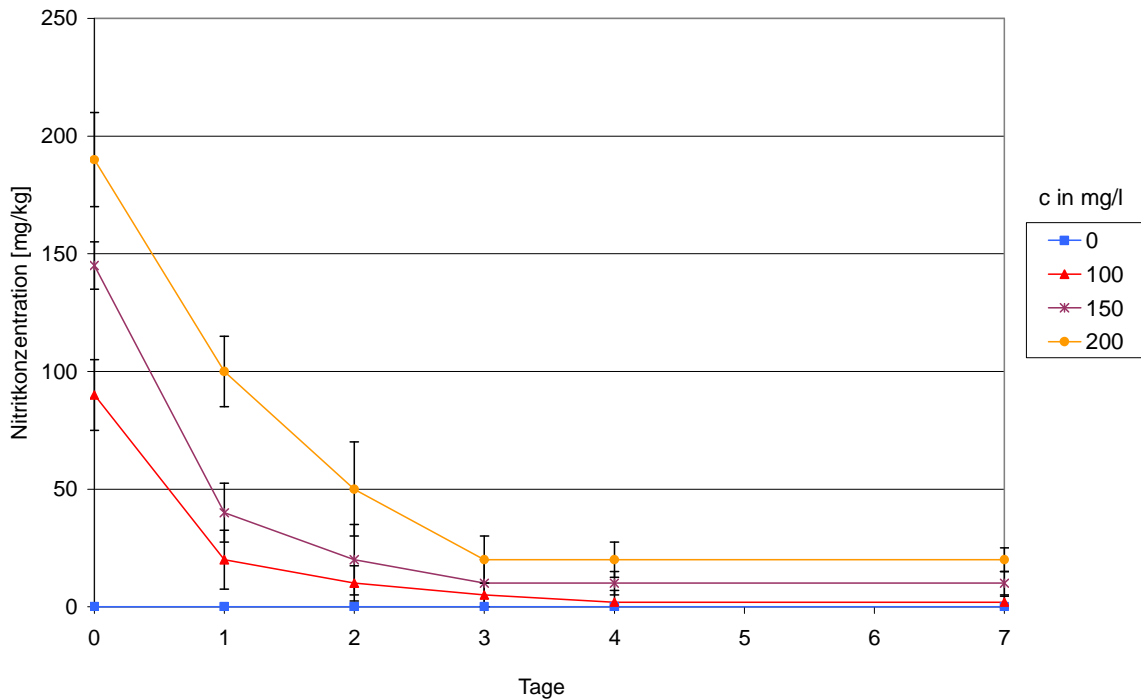


Abb.124:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100 150 und 200 mg/l) in Fraser-Bouillon (inokuliert mit *Listeria monocytogenes*) bei 17 °C, pH 5 und a_w : 0,94. Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

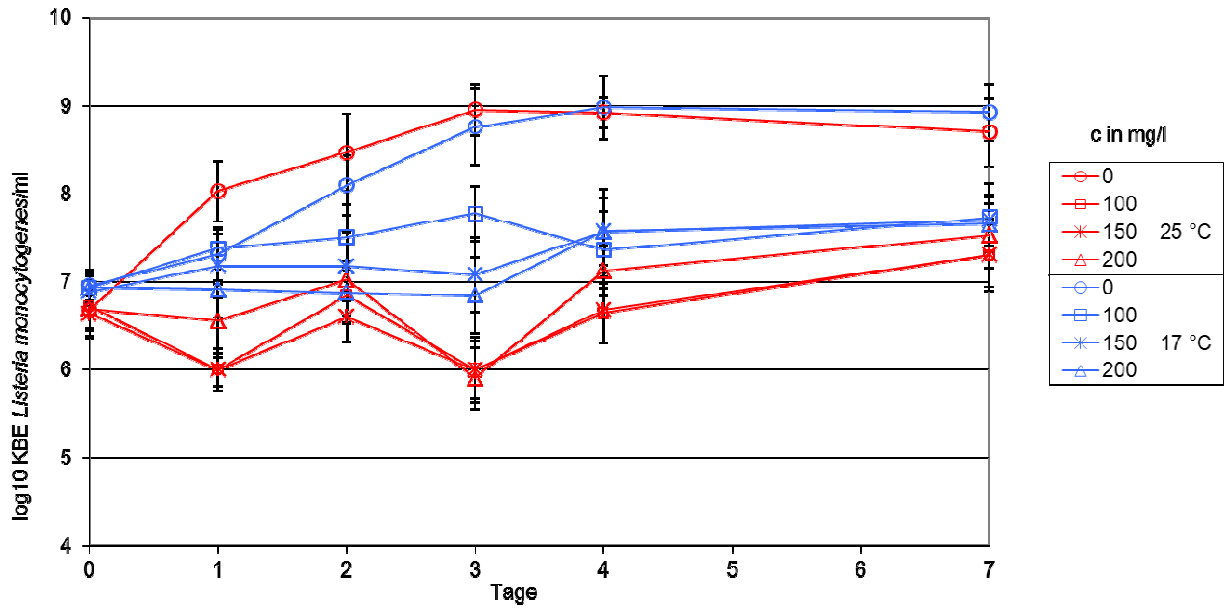


Abb.125: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 7, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

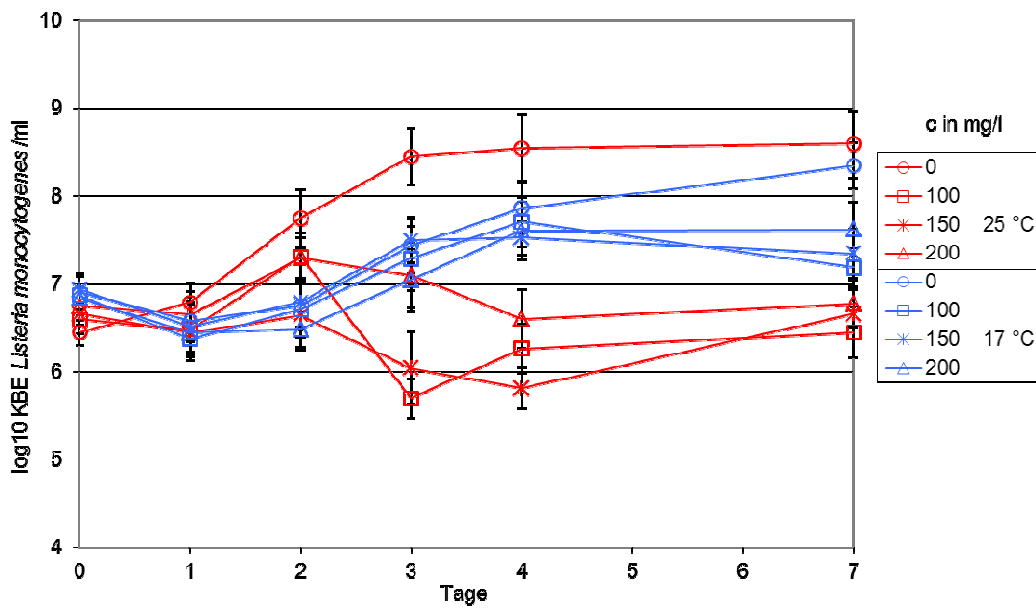


Abb.126: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 7, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

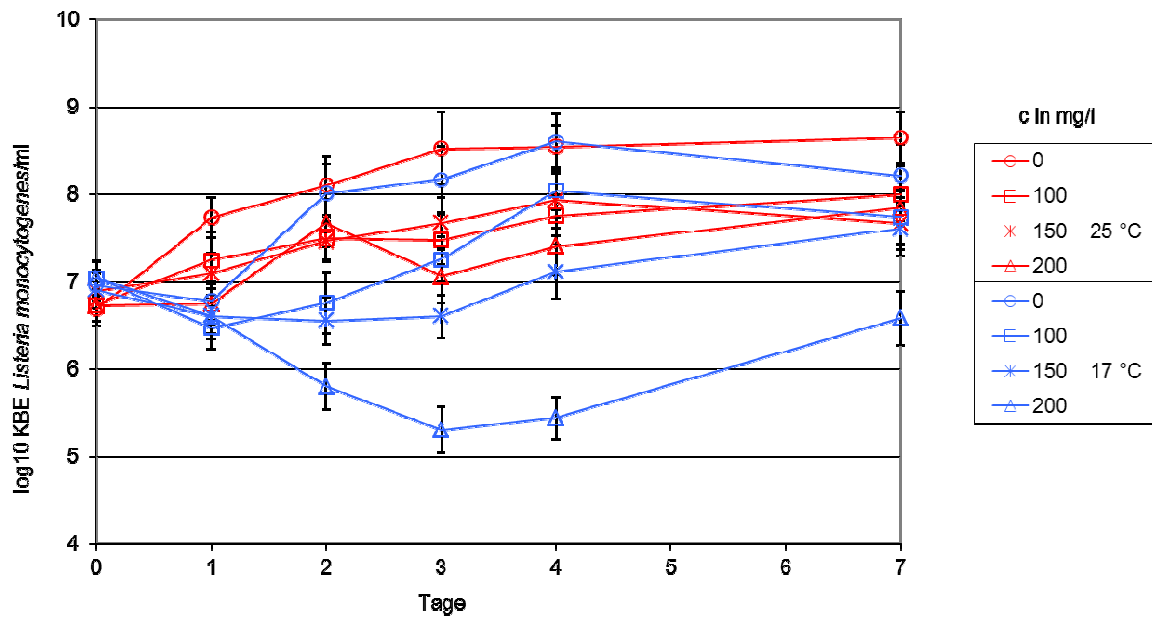


Abb.127: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 6, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

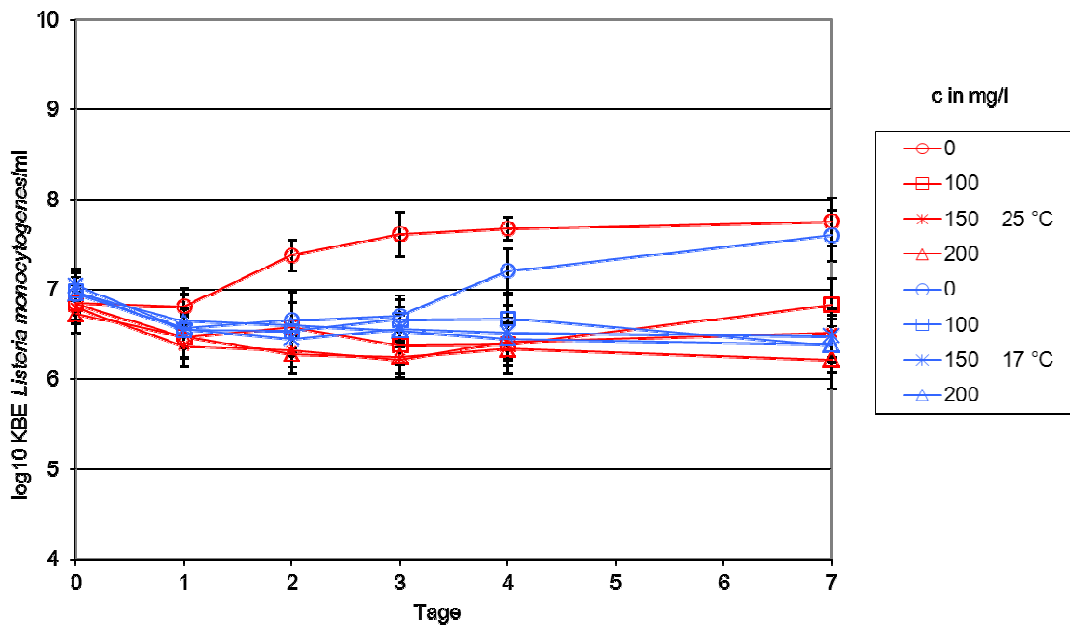


Abb.128: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 6, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

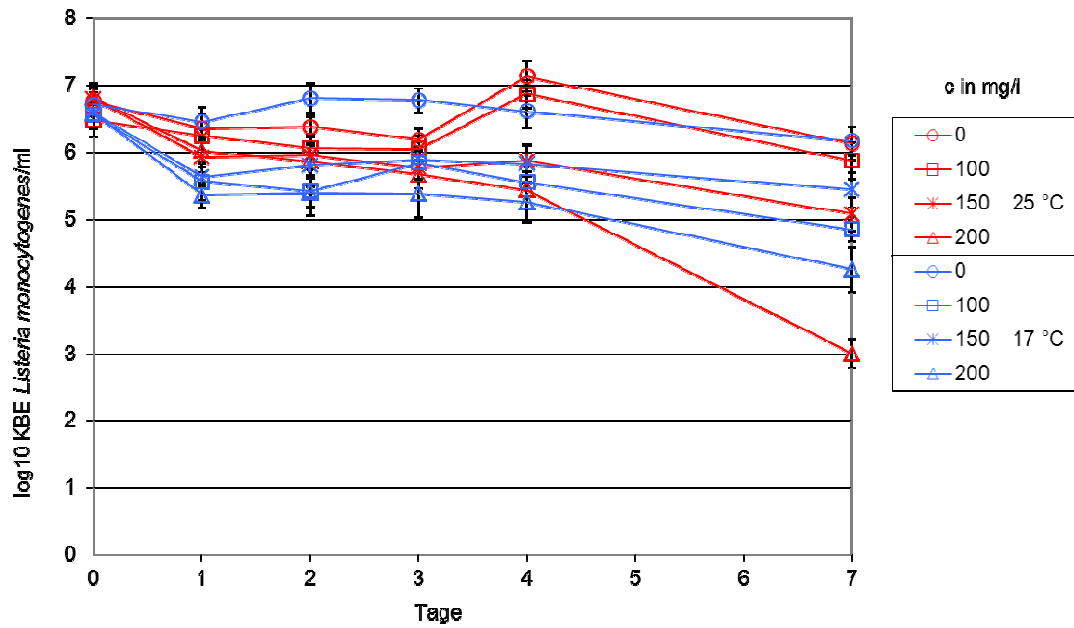


Abb.129: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 5, a_w : 0,98 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

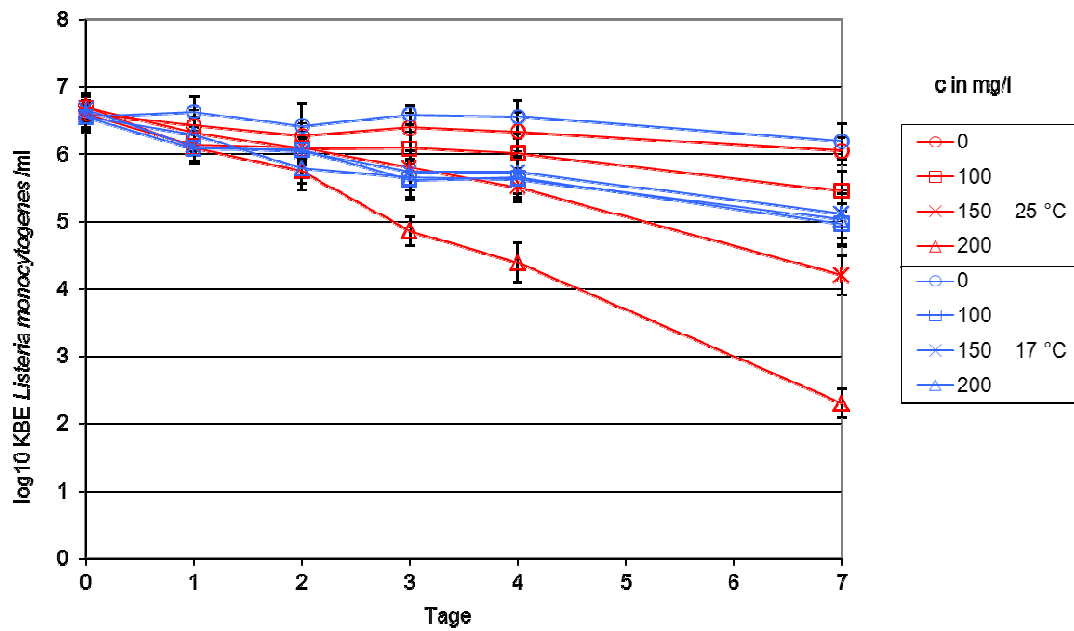


Abb.130: Vergleich des Temperatureinflusses (25 °C und 17 °C) auf das Keimwachstum von *Listeria monocytogenes* in Fraser-Bouillon bei pH 5, a_w : 0,94 und unterschiedlichen Natriumnitritkonzentrationen c (0, 100, 150 und 200 mg/l).

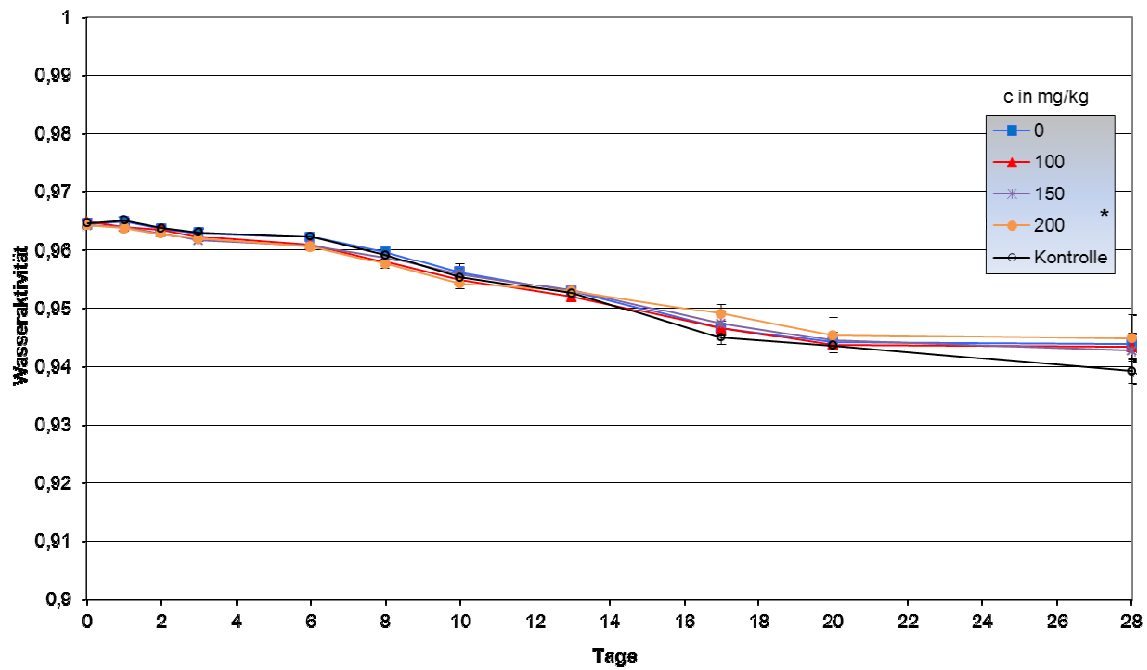


Abb.141:Verlauf der a_w -Werte in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm B und 3 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

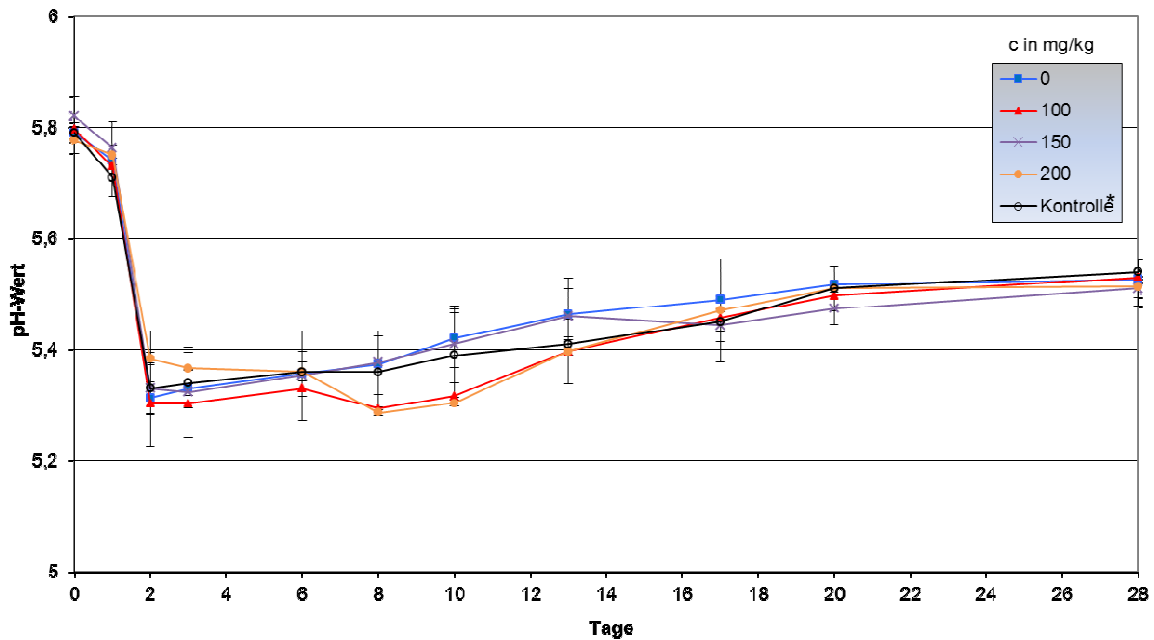


Abb.143:Verlauf der pH-Werte in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm B und 3 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

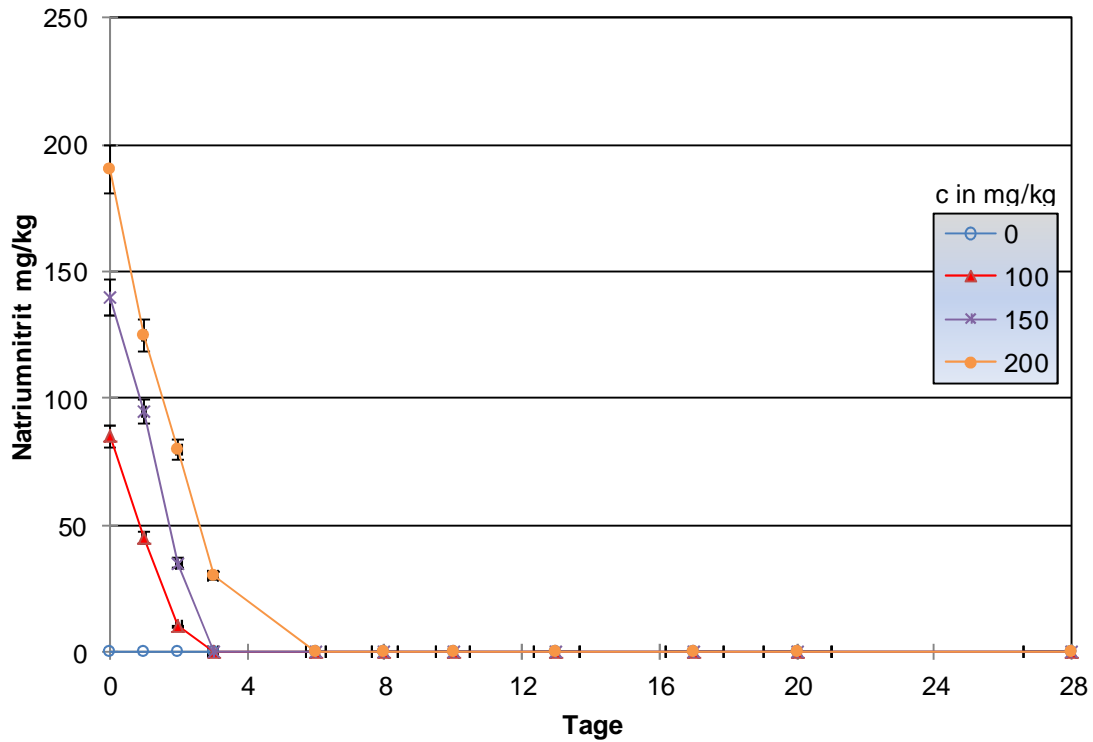


Abb.144:Verlauf der Natriumnitritkonzentration (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm A). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

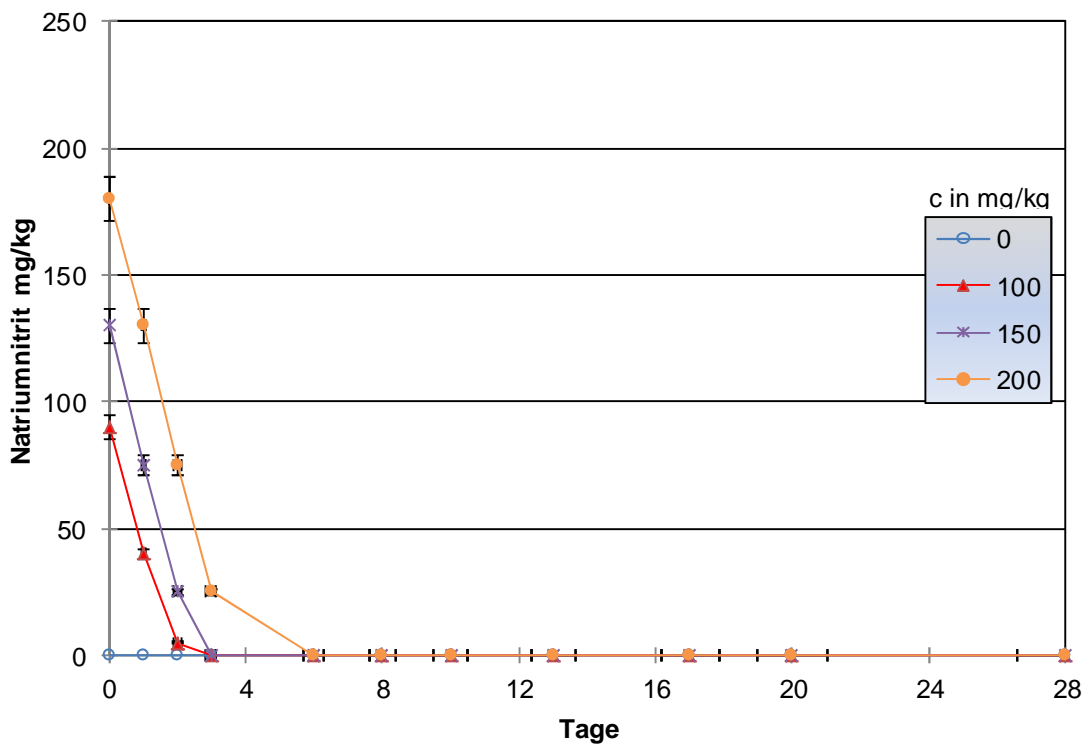


Abb.145:Verlauf der Natriumnitritkonzentration (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (Reifeprogramm B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

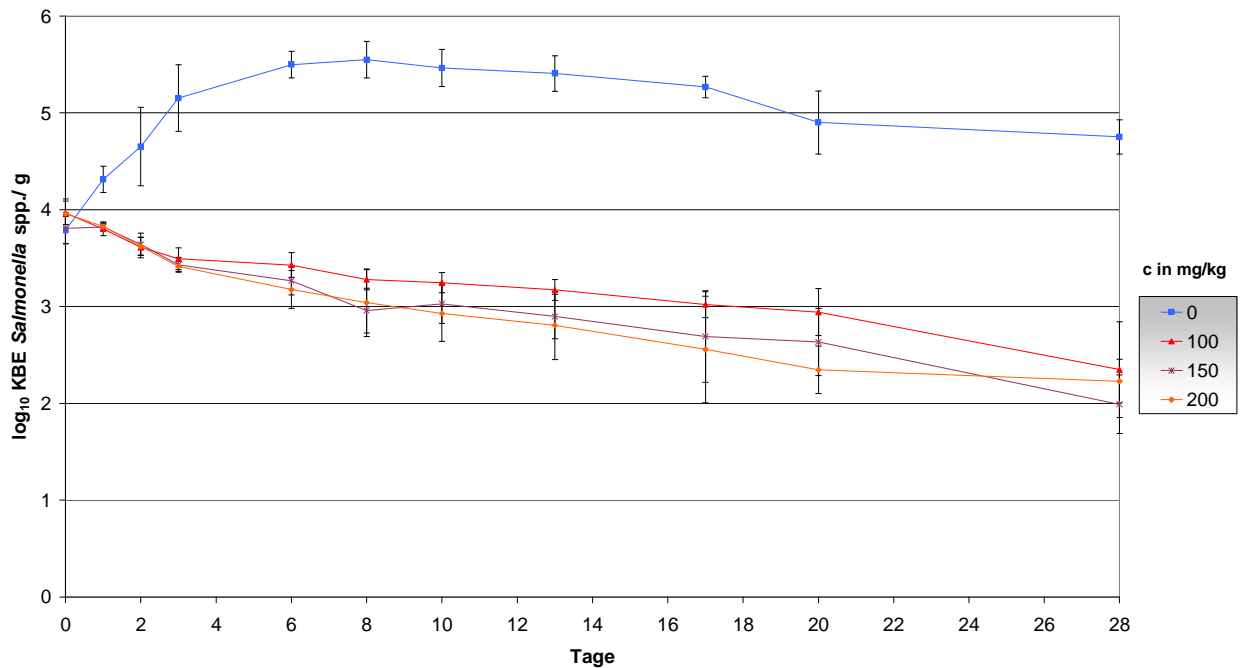


Abb.149: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

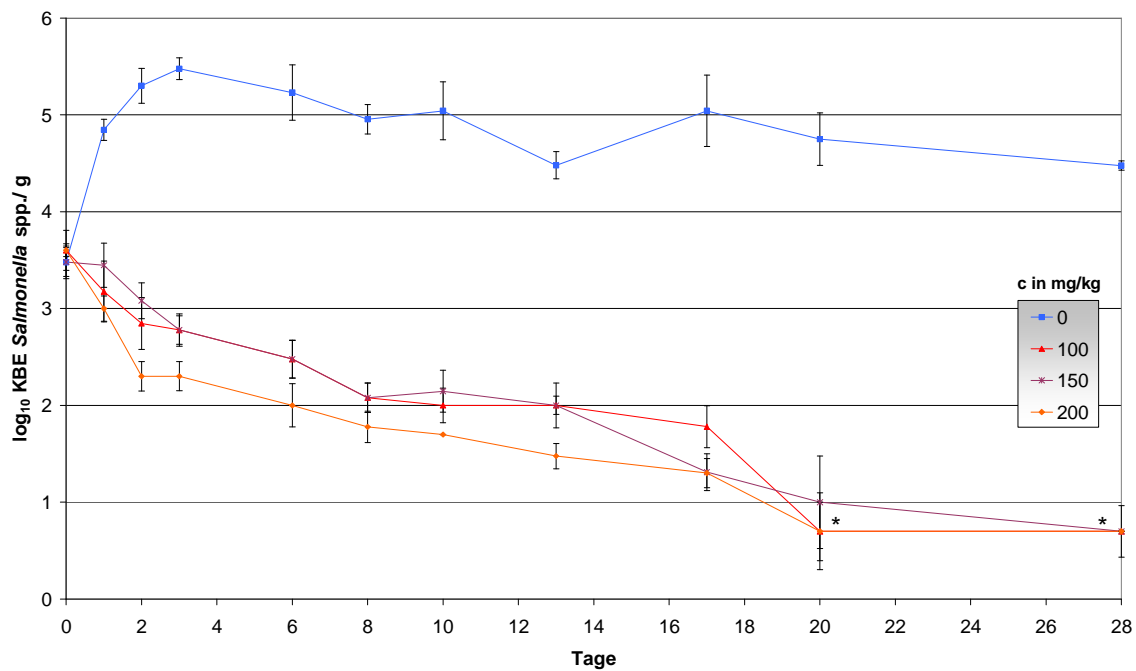


Abb.151: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

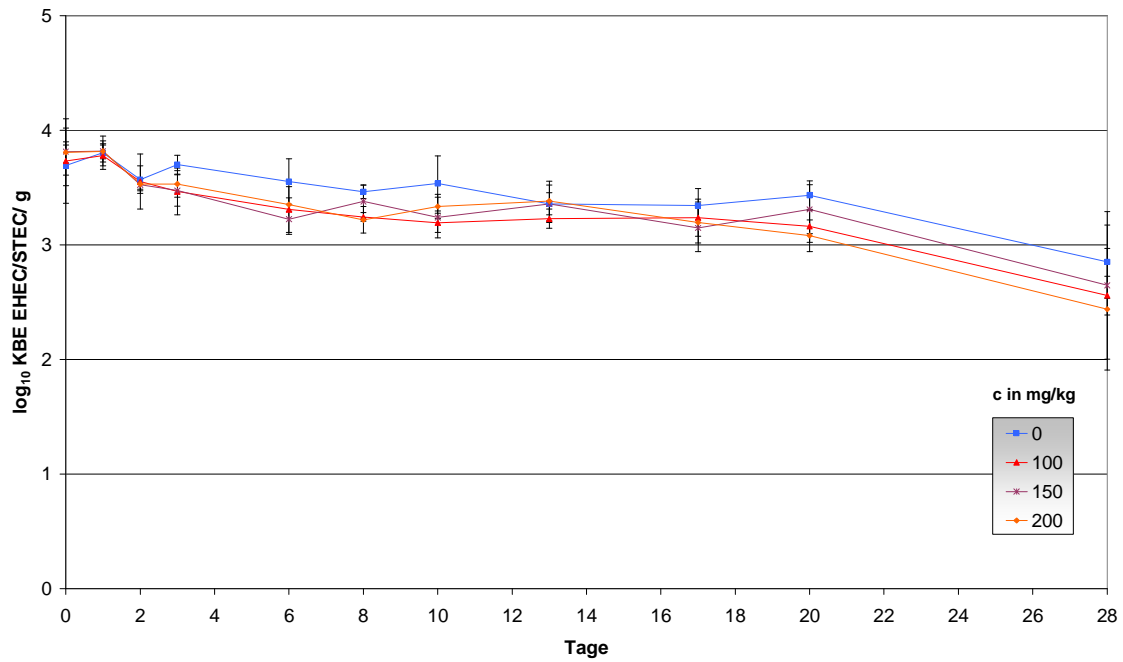


Abb.153: Verhalten von STEC/EHEC in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

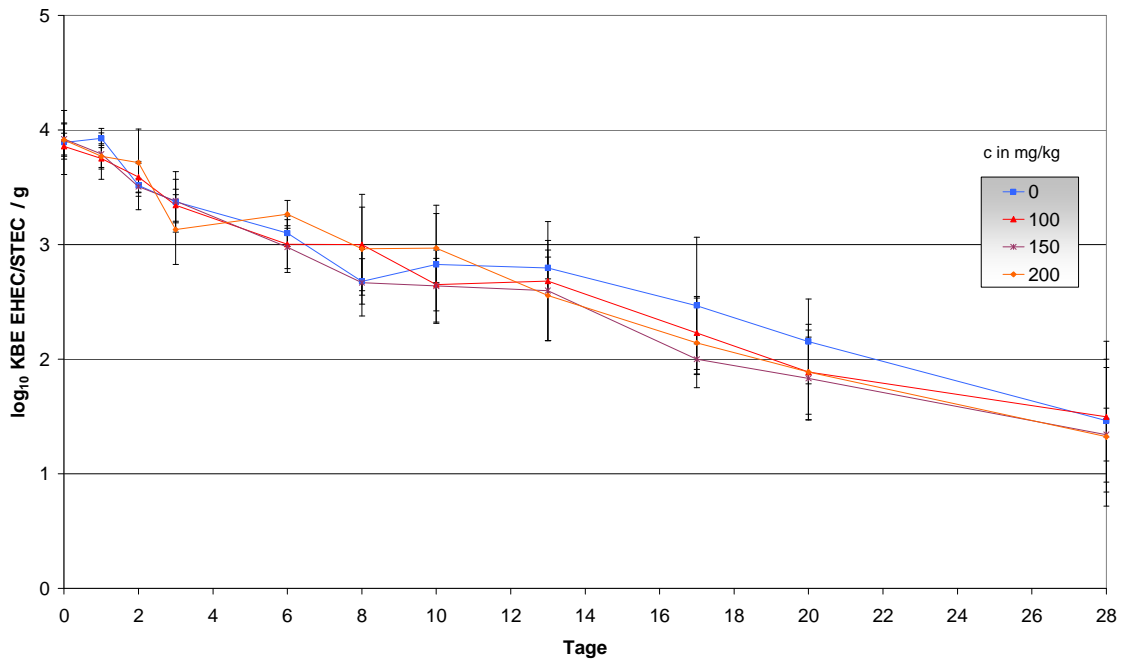


Abb.155: Verhalten von STEC/EHEC in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

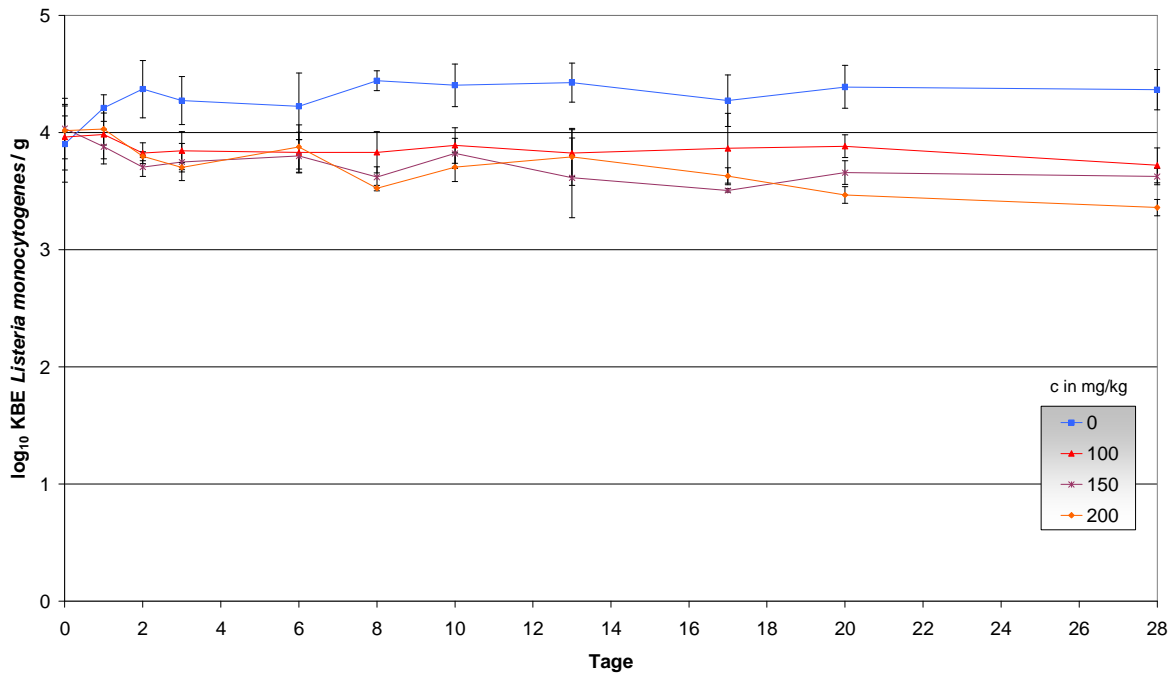


Abb.157: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm A) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

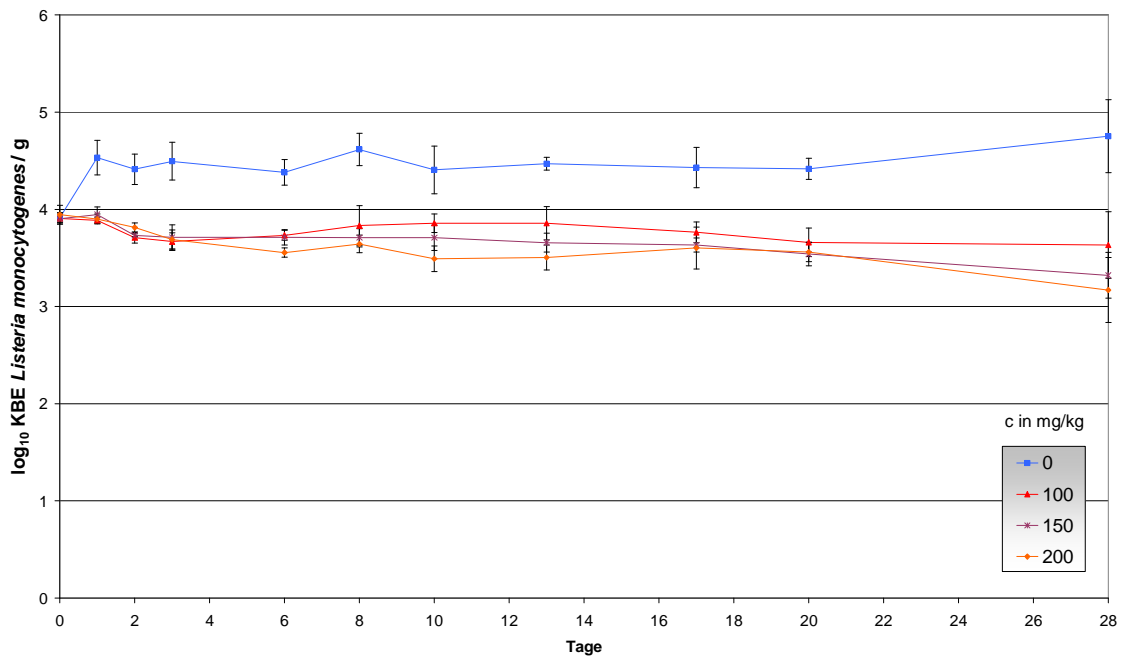


Abb.159: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer kurzgereiften streichfähigen Rohwurst (3 % NaCl; Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

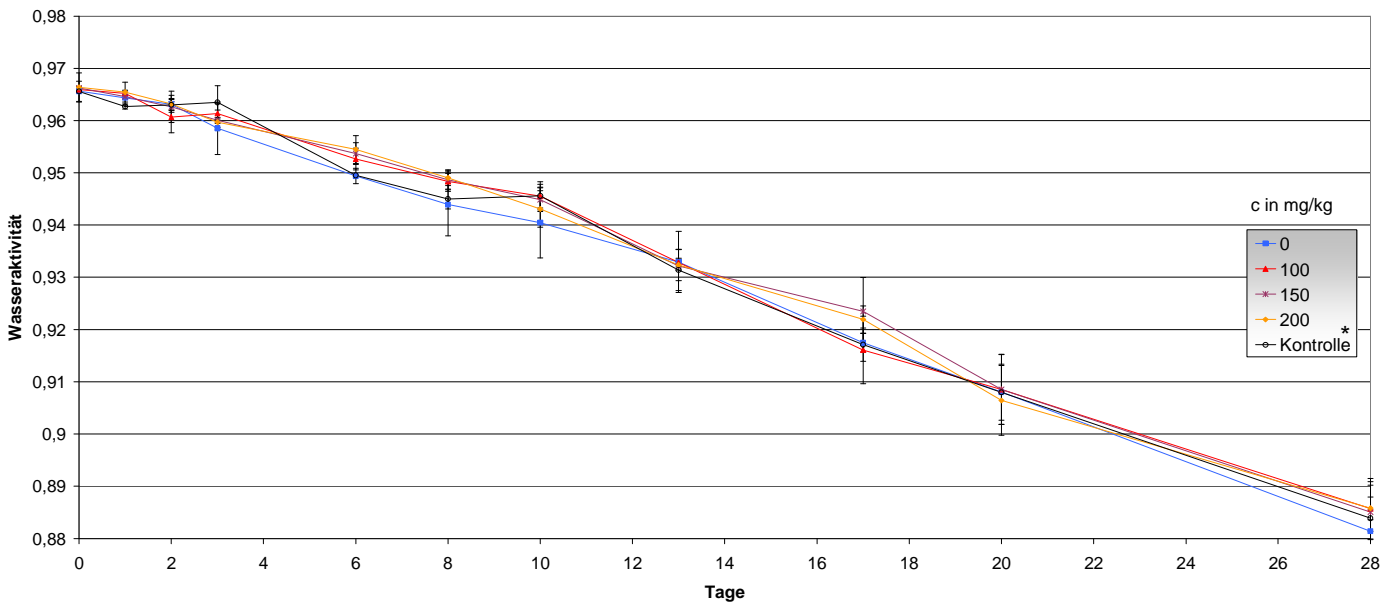


Abb.161:Verlauf der a_w -Werte in einer schnellgereiften schnittfesten Rohwurst (Reifeprogramm B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

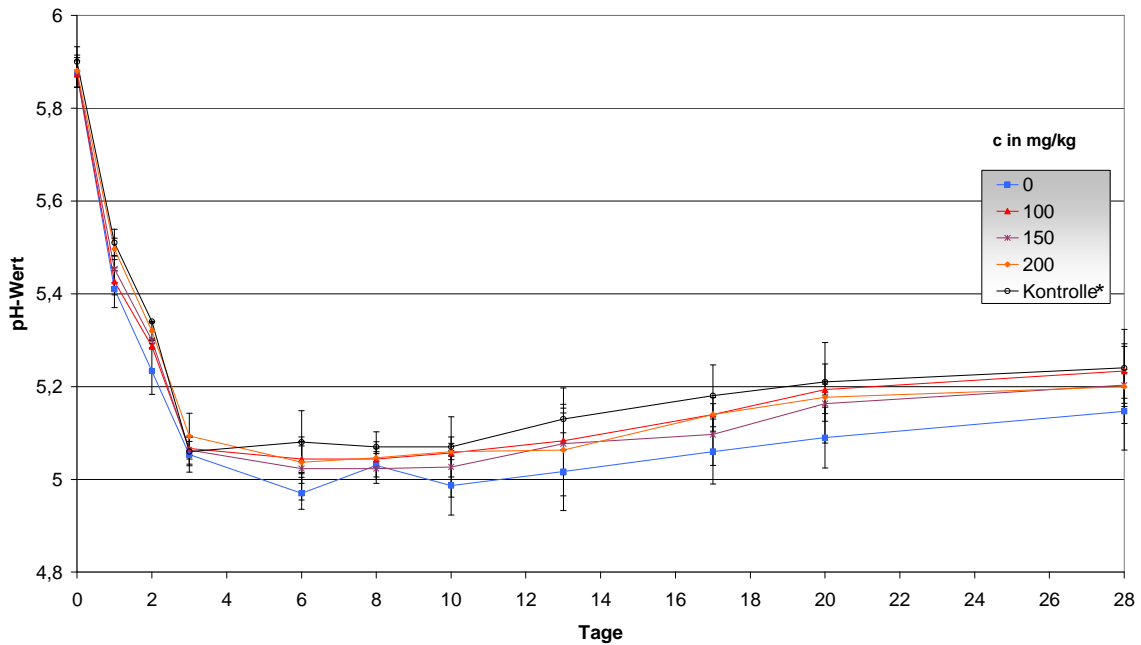


Abb.163:Verlauf der pH-Werte in einer schnellgereiften schnittfesten Rohwurst (Reifeprogramm B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

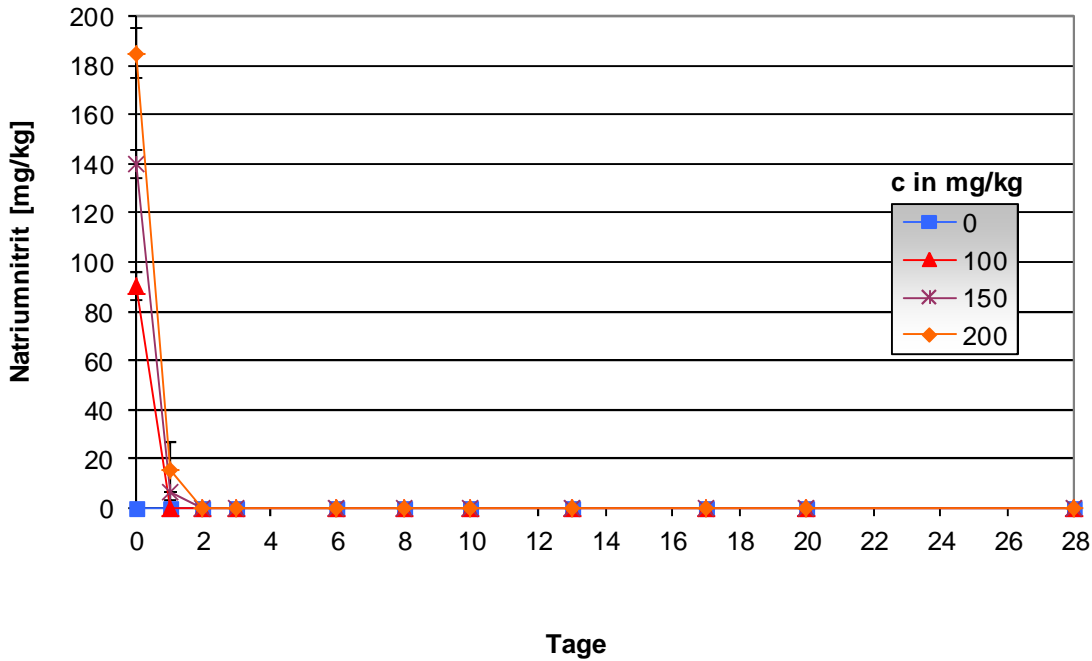


Abb.165:Verlauf der Natriumnitritkonzentration (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm B). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

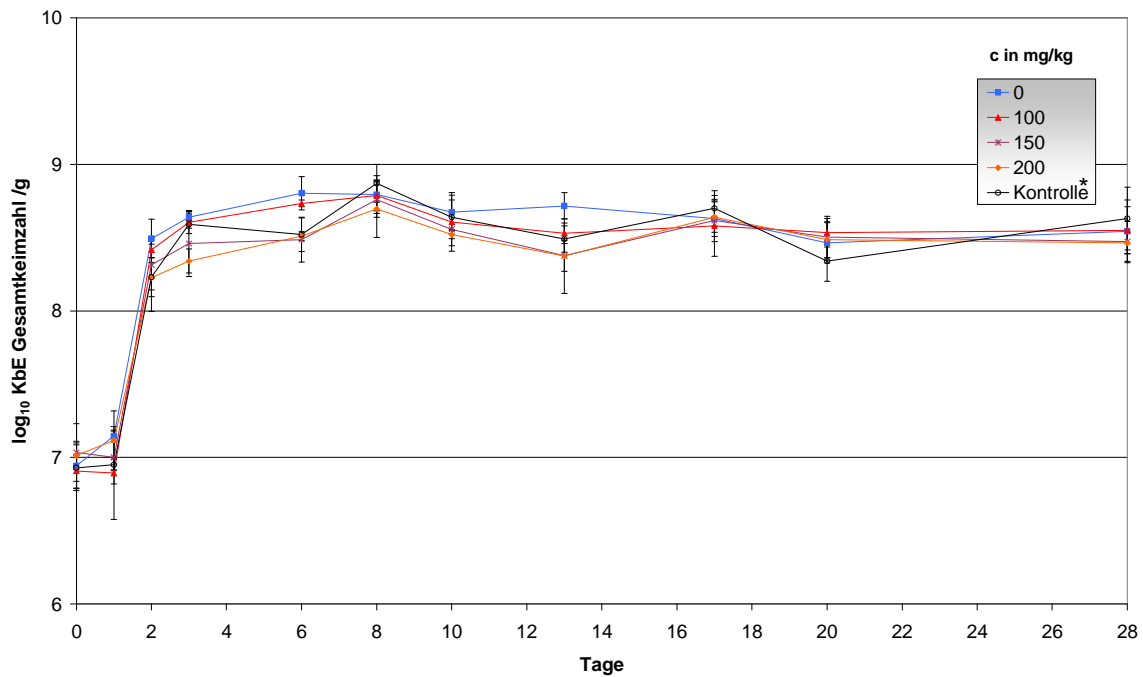


Abb.166:Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm A) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

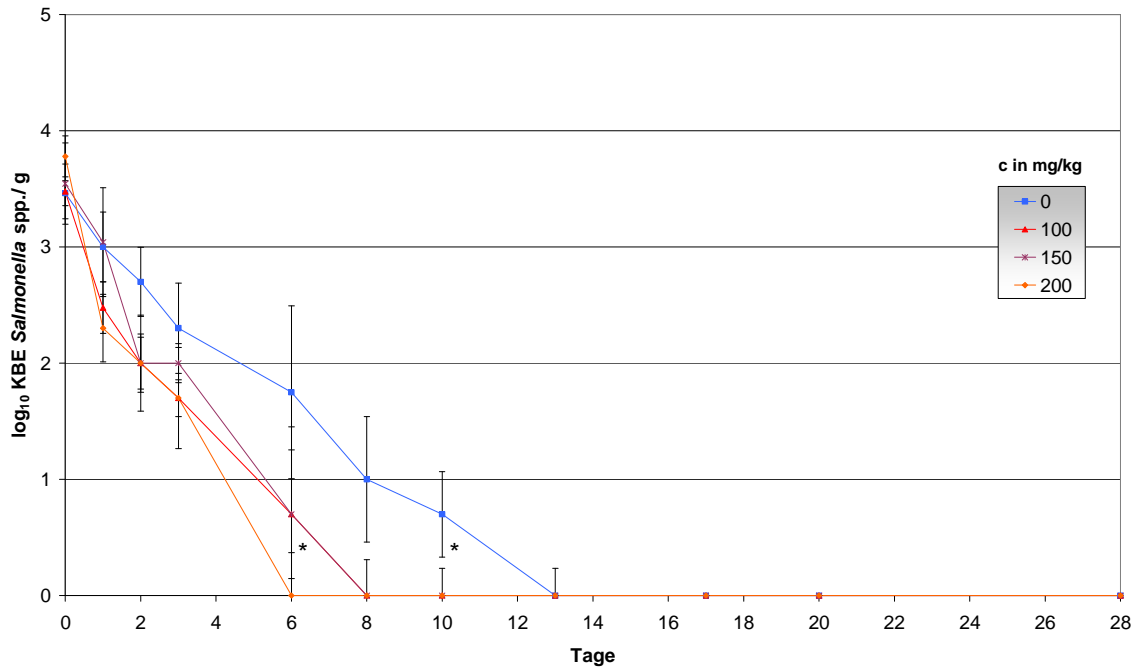


Abb.169: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

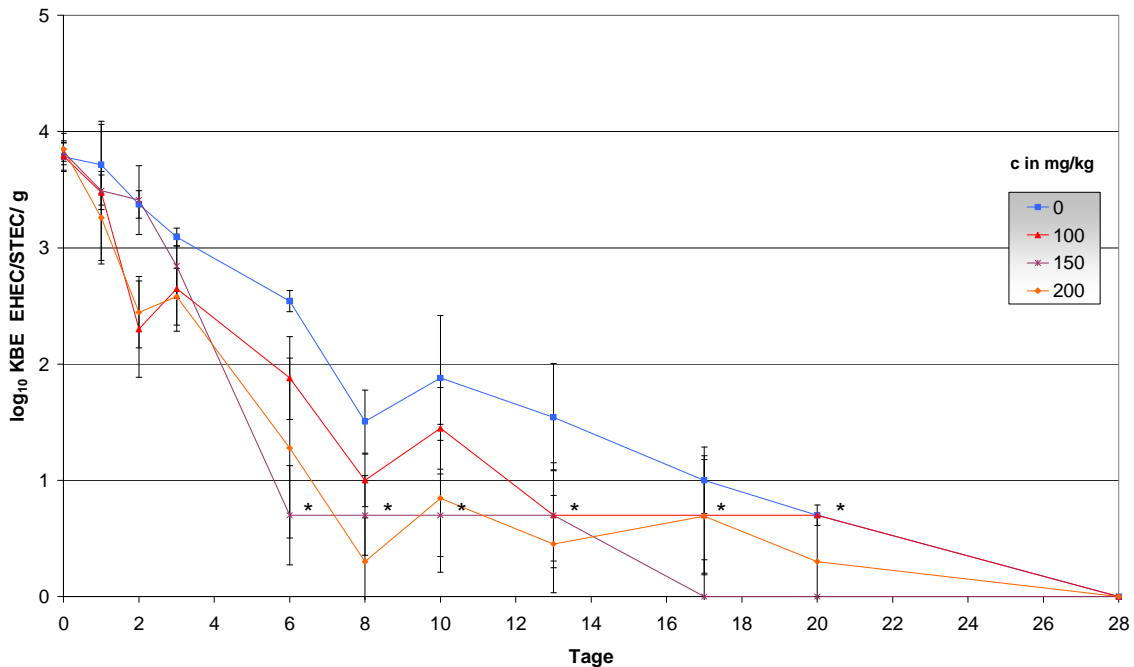


Abb.171: Verhalten von STEC/EHEC in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

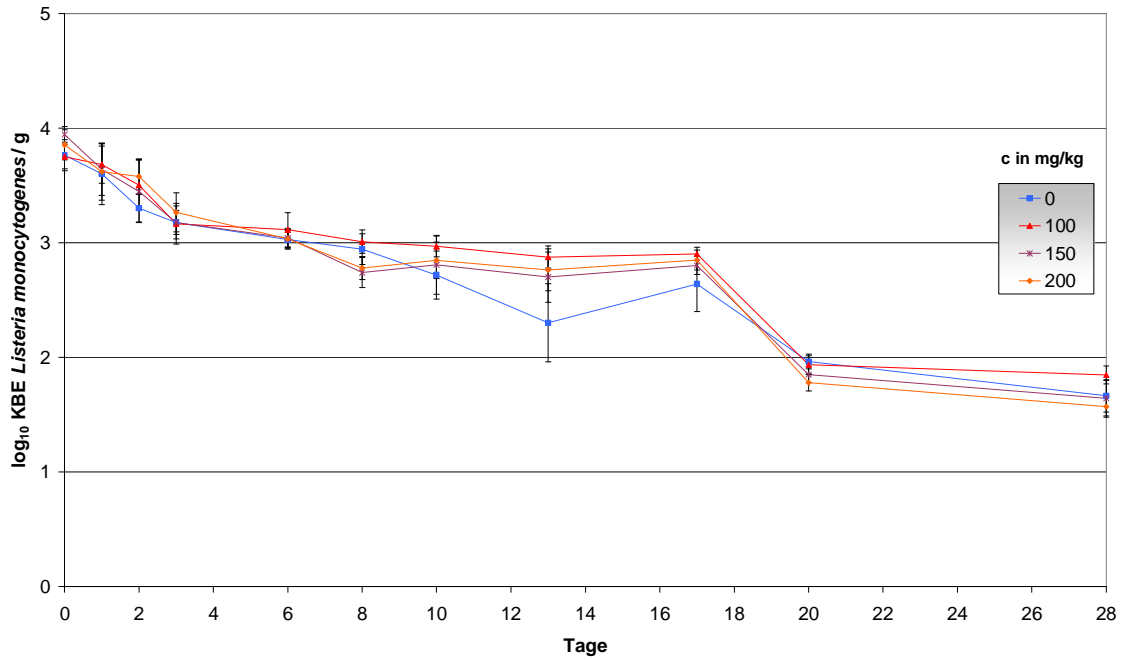


Abb.173: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer schnellgereiften Rohwurst (Reifeprogramm B) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

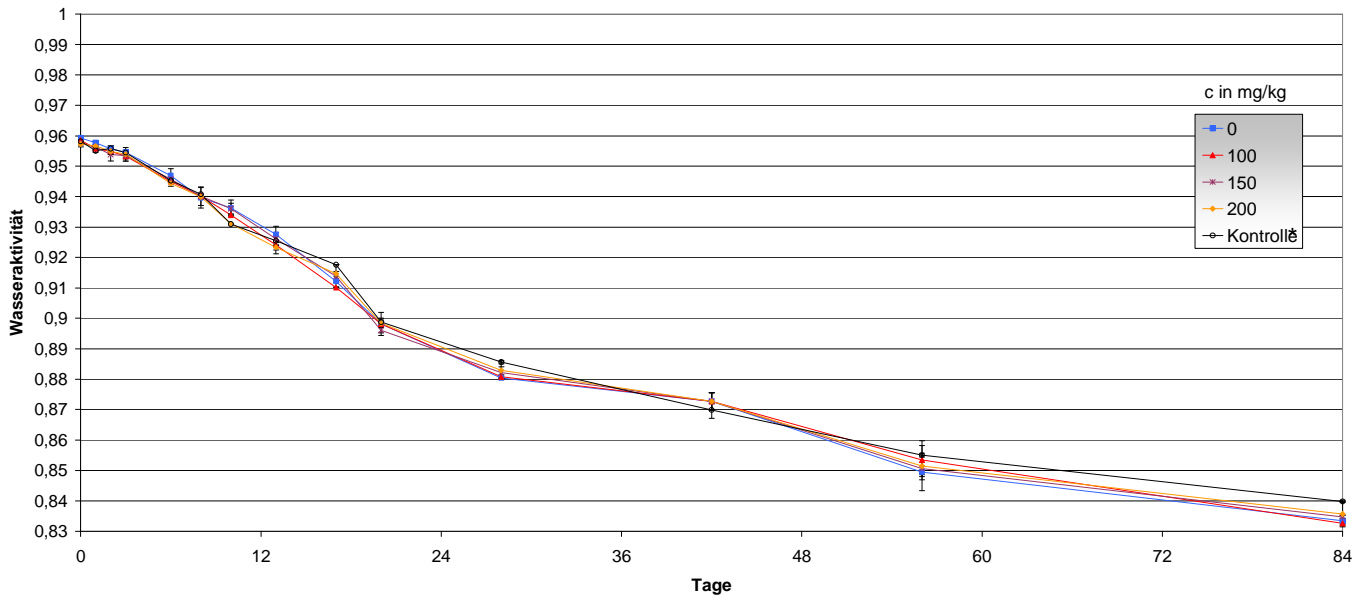


Abb.175: Verlauf der a_w -Werte in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

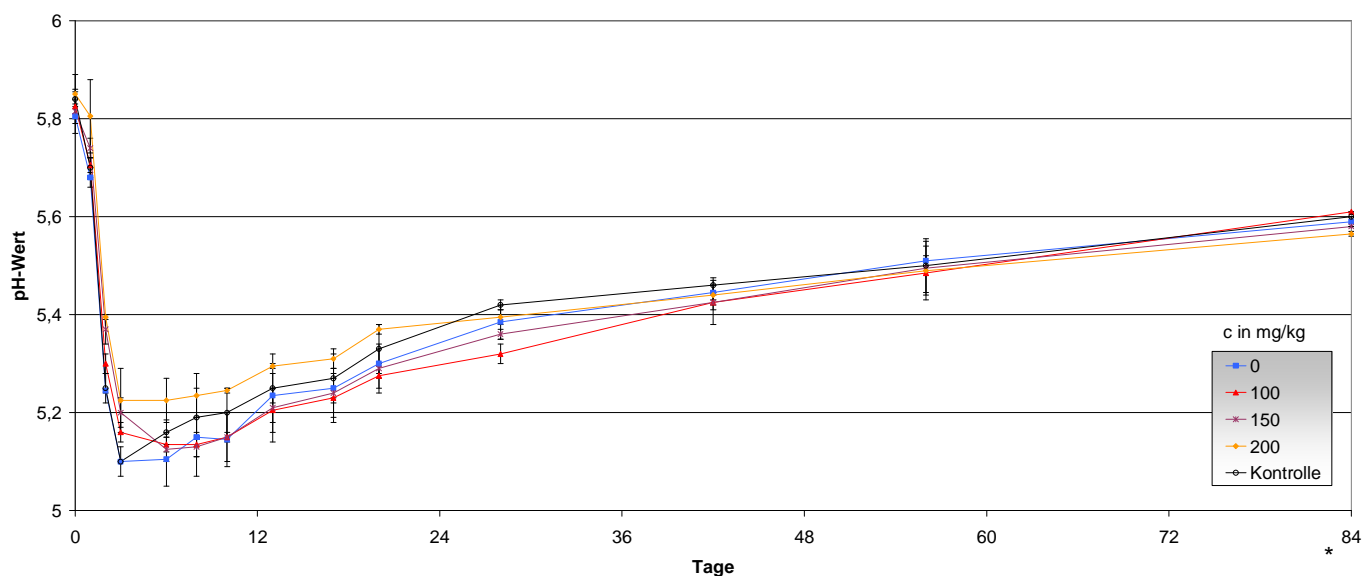


Abb.177:Verlauf der pH-Werte in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

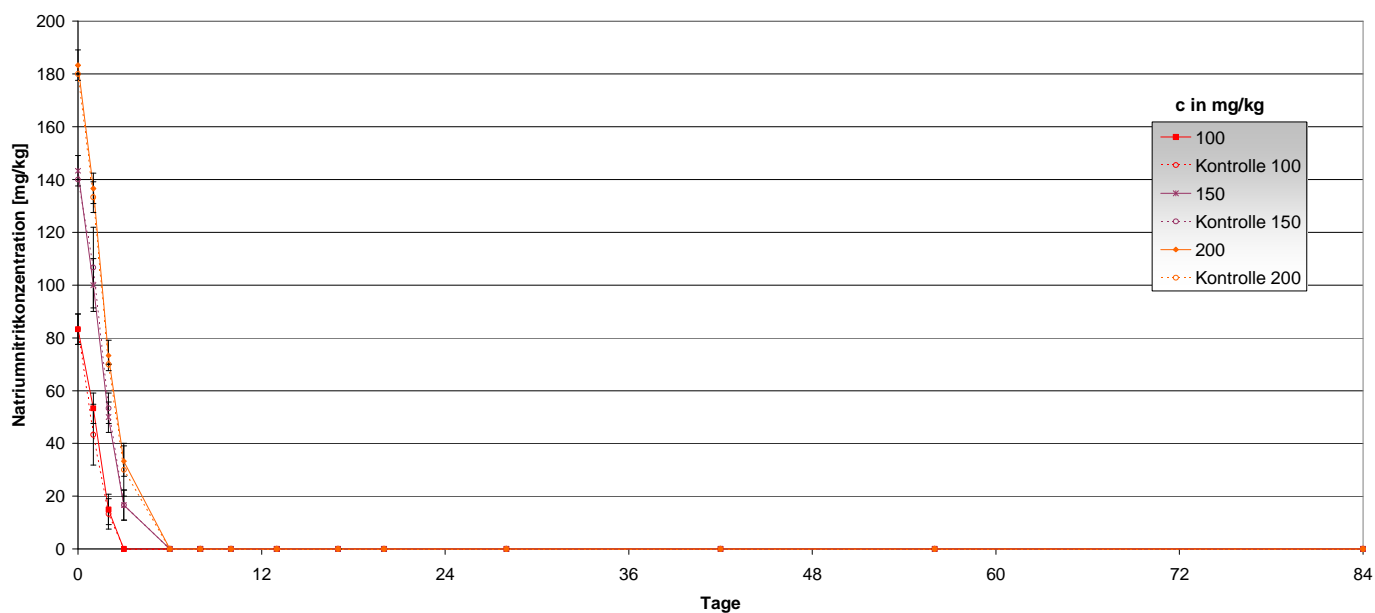


Abb.179:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer langgereiften schnittfesten Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

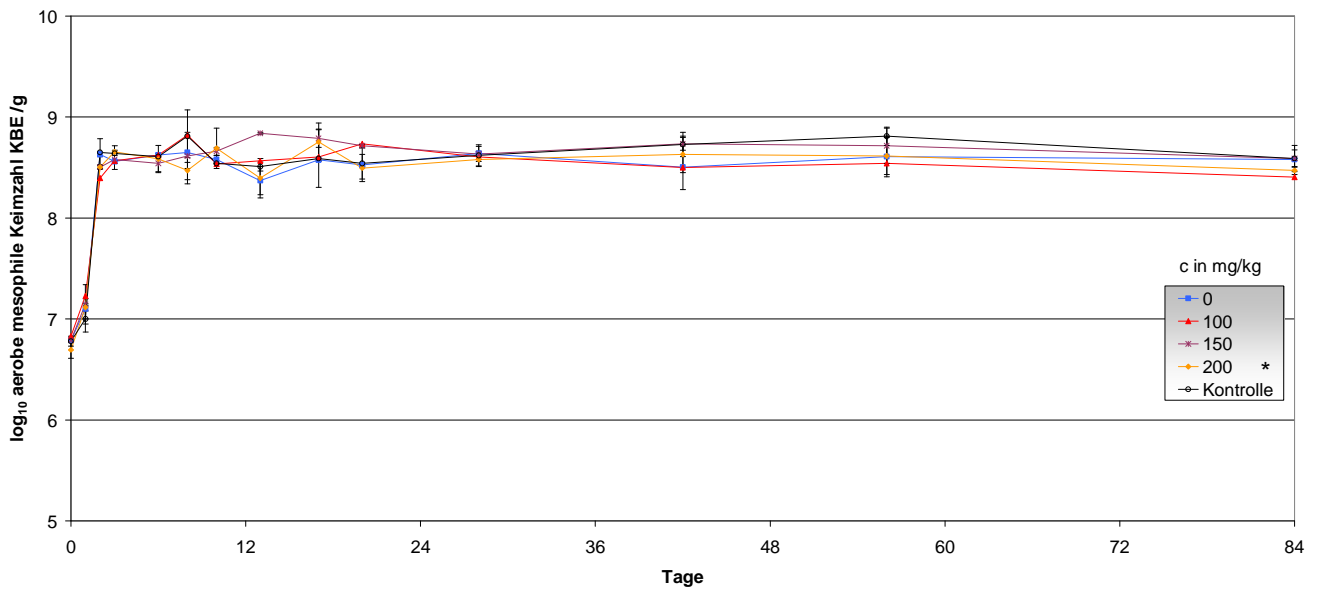


Abb.181:Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer langgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

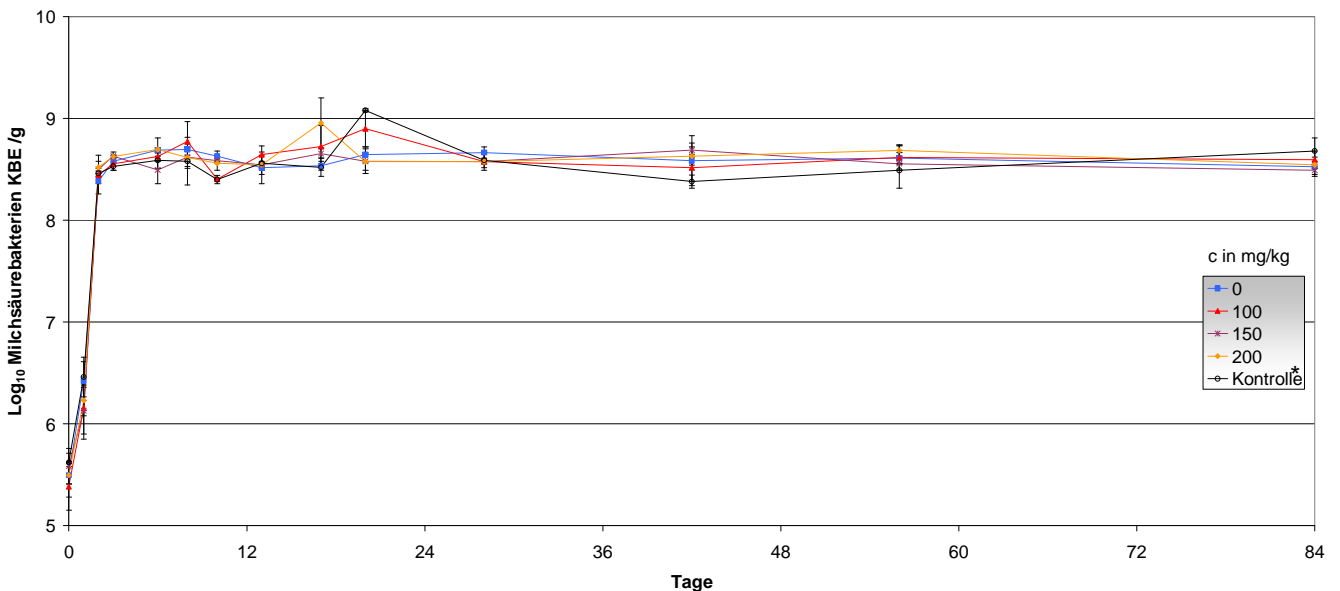


Abb.183:Wachstum der Milchsäurebakterien in einer langgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

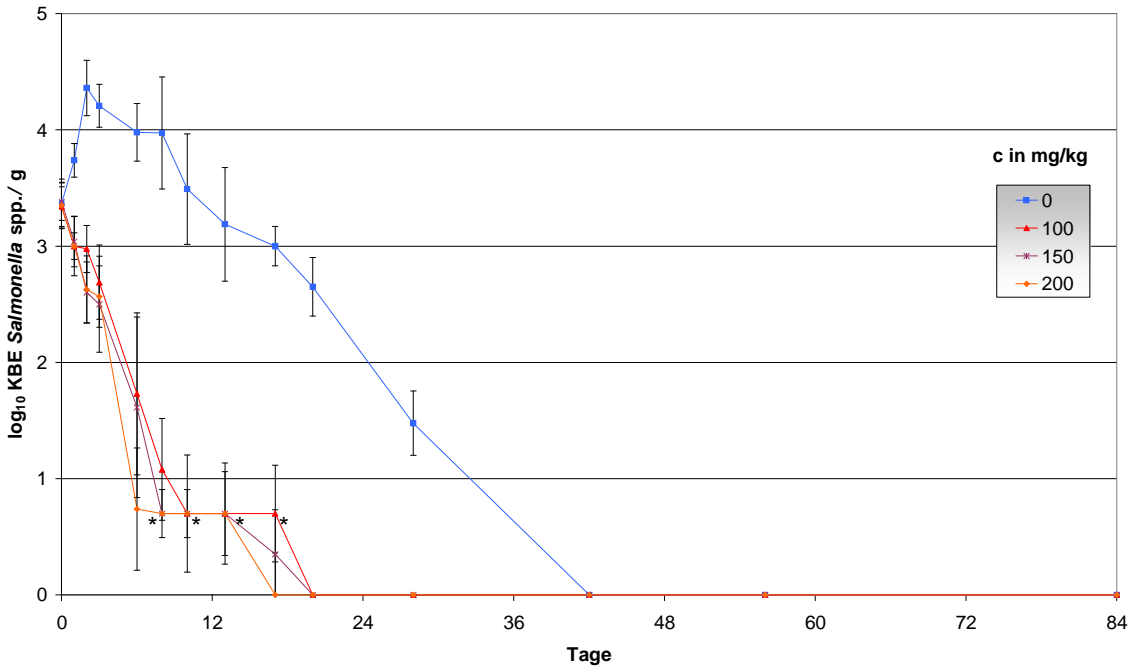


Abb.185: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer langgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

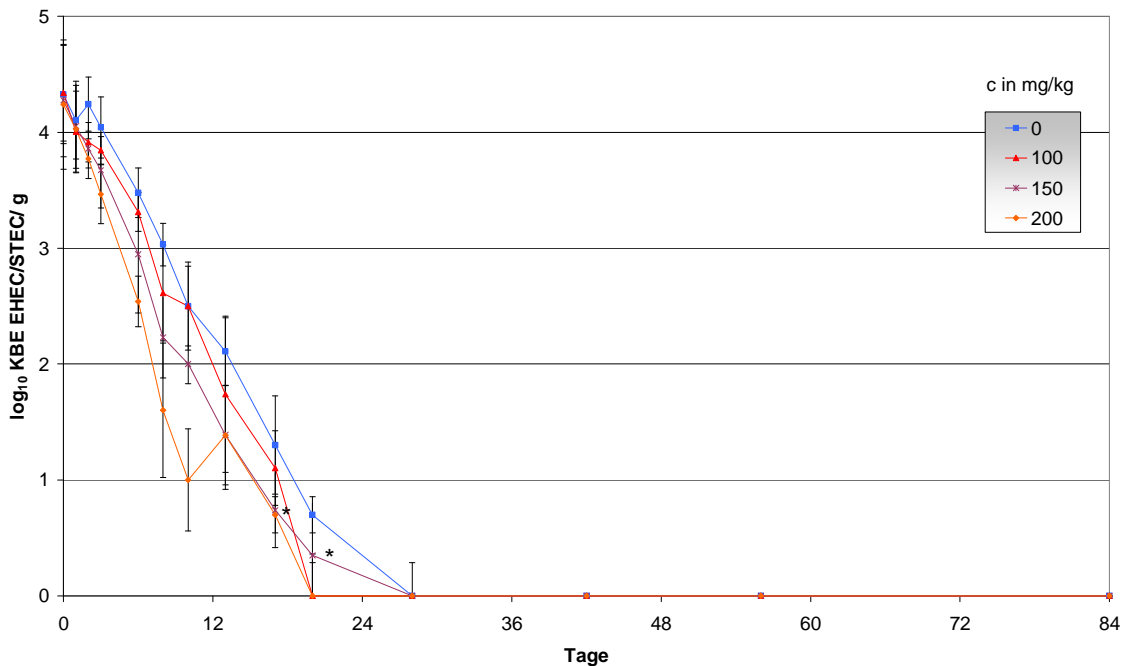


Abb.187: Verhalten von STEC/EHEC in einer langgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KbE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

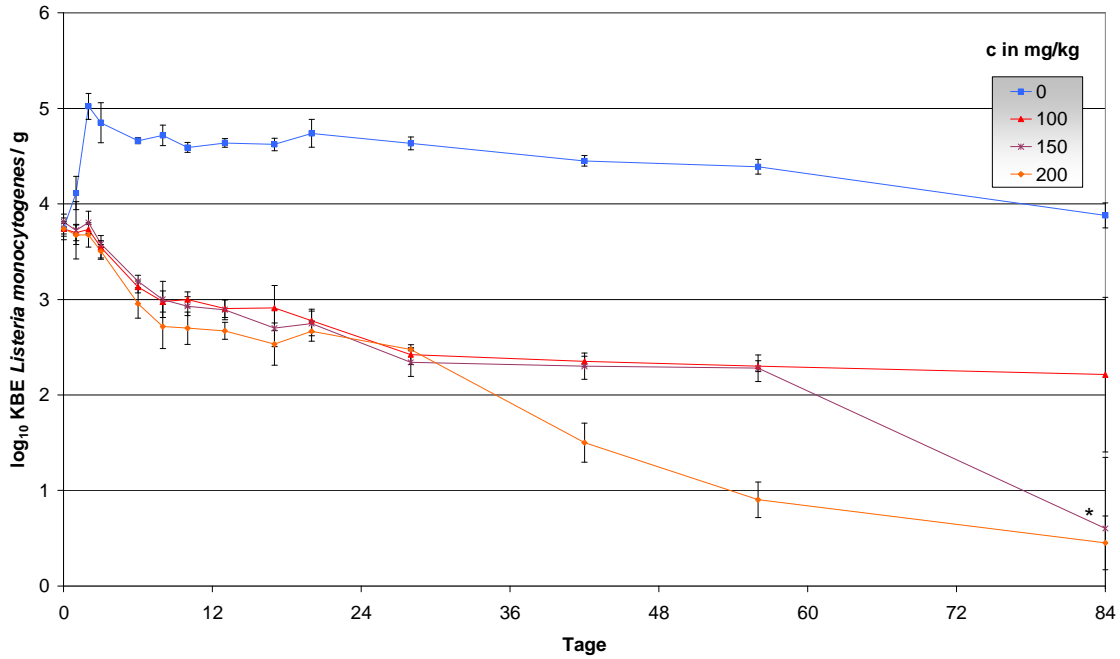


Abb.189: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer langgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

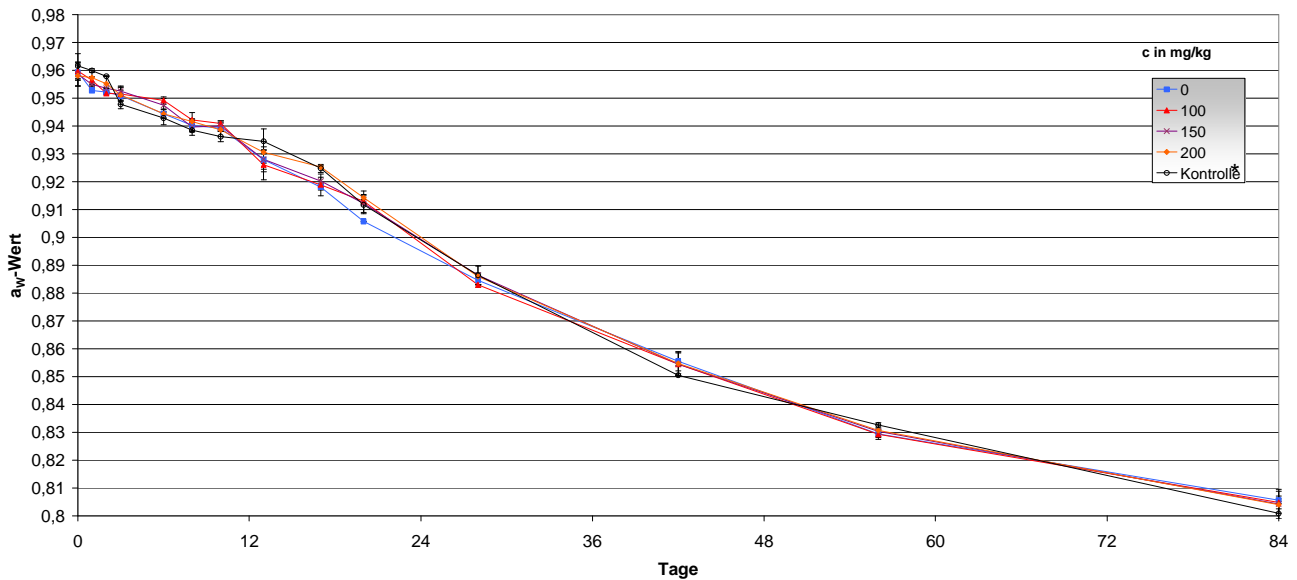


Abb.191: Verlauf der a_w -Werte in einer edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

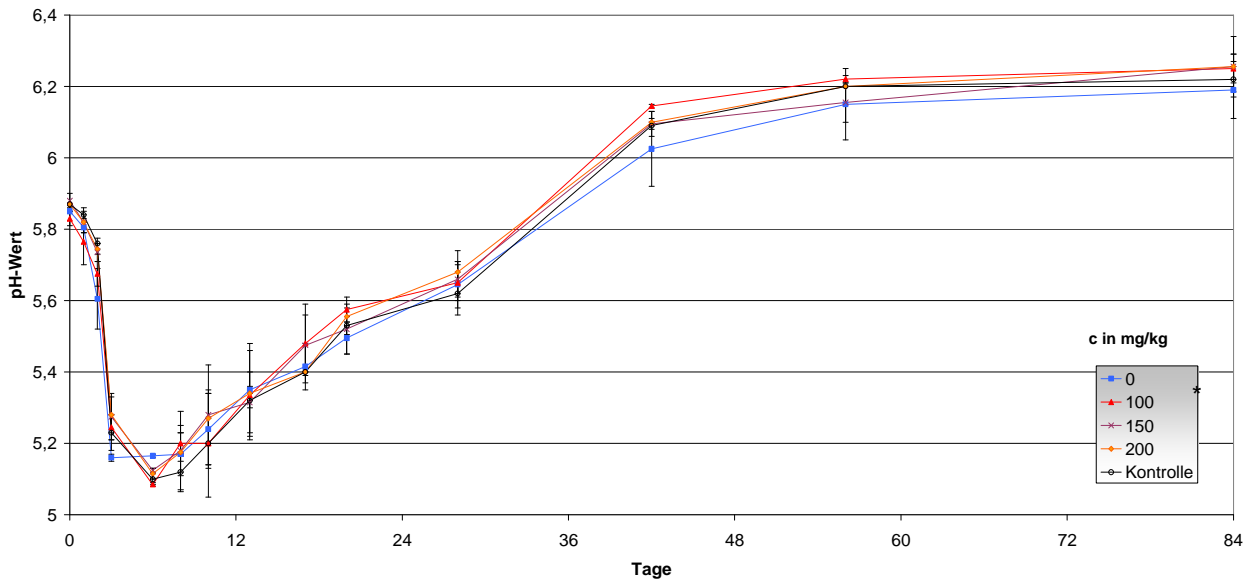


Abb.193:Verlauf der pH-Werte in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Mittelwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

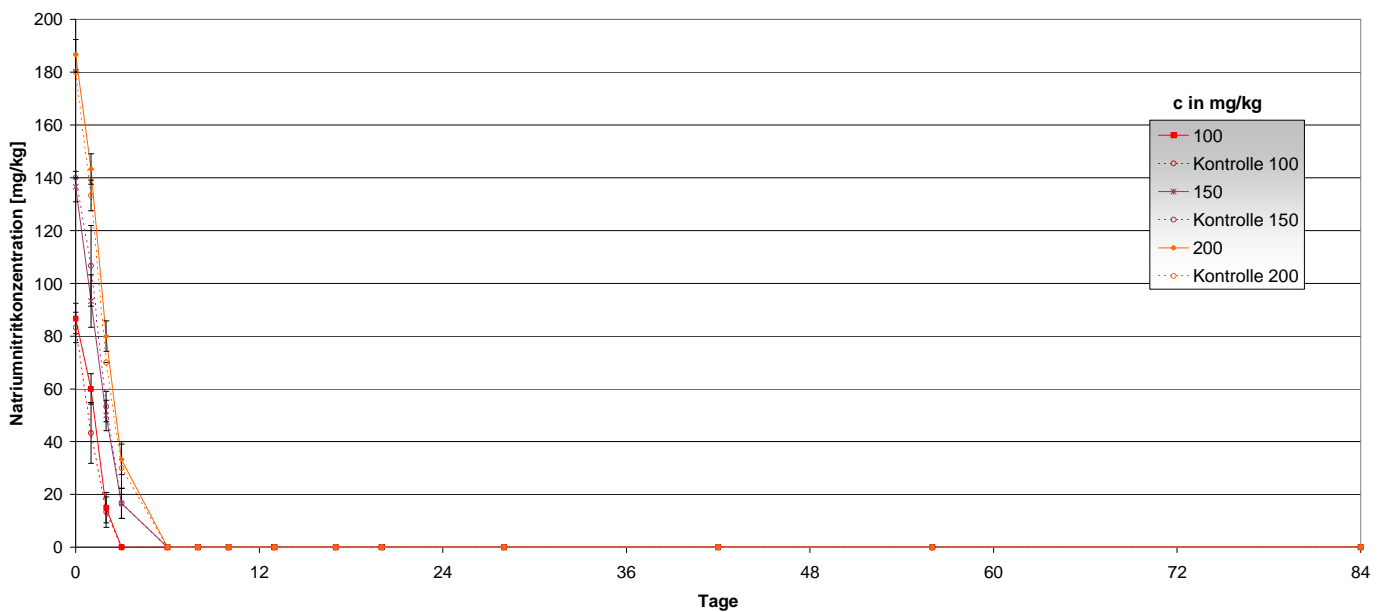


Abb.195:Verlauf der Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit) in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl). Die Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

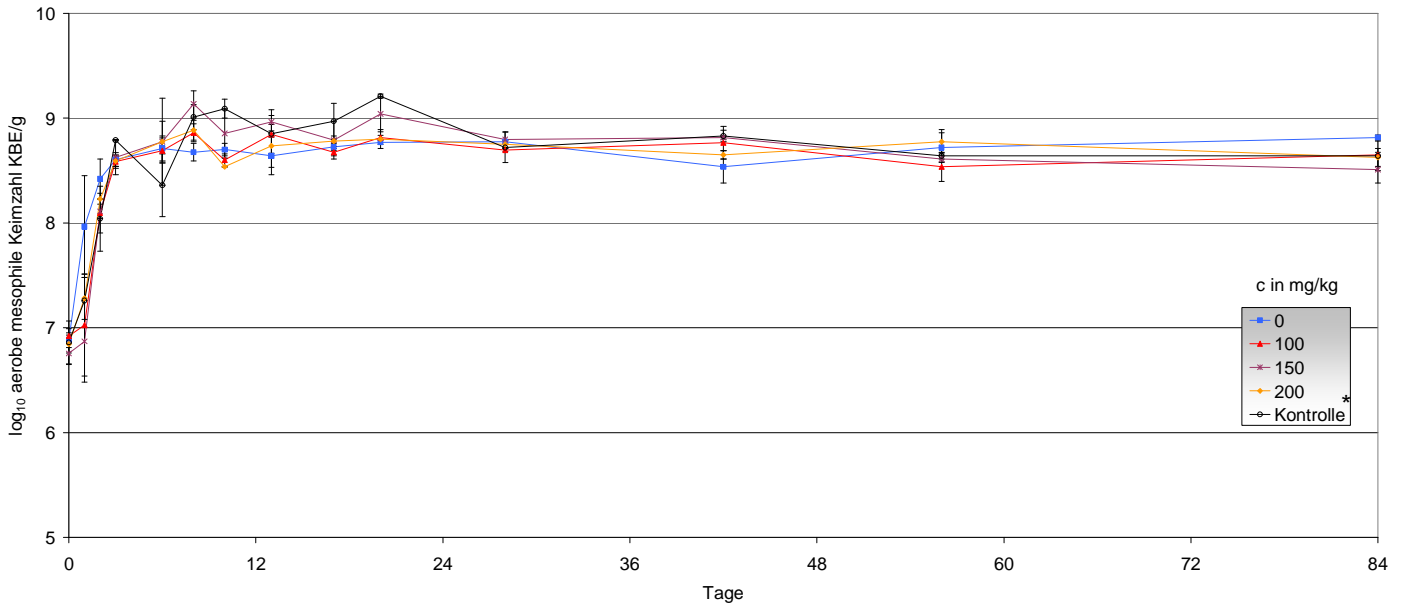


Abb.197:Wachstum der aeroben mesophilen Keimzahl in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

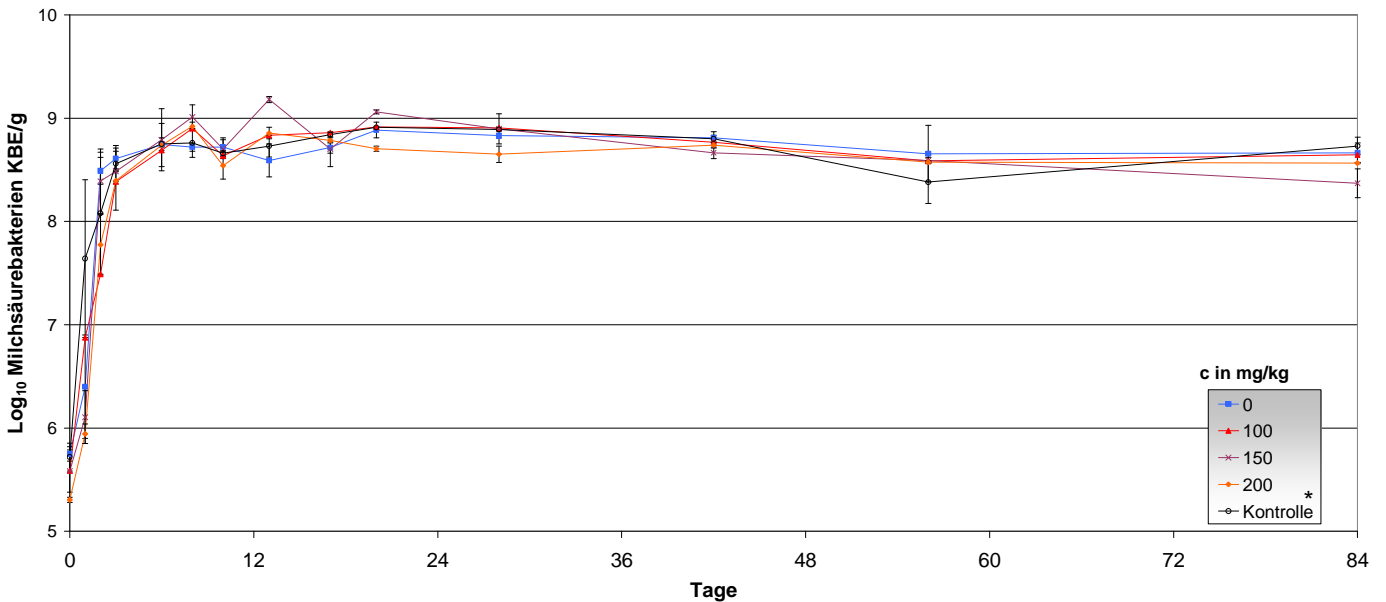


Abb.199:Wachstum der Milchsäurebakterien in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss verschiedener Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

* Medianwert mit Standardabweichung der Kontrollen 0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit

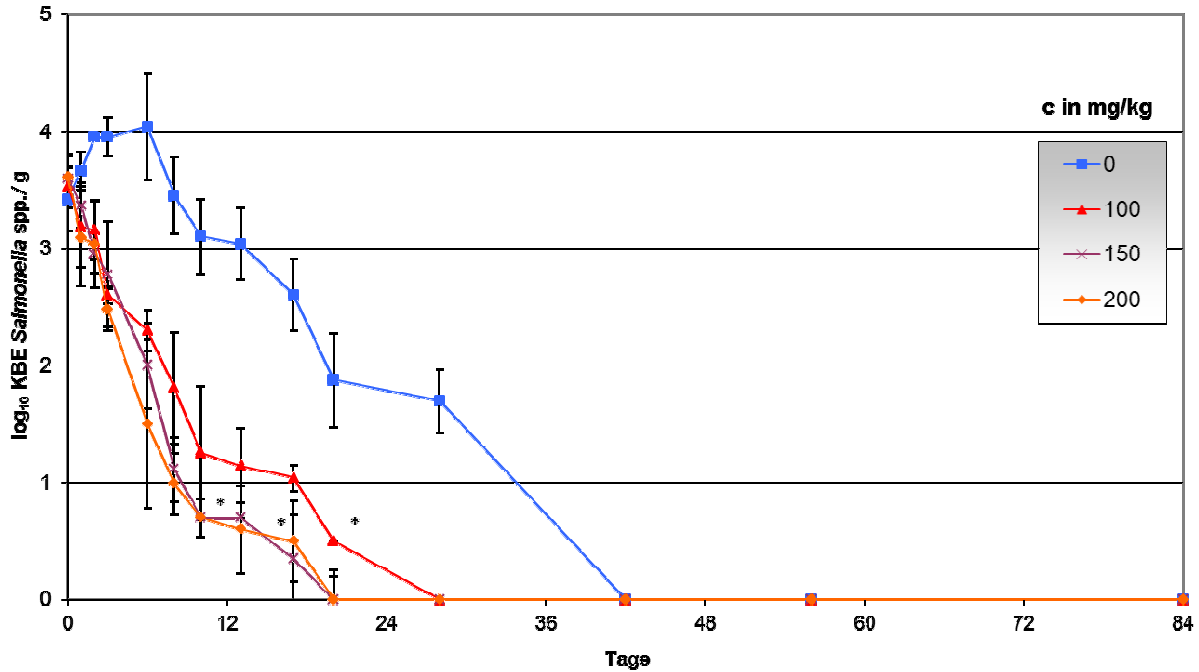


Abb.201: Verhalten von *Salmonella* spp. in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.
 * Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

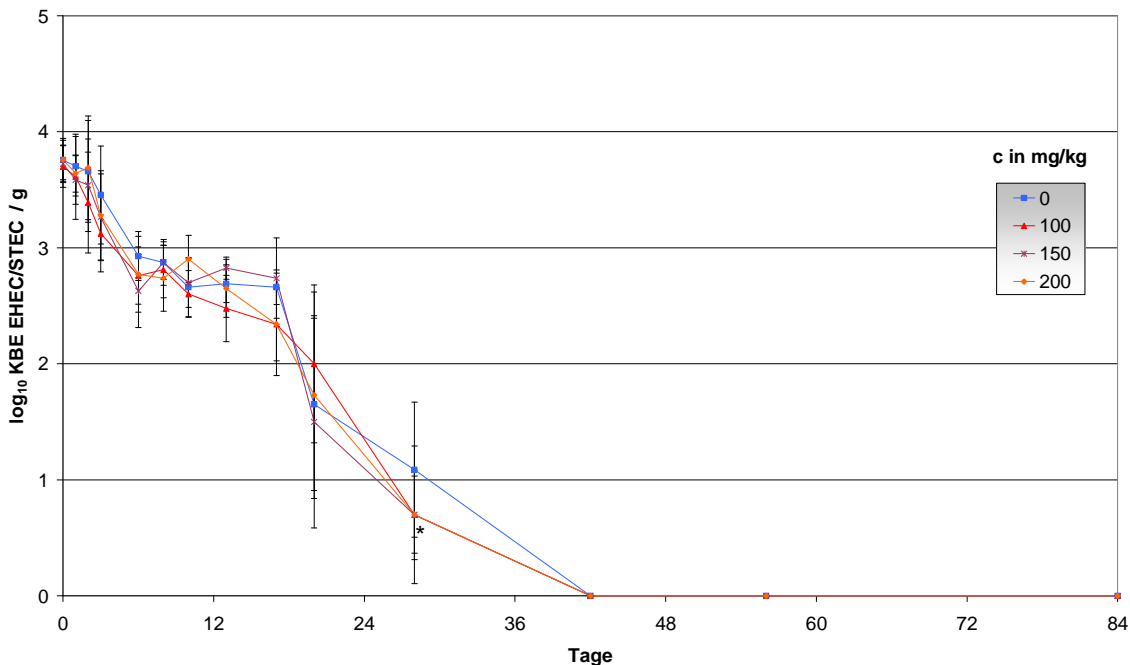


Abb.203: Verhalten von STEC/EHEC in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.
 * Wert dokumentiert, dass die quantitative Nachweisgrenze (1 log₁₀ KBE/g) unterschritten wurde und ein Nachweis nur noch qualitativ nach Anreicherung möglich war

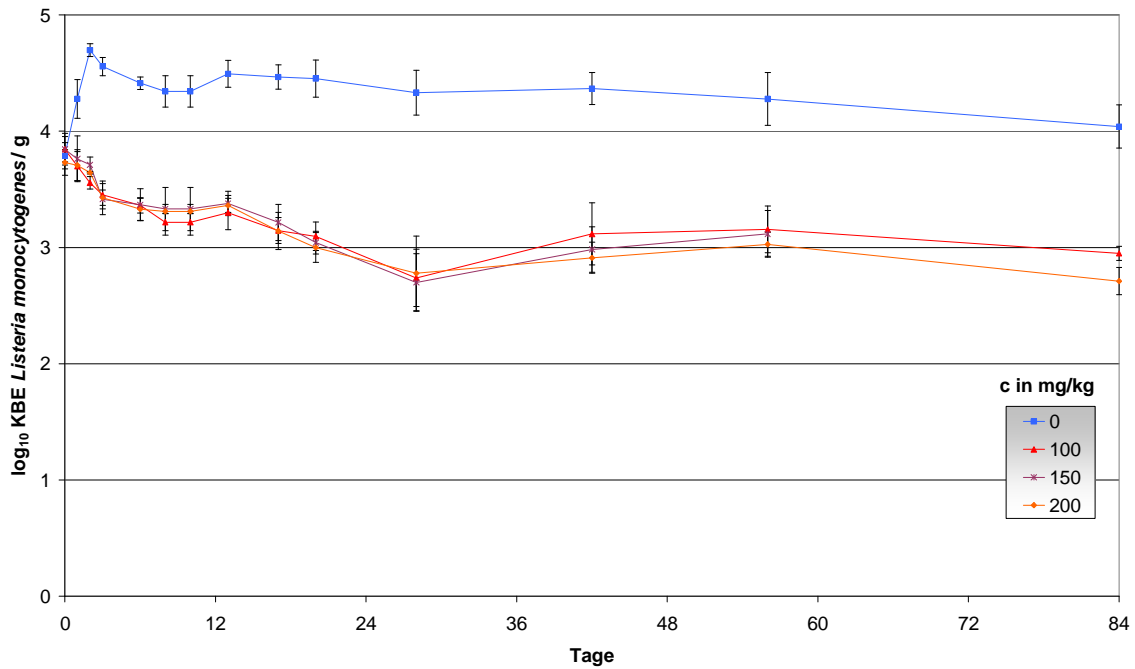


Abb.205: Verhalten von *Listeria monocytogenes* in einer Edelschimmelpilzgereiften Rohwurst (3,4 % NaCl) unter dem Einfluss unterschiedlicher Natriumnitritkonzentrationen (0, 100, 150 und 200 mg/kg Natriumnitrit). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

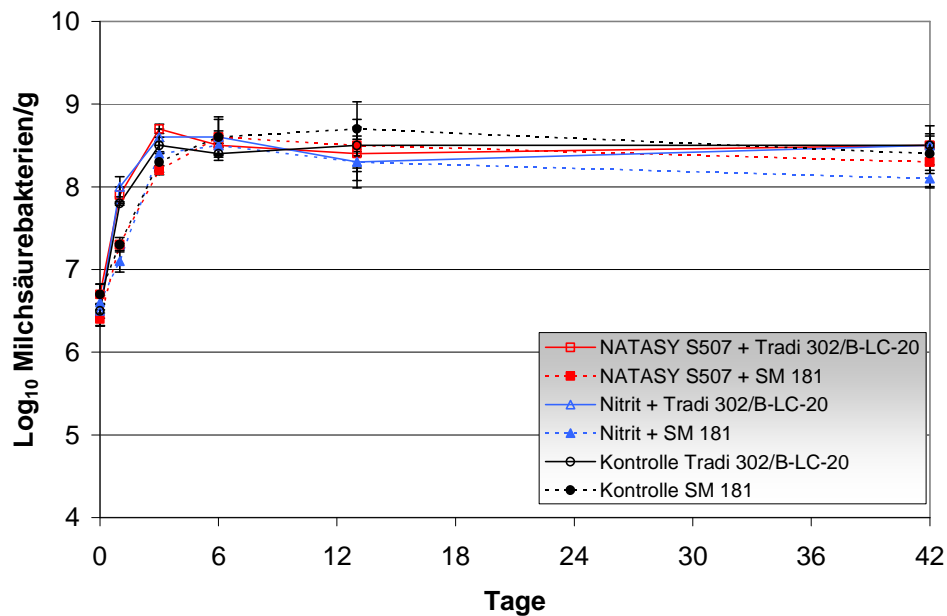


Abb.218: Wachstum der Milchsäurebakterien in einer luftgetrockneten Mettwurst hergestellt mit zwei unterschiedlich schnell säuernden Starterkulturen (SM 181 und Tradi 302/B-LC-20). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

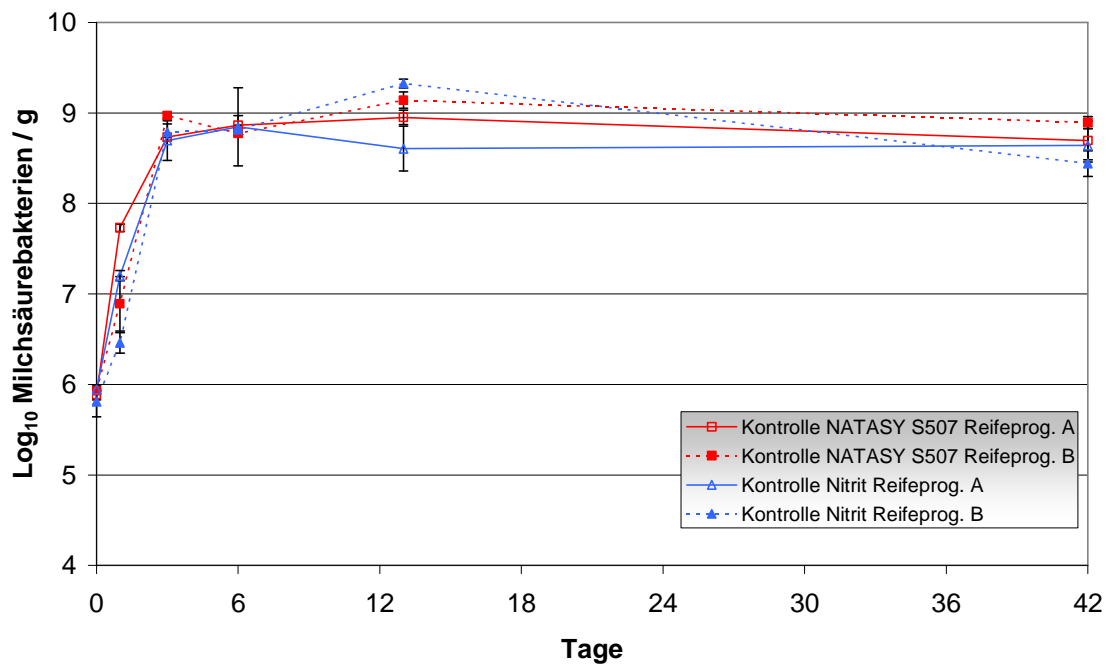


Abb.224:Wachstum der Milchsäurebakterien in einer luftgetrockneten Mettwurst unter dem Einfluss von zwei verschiedenen Reifeprogrammen (A und B). Die Datenpunkte repräsentieren Medianwerte mit Standardabweichungen aus der Messung von Dreifachansätzen.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis, Inhaber des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas, das Interesse an der Arbeit sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, unter der damaligen Leitung von Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Gareis dem verantwortlichen des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, möchte ich mich auch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Reifekammern zur Durchführung der Untersuchungen bedanken.

Herrn Dr. W. Rödel und Herrn Dr. R. Scheuer danke ich ganz herzlich für die Einarbeitung und die Heranführung an das Thema sowie die stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Diskussionen während der Arbeit.

Frau Dr. R. Pichner danke ich ganz herzlich für die stete Hilfsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge während der Durchführung der Arbeit, für die gewährte moralische und konstruktive Unterstützung und ihre unermüdliche Geduld bei der Korrektur der Entwürfe.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Institutes, Kulmbach, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau L. Weber und Frau E. Gardill für die hervorragende und engagierte Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitstechniken, Frau Lilly Baraulja und Herrn Dresel für die gewissenhafte und rasche Unterstützung bei der Untersuchung der Rohwurstproben.

Herrn H. Hechelmann gilt ein spezieller Dank für die Einbringung seiner Erfahrung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank Herrn Prof. K. Heller, Institutsleiter des Institutes für Mikrobiologie und Biotechnologie, des Max Rubner-Institutes, Kiel, für die kritische Durchsicht und das Korrekturlesen der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meiner Frau Kathrin Kabisch, meiner Tochter Lara und meinem Sohn Jannik danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.