

INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR MILCH UND LEBENSMITTEL WEIHENSTEPHAN
TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Listeria monocytogenes:
Vorkommen in oberflächengereiften Weichkäsen und
Entwicklung antagonistischer Reifungskulturen

MELANIE LOESSNER

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 Haushalts- und Ernährungswissenschaften
(Dr. oec. troph.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. H. Klostermeyer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

2. Univ.-Prof. Dr. G. Cerny

Die Dissertation wurde am 11.12.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.12.2000 angenommen.

Käse ist wahrscheinlich das Beste
aller Nahrungsmittel,
ebenso wie Wein
das Beste aller Getränke ist.

Patience Gray, 1957

Diese Dissertation wurde am Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Siegfried Scherer angefertigt. Herrn Scherer möchte ich ganz herzlich dafür danken. Nicht nur, weil dieser Platz dafür vorgesehen ist, sondern vielmehr dafür, daß seine persönliche, spontane und unkonventionelle Art der Betreuung als Doktorvater diese Arbeit nie haben langweilig werden lassen.

Ohne die Diplomarbeiten von Evi Lang-Halter, Margarete Müller, Sandra Steffan, Bettina Prechter und Bettina Maier wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ein ganz herzliches Dankeschön für das gute Verhältnis, das wir zueinander hatten; es hat Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten !

Viele meiner Kollegen waren mir während meiner Arbeit eine große Hilfe. Ein ganz besonderer Dank gehört daher Angela Kempe, Ingrid Rachinger, Anita Podolinsky und Rita Festl für die wertvolle Hilfe beim Untersuchen von unendlich viel erscheinenden Käseproben, Hilde Maier für das Nicht-Müde-Werden beim Reinigen der vielen Glaswaren, die wir im Laufe der Jahre „verbraucht“ haben und Helene Oberreuter für die Hilfe bei der Identifizierung von coryneformen Stämmen. Meinem Bürokollegen Markus Carnio sei Dank für viele ergiebige Diskussionen und Gespräche. Allen anderen Mitarbeitern am Institut für Mikrobiologie, die ich an dieser Stelle nicht gesondert erwähnen kann, danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt allerdings unserem Sohn „Joey“ dafür, daß er mir wider Erwarten ausreichend Zeit zum Schreiben dieser Arbeit gegeben hat und den Großeltern, Monika und Hartmut Rudolf und Brigitte und Heiner Löbner, die mir in der Endphase beim Schreiben dieser Arbeit durch ihre Tätigkeit als Babysitter wertvolle Dienste geleistet haben.

Last, but not least: Martin Löbner, meinem Mann, der mir während der gesamten Zeit immer zugehört hat und besonders in den letzten Wochen den Rücken freigehalten, mich durch seine kulinarische Versorgung bei „Schreiblaune“ gehalten und Joey stundenlang spazieren getragen hat. Du warst mir die größte Hilfe, die ich mir überhaupt vorstellen kann !

1	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1.1	Historischer Hintergrund	1
1.1.2	Morphologie, Taxonomie und Ökologie	2
1.1.3	Klinische Manifestationen und Epidemiologie der Listeriose	3
1.1.4	Listerien in Lebensmitteln	4
1.1.5	Die Bedeutung von <i>Listeria monocytogenes</i> auf Rotschmierenkäse	5
1.1.6	Nachweis und Differenzierung	6
1.2	Mikrobielle Zusammensetzung der Rotschmiere	7
1.3	Einsatz von Bakteriocinen in Lebensmitteln	9
1.3.1	Definition von Bakteriocinen	9
1.3.2	Anwendung von Schutzkulturen und Bakteriocinen	10
1.3.3	Antilisterielle Wirkung von Bakteriocinen aus Rotschmiere	10
1.3.4	Limitierende Faktoren für die Anwendung von Bakteriocinen	12
1.4	Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR) - Spektroskopie	14
1.5	Aufgabenstellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Verwendete, Organismen, Reifungskulturen und Nährmedien	16
2.1.1	Verwendete Mikroorganismen	16
2.1.2	Verwendete Reifungskulturen	16
2.1.3	Verwendete Nährmedien und Puffer	17
2.2	Herkunft der untersuchten Käseproben	19
2.3	Nachweis von <i>Listeria</i>	20
2.3.1	IDF-Standard 143A: 1995	20
2.3.2	DIN EN ISO 11290-1, 1997	20
2.3.3	Quantitativer Nachweis von <i>Listeria</i>	21
2.3.4	Differenzierung von <i>Listeria</i>	21
2.4	Nachweis und Quantifizierung der antilisteriellen Aktivität von Bakterienstämmen	22
2.5	Nachweis der Resistenzbildung von <i>Listeria</i> gegen Pediocin AcH	23
2.6	Isolierung von Bakterien- und Hefenstämmen	23
2.7	Reifung von Rotschmierenkäse im Labor	24
2.7.1	Reifung von Modell-Rotschmierenkäse im Labormaßstab	24
2.7.2	„Alt-Jung-Schmierer“ von Weichkäsen im Labormaßstab	25

2.8	Herstellung der Schmierlaken und Kontamination mit <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.8.1	Herstellung der Schmierlaken	27
2.8.2	Kontamination mit <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.9	Bestimmung der Keimzahlen und des pH-Wertes der Käseoberfläche	29
2.10	Methodik der Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR) - Spektroskopie	31
2.10.1	Identifizierung der Stämme der definierten Reifungskultur	31
2.10.2	Identifizierung der von der Käseoberfläche isolierten Stämme	33
2.11	Zusammenfassung der wichtigsten Parameter aller Reifungsversuche	34
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Käse	36
3.1.1	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Sauermilchkäse	36
3.1.2	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Rotschmierkäse	39
3.2	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i> durch einen Pediocin-bildenden <i>Lactobacillus plantarum</i>-Stamm ALC 01	44
3.2.1	Antilisterielle Aktivität von <i>Lb. plantarum</i> ALC 01	44
3.2.2	Entwicklung des pH-Wertes und der Keimzahlen bei der Reifung mit <i>Lb. plantarum</i> ALC 01	45
3.2.3	Stabilität von resistenten Mutanten	46
3.2.4	Nachweis von <i>Lb. plantarum</i> ALC 01	46
3.2.5	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i>	47
3.3	Reifung von Rotschmierkäse durch Kombination verschiedener bacteriocinbildender Bakterienstämme	53
3.3.1	Kombination von <i>B. linens</i> M18 und <i>S. equorum</i> WS 2733	53
3.3.2	Kombination von <i>B. linens</i> M18, <i>M. lacticum</i> WS 1899 und verschiedenen <i>Arthrobacter</i> -Stämmen	55
3.3.3	Kombination verschiedener coryneformer Stämme von einem Raclette-Käse	55
3.4	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i> durch undefinierte komplexe Oberflächenkulturen	58
3.4.1	Allgemeine Reifungsparameter	58
3.4.2	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i>	60

3.5	Entwicklung von definierten Mehrstammkulturen	63
3.5.1	pH-Werte bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen	63
3.5.2	Hefen- und Milchschimmelkeimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen	64
3.5.3	Aerobe Gesamtkeimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen	64
3.5.4	<i>Listeria</i> -Keimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen	64
3.5.5	Entwicklung der Reifungskulturen im Verlaufe des „Alt-Jung-Schmierens“	67
4	DISKUSSION	69
4.1	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Käse	69
4.1.1	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Sauermilchkäse	69
4.1.2	Vorkommen von <i>Listeria</i> und <i>Listeria monocytogenes</i> auf Rotschmierekäse	70
4.2	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i> durch einen Pediocin-bildenden <i>Lactobacillus plantarum</i>-Stamm ALC 01	76
4.2.1	Pediocinaktivität	76
4.2.2	Reifungsparameter	76
4.2.3	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i>	76
4.3	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i> durch Kombination von Rotschmierebakterien mit verschiedener bakteriocinogener Aktivität	80
4.4	Hemmung von <i>Listeria monocytogenes</i> durch undefinierte komplexe Oberflächenkulturen	81
4.5	Entwicklung definierter Mehrstamm-Reifungskulturen	82
4.5.1	Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora Raclette	83
4.5.2	Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora MB	84
4.5.3	Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora WE	85
4.5.4	Hemmung von <i>Listeria</i>	86
4.5.5	FT-IR-Spektroskopie	87
4.6	Durchführung von Reifungsversuchen	88
4.7	Ausblick	89
5	LITERATURVERZEICHNIS	91

6 ANHANG

**Anhang 1: FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme
der Reifungskultur Raclette**

**Anhang 2: FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme
der Reifungskultur MB**

**Anhang 3: FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme
der Reifungskultur WE**

**Anhang 4: Quantitative *Listeria*-Keimzahlbestimmung
mittels MPN-Verfahren**

Zusammenfassung

Listeria-Kontaminationen auf Rotschmierenkäse stellen in der Praxis nach wie vor ein bedeutendes Problem dar, vor allem aufgrund der Tatsache, daß bis heute keine befriedigende definierte Mehrstammreifungskultur zur Herstellung bestimmter Käsesorten existiert und in vielen Käsereien nach wie vor die traditionelle Methode des „Alt-Jung-Schmierens“ angewendet wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in einem Zeitraum von 8 Monaten 415 Käse aus dem deutschen Handel (Rotschmieren- und Sauermilchkäse) auf das Vorkommen von *Listeria* ssp. untersucht. Von 329 Rotschmierenkäseproben konnte in 6,4% *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden. Acht Proben enthielten mehr als 100 *L. monocytogenes*/cm² Käseoberfläche, zwei Proben sogar über 10⁴ *L. monocytogenes*/cm². In Proben aus pasteurisierter Milch konnte bei 8,0%, in solchen aus Rohmilch nur bei 4,8% *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Dabei waren Käseproben aus Frankreich weniger betroffen (3%) als Proben aus Deutschland (7%). Von 41 untersuchten Sauermilchkäseproben war der Nachweis von *Listeria monocytogenes* in 4,8% möglich; die Keimzahlen lagen hierbei unter 10 KbE/cm². Mit Hilfe der Phagentypisierung konnte bestätigt werden, daß Kontaminationen in den Käsereien über Zeiträume von mehreren Wochen bestehen blieben und Kreuzkontaminationen innerhalb der Käsereien eine bedeutende Rolle spielten.

Weiterhin wurde in Reifungsversuchen unter möglichst praxisnahen Bedingungen die antilisterielle Wirkung eines Pediocin- bildenden *Lactobacillus plantarum*-Stammes untersucht. Dazu wurden Weich- oder Schnittkäse sowie eine komplexe Oberflächenflora, bzw. eine definierte Reifungskultur verwendet. Die Anzucht des Stammes erfolgte in einem Spezialmedium, um eine möglichst hohe Menge an Pediocin zu erhalten. In den Reifungsversuchen konnte *L. monocytogenes* bei einer Anfangskontamination von bis zu 2x10² KbE/ml Schmierlake durch den *Lactobacillus*-Stamm auf Weichkäsen unter Verwendung einer definierten Reifungskultur über einen Zeitraum von sechs Wochen vollständig gehemmt werden. Bei Anfangskontaminationen von mehr als 10² KbE/ml konnten mehr oder weniger deutliche Hemmeffekte beobachtet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die mit dem Anzuchtmedium auf die Käseoberfläche gelangten Nährstoffe das Wachstum von *Listeria* begünstigen können. In Versuchen zur Ermittlung der Aktivität

des Pediocins konnte das Auftreten offensichtlich Pediocin-resistenter *Listeria*-Stämme beobachtet werden. Bei der Kontamination der Käse mit diesen resistenten *Listeria*-Stämmen wurden hohe Keimzahlen auf der Käsoberfläche erreicht – eine Hemmung durch den Einsatz des Bakteriocinbildners fand nicht statt.

Um möglichen Resistenzbildungen vorzubeugen, ist der Einsatz von verschiedenen Bakteriocinen ein vielversprechender Ansatz. So wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht, durch Kombination verschiedener, bakteriocinbildender coryneformer Stämme aus verschiedenen Habitaten eine Reifungskultur zusammenzustellen. Allerdings entwickelte sich hierbei keine stabile, ausgewogene Reifungskultur und auch die antagonistische Wirkung gegenüber *Listeria* war nicht stärker, als dies zuvor bei der Verwendung von Einstammkulturen beobachtet werden konnte. Hingegen konnte durch die Kombination von 7 Stämmen von einem Raclette-Käse zusammen mit dem ebenfalls vom selben Käse isolierten, Micrococcin-produzierenden Stamm *Staphylococcus equorum* WS 2733 erhebliche antilisterielle Effekte beobachtet werden, die aber nicht nur auf das Vorhandensein von Bakteriocinen zurückgeführt werden können.

In Reifungsversuchen mit komplexen Oberflächenkulturen konnte deren antagonistische Wirkung im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, deren Mechanismen allerdings nicht geklärt werden. Jedoch gelang es in zwei Fällen, durch eine Kombination von Einzelstämmen aus zwei komplexen Oberflächenkulturen und deren Verwendung als „definierte Reifungskultur“ erhebliche antilisterielle Effekte beim „Alt-Jung-Schmierer“ im Labor zu erzielen. In diesen Versuchen konnte außerdem mit Hilfe der Methodik der FT-IR-Spektroskopie die Entwicklung der Reifungskultur über mehrere Wochen im Labor anhand der Identifizierung einer großen Anzahl von isolierten Stämmen mitverfolgt werden. Dabei wurde deutlich, daß sich die Oberflächenflora während des Versuchsverlaufes bezüglich der Zusammensetzung deutlich veränderte. In einem Reifungsversuch konnte die Entwicklung und Veränderung der definierten Reifungskultur gut beobachtet werden. Nach makroskopischer Beurteilung war es in diesem Fall möglich, mit einer definierten Reifungskultur aus 12 Stämmen Rotschmierkäse über sechs Produktionschargen herzustellen.

Faßt man die Ergebnisse aller Reifungsversuche zusammen, so gibt es kein „Mittel der Wahl“ zur effektiven Bekämpfung von *Listeria* bei der Reifung von Rotschmierekäse in einem kontaminierten Betrieb. Allerdings könnten der Einsatz von Schutzkulturen im akuten Fall, bzw. die Verwendung von definierten Reifungskulturen in Verbindung mit guten hygienischen Bedingungen zur Vorbeugung die immer noch hohen Kontaminationsraten in diesem Produkt deutlich senken.

Summary

Listeria contaminations on red smear cheeses still represent a problem which attracts interest, as no defined ripening culture is available so far. It has been shown that the frequent contamination of these types of cheeses results from a post-process contamination arising from traditional methods of cheese production, such as "old-young-smearing".

The incidence of *Listeria* spp. in 415 European red smear cheeses (including acid curd cheese) was determined over a period of eight months. Out of 329 red-smear cheese samples of various types, 6.4% were shown to be contaminated with *L. monocytogenes*. Eight samples contained more than 100 *L. monocytogenes* cfu/cm² cheese surface, 2 samples had counts exceeding 10⁴ cfu/cm² cheese surface. Surprisingly, a higher incidence of *L. monocytogenes* was observed in cheeses made from pasteurized milk (8.0 %) than in cheeses manufactured from raw milk (4.8 %). *Listeria* were found more frequently in cheese samples from Germany (7%) than in samples from France (3%). Out of 41 acid curd cheese samples examined, two samples (4.8%) were found to be positive for *Listeria monocytogenes*. Cell counts were below 10 cfu/cm². Phage-typing of isolated *Listeria* strains clearly confirmed that (i) contaminations within dairy plants were persistent over a period of several weeks to months, and (ii) suggested that cross-contamination within the dairy plant is an important factor.

VIII

Furthermore, the potential of *Lactobacillus plantarum* producing pediocin AcH to inhibit *Listeria monocytogenes* on red smear cheese was investigated. Soft and semi-soft cheeses and either complex wash-off cultures from commercial cheeses or a defined ripening culture were used in these experiments. *Lb. plantarum* was pre-cultured in a special culture medium in order to produce maximum pediocin AcH activity. A complete growth reduction was observed at 2×10^2 cfu *L. monocytogenes* per ml of salt brine solution on soft cheeses ripened with a defined ripening culture over a period of six weeks. When challenged with more than 10^2 cfu/ml brine, inhibitory effects were less satisfactory. Nutrients of the culture media, which were also applied to the cheese surface, obviously promoted the growth of *Listeria* cells. In further experiments, Pediocin-resistant mutants of *Listeria* appeared. Employing these resistant strains for artificial contamination in further experiments resulted in high *Listeria* cell counts on the cheese surface; no significant inhibitory effect could be observed, in these cases.

In order to prevent the occurrence of resistant strains, the simultaneous or subsequent application of different bacteriocins could be a promising approach. Therefore, a defined ripening culture was developed by combination of different bacteriocinogenic cheese smear coryneform bacteria isolated from different cheeses. However, the establishment of a stable surface flora could not be observed, and anti-listerial effects were less pronounced than those observed using single strain cultures for ripening, whereas strong inhibition could be achieved by combination of seven non-bacteriocin-producing strains with *Staphylococcus equorum* WS 2733, a foodborne strain that was found to produce a potent antibacterial substance identified as Micrococcin.

Inhibitory effects could also be observed when using complex wash-off cultures from different red smear cheese types taken from commercial sources. The exact reason for these effects are still unknown. Combination of single strains of two complex wash-off cultures and their use as “defined ripening culture” displayed significant antilisterial effects when imitating the method of traditional “old-young-smearing” under laboratory conditions. During these experiments, the development of the ripening culture was monitored over a period of several weeks, using FT-IR-spectroscopy for identification of a high number of strains of coryneform bacteria. It

could be shown that the composition of the surface flora changed dramatically. In a ripening experiment, the development of the flora could be followed and enabled the composition of a defined flora of 12 strains, which was successfully used for six subsequent productions of red smear soft cheese under laboratory conditions.

Summarizing all the ripening experiments, it is evident that there is no single approach for effective control of *Listeria monocytogenes* in red smear cheese, when contamination occurs in a dairy. Nevertheless, the use of bacteriocin producing cultures in cases of acute contamination, and the use of defined ripening cultures in combination with a good manufacturing practice as protective measures, can significantly aid in reducing the still unacceptably high contamination rates of soft cheeses with *Listeria*.

1 Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Historischer Hintergrund

Die durch den opportunistisch pathogenen Erreger *Listeria monocytogenes* hervorgerufene Listeriose wurde in den ersten Jahren nach ihrer Entdeckung zunächst bei Schafen diagnostiziert. Die Geschichte der Listeriose begann offiziell in den Jahren 1923-1924 mit einer Beschreibung eines bei infizierten Labortieren Monozytose verursachenden Erregers (*Bacterium monocytogenes*) durch MURRAY et al. (1926). Diese Keimart war sehr wahrscheinlich mit dem bereits 1911 von HUELPHERS aus dem nekrotischen Gewebe einer Kaninchenleber isolierten Bakterium identisch. Für die Gattung wurde 1940 zu Ehren von Dr. Lister, dem Entdecker der Antisepsis, der Name *Listeria monocytogenes* eingeführt (SEELIGER, 1989).

Dagegen war eine Erkrankung beim Menschen bislang sehr selten, so daß selbst in berühmten Lehrbüchern *Listeria* lange Zeit kaum erwähnt wurde (SEELIGER, 1989). Der erste Schritt aus diesem Zustand der Unkenntnis gelang PALSSON im Jahre 1963 mit der Entdeckung, daß Silage von ungenügender Qualität eine ausreichende *L. monocytogenes*-Keimzahl enthalten konnte, um Infektionen bei Milchvieh auszulösen. Spätere Untersuchungen zeigten, daß der größte Teil der Erkrankungen bei Tieren durch Futtermittelinfektionen, häufig durch eben diese ungenügend gesäuerte Silage (> pH 5), hervorgerufen wird (SEELIGER, 1989; KRÄMER, 1997). Zur Aufklärung der Listeriose beim Menschen wurde durch Untersuchungen im Rahmen des Listeriose-Ausbruchs in Kanada, der durch kontaminierten Krautsalat verursacht wurde (SCHLECH et al., 1983), beigetragen. Hierbei konnte ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen diesem Lebensmittel und den Feldern, auf denen der Kohl angebaut und wahrscheinlich durch den Kot listeriosekranker Schafe kontaminiert wurde, nachgewiesen werden.

Obwohl die erste Diagnose für eine Listeriose- Erkrankung erstmals bei einem an Meningitis erkrankten Soldaten während des Ersten Weltkrieges bestätigt werden konnte (ROCOURT, 1994), machen andere Historiker die Listeriose bereits als Ursache für Queen Anne`s 17 erfolglose Schwangerschaften im 17. Jahrhundert verantwortlich (SAXBE, 1972). Vor 1960 wurde nur von wenigen Fällen berichtet, dahingegen wurden mehr als 10 000 Erkrankungen bis 1982 in der medizinischen Fachliteratur und

mittlerweile Hunderte von Erkrankungen jährlich weltweit beschrieben. (ROCOURT, 1991; ROCOURT und BROSCHE, 1991). Diese Entwicklung reflektiert eine Veränderung der Gesellschaftsform, die die Weiterentwicklung des Krankheitserregers begünstigt:

- *Listeria monocytogenes* ist als Krankheitserreger verantwortlich für opportunistische Erkrankungen bei Personen, deren Immunsystem geschwächt ist und die damit einer der Risikogruppen der sogenannten „YOPI`s“ (young, old, pregnant, immunocompromised) angehören. Der medizinische Fortschritt zur Verlängerung der Lebenserwartung und zur Verbesserung der Lebensbedingungen immundefizienter Personen erklärt damit z.T. diese Entwicklung.
- *Listeria monocytogenes* kommt ubiquitär in der Umwelt vor und kann bei niedrigen Temperaturen bis hin zu +4°C wachsen. Damit erklärt sich die Fähigkeit zur hohen Kontamination in einigen Lebensmitteln. Die starke Expansion der Ernährungsindustrie, verbunden mit dem System der Kühlung (vom Supermarkt in den Kühlschrank), hat unsere Ernährungsgewohnheiten somit sehr verändert (z.B. in Form von Fertiggerichten, die nur kurz erwärmt werden). (ROCOURT, 1994)

1.1.2 Morphologie, Taxonomie und Ökologie

Nach Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology (SEELIGER und JONES, 1986) sind Listerien kurze grampositive Stäbchen mit einer Länge von 0,5 - 2 µm und einem Durchmesser von 0,4 - 0,5 µm. Die Keime neigen dazu kokkoide Formen anzunehmen und liegen einzeln, in Ketten oder in Palisadenform vor. *Listeria* bildet weder Sporen noch Kapseln. Eine peritriche Geißelung befähigt sie zu taumelnder Fortbewegung. Die Keime sind anspruchslos und widerstandsfähig. Das Wachstum erfolgt bei pH-Werten zwischen 5,5 und 9,5 unter aeroben bis fakultativ anaeroben Bedingungen, wobei das pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich liegt (SEELIGER und JONES, 1986). Eine Vermehrung findet im Temperaturbereich von 1 - 45°C statt, wobei das Optimum zwischen 30 und 37°C liegt. Bei einer Hitzeeinwirkung von 60°C für 30 min und auch durch die gängige HTST (high-temperature short-time – Pasteurisierung, Minimum 71,7°C für 15 s) werden die Erreger zuverlässig abgetötet (LOVETT et al., 1990). Alle Stämme sind in der Lage, bis zu einer NaCl-Konzentration von etwa 10 % (a_w 0,92), einige Stämme sogar noch bis zu einer NaCl-Konzentration von etwa 20 % (a_w 0,82) zu wachsen (CHEROUTRE-VIALETTE et al., 1998; KRÄMER, 1997; FARBER und

PETERKIN, 1991). Auf einem klaren Agar erscheinen die Kolonien im Schräglicht (45° Winkel) als typisch bläulich irisierend, ein wesentliches diagnostisches Merkmal (HENRY, 1933). Der Gattung *Listeria* sind nach derzeitigem Erkenntnisstand sechs Spezies zugeordnet: *L. monocytogenes*, *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. ivanovii* (SEELIGER et al., 1984), *L. seeligeri*, *L. welshimeri* (ROCOURT und GIRMONT, 1983) sowie *L. grayi*, die in *L. grayi* ssp. *grayi* und *L. grayi* ssp. *murrayi* zu unterteilen ist (ROCOURT et al., 1992). Listerien sind in der Natur ubiquitär verbreitet. Nach GRAY und KILLINGER (1966) kommen sie in Abwasser, Silage, Schlamm, auf verrottendem Pflanzenmaterial, im Erdreich, in Fäces von Mensch und Tier und in Schlachthofmaterial vor.

1.1.3 Klinische Manifestationen und Epidemiologie der Listeriose

Der Kontakt mit nicht-pathogenen und pathogenen Listerien ist häufig. Bei 1 bis 30 % aller Menschen können in Stuhlproben Listerien nachgewiesen werden (HOF, 1999). Eine Infektion mit *L. monocytogenes* wird meist durch kontaminierte Lebensmittel verursacht. Die Gefahr einer Listeriose besteht hauptsächlich für abwehrgeschwächte Personen wie alte und kranke Personen, Schwangere, Un- und Neugeborene. Schwangere besitzen eine zwölfmal höhere Anfälligkeit für den Erreger als die Durchschnittsbevölkerung (HOF, 1999). Durch die Infektionsstrategie ist der Keim auch in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke und die Plazentabarriere zu überwinden und kann sowohl Meningitis und Meningo-Enzephalitis verursachen, als auch diaplazentar den Fötus infizieren und dabei Früh- und Fehlgeburten auslösen. Ansonsten reicht das Krankheitsbild von grippeartigen Beschwerden bis zu Sepsis (Übersicht in SLUTSKER und SCHUCHAT, 1999). Bei schweren Verlaufsformen einer manifesten Listeriose liegt trotz gezielter Antibiotikatherapie die Letalität bei 30 % (TERPLAN et al., 1989). Gesunde Menschen werden gelegentlich mit *Listeria* infiziert, wobei die Erkrankung meist einen relativ harmlosen Verlauf nimmt, der einem grippalen Infekt ähnelt. Dennoch mehren sich die Hinweise, daß auch immunkompetente Personen schwer an Listeriose erkranken können (AURELI et al., 2000).

Die Pathogenität von *L. monocytogenes* beruht auf dessen Invasivität und Befähigung zum intrazellulären Wachstum (GOEBEL et al., 1991; KREFT, 1992). Das Listeriolysin, ein Hämolysin, gilt als Hauptvirulenzfaktor (HOF, 1999). Die spezifischen Virulenzmechanismen dieses Organismus wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht (Übersicht von KUHN und GOEBEL, 1999) und stellen ein Beispiel für einen anscheinend perfekt adaptierten humanen Infektionserreger dar. Bereits geringe

Keimzahlen im Bereich von 10^3 KbE können im Tierversuch eine Infektion mit tödlichem Ausgang verursachen (HOF et al., 1986). Jedoch ist eine minimale Infektionsdosis für Personen, die keiner Risikogruppe angehören nach wie vor unbekannt. Nachdem verschiedene epidemisch verlaufene Listeriosen beim Menschen auf den Genuß kontaminierter Lebensmittel zurückgeführt werden konnten, sollte neben der Häufigkeit von Kontaminationen in bestimmten Lebensmittelgruppen auch die Höhe der Kontamination im Lebensmittel von Interesse sein.

1.1.4 Listerien in Lebensmitteln

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens in der Umwelt, der Fähigkeit, auch bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen und der Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten ($< \text{pH } 5,0$) und hohen Kochsalzkonzentrationen bis zu 10% (FARBER und PETERKIN, 1991) ist die Kontrolle von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln nach wie vor schwierig. So wurde der Krankheitserreger bisher in einer großen Anzahl von Lebensmitteln, darunter Rohmilch, Weichkäse, fermentierte Wurstwaren, Geflügel, Pâté, rohem Fleisch, Hackfleisch, Speiseeis, Gemüse, Salaten, rohem Fisch und Feinkostprodukten entdeckt (Übersicht bei ROCOURT und COSSART, 1997; RYSER und MARTH, 1999). Eine große Anzahl von Listeriose-Ausbrüchen konnten auf den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln zurückgeführt werden (siehe Tab. 1.1.4.1). Besonders problematisch erscheinen in diesem Zusammenhang sogenannte „ready-to-eat“-Lebensmittel, die aufgrund ihres hohen Verarbeitungsgrades, eines langen Mindesthaltbarkeitsdatums und langen Reifungszeiten für *L. monocytogenes* gute Wachstumsbedingungen bieten (MCLAUCHLIN, 1993).

Tab. 1.1.4.1: Ausbrüche lebensmittelbedingter Listeriosen beim Menschen

Jahr	Ort	Fälle	Letalität	Involvierte Lebensmittel
1979	Boston, USA	23	22%	rohes Gemüse
1980	Auckland, NZ	22	27%	rohe Meeresfrüchte
1981	Nova Scotia, CAN	41	44%	Krautsalat
1983	Boston, USA	49	29%	pasteurisierte Milch
1983-87	Waadt, CH	122	38%	Rotschmiereweichkäse „Vacherin Mont d`Or“
1985	Los Angeles, USA	181	34%	Labkäse mexikanischer Art
1986-87	Philadelphia, USA	36	44%	verschiedene rohe Lebensmittel
1989/90	Dänemark	26	23%	Hart- u. Blauschimmelkäse
1992	Frankreich	279	?	Schweinezunge in Aspik
1994	Schweiz	57	32%	Weichkäse
1994-95	Frankreich	33	25%	Weichkäse
1994/95	Schweden	8	25%	Geräucherter Fisch
1996	Illinois, USA	45	?	Schokoladenmilch
1998-99	USA	50	34%	Würstchen, Milch, Aufschnitt
1998/99	Finnland	18	22%	Butter
1999	Frankreich	25	7 %	Schweinezunge in Aspik

* (siehe JAY, 1991; RYSER und MARTH, 1999, ROCOURT und COSSART, 1997; BATT, 1999, EUROPÄISCHE KOMMISSION, 1999)

1.1.5 Die Bedeutung von *Listeria monocytogenes* auf Rotschmierekäse

Rotschmierekäse sind im Vergleich zu anderen Käsen in hohem Maße von *Listeria*-Kontaminationen betroffen (BREER, 1986; TERPLAN et al., 1986). Grund dafür ist neben dem alkalischen Milieu (pH > 7,0) auf der Käsoberfläche das traditionelle „Alt-Jung-Schmier“ der Käse (BUSSE, 1990; HAHN und HAMMER, 1990). Hierbei werden zunächst die gereiften Rotschmierekäse in einer Salzlake gewaschen, danach die sogenannten grünen Käse mit derselben Lake geschmiert. Dadurch wird einerseits die komplexe Reifungsflora übertragen, andererseits kann aber gleichzeitig eine Kontamination mit *Listeria* oder anderen unerwünschten Mikroorganismen erfolgen (CANILLAC und MOUREY, 1993). Die *Listeria*-Keimzahlen in Salzbädern sind gering. Nach ASPERGER und HEISTINGER (1998) gelang der Nachweis oftmals erst beim Ansatz von

100 ml SalzbädLösung. Listerien können durch Dauerausscheider, Verschleppung oder mangelhafte hygienische Maßnahmen in die Lebensmittelbetriebe und dadurch in die Lebensmittel gelangen (LOESSNER, 1991). Nach BUSSE (1990) sind meist fehlerhaft konstruierte, schlecht zu reinigende Anlagenteile oder falsche Prozeßführung die Ursache für Produktrekontaminationen mit *Listeria* ssp. Auf Grund ihrer Säureempfindlichkeit und ihres Wachstums bei aeroben bis fakultativ anaeroben Bedingungen besiedeln Listerien überwiegend oder ausschließlich die Käserinde (TERPLAN et al., 1986).

1.1.6 Nachweis und Differenzierung

Nicht alle Isolate gehören zur pathogenen Art *L. monocytogenes*. Allerdings ist das Auftreten von Stämmen der apathogenen Spezies ein brauchbarer Hinweis auf mögliche Kontaminationsherde mit *L. monocytogenes* (HAHN und HAMMER, 1990). Daher ist der Nachweis aller Arten erforderlich, um im Falle einer Kontamination von Produkten oder Produktionsanlagen rechtzeitige Maßnahmen einleiten zu können. Die allgemein gebräuchliche Methode zur Detektion und Isolierung von *Listeria* in Lebensmitteln und Umweltproben beruht auf einer selektiven Anreicherung des Probenmaterials in flüssigen Nährmedien, gefolgt vom Einsatz verschiedener Selektiv-Nähragarplatten, auf welchen verdächtige *Listeria* Kolonien isoliert werden können (International Dairy Federation Standard 143A:1995, bzw. DIN EN ISO 11290-1, 1997). Anschließend müssen noch Tests zur Feststellung der hämolytischen Eigenschaften und der Zuckerverwertung durchgeführt werden, um die Isolate einer Spezies zuordnen zu können. Durch mangelnde Hygiene und/ oder fehlerhafte Produktionsanlagen ergeben sich im Produktionsprozeß nach der Wärmebehandlung der Ausgangsprodukte oft schwer zu eliminierende Kontaminationsherde, welche immer wieder zum Eintrag von *Listeria* in das Produkt führen. Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung dieser Rekontaminationen und zur epidemiologischen Unterscheidung von nichtverwandten Stämmen ist die Typisierung der Isolate. Obwohl in den letzten Jahren einige molekulare Typisierungsmethoden für *Listeria* entwickelt wurden (Ribotypisierung, Multilocus Enzym Elektrophorese, Makro-Restriktionsanalyse, verschiedene Methoden auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und weiteres mehr (GRAVES et al., 1999), wird die Phagentypisierung von *Listeria* immer noch als eine der einfachsten und zuverlässigsten Methoden angesehen, mit der viele Isolate in kurzer Zeit untersucht

werden können (LOESSNER und BUSSE, 1990a; LOESSNER, 1991; MCLAUCHLIN et al., 1996)

1.2 Mikrobielle Zusammensetzung der Rotschmiere

Die Oberflächenflora von geschmiertem Käse ist sehr komplex und aus unterschiedlichen Mikroorganismen zusammengesetzt. Welche Bakterien und Hefen in der Flora enthalten sind, ist mitunter auch abhängig von der Käsesorte, wobei die Familie der Schmierekäse recht unterschiedliche Käsetypen mit gelblich-rötlicher oder weißlicher Schmiere umfaßt. Dazu gehören Weichkäse mit Rotschmiere wie Limburger, Romadur und Weinkäse (Deutschland), Livarot, Maroilles (Frankreich), Vacherin (Schweiz) und Esrom (Dänemark, Kanada), halbfeste Schnittkäse und Schnittkäse wie Tilsiter oder Appenzeller, Hartkäse wie Bergkäse oder Gruyère sowie Sauermilchkäse (BUSSE, 1989; KAMMERLEHNER, 1986). Charakteristisch für Weichkäse mit Schmierebildung sind eine schnelle Reifung und eine starke Proteolyse und Lipolyse (REPS, 1987). Auch Sauermilchkäse wie Harzer, Mainzer oder Handkäse gehören im weitesten Sinne zur Gruppe der Rotschmierkäse und sind, wie auch die anderen oberflächengereiften Käsesorten, besonders anfällig für Kontaminationen (BREER, 1986; TERPLAN et al., 1986; RYSER und MARTH, 1999).

Die folgenden Angaben zur mikrobiellen Zusammensetzung der Schmiere beziehen sich vorwiegend auf Rotschmiereweichkäse. Durch den Abbau von Lactat durch Hefen wie *Debaryomyces hansenii*, *Candida intermedia*, *Galactomyces geotrichum* und *Kluyveromyces* sp. kommt es zu Beginn der Käsereifung zu einem Anstieg des pH-Wertes auf der Käseoberfläche. Der weiße Milchsimmel *Galactomyces geotrichum* zählt zu den sogenannten „*Fungi imperfekti*“ und bildet die einfachste Form der Schimmelpilze. *G. geotrichum* verstoffwechselt wie auch die Hefen das bei der Käseherstellung gebildete Lactat und ist an Proteolyse und Lipolyse beteiligt. Das pH-Optimum liegt bei 5,0 (VIERLING-DREWES, 1993). Durch den pH-Anstieg ist das Wachstum der salztoleranten, aber säureempfindlichen bakteriellen Flora, die sich aus coryneformen Bakterien, Mikrokokken und zum Teil auch gramnegativen Bakterien zusammensetzt, möglich (CHOISY et al., 1987; DULMOVITS, 1993; EL-ERIAN, 1972; ELISKASES-LECHNER und GINZINGER, 1995a; LENOIR, 1984). Das Zusammenwirken der einzelnen Keime der Flora im Verlauf der Käsereifung ist zum Großteil unbekannt. Es ist aber bekannt, daß die coryneformen Bakterien auf der Käseoberfläche einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung des typischen Aromas leisten (REPS, 1987).

Eine besondere Rolle spielt *Brevibacterium linens* in der Oberflächenflora, da diese Art durch die Bildung eines orangefarbenen Carotinoides an der Färbung der Käse beteiligt ist. *B. linens* kommt natürlicherweise auf Käse vor und wurde bisher aus keinem anderen Habitat isoliert (JONES und KEDDIE, 1986). Den Hauptanteil der Bakterien auf der Käseoberfläche machen ungefärbte bis leicht gelbliche Coryneforme aus. *B. linens* hat auf reifem Käse einen Anteil von maximal 30 % (EL-ERIAN, 1972; ELISKASES-LECHNER und GINZINGER, 1995a). Bei einer Analyse der Oberfläche von Tilsiter konnten BOCKELMANN et al. (1997a) zeigen, daß 75-95 % der bakteriellen Flora aus coryneforme Bakterien bestehen, wobei *B. linens* nur mit einem Anteil von 0-15 % vertreten war. Weiterhin wurden auf allen Käsen zu 5-15 % Vertreter der Gattung *Staphylococcus* nachgewiesen (allerdings weder *Staphylococcus aureus*, noch eine andere pathogene Art). Bei Untersuchungen der bakteriellen Oberflächenflora von deutschen und französischen Rotschmierkäsen fanden CARNIO et al. (1999) Keime der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* und *Microbacterium*.

Da Aussehen, Aroma und Textur der Rotschmierkäse hauptsächlich durch die Oberflächenflora geprägt werden, ist es wichtig, daß durch geeignete Maßnahmen ein Selektionsdruck zugunsten der erwünschten Mikroorganismen entsteht. Dazu müssen die Verhältnisse für diese Keime bezüglich Faktoren wie Wasseraktivität der Käseoberfläche, Temperatur und Luftfeuchtigkeit des Reifungsraumes, dem Einsatz von Kulturen und der periodischen Oberflächenbehandlung optimal gestaltet werden. Alternativen zum Verfahren des „Alt-Jung-Schmierens“ sind bislang nicht verfügbar, da von den Kulturenherstellern keine individuellen Mehrstammkulturen angeboten werden können. Eine solche definierte Reifungskultur sollte idealerweise aus einer Zusammenstellung geeigneter Mikroorganismen bestehen, die sowohl an die Käsesorte, als auch an die Betriebsverhältnisse angepaßt sind (PHILIPP, 1993). Individuelle Kulturen für die einzelnen herstellenden Betriebe sind verständlicherweise nicht nur von finanziellem Interesse. Im optimalen Fall enthalten diese definierten Reifungskulturen Bakteriocinbildner, die unter den Bedingungen auf der Käseoberfläche einen Hemmeffekt gegenüber unerwünschten Mikroorganismen wie *Listeria* aufweisen.

1.3 Einsatz von Bakteriocinen in Lebensmitteln

1.3.1 Definition von Bakteriocinen

Bakteriocine sind eine sehr heterogene Gruppe proteinhaltiger Substanzen bakteriellen Ursprungs mit antibiotischer Wirkung gegen ein begrenztes Spektrum an Mikroorganismen, wobei ihre Aktivität hauptsächlich gegen artverwandte Keime gerichtet ist (HOLZAPFEL et al., 1995). Gemeinsam ist allen bekannten Bakteriocinen ein Proteinanteil, der wahrscheinlich für die antibakterielle Aktivität verantwortlich ist. Die Unterteilung der Bakteriocine erfolgt nach KLAENHAMMER (1993) in vier große Klassen:

Klasse I	Lantibiotika
Klasse II	kleine, hitzestabile Nicht-Lantibiotika
Klasse III	große, hitzelabile Proteine
Klasse IV	komplexe Bakteriocine

Die Bakteriocine der Klasse IIa gelten mit als am besten erforscht und sind aufgrund ihrer hohen Anzahl, ihrer signifikanten biologischen Aktivität und ihrer potentiellen Anwendung im Lebensmittel von besonderem Interesse (ABEE et al., 1995). Alle bisher als Klasse IIa identifizierten Bakteriocine zeigen eine bakteriocide Wirkung gegenüber dem Erreger *Listeria monocytogenes* (ENNAHAR et al., 1999).

1.3.2 Anwendung von Schutzkulturen und Bakteriocinen

Durch die Zugabe von Schutzkulturen (künstlich zugesetzte, gesundheitsunbedenkliche Bakterien) können unerwünschte Bakterien direkt gehemmt werden. Die Hemmwirkung der Schutzkulturen beruht u.a. auf der Bildung organischer Säuren (z.B. Milchsäure) mit pH-Wert-Absenkung (ELSSER, 1997), auf der Bildung unspezifischer Hemmstoffe (z.B. Wasserstoffperoxid) oder auf der Bildung spezifischer Hemmstoffe (z.B. Bakteriocine) sowie auf Nährstoffkompetition (MÜLLER und WEBER, 1996). Eine Hemmung von *L. monocytogenes* erfolgt auch durch das Lactoperoxidase-System (JAY, 1992); hier kann die antilisterielle Wirkung auch durch die Kombination mit Bakteriocinen verstärkt werden (RODRIGUEZ et al., 1997). Kombinierte Effekte der Faktoren pH-Wert, Salzkonzentration und Temperatur auf das Wachstum von *Listeria* wurden in mehreren Studien unter anderem von COLE et al. (1990) erforscht.

Der Einsatz von Bacteriocinen in Lebensmitteln kann auf sehr unterschiedliche Art und Weise erfolgen (MURIANA, 1996): als bakteriocinbildende Schutzkultur, als bakteriocinbildende Starterkultur für fermentierte Lebensmittel, als bakteriocinhaltiger Überstand der Flüssigkultur des jeweiligen Produzentenstammes oder als gereinigtes Bacteriocin selbst. Dabei stellt die Verwendung einer bakteriocinbildenden Schutz- oder Starterkultur bislang die einfachste und für die Betriebe kostengünstigste Möglichkeit dar, die gewünschte Substanz in das Lebensmittel einzubringen. Bacteriocinbildende Milchsäurebakterien erscheinen aufgrund ihrer Einstufung als GRAS- Organismus („generally recognized as safe“) und ihrer breiten Anwendung als Starterorganismen in der Lebensmittelindustrie besonders geeignet und wurden daher in der Vergangenheit bereits intensiv auf Anwendbarkeit der von ihnen produzierten Bacteriocine untersucht (MURIANA, 1996).

1.3.3 Antilisterielle Wirkung von Bacteriocinen aus Rotschmiere

Bei der Verwendung von unterschiedlichen, komplexen industriellen Reifungsfloren von Rotschmierekäsen konnten bei der Reifung von Käse im Labor zum Teil erhebliche antilisterielle Effekte beobachtet werden (EPPERT et al., 1997). Die Ursachen für eine solche Hemmwirkung sind unbekannt. Es ist jedoch denkbar, daß bei den beobachteten Hemmeffekten die Bildung von Bacteriocinen oder anderen antilisteriell wirkenden Substanzen durch die Rotschmiereflora eine Rolle spielen. Weiterhin müssen aber auch andere Faktoren, wie z.B. die Ausbildung eines stabilen Ökosystem auf der Käseoberfläche, bei denen Erreger wie *Listeria* keine ökologische Nische und damit keine Möglichkeit zur Vermehrung finden, in Betracht gezogen werden.

Während die Produktion von Bacteriocinen bei Milchsäurebakterien weit verbreitet und gut erforscht ist (Übersicht bei HOLZAPFEL et al., 1995; JACK et al., 1995; KLAENHAMMER, 1993; PIARD und DESMAZEAUD, 1992), ist das Vorkommen von Bacteriocinen oder Bacteriocin-ähnlichen Substanzen bei Organismen aus Rotschmiere noch vergleichsweise schlecht erforscht. Eine ganze Reihe von Studien berichten von einer antilisteriellen Wirkung von coryneformen Bakterien (CARNIO et al., 1999; ENNAHAR et al., 1996; ENNAHAR und DESCHAMPS, 2000, MAISNIER-PATIN und RICHARD, 1995; MARTIN et al., 1995; RYSER et al., 1994; VALDÉS-STAUER et al., 1991).

Von VALDÉS-STAUBER et al. (1991) wurden 187 coryneforme Bakterien von Rotschmierekäsen auf ihre hemmende Wirkung gegen *Listeria* untersucht. Hierbei wurde bei Stämmen der Arten *B. linens*, *Arthrobacter nicotanae* und *Arthrobacter nucleogenes* eine antilisterielle Aktivität festgestellt. Der dabei isolierte Stamm *B. linens* M18 bildet das Bakteriocin Linocin M18 (VALDÉS-STAUBER und SCHERER, 1994). Das Strukturgen für Linocin M18 wurde kloniert und seine weite Verbreitung innerhalb der coryneformen Bakterien nachgewiesen (VALDÉS-STAUBER und SCHERER, 1996).

RYSER et al. (1994) isolierten von 105 traditionellen französischen Rotschmierekäsen 9 Stämme von Mikroorganismen, die antagonistische Effekte gegen *Listeria* aufwiesen. Die Isolate konnten *Enterococcus*, *Staphylococcus* sowie coryneformen Keimen zugeordnet werden. Mit Ausnahme eines *B. linens*-Stammes konnte die Hemmung durch Proteasen aufgehoben werden, was vermuten läßt, daß es sich dabei um Bakteriocine handelt. MAISNIER-PATIN und RICHARD konnten 1995 zeigen, daß dieser Stamm das bakteriocinähnliche Linenscin OC2 produziert. Linenscin OC2 induziert bei *Listeria* die Bildung von Protoplasten und verursacht letztlich die Zellyse.

MARTIN et al. (1995) berichteten ebenfalls von *B. linens*-Stämmen, die eine antilisterielle Substanz produzieren, die im pH-Bereich von 4,0 - 9,0 stabil ist. Eine Hemmung von Listerien konnte allerdings lediglich auf festem Nährmedium festgestellt werden; die Daten über die Durchführung von Reifungsversuchen sind unvollständig.

ENNAHAR et al. (1996) führten bei 1962 Isolaten von Münsterkäse ein Screening auf eine Aktivität gegen *L. monocytogenes* durch. Hierbei wurden 6 Stämme gefunden, die antilisterielle Verbindungen produzierten. Die stärkste antilisterielle Substanz wurde als ein von *Lactobacillus plantarum* WHE 92 produziertes Bakteriocin identifiziert, dessen Primärstruktur identisch mit der von Pediocin AcH ist, welches normalerweise von *Pediococcus acidilactici* gebildet wird (HENDERSON et al., 1992; MOTLAGH et al., 1992; SCHVED et al., 1993). Das Hemmspektrum erstreckt sich über die Arten *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Micrococcus sedentarius*, *Staphylococcus xylosus* und *Bacillus cereus* sowie über die Gattung *Listeria*. Dagegen werden keine gramnegativen Bakterien gehemmt. Das pH-Optimum von Pediocin AcH liegt zwischen 4,0 und 6,0. In vitro konnte eine Reduktion der Keimzahl von *L. monocytogenes* Serovar 4d um 3 log-Einheiten gezeigt werden. Bei Versuchen zur Überprüfung der Wirksamkeit von Pediocin AcH auf der

Käseoberfläche (ENNAHAR et al., 1998) wurde der eingesetzte *Listeria*-Stamm vollständig gehemmt. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht übertragbar, da bei der Durchführung der Reifungsversuche nicht auf praxisnahe Bedingungen geachtet wurde. Der hier genannte *Lactobacillus plantarum*-Stamm WHE 92 ist im Handel als "Listerienschutzkultur ALC 01" (antilisterial culture) erhältlich. In dieser Form wurde der Stamm im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

CARNIO et al. (1999) isolierten von der Oberfläche von deutschen und französischen Rotschmierkäsen Bakterien mit antilisteriellem Potential. Von 299 Isolaten waren 30 in der Lage mindestens einen *L. monocytogenes*-Indikatorstamm zu hemmen. Die Isolate wurden als Vertreter der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus* und *Microbacterium* identifiziert. Beim Screening der Oberflächenflora eines Raclette-Käse wurde auch der *Staphylococcus equorum*-Stamm WS 2733 isoliert, der einen bakteriostatischen Effekt gegenüber einer Vielzahl von grampositiven Bakterien zeigt (CARNIO et al., 2000). Die Gattung *Staphylococcus* ist bekannt für die Produktion vieler antibakterieller Substanzen (SAHL, 1994; SAHL und BRANDIS, 1981). Dieser Stamm produziert Micrococcin P1, ein makrocyclisches Peptidantibiotikum (BYCROFT und GOWLAND, 1978). Durch den Einsatz von *Staphylococcus equorum* WS 2733 auf der Käseoberfläche konnte das Wachstum von *L. monocytogenes* deutlich reduziert werden (CARNIO et al., 2000).

ENNAHAR und DESCHAMPS (2000) charakterisierten den antilisteriellen Effekt des Bakteriocins Enterocin A. Enterocin A wird vom *Enterococcus faecium*-Stamm EFM01 produziert, der aus Käse isoliert wurde. Dieses Bakteriocin weist ein enges antimikrobielles Spektrum auf, welches hauptsächlich gegen *Listeria* ssp. gerichtet ist. Wegen seiner hohen Spezifität und seiner Wirkung in einem weiten pH-Bereich von 4,0 bis 9,0 wäre sein Einsatz in fermentierten Lebensmitteln interessant.

1.3.4 Limitierende Faktoren für die Anwendung von Bakteriocinen

Laut §11 LMBG Zusatzstoffverbote ist die Zugabe von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln grundsätzlich verboten, wenn sie nicht ausdrücklich für den konkreten Zusatzstoff und das konkrete Lebensmittel erlaubt ist. Mikroorganismen sind in §11 LMBG von dieser Regelung ausgenommen. In der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung Anlage 5 ist beispielsweise der Zusatz von Nisin (E 234) geregelt. Andere Bakteriocine wie z.B.

Pediocin sind dagegen nicht als Zusatzstoff zugelassen und dürfen somit in Form von gereinigtem Bakteriocin nicht auf die Käsoberfläche aufgebracht werden.

Die nur beschränkte Verwendungsfähigkeit von bakteriocin-produzierenden Kulturen in fermentierten Lebensmitteln ist unter anderem auf Faktoren wie ein begrenztes Hemmspektrum, eine niedrige Syntheserate, Regulationssysteme, genetische Instabilitäten, Inaktivierung oder die Entwicklung von Resistenzen zurückzuführen. Eine Resistenz gegenüber Bakteriocinen beruht auf Veränderungen von Zellwandbestandteilen, die auch bei Protoplasten von resistenten gram-positiven Indikatorzellen beobachtet werden kann (JACK et al., 1995, SCHVED et al., 1994). HOOVER et al. beobachteten bereits 1989 gegen eine von *Pediococcus acidilactici* gebildete hemmende Substanz (vermutlich Pediocin PA-1) offensichtlich auftretende resistente *Listeria monocytogenes*- Stämme. REKHIF et al. (1994) ermittelten die Mutationshäufigkeit zur Resistenz von *Listeria* gegenüber den Bakteriocinen Mesenterocin 52, Curvaticin 13 und Plantaricin C19, wobei die Frequenz bei 10^{-3} – 10^{-4} lag. Ferner konnten SONG und RICHARD (1997) zeigen, daß mit dem Erwerb der Resistenz gegenüber einem Bakteriocin auch unbeabsichtigte Kreuzresistenzen gegenüber anderen Bakteriocinen auftreten.

CARNIO et al. (1999) beobachteten eine verminderte Sensitivität verschiedener *L. monocytogenes*- Isolate von Rotschmierkäse gegenüber den von coryneformen Stämmen gebildeten hemmenden Substanzen im Vergleich zu anderen *L. monocytogenes*- Stämmen, die beispielsweise von Tieren oder anderen Lebensmitteln isoliert wurden. Diese Beobachtung ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, daß der Selektionsdruck auf der Käsoberfläche durch mikroevolutionäre Anpassung in der Ausbildung von Resistenzmechanismen resultiert haben könnte. Außerdem ist es möglich, daß *Listeria*-Stämme, die bereits eine Resistenz aufweisen, eine bevorzugte Rolle bei einer Kontamination der Käse spielen (CARNIO et al., 1999).

Ferner ist die Bindungsaffinität von Bakteriocinen zu den Ziel-Zellmembranen vom umgebenden pH- Wert abhängig. Ein Absenken des pH-Wertes von 7,5 auf 6,0 bewirkt dabei unter anderem eine verbesserte Bindungsfähigkeit von Pediocin PA-1 an der Membran (CHEN et al., 1997). Weiterhin konnten KAISER und MONTVILLE (1997) zeigen, daß die Porenbildung durch Bavaricin MN bei einem pH-Wert von 6,0 optimal und bei anderen pH-Werten weniger effizient funktioniert.

Neue Trends in der Bakteriocinforschung wie die heterologe Expression von Bakteriocinen in verschiedenen Milchsäurebakterien stellen ein ausgezeichnetes Werkzeug zur Lösung dieser Probleme dar (HORN et al., 1998; CHIKINDAS et al., 1995). Weiterhin könnten beispielsweise auch Milchsäurebakterien, welche in der Lage sind zwei oder mehr Bakteriocine zu produzieren (QUADRI et al., 1994; BHUGALOO-VIAL et al., 1996; EIJSINK et al. 1998; CASAUS et al., 1997; BRURBERG et al. 1997) oder aber auch eine Kombination zweier verschiedener Bakteriocine Ansatzpunkte für neue Schutzkulturen darstellen.

1.4 Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie

Die FT-IR-Spektroskopie ist eine Anwendung der Schwingungs-Spektroskopie und nutzt die Tatsache, daß Bindungen in Molekülen durch die Absorption von Energiequanten einfallenden infraroten Lichts zu Schwingungen angeregt werden. Die Aufzeichnung der Absorption gegen die Frequenz oder Wellenzahl bezeichnet man als Spektrum. Anstelle der Frequenz (Wellenlänge) wird üblicherweise die reziproke Wellenlänge verwendet („Wellenzahl“; Einheit: cm^{-1}), da diese der Energie direkt proportional ist. Als analytische Technik profitiert die FT-IR-Spektroskopie von der Tatsache, daß das Schwingungsspektrum einer Substanz oder eines Mikroorganismus einen charakteristischen und zudem strukturell sensitiven Fingerabdruck der Moleküle auf atomarer Ebene darstellt. Die Selektivität der FT-IR-Technik ist sehr hoch und erlaubt Differenzierungen auch sehr nah verwandter Gruppen von Bakterien, in der Regel sogar Unterscheidungen zwischen verschiedenen Stämmen ein und derselben Spezies (HELM et al. 1991, KÜMMERLE et al., 1998).

1.5 Aufgabenstellung

Listeria-Kontaminationen auf Rotschmiereweichkäsen stellen in der Praxis nach wie vor ein bedeutendes Problem dar. Das tatsächliche Ausmaß von *Listeria*-Kontaminationen in Käse aus dem Handel ist aber nur unvollständig bekannt, auch gibt es keine systematischen Studien zur tatsächlichen Höhe einer Kontamination (Keime/ cm^2) auf einer Käsesorte. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine Statuserhebung über das Vorkommen von Listerien in Rotschmiere- und Sauermilchkäsen im deutschen Handel über einen längeren Zeitraum erfolgen.

Weiterhin steht nach wie vor für die Käsereien keine definierte, effiziente, anti-listeriell wirkende Oberflächenreifungskultur für Rotschmierekäse zur Verfügung. Der Einsatz von Einstammkulturen mit antilisteriell wirkenden Stämmen würde zwar das Kontaminationsrisiko erheblich verringern, ist aber dem traditionellen Verfahren unterlegen. Es kann hierbei zu einer verzögerten Reifung kommen, woraus Schimmelbildung und Fehlreifungen resultieren können (PHILIPP, 1993; EPPERT, 1997). Außerdem kann bei diesem Verfahren die Produktvielfalt innerhalb der Gruppe der Rotschmierekäse nicht gewahrt werden. Um einer eventuellen *Listeria*-Kontamination der Käse während des Herstellungsprozesses entgegenzuwirken, wird der Einsatz von sogenannten Schutzkulturen diskutiert und teilweise bei Schnittkäse durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, unter praxisnahen Bedingungen die Wirkung des pediocinbildenden *Lb. plantarum*-Stammes ALC 01 gegenüber *L. monocytogenes* zu untersuchen. Die zentrale Fragestellung war, bei welchen *Listeria*-Anfangskontaminationen ALC 01 in der Lage ist, *L. monocytogenes* vollständig zu hemmen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine definierte Mehrstammkultur zur Reifung von Rotschmierekäse zu entwickeln, die einerseits alle Kriterien einer guten Käsureifung erfüllt und andererseits eine antilisterielle Wirkung aufweist. Dafür mußten zuerst die hemmenden Effekte verschiedener komplexer Reifungsfloren untersucht werden. Für die Reifungsversuche wurden Käse im Labor gereift, wobei die äußeren Bedingungen wie Luftfeuchtigkeit, Reifungstemperatur und periodischer Schmiervorgang so weit wie möglich an die individuellen Gegebenheiten in der Käserei angepaßt wurden, um möglichst praxisnahe Bedingungen zu erzielen. Dazu gehörte auch die Etablierung des „Alt-Jung-Schmierens“ über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter Laborbedingungen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen, Reifungskulturen und Nährmedien

2.1.1 Verwendete Mikroorganismen

Als Schutzkultur zur Hemmung und gegen die Vermehrung von *Listeria* auf der Käseoberfläche von Rotschmierekäse wurde die gefriergetrocknete Kultur ALC 01 (antilisterial culture, ALC 01) der Firma DW eingesetzt. Laut Angaben des Herstellers handelt es sich dabei um „eine Einstammkultur vom Typ *Lactobacillus plantarum*, die von einem geschmierten Rohmilchweichkäse isoliert wurde“. Der von ENNAHAR et al. (1996) von einem französischen Münster-Käse isolierte Stamm produziert das Bakteriocin Pediocin ACh. Als Kontrolle in den Reifungsversuchen diente *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (WS 1033, DSMZ 20174, Typstamm), der kein Bakteriocin produziert.

Für die künstliche Kontamination der Käse in den Reifungsversuchen wurde der Stamm *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 (Isolat von „Vacherin Mont d'Or“-Ausbruch; BILLE, 1990; Serovar 4b) verwendet. Als Indikatorstämme zur Ermittlung des Hemmspektrums von ALC 01 wurden zusätzlich die Stämme WSLC 1685 sowie WSLC 10179 -10188 verwendet.

2.1.2 Verwendete Reifungskulturen

Für die Reifung von Rotschmierekäsen wurden Einstammkulturen, definierte Mehrstammkulturen sowie undefinierte komplexe Reifungsfloren industrieller Herkunft verwendet. Bei den Einstammkulturen handelte es sich um *B. linens* M18 als Linocin M18 produzierenden Teststamm (VALDÉS-STAUER et al., 1991) sowie um den Micrococcin-produzierenden Teststamm *Staphylococcus equorum* WS 2733 (CARNIO et al., 1999). Weiterhin wurden für Versuch B2 die eine nicht genauer definierte hemmende Substanz bildenden Stämme *Arthrobacter ilicis* WS 2789, 2790, 2791, 2797, 2798 und 2799 (CARNIO et al., 1999) sowie der Stamm *Microbacterium lacticum* WS 1899 verwendet. Als definierte Mehrstammkultur wurden für die Versuche A2 und C1 zum einen die kommerziellen Reifungskulturen OFR9 und DH2 (Wisby, Niebüll, Deutschland), weiterhin die durch Zusammensetzung von Einzelstämmen einer komplexen Oberflächenflora gewonnenen Kulturen von drei Rotschmierekäsen

(Versuche D1 bis D5), sowie die durch Kombination verschiedener bakteriocinbildender Stämme von verschiedenen Rotschmierkäsen (Versuche B1 bis B3) zusammengesetzten, definierten Mehrstammkulturen verwendet. Bei der Kultur OFR9 handelt es sich um eine Mischkultur aus *Brevibacterium*-Stämmen, Hefen sowie *Geotrichum candidum*, die Kultur DH2 hingegen ist eine Reinkultur von *Debaryomyces hansenii*. Bei den drei Rotschmierkäsen der Versuche D1 bis D5 handelte es sich um einen Raclettekäse (Schnittkäse) einer französischen Rohmilchkäserei, sowie um zwei Weichkäse deutscher Hersteller aus pasteurisierter Milch, die im Nachfolgenden als Kultur MB, bzw. WE bezeichnet werden. Die verschiedenen bakteriocinbildenden Isolate der Versuche B2 und B3 wurden von CARNIO et al. (1999) von der Oberfläche verschiedener französischer Rotschmierkäse isoliert.

Die undefinierten industriellen komplexen Oberflächenflore (Versuche A1, A3-A6 sowie C1-C3) stammten von reifen, abgepackten, im Handel erhältlichen Rotschmierkäsen verschiedener Herkunft.

2.1.3 Verwendete Nährmedien und Puffer

Für die Kultivierung der genannten Mikroorganismen und für die Untersuchung der Käse wurden folgende Nährmedien verwendet:

2.1.3.1 Allgemein verwendete Nährmedien

• AC-Agar	<u>A</u>esculin-<u>C</u>ellobiose-Agar (nach HUNGER, 1986)	
20,0 g	Pepton aus Casein	
5,0 g	Hefeextrakt	
20,0 g	D-Cellobiose	
4,0 g	NaCl	
1,5 g	Na-Acetat × 3 H ₂ O	
0,5 g	Tween 80	
1,0 g	Aesculin	
0,5 g	Ammoniumeisen (III)- citrat	
15,0 g	Agar-Agar	
6,5 ml	Chlorphenolrotlösung	
ad 1000 ml	Aqua dest.	pH 7,0 ± 0,05

- **Citrat-Puffer (Natriumcitrat-Puffer)**

17 g	tri-Natriumcitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$)
ad 1000 ml	Aqua dest. pH 7,5

sowie die Medien:

- **APT** **All purpose (Tween) Medium (Merck, Darmstadt)**
- **MRS-Agar** **(*Lactobacillus*-Agar bzw. –Bouillon nach DE MAN, ROGOSA und SHARPE, 1960)**
- **PC3+** **Plate Count-Bouillon, bzw. –Agar mit 3% NaCl**
- **BHI** **Brain Heart Infusion (Merck, Darmstadt)**
- **TB / TA_w** **Tryptose-Bouillon, bzw. –Weichagar (Merck, Darmstadt)**

2.1.3.2 Medien für den Nachweis von *Listeria*

- **TSB** **Trypticase Soja Bouillon**

17,0 g	Pepton aus Casein
3,0 g	Phyto-Pepton
5,0 g	Natriumchlorid
2,5 g	di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
2,5 g	D(+)- Glucose
6,0 g	Hefeextrakt
ad 1000 ml	Aqua dest. pH 7,3 ± 0,2
- **ANC** **Acriflavin - Nalidixinsäure– Cycloheximid (Supplemente)**

Hemmstoffe zur selektiven Anreicherung,
Zugabe zum Grundmedium (= 175 ml TSB)
Endkonzentrationen: 10 mg/l, 40 mg/l, bzw. 50 mg/l

Weiterhin:

- **OXFORD** ***Listeria* Selektivagar (Oxoid, Hampshire)**
- **FRASER** ***Listeria*-Selektiv-Anreicherungsbouillon (Merck)**
- **PALCAM** ***Listeria*-Selektivagar (Merck)**

2.1.3.3 Medien für die FT-IR-Spektroskopie

- **CaSo** **Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Oxoid)**
15,0 g Pepton aus Casein
5,0 g Pepton aus Sojamehl
5,0 g Natriumchlorid
15,0 g Agar-Agar
ad 1000 ml Aqua dest. pH 7,3 ± 0,
- **YGC(B)** **Hefeextrakt Glucose Chloramphenicol (Bromphenolblau)-**
Agar (Merck)

Bebrütung: 24 h ± 30 min, 30°C, aerob

2.2 Herkunft der untersuchten Käseproben

50 Sauermilchkäse-Proben (41 verschiedene Käse vom Typ Gelbkäse) wurden aus dem Einzelhandel, direkt von Großhändlern oder den Molkereien selber bezogen. Die Proben wurden lt. Deklaration aus pasteurisierter Milch hergestellt. 374 untersuchte Rotschmierekäse-Proben wurden in Testproben (329) und Bestätigungsproben (45) unterteilt. Alle Rotschmierekäse-Proben wurden ebenfalls aus dem Einzelhandel (110 Proben) oder von Großhändlern (140 Proben), Ab-Hof-Produzenten (72 Proben) oder den Molkereien (7 Proben) bezogen. Der Transport bzw. Versand erfolgte gekühlt. Von den Rotschmierekäse-Proben wurden lt. Deklaration auf der Verpackung oder persönlicher Auskunft des Verkaufspersonals 163 Käse (49,5 %) aus pasteurisierter Milch und 166 Käse (50,5 %) aus Rohmilch hergestellt. Die erhaltenen Informationen betreffend der verwendeten Milch wurden nicht überprüft. 192 Weichkäse (58,4%), 92 halbfeste Schnittkäse (28,0%) und 45 Hartkäse (13,7%) wurden gemäß der unter in Kap. 2.3.1 beschriebenen Methode (IDF Standard 143A:1995) auf das Vorhandensein von *Listeria* untersucht. Die Untersuchung erfolgte so bald wie möglich und spätestens innerhalb von 48 Stunden nach dem Eintreffen im Labor. Die Käseproben wurden hierfür steril in zwei Teilproben unterteilt. Eine Teilprobe wurde in einem sterilen Polypropylenbeutel verpackt und bei -80°C zur nachfolgenden Ermittlung der *Listeria*-Keimzahlen gelagert.

2.3 Nachweis von *Listeria*

Zum Nachweis von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* in den untersuchten Käseproben und zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* auf der Käseoberfläche im Verlauf der durchgeführten Reifungsversuche (Versuche A1–D4) wurden alternativ die zwei folgenden Methoden verwendet.

2.3.1 Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten (IDF-Standard 143A:1995)

Für den Nachweis von *Listeria* in den untersuchten Sauermilch- und Rotschmierekäseproben wurde die ANC-Anreicherung verwendet. Hierfür wurden 25 g der Käseoberfläche mit 50 ml Na-Citratlösung im Stomacher homogenisiert. Nach Zugabe von 175 ml ANC-Bouillon wurde der Ansatz 2 Tage bei 30 °C bebrütet. Anschließend wurde je eine Öse Material aus der Anreicherung auf Oxford-Agar ausgestrichen und 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Pro Käseprobe wurden fünf verdächtige *Listeria*-Kolonien von Oxford-Agar isoliert und weiteren Tests zur Identifizierung unterzogen. Weiterhin wurde diese Methode zum qualitativen Nachweis von *Listeria monocytogenes* auf der Oberfläche der Käse der Reifungsversuche B, C und D angewendet.

2.3.2 Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* gemäß § 35 LMBG (DIN EN ISO 11290-1, 1997)

In den Reifungsversuchen A1-A6 wurde die Anreicherung nach ISO 11290, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG (9/1998) durchgeführt. Dazu wurde die zweistufige Fraser-Anreicherung verwendet. 20 g der Käseoberflächen wurden mit 180 ml ½ Fraser-Bouillon im Stomacher homogenisiert. Diese erste selektive Anreicherungssuspension wurde einen Tag bei 30 °C inkubiert. Der Ausstrich erfolgte auf Oxford- und PALCAM-Agar. Zusätzlich wurde 0,1 ml der ersten Anreicherung in 10 ml Fraser-Bouillon pipettiert und diese zweite selektive Anreicherungssuspension 2 Tage bei 37 °C bebrütet. Auch hier wurde wiederum auf Oxford- und PALCAM-Agar ausgestrichen.

2.3.3 Quantitativer Nachweis von *Listeria*

Der quantitative Nachweis von *Listeria* erfolgte bei erwartungsgemäß hohen Keimzahlen durch eine direkte Keimzahlbestimmung (Ausplattieren auf Oxford-Agar), bei erwarteten niedrigen Keimzahlen und bei den verschiedenen untersuchten Rotschmierekäseproben durch ein modifiziertes MPN-Verfahren, dessen Schema Anhang 5 zu entnehmen ist. Die MPN-Methode bestimmt die wahrscheinlichste Keimzahl einer Probe. Setzt man von einer Probe eine dezimale Verdünnungsreihe mit mehreren Parallelen in einem flüssigen Medium an, so ergibt sich am oberen Ende der Verdünnungsreihe ein bestimmtes Muster. Dieses Muster steht in einer statistischen Beziehung zur Keimzahl der untersuchten Probe. Die wahrscheinlichste Keimzahl kann über eine Tabelle ermittelt werden. Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit erfolgten mit drei Parallelansätzen, die mittels der MPN-Tabelle nach McCrady (OBLINGER und KOBURGER, 1984) ausgewertet wurden.

2.3.4 Differenzierung von *Listeria*

Die von Oxford-Agar isolierten *Listeria*- Stämme wurden zur Differenzierung in ½ BHI über Nacht überimpft und im Folgenden die Fähigkeit zur Verstoffwechslung von Glucose-, Salicin-, Xylose- und Rhamnose sowie die Fähigkeit der β -Hämolyse überprüft. Dabei bildet sich ein typisches Muster, welches für die jeweilige Art charakteristisch ist. Die Ergebnisse wurden nach folgendem Schema ausgewertet:

Tabelle 2.3.4.1: Zucker-Fermentations- und Hämolysemuster verschiedener *Listeria*- Spezies

<i>Listeria</i> -Spezies	Zucker-Fermentation				β -Hämolyse
	Glucose	Salicin	Xylose	Rhamnose	
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	+	+	-	-/+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	+	+	-/+	-

Da eine direkte Keimzahlbestimmung von *Listeria* erst ab einer Dichte von 10^2 - 10^3 KbE/cm² Käsedeckfläche möglich ist, mußte zum Nachweis von niedrigeren Keimzahlen

eine selektive Anreicherung durchgeführt werden. War der Nachweis hierbei deutlich positiv, wurden die Keimzahlen durch direktes Ausplattieren auf einem Selektivmedium bestimmt.

2.4 Nachweis und Quantifizierung der antilisteriellen Aktivität von Bakterienstämmen

Um die Aktivität des von *Lb. plantarum* ALC 01 gebildeten Pediocin AcH zu bestimmen, wurde die von BARRY (1980) beschriebene Methode des „spot-on-the-lawn-assay“ verwendet. Hierfür wurden die Zellen nach Angabe der Firma DW 10 bzw. 14 h bei 37 °C in 250 ml verschiedener Anzuchtmedien (MRS, APT, VisStart® TW ALC 01) angezüchtet, unmittelbar anschließend abzentrifugiert (10`000 U/min, 20 min), sterilfiltriert (0,2 µm) und im Verhältnis 1:1 mit 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verdünnt.

Zur Bestimmung der antilisteriellen Aktivität der von Rotschmierekäsen isolierten Stämme der Versuche B1-B3 wurde der von MAYR-HARTING et al. (1972) und HOOVER (1993) beschriebene „macrocolony-assay“ angewendet. Hierzu wurden die Stämme in jeweils 10 ml PC3+-Bouillon für 2-3 Tage unter Schütteln bei 30°C angezüchtet und direkt (ohne vorheriges Abzentrifugieren) für den Nachweis verwendet.

Zur Herstellung der *Listeria*-Weichagarplatten wurden für beide Versuchsansätze jeweils 6,5 ml Tryptose-Weichagar (0,8%) bei 48°C mit 100 µl einer ÜNK (½ BHI-Bouillon) der *Listeria*-Indikatorstämme in Petrischalen ausgegossen. Auf die erstarrten *Listeria*-Weichagarplatten wurden jeweils 10 µl aus jeder Verdünnungsstufe des gepufferten Pediocins, bzw. 10 µl der entsprechenden Kultur aufgetropft und bei 30 °C 1 d bebrütet. Die Auswertung nach deutlich erkennbaren Hemmhöfen erfolgte nach 24, 48 und 72 h unter Verwendung der Henry-Beleuchtung (HENRY, 1933). Im Fall des „spot-on-the-lawn-assay“ wurde die Verdünnungsstufe x ermittelt, bei der noch eine sichtbare Hemmung in Form eines klaren Hemmhofes zu erkennen war und die Aktivitätseinheiten pro ml (AU/ml) nach folgender Formel berechnet.

$$2^x \times 100 = \text{AU/ ml}$$

2.5 Nachweis der Resistenzbildung von *Listeria* gegen Pediocin AcH

Gegen Pediocin AcH resistente Mutanten von *L. monocytogenes* WSLC 1364 (WSLC 1364^R) konnten einfach aus den deutlich sichtbaren Hemmhöfen mit einer Stichöse von den Weichagarplatten isoliert und durch einen Ausstrich auf PALCAM-Agar gereinigt werden. Um die Stabilität der Resistenz zu überprüfen, wurde eine der isolierten resistenten Mutanten (WSLC 1364^R) in 6 ml ½-BHI-Bouillon bei 30°C kultiviert und nach exakt 24 h ein Aliquot der Kultur (10 µl) in ein neues Röhrchen mit ½-BHI-Bouillon überführt. Insgesamt wurden 10 solcher Transfers durchgeführt. Nach 5 und 10 Tagen wurde eine Probe entnommen, dezimal verdünnt, auf BHI-Agar ausplattiert und 20 Kolonien zufällig ausgewählt. Diese 20 Stämme wurden wiederum einem „spot-on-the-lawn-assay“ unterzogen, um das Vorhandensein einer Resistenz zu überprüfen.

2.6 Isolierung von Bakterien- und Hefenstämmen von der Käsoberfläche

Für die Entwicklung einer definierten Mehrstamm-Reifungskultur aus der komplexen, undefinierten Reifungsflora von insgesamt drei verschiedenen Käsen wurden Einzelstämme isoliert, anschließend separat vermehrt und zu einer Mehrstammkultur zusammengesetzt um zu einer definierten Kultur zu gelangen. Es handelte sich hierbei um einen Raclette-Käse (halbfeste Schnittkäsesorte aus Rohmilch) einer Käserei aus Frankreich und drei Rotschmierekäsesorten aus zwei deutschen Käsereien (Weichkäsesorten aus pasteurisierter Milch). Zur Isolierung der Stämme wurden Teile der Deckflächen abgeschnitten und mit 1,75%iger tri-Natrium-Citratlösung im Stomacher homogenisiert. Wie bei PRECHTER (2000) und MAIER (2000) beschrieben, wurden die Homogenisate verdünnt und auf PC 3+ -Agar und YGCB-Agar ausplattiert und bebrütet. Die verschiedenen Bakterienstämme, Hefen und Schimmelpilze konnten primär anhand ihrer unterschiedlichen Koloniemorphologie voneinander unterschieden werden. Eine genaue Identifikation der isolierten Stämme wurde mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie durchgeführt.

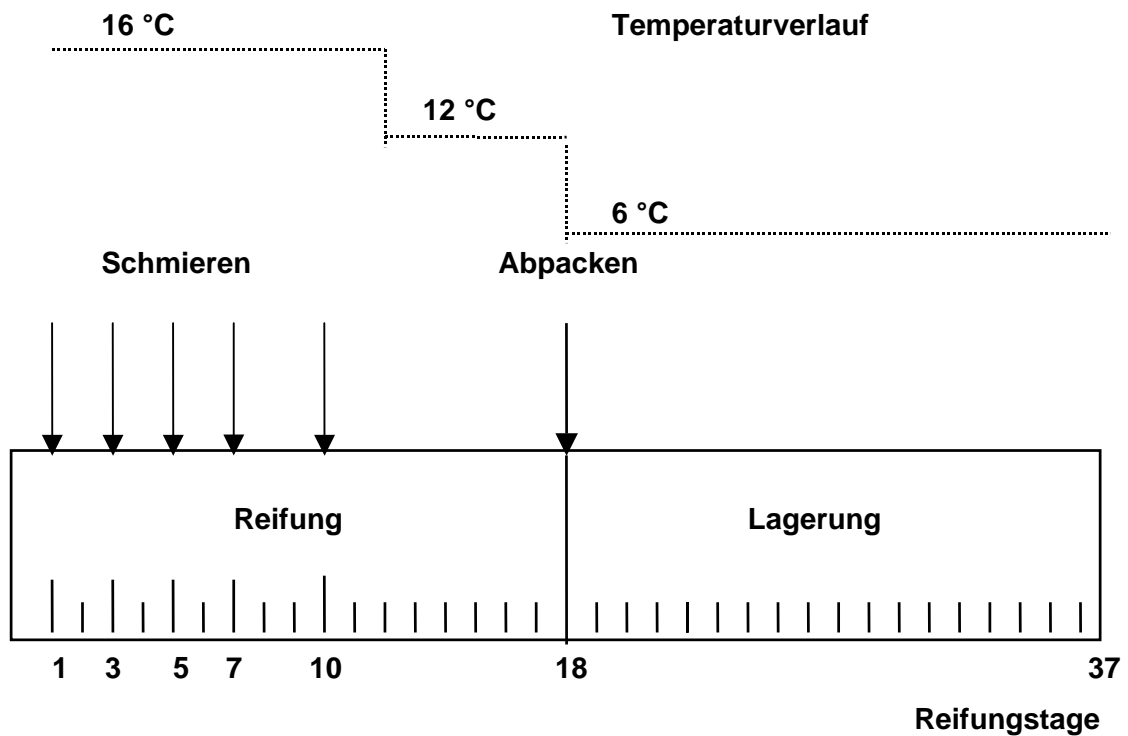
Kultivierung der verwendeten Stämme. Zur Herstellung der Reifungskulturen für das Schmierkäse (Versuche B1 – B3, D1 – D5) wurden die isolierten Stämme in PC 3+ -Bouillon (Bakterienstämme), bzw. in YM-Bouillon (Hefen und Milchsimmel) überführt und kultiviert, durch anschließende Zentrifugation geerntet und in einer 5%igen Kochsalzlösung mit dem Zusatz von Glycerin (Endkonzentration 15 %) bei

–70°C bis unmittelbar vor dem Schmieren aufbewahrt (PRECHTER (2000), MAIER (2000)). Um eine genaue Einstellung der Keimzahl in der Schmierlake zu gewährleisten, wurde von der Kultur eines jeden Stammes eine Keimzahlbestimmung durchgeführt. Es wurden Keimzahlen von 10^9 - 10^{10} Keimen pro ml erreicht.

2.7 Reifung von Rotschmierekäse im Labor

2.7.1 Reifung von Modell-Rotschmierekäse im Labormaßstab

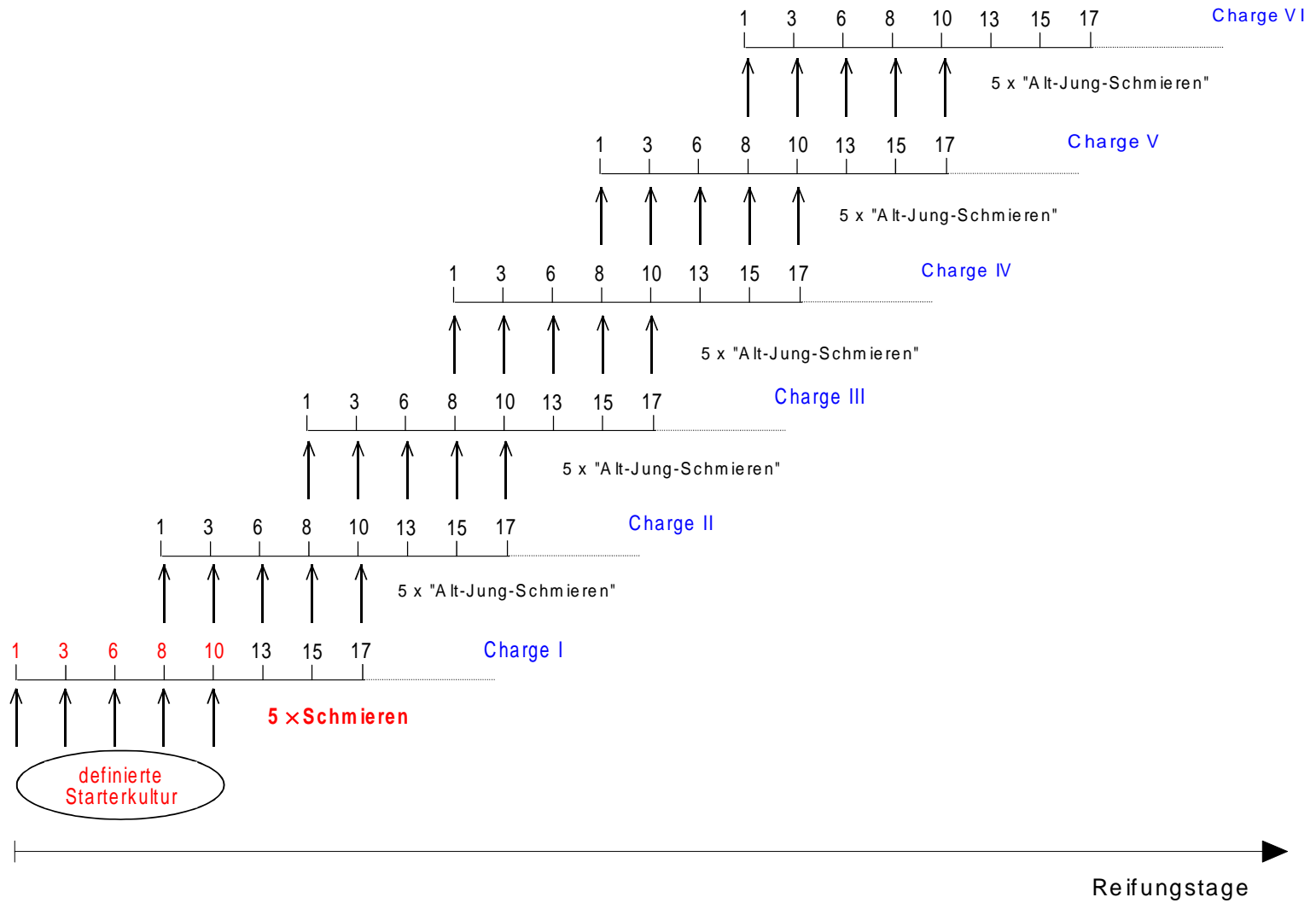
Für die Reifungsversuche wurden Weinkäse (62,5g, 45 % Fett i.Tr.) aus industrieller Produktion direkt nach dem Trockensalzen verwendet (sog. „grüne Käse“). Lediglich in Versuch A2 wurden 1-3 Laibe halbfester Schnittkäse (45 % Fett i. Tr.; 2000 g) ebenfalls aus industrieller Produktion verwendet, aus denen mit geeigneten Edelstahlwerkzeugen 12 Käsestücke mit gleicher Höhe und gleichem Durchmesser wie dem der Weichkäse ausgestochen wurden. Der Zeitpunkt des Schmierens der Käse sowie die Reifungsbedingungen im Labor, wie z.B. die Luftfeuchtigkeit und die Lagerungstemperatur wurden soweit wie möglich der industriellen Rotschmierekäseproduktion angeglichen. Glasexsikkatoren dienten als Reifungskammern für die Käse (EPPERT, 1997). Durch eine 7,95 %ige NaCl-Lösung in der Bodenwanne der Exsikkatoren wurde die relative Feuchte auf 95% eingestellt (SULZER und BUSSE, 1991). Die Exsikkatoren wurden in Kühlbrutschränken gelagert. Das Schmieren der Käse erfolgte von Hand mit sterilen Handschuhen fünfmal in einem Zeitraum von 10 Tagen für die Weichkäse und zusätzlich an Tag 14 für die halbfesten Schnittkäse und war außerdem mit einem Wenden der Käse nach jedem Schmieren verbunden. Die Käse wurden von Tag 1 bis 12 bei 16°C, von Tag 13 bis 18 bei 12°C gereift und an Tag 19 in Alufolie abgepackt und bei 4°C bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums gelagert. Nachfolgende Abbildung verdeutlicht schematisch die Behandlung und Reifung der Käse (Abb. 2.7.1.1)

Abbildung. 2.7.1.1: Reifung und Lagerung von Rotschmierekäsen

2.7.2 „Alt-Jung-Schmierer“ von Weichkäsen im Labormaßstab

Im Unterschied zu der unter 2.7.1 beschriebenen Reifung der Weichkäse wurde bei der Durchführung dieser Reifungsversuche (A6, D1 – D5) das traditionell angewendete „Alt-Jung-Schmierer“ im Labor über einen Zeitraum von 6 Wochen (Charge I bis VI) simuliert. Am Tag vor dem ersten Schmieren wurden die grünen Käse direkt nach dem Salzen dem Produktionsprozeß entnommen und in Glasexsikkatoren bei 16 °C gelagert, um eine noch bessere Diffusion des Salzes im Käseteig zu ermöglichen. Wie der Abbildung 2.7.2.1 entnommen werden kann, wurden die grünen Käse der Charge I an den Reifungstagen 1, 3, 6, 8 und 10 fünfmal mit einer komplexen Reifungskultur (A6), bzw. der definierten Reifungskultur aus den verschiedenen Bakterien- und Hefenstämmen (D1-D5) geschmiert. Am 8. Reifungstag erfolgte nach diesem Schmieren zum ersten Mal der Transfer der auf den Käsen bereits etablierten Reifungsflora auf die einen Tag alten grünen Käse der neuen Käsecharge II. Der gleiche Vorgang wurde am 10. Reifungstag der Käse der Charge I wiederholt. Am 13. Reifungstag der Käsecharge I wurde die Oberflächenflora von zwei Käsen in 100 ml 5%iger NaCl-Lösung steril abgerieben und anschließend die 6 Tage alten Käse der

Abbildung 2.7.2.1: Schematischer Verlauf des „Alt-Jung-Schmierens“



Charge II darin geschmiert. An den Reifungstagen 15 bzw. 17 wurden die Reifungsflora von jeweils zwei gereiften Käsen der Charge I wiederum abgeschmiert, mit dieser Kultur die 8 bzw. 10 Tage alten Käse der Charge II „alt-jung-geschmiert“ und anschließend dieselbe Schmierlake zum Schmieren der 1 bzw. 3 Tage alten Käse der Charge III verwendet. Nach diesem Schema wurde bis zur Käsecharge VI verfahren.

2.8 Herstellung der Schmierlaken und Kontamination mit *Listeria monocytogenes*

2.8.1 Herstellung der Schmierlaken

2.8.1.1 Reifung mit definierten Mehrstammkulturen (Versuche A2, B1 – 3, D1 - 5)

Für die Reifung der Käse in den Versuchen A2 wurde eine definierte Reifungskultur in flüssiger Form der Firma DW mit dem Handelsnamen OFR9 verwendet, die in Kombination mit der Kultur DH2 zur Produktion von halbfesten Schnittkäsen in Betrieben Gebrauch findet. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden die Keimzahlen der Kulturen bestimmt und beim Schmieren der Käse auf ca. 10^8 KbE/ml Schmierlake eingestellt. Die Kultur OFR9 wurde als Kontrolle ebenfalls in Versuch C1 verwendet, jedoch wurde hier auf Verwendung der Kultur DH2 verzichtet. In den Versuchen B1 - B3 wurde durch Kombination verschiedener Stämme eine definierte Schmierlake hergestellt. Mit Ausnahme von Versuch B1 wurden alle verwendeten Stämme hierfür in gleichen Verhältnissen zur Schmierlake zugegeben; die Keimzahl betrug ca. 10^8 KbE/ ml. Für die Versuche D1-D5 wurde die definierte Oberflächenreifungskultur, bestehend aus 12 -29 verschiedenen Bakterien- und Hefenstämmen, unmittelbar vor jedem Schmieren durch Mischen in einer 5 %-igen NaCl-Lösung zusammengesetzt. Diese stellte mit einer Keimzahl von ca. 10^8 Keimen pro ml die Schmierlake für die Oberflächenbehandlung der Käse dar. Die Anteile der einzelnen Stämme entsprachen in etwa denen, die bei der Analyse der Oberflächenflora ermittelt wurden (Versuche D2 - D5) (MAIER, 2000), während in Versuch D1, unabhängig von den Anteilen auf der Käsoberfläche, ungefähr gleiche Anteile aller Stämme in der Schmierlake erreicht werden sollten (PRECHTER (2000). In Versuch D1 (Raclette-Flora) wurden der Schmierlake der Charge VI_b zusätzlich 10^8 KbE/ ml *B. linens* hinzugefügt.

2.8.1.2 Reifung mit undefinierten komplexen Oberflächenkulturen (Versuche C1, C2, C3)

Die komplexe Oberflächenflora wurde durch steriles Abtragen der Oberflächenflora von handelsüblich gereiften Käsen gewonnen. Die Rotschmiere wurde in ca. 100 ml 5 %iger NaCl-Lösung suspendiert und die Zellen abzentrifugiert (8'000 U/min, 25 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen mit 5%iger NaCl-Lösung gewaschen und nochmals zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 50 ml 5%iger NaCl-Lösung aufgenommen, 15% Glycerin zugesetzt, aliquotiert und bei -70°C gelagert. Die Keimzahl der eingefrorenen Kulturen betrug ca. 5×10^9 - 10^{10} KbE/ml. Vor dem Einsatz als Reifungskultur wurde die Keimzahl auf PC3+-Agar bestimmt und die Abwesenheit von *Listeria* in ca. 10 ml Kultur durch ein selektives Anreicherungsverfahren überprüft. Die Keimzahl in der Schmierlake wurde durch Verdünnen in 5 %iger NaCl-Lösung auf ca. 10^8 KbE/ml eingestellt. Die Oberflächenbehandlung der Käse erfolgte analog zu der im Kapitel 2.7.1 beschriebenen Methode. Weitere Versuchsparameter sind Tab. 2.11.1 zu entnehmen.

2.8.1.3 Zusatz einer bacteriocin-bildenden Schutzkultur (*Lb. plantarum* ALC 01) (Versuche A1-A6)

Wie bei STEFFAN (2000) beschrieben, wurden der Schmierlake an bestimmten Tagen die Schutzkultur *Lb. plantarum* ALC 01, bzw. der bacteriocin-negative Kontrollstamm *Lb. plantarum* ATCC 14917 zugesetzt. Beide Stämme wurden vor ihrer Applikation auf der Käsoberfläche in dem hierfür entwickelten Medium VisStart® TW ALC 01 bei 37 °C 14 h kultiviert, bis ein pH-Wert von 4,0-3,9 erreicht war. Die Schmierlake bestand grundsätzlich aus einer 5%igen NaCl-Lösung mit der entsprechenden Reifungskultur. Für den Versuch A3 wurde die Schutzkultur sowohl in oben beschriebener Weise, als auch in Form des durch Zentrifugation gewonnenen Überstands und des Pellets appliziert. Hierzu wurden 200 ml von der Kultur von ALC 01 abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Zur Entfernung des gebildeten Bacteriocins wurde das Pellet mit unbeimpftem Medium VisStart® TW ALC 01 gewaschen, wiederum abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 ml VisStart® TW ALC 01 resuspendiert. Die ALC 01-Pellet-Suspension und der ALC 01-Überstand wurden in gleicher Weise wie die Schutzkultur ALC 01 der Schmierlake zugesetzt.

In Versuch A4 wurde überprüft, ob das Aufbringen von Nährstoffen auf die Käseoberfläche in Form der Anzuchtmedien APT bzw. VisStart®TW ALC 01 einen Einfluß auf die Entwicklung der *Listeria*-Keimzahlen ausübt. Dazu wurde bei einer Charge VisStart®TW ALC 01 und bei der zweiten Charge APT-Medium zur Schmierlake hinzugefügt. Die dritte Charge wurde zur Kontrolle nur mit der komplexen Oberflächenflora geschmiert. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Versuchen, wurden noch zwei weitere Reifungsversuche (A5 und A6) durchgeführt, um die Entwicklung und das Verhalten resistenter *Listeria*-Zellen zu überprüfen.

2.8.2 Kontamination mit *Listeria monocytogenes*

Für die Kontamination der Käse wurde der Stamm *L. monocytogenes*-Stamm WSLC 1364 bzw. bei den Versuchen A5 und A6 zusätzlich die resistente Mutante WSLC 1364^R) verwendet, die jeweils als Übernachtskultur in ½ BHI angezogen wurden. Die OD₆₀₀ der Kulturen wurde vor dem ersten Schmieren photometrisch bestimmt und anhand einer Eichkurve die ungefähre Keimzahl ermittelt. Das gewünschte Aliquot wurde nach Verdünnung in ¼ Ringerlösung unmittelbar vor dem Schmieren in die Schmierlake pipettiert. Die genaue *Listeria*-Keimzahl der Übernachtskultur wurde anschließend durch Ausplattieren auf PC-Agar bestimmt.

2.9 Bestimmung der Keimzahlen und des pH-Wertes der Käseoberfläche

Während der Reifung und Lagerung der Käse wurden die Keimzahlen von *Lb. plantarum* ALC 01 bzw. ATCC 14917, der Hefen, die aeroben Gesamtkeimzahlen sowie die *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche ermittelt. Hierfür wurde vor dem Schmieren aus jedem Exsikkator ein Käse entnommen, die Deckflächen abgeschnitten, je 20 g ± 1 g in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 180 ml 1,75 %iger tri-Na-Citratlösung im Stomacher homogenisiert. Die Proben wurden mit ¼ Ringerlösung dezimal verdünnt und im Doppelansatz auf die entsprechenden Nährmedien ausgespatelt. Die Keimzahl pro ml wurde auf die Keimzahl pro cm² Käseoberfläche umgerechnet.

Für die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl wurde PC3+-Agar verwendet. Die PC3+-Platten wurden bei 30 °C 3 d aerob bebrütet und einen weiteren Tag zur Pigmentbildung der coryneformen Stämme bei Tageslicht und Raumtemperatur

stehengelassen. Die Kolonien wurden nach Farbe differenziert ausgezählt. Die Keimzahl der Hefen wurde auf YGCB-Agar ermittelt (Bebrütung bei 30 °C, 3 d). Die Auswertung erfolgte getrennt nach Schimmelartigen und Hefen. Zur Bestimmung der *Lactobacillus*-Keimzahlen wurden zwei verschiedene Nährböden verwendet. Die MRS-Platten wurden bei 37 °C 2 d aerob, die AC-Platten unter gleichen Bedingungen anaerob bebrütet. Milchsäurebakterien bilden auf MRS-Agar weißliche, matte, halbkugelförmige Kolonien, die den typischen Geruch nach Milchsäure aufweisen. Dagegen spaltet *Lb. plantarum* auf AC-Agar den Inhaltsstoff Äsculin zu Äsculetin und Glucose. Äsculetin bildet in einer Verbindung mit Fe(III)-Ionen einen olivgrünen bis schwarzen Komplex, wodurch um die ca. 1 mm kleinen, dunkelbraun bis braunschwarzen Kolonien mit dunklem Zentrum ein dunkler Hof zu sehen ist (HUNGER, 1986). Für die direkte Keimzahlbestimmung von *Listeria monocytogenes* wurde Oxford- bzw. PALCAM- Selektivagar verwendet (2d, 30°C). *Listeria* spaltet das in beiden Nährböden vorhandene Äsculin zu Äsculetin unter Bildung von Fe(III)- Ionen, die durch Niederschlag schwarzer Komplexverbindungen die Kolonien und das Medium dunkel färben. Zusätzlich zeigt *Listeria* auf Oxford- und PALCAM-Agar in der Regel eine typische Koloniemorphologie. Die Kolonien erscheinen oliv-braun, rund, glatt mit leichtem Glanz und einer typischen Einbuchtung („Delle“) in der Mitte der Kolonie (CURTIS et al., 1989).

Zur Kontrolle der Reifung wurden bei jeder Untersuchung die pH-Werte der Käseoberflächen mittels einer Oberflächenelektrode (METTLER TOLEDO InLab® 410 pH-Elektrode) gemessen. Hierbei wurden fünf Messpunkte auf dem Käserand ausgewählt. Aus diesen Werten wurde jeweils der Mittelwert gebildet, wodurch der pH-Verlauf jeder Charge über die gesamte Zeit der Reifung und Lagerung verfolgt werden konnte.

2.10 Methodik der Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie

2.10.1 Identifizierung der Stämme der definierten Reifungskultur

FT-IR-Spektren von coryneformen Bakterien werden durch Veränderungen des Nährmediums, des Ausstrichverfahrens, der Inkubationstemperatur, der Wachstumsdauer und der Trocknungsmethode der Bakteriensuspension auf dem Probenrad beeinflusst. Eine weitestgehend standardisierte Probenaufbereitung muß daher für eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen definiert sein. Zur Identifizierung von coryneformen Bakterienstämmen der drei komplexen Oberflächenflore (Reifungsversuche D1-D5) wurden folgende Versuchsparameter verwendet:

Gewinnung von Reinkulturen. Um die Identifizierung von Mikroorganismen exakt durchführen zu können, müssen die zu untersuchenden Bakterienstämme in Reinkultur vorliegen. Für diesen Zweck wurden von den isolierten Stämmen Reinigungsausstriche auf PC3+- Agar angelegt, anschließend auf CaSo-Agar überimpft und 3 d bei 30 °C bebrütet.

Kultivierung der Reinkulturen und Probenpräparation. Von der jeweiligen, auf CaSo-Agar vorkultivierten Reinkultur wurde mit Hilfe einer Platin-Öse wenig Zellmaterial abgenommen, erneut auf CaSo-Agar überführt und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig auf dem Nährboden verteilt. Die Platten wurden für exakt 24 h \pm 30 min bei 30 °C bebrütet. Im weiteren wurde je Probe eine gehäufte Öse (kalibrierte Platinöse, Durchmesser 1 mm) Zellmaterial von dem Bakterienrasen auf dem CaSo-Agar abgenommen und in 100 μ l sterilem Aqua dest. suspendiert. Ein Aliquot von 35 μ l der Mikroorganismen-Suspension wurde auf je ein Probenfeld des Probenrades (ZnSe-Küvette) aufgebracht und bei 42°C \pm 2°C für ca. eine Stunde getrocknet, um einen transparenten Probenfilm zu erhalten. Die erhaltene Proben wurden direkt zur Messung im FT-IR-Spektrometer verwendet. Die Messung der verschiedenen isolierten Bakterienstämme zur Erstellung von drei Bibliotheken mit den Isolaten von je einem Käse erfolgte je Stamm dreimal. Zur Erstellung von Referenzspektren für die Spektrenbibliothek wurden Mittelwertsspektren aus jeweils drei qualitativ guten Einzelspektren gebildet, sofern diese in der Clusteranalyse zusammengruppierten.

Vermessen der Mikroorganismen mit der FT-IR-Spektroskopie. Alle Spektren wurden mit Hilfe des IFS-28B FT-IR-Spektrometers (BRUKER, Karlsruhe) zwischen den Wellenzahlen 4000 cm^{-1} und 500 cm^{-1} ermittelt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Software OPUS[®], Version 3.0, zur mikrobiologischen Identifizierung (BRUKER; KÜMMERLE et al., 1998).

Bearbeitung der gemessenen Spektren. Die Auswertung (Identitätsprüfung und Clusteranalyse) der Spektren wurde mit der ersten Ableitung vorgenommen.

Qualitätsprüfung der gemessenen Spektren (Quality Test). Mit diesem Test wurde die „Qualität“ der gemessenen Spektren bezüglich der Extinktionswerte, des Signal/Rausch-Verhältnisses, der Intensität der Wasserdampfbanden sowie störender Interferenzen geprüft. Spektren, die bestimmte Grenzwerte nicht einhielten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen .

Auswertung der Spektren mit der Clusteranalyse oder dem Identitätstest. Die spektrale Distanz (d-Wert) ist ein Maß für die Ähnlichkeit der Spektren zweier Isolate und reflektiert die Größe sich nicht überlappender Bereiche beider Spektren (bzw. derer 1. Ableitungen). Die resultierende Distanzmatrix stellt die Basis für die Clusteranalyse (Dendrogramm) dar (KÜMMERLE et al., 1998). Diese Methode ist für die Differenzierung von Mikroorganismen geeignet. Dabei wird zur Identifizierung das Spektrum eines unbekanntes Isolates mit allen Spektren der Referenzspektrenbibliothek verglichen. Anschließend wird eine Hitliste erstellt, die die Spektren mit der geringsten Distanz zum Isolat aufführt (KÜMMERLE et al., 1998). Die Identifizierung der verschiedenen Bakterienstämme erfolgte mit der Referenzbibliothek der Keimgruppe der Coryneformen, die sowohl aus der Umwelt als auch von Käsen isoliert wurden (OBERREUTER et al., 2000). Diese Bibliothek umfaßt die Spektren von 730 Stämmen von 220 verschiedenen Spezies aus 46 Gattungen. Konnte mit Hilfe dieser Bibliothek keine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden, so wurden weitere Spektrenbibliotheken für Bazillen, grampositive Kokken und Enterobakterien zur Identifizierung hinzugezogen. Ergebnis der Auswertung war ein Identitätsreport, in dem die Referenzstämme in absteigender Ähnlichkeit zum zu identifizierenden Spektrum aufgelistet wurden.

Erstellung von individuellen Bibliotheken

Alle Isolate eines Käses und deren Identifizierung wurden in einer individuellen Bibliothek zusammengestellt und zur Zuordnung der weiteren Isolate (siehe 2.10.2) herangezogen.

2.10.2 Identifizierung der von der Käseoberfläche isolierten Stämme

Mit Hilfe der Versuche D1-D3 sollte die Entwicklung der Florazusammensetzung im Verlauf des sechswöchigen „Alt-Jung-Schmierens“ verfolgt werden. Dabei waren die jeweiligen Anteile der definierten Bakterienstämme an der gesamten Flora von Interesse. Dieser Anteil wurde als „definierte Flora“ benannt. Zudem wurden auch diejenigen Bakterienstämme in der jeweiligen Schmierlake untersucht, die nicht als definierte Reifungskultur für die Rotschmierkäse der anfänglichen Schmierlake der Käsecharge I zugesetzt wurden. Diese Bakterienstämme wurden als „nicht-definierte Flora“ bezeichnet. Um einen Überblick über die Entwicklung der Bakterienflora in den Schmierlaken während des gesamten Reifungsverlaufes der Käsechargen I bis VI zu erhalten, wurden bestimmte Schmierlaken ausgewählt und untersucht.

Gewinnung von je 100 Kolonien aus den ausgewählten Schmierlaken

Unmittelbar nach dem jeweiligen Schmierens wurden je 1 ml Schmierlake als Probe gezogen, dezimal verdünnt und auf PC 3+ -Agar ausgespatelt und bebrütet. Um den Anteil der verschiedenen Bakterienstämme in den Schmierlaken in Prozent ausdrücken zu können, wurden von jeder Schmierlakenprobe 100 Kolonien isoliert, auf CaSO-Agar überimpft und wie in Kap. 2.10.1 weiter verfahren, um die Stämme mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie zu identifizieren. Die Erstellung eines Dendrogramms mit den 100 Bakterienstämmen und den Bakterienstämmen der jeweiligen individuellen Bibliothek der Käsesorte ermöglichte eine Zuordnung der Stämme. Sobald eine Zuordnung eines Stammes der Schmierlake im Dendrogramm nicht möglich war, wurde der unbekannte Stamm mit Hilfe des Identitätstests identifiziert. Die Identifizierung wurde in Abhängigkeit der Hit-Qualität auch mit anderen Referenz-Bibliotheken durchgeführt.

Bestimmung der Florazusammensetzung von grünen Käsen (PRECHTER, 2000). Im Laufe der Käsereifung der Chargen I bis VI siedelte sich auf der Käseoberfläche neben der definierten Reifungskultur eine nicht-definierte Flora an. Um festzustellen, wie sich diese nicht-definierte Flora zusammensetzte, wurde die Zusammensetzung der

Oberflächenflora eines grünen Käses nach dem Salzbad analog zu der oben genannten Methode bestimmt.

2.11 Zusammenfassung der wichtigsten Parameter aller Reifungsversuche

Zur Übersicht sind die wichtigsten Parameter sämtlicher Reifungsversuche in Tab.2.11.1 zusammengefaßt

Tabelle 2.11.1: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter aller Reifungsversuche

Versuch	Test-/ Kontrollstamm (Applikation)	Reifungskultur	Käsesorte	Kontamination mit <i>L. monocytogenes</i> Stamm KbE/ ml Lake		Bemerkung
Reifungsversuche mit <i>Lactobacillus plantarum</i> ALC 01 / ATCC 14917						
A1	ALC 01/ ATCC 14917	komplexe Flora KS	Weichkäse	WSLC 1364	2×10^2 4×10^3 4×10^4	
A2	ALC 01/ ATCC 14917	definierte Reifungskultur OFR 9, DH 2	halbfester Schnittkäse	WSLC 1364	2×10^2	
A3	ALC 01 Überstand/ ALC 01 Pellet	definierte Reifungskultur OFR 9, DH 2	Weichkäse	WSLC 1364	7×10^2	
A4		komplexe Flora KS	Weichkäse	WSLC 1364	2×10^2	Zusatz von APT, bzw. VisStart TW [®] ALC01
A5	ALC 01	komplexe Flora KS	Weichkäse	WSLC 1364/ WSLC 1364 ^R	1×10^2 1×10^3	
A6	ALC 01	komplexe Flora KS	Weichkäse	WSLC 1364 / WSLC 1364 ^R	5×10^2 (Ch I)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 3 Chargen
Reifungsversuche durch Kombination verschiedener bacteriocinbildender Bakterienstämme						
B1	M18, WS 2733	1: 10, 1:50, Tag 10	Weichkäse	WSLC 1364	1×10^4	
B2		M18, <i>M.lacticum</i> WS 1899, <i>Arthrobacter</i> ssp.	Weichkäse	WSLC 1364	4×10^2	
B3	WS 2733	F.01, F.02, F.03, F.04, F.05, F.07, F.08,	Weichkäse	WSLC 1364	5×10^2	
Reifungsversuche mit undefinierten komplexen Oberflächenkulturen						
C1		AB, MB, KS, WE, PO, TA, Racl, OFR9	Weichkäse	WSLC 1364	$2-3 \times 10^2$	
C2		MB, KS, WE, Racl,	Weichkäse	WSLC 1364	$2-3 \times 10^3$	
C3		MB, KS, WE	Weichkäse	WSLC 1364	$1,5 \times 10^4$	
Reifung mit definierten Mehrstammkulturen						
D1		Raclette	Weichkäse	WSLC 1364	1×10^2 (Tag 1, Ch I)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 6 Chargen
D2		MB	Weichkäse	WSLC 1364	1×10^2 (Tag 1, Ch I)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 6 Chargen
D3		WE	Weichkäse	WSLC 1364	1×10^2 (Tag 1, Ch I)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 6 Chargen
D4		MB	Weichkäse	WSLC 1364	$1-4 \times 10^2$ (Tag 1, Ch I & 6)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 6 Chargen
D5		WE	Weichkäse	WSLC 1364	$4-8 \times 10^1$ (Tag 1, Ch I & 6)	„Alt-Jung- Schmierer“ über 6 Chargen

3 Ergebnisse

3.1 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* auf Käse

3.1.1 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* auf Sauermilchkäse

Laut Verpackungsangaben (EWG-Number) wurden alle 50 untersuchten Sauermilchkäse-Proben in insgesamt acht verschiedenen Käsereien produziert. In einigen Fällen wurden zwei identische Käse von der gleichen Käserei als zwei unterschiedliche Marken mit unterschiedlicher Verpackung vertrieben. Von 41 verschiedenen untersuchten Proben konnten in 2 Proben (4,8%) *L. monocytogenes* und in 8 Proben (19,5%) *L. innocua* in 25 g nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer modifizierten MPN-Methode konnten *L. monocytogenes*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche unter 10 KbE/cm² (2 Proben) und *L. innocua*-Keimzahlen zwischen <10 KbE/cm² (3 Proben), >10 KbE/cm² (3 Proben), >10² KbE/cm² (3 Proben) und >10³ KbE/cm² (1 Probe) nachgewiesen werden. *L. monocytogenes*-positive Proben konnten durch eine weitere Untersuchung der Rückstellprobe (Lagerung bei -80°C) bestätigt werden, jedoch war es nicht möglich, den selben Erreger in entsprechenden Proben nachzuweisen, die einige Wochen später im selben Geschäft gekauft wurden. Hingegen konnten *L. innocua*-positive Proben in einigen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt bestätigt werden (Tab. 3.1.1.1). In drei Molkereien (BI, HO, and HT) konnten in 11, 4, bzw. einer Probe keine Listerien nachgewiesen werden.

Aus den untersuchten Sauermilchkäse-Proben konnten zwei verschiedene *L. monocytogenes*-Phagovare und sechs verschiedene *L. innocua*-Phagovare isoliert werden. In Käserei RK konnten in 5 *L. innocua*-positiven Käseproben zwischen Juni und November 1999 insgesamt 3 Phagovare unterschieden werden. Dabei enthielt jede Käseprobe ein, zwei oder drei verschiedene *L. innocua*-Stämme eines Phagovars. In den Käseproben der Käserei LO konnte im Juni und August 1999 *L. innocua* und im Juli 1999 *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Dabei zeigten alle *L. innocua*-Isolate den gleichen Phagovar, der sich deutlich vom Phagovar des isolierten *L. monocytogenes*-Stammes unterschied. Von den Käsereien DO, HA und RÖ konnte jeweils nur eine Käseprobe untersucht werden. Dabei wurden drei unterschiedliche Phagovare ermittelt (Tabelle 3.1.1.2).

Tabelle 3.1.1.1: Vorkommen von *Listeria innocua* und *Listeria monocytogenes* auf Sauermilchkäse (1999)

Käserei	Anzahl <i>Listeria</i> - positiver oder -negativer Proben					
	Juni	Juli	August	September	Oktober	November
RK	1 <i>L. innocua</i>		1 <i>L. innocua</i>		2 <i>L. innocua</i> 1 negativ	1 <i>L. innocua</i>
LO	1 <i>L. innocua</i>	5 negativ 1 <i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i>	6 negativ 1 <i>L. innocua</i>			1 negativ
DO		1 negativ		1 <i>L. innocua</i> 2 negativ		
LE		1 <i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i>	3 negativ			
BI					11 negativ	
HA	1 negativ	1 negativ 1 <i>L. innocua</i>				
HO				4 negativ		
RÖ						1 <i>L. innocua</i>
HT				1 <i>L. innocua</i>		
DU						1 <i>L. innocua</i>

Tabelle 3.1.1.2: Übersicht über die isolierten *Listeria*- Phagovare aus verschiedenen Sauermilchkäsereien

Käserei	Phagovare					
	Juni	Juli	August	September	Oktober	November
RK	[AB1] <i>L. innocua</i> [A2] <i>L. innocua</i>		[AB1] <i>L. innocua</i> [A2] <i>L. innocua</i> [A3] <i>L. innocua</i>		[A2] <i>L. innocua</i> [A3] <i>L. innocua</i>	[A2] <i>L. innocua</i>
LO	[AB1] <i>L. innocua</i>	[B2] <i>L. monocytogenes</i>	[AB1] <i>L. innocua</i>			
DO				[C1] <i>L. innocua</i>		
LE		[D1] <i>L. monocytogenes</i>				
HA		[F1] <i>L. innocua</i>				
RÖ						[H1] <i>L. innocua</i>

Phagovare sind wie folgt definiert:

[AB1] : Lyse durch Phage: A511

[A2] : keine Lyse

[A3] : Lyse durch Phagen: B056, B035

[B2] : Lyse durch Phagen: A511, A502, A620 (*L. monocytogenes*)

[C1] : Lyse durch Phagen: A511, B055, A020

[D1] : Lyse durch Phagen: A511 (*L. monocytogenes*)

[F1] : Lyse durch Phagen: A511, B054, B055, B101, B110, C707, B024

[H1] : Lyse durch Phagen: A511, B653, B054, B055, B056, B101, B110, B110, C707, B024, B035

3.1.2 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* auf Rotschmierkäse

Von insgesamt 329 untersuchten Käseproben enthielten 21 (6.4%) *Listeria monocytogenes*. 39 Käseproben (11.8 %) enthielten ferner weitere *Listeria* –Arten wie *L. innocua* (35 Proben, 10,6 %) und *L. seeligeri* (4 Proben, 1,2 %). Sechs Käseproben enthielten zwei oder mehr verschiedene *Listeria* -Spezies, davon mindestens ein *Listeria monocytogenes*- Isolat (Tab 3.1.2.1).

Tabelle 3.1.2.1: Vorkommen von *Listeria* spp. in Rotschmierkäse

Land	Anzahl Proben	Anzahl positiver Proben (%)		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>
Frankreich	150	5* (3,3)	21* (14)	-
Deutschland	120	11* (9,2)	11* (9,2)	4* (3,3)
Italien	23	4 (17,4)	2 (8,7)	-
Schweiz	22	-	1 (4,5)	-
Österreich	10	1 (10)	-	-
Dänemark	4	-	-	-
Gesamt	329	21 (6,4)	35 (10,6)	4 (1,2)

* Proben enthielten zwei oder mehr *Listeria* -Spezies, davon ein *L. monocytogenes* -Isolat

In insgesamt 12 Weichkäsen (6,3%), 7 halbfesten Schnittkäsen (7,6%) und 2 Hartkäseproben (4,4%) konnte *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Dabei waren 13 von 163 (8 %) Käseproben aus pasteurisierter Milch und 8 von 166 (4,8%) Käseproben aus Rohmilch betroffen. Signifikante Unterschiede bezüglich der verwendeten Milchart (Kuh, Schaf, Ziege) konnten nicht beobachtet werden (Tab. 3.1.2.2).

Tabelle 3.1.2.2: Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Rotschmierekäse

Land	Anzahl Proben	Käseart			Hitzebehandlung der Milch		Herkunft der Milch		
		Weichkäse	Halbfester Schnittkäse	Schnitt- und Hartkäse	Past. Milch	Rohmilch	Kuh	Schaf	Ziege
Frankreich	150 (5)	124 (5)	25 (-)	1 (-)	59 (1)	91 (4)	128 (5)	10 (-)	12 (-)
Deutschland	120 (11)	52 (6)	42 (4)	26 (1)	73 (10)	47 (1)	106* (9)	5* (-)	12* (2)
Italien	23 (4)	5 (-)	14 (3)	4 (1)	17 (2)	6 (2)	21 (3)	2 (1)	- (-)
Schweiz	22 (-)	4 (-)	6 (-)	12 (-)	8 (-)	14 (-)	21 (-)	- (-)	1 (-)
Österreich	10 (1)	4 (1)	4 (-)	2 (-)	2 (-)	8 (1)	9 (1)	- (-)	1 (-)
Dänemark	4 (-)	3 (-)	1 (-)	- (-)	4 (-)	- (-)	4 (-)	- (-)	- (-)
Gesamt	329 (21)	192 (12)	92 (7)	45 (2)	163 (13)	166 (8)	289* (18)	17* (1)	26* (2)
% <i>L. monocytogenes</i>	6.4	6.3	7.6	4.4	8.0	4.8	6.2	5.9	7.7

() Anzahl *L. monocytogenes* – positiver Käseproben

* Zwei Käseproben wurden aus zwei oder drei Milchsorten hergestellt

Listeria-positive Proben konnten durch eine weitere Untersuchung der Rückstellprobe (Lagerung bei -80°C) bestätigt werden, jedoch war es zum Teil nicht möglich, den gleichen Erreger in Proben nachzuweisen, die einige Wochen später im selben Geschäft gekauft wurden (Tab. 3.1.2.3).

Tabelle 3.1.2.3: *L. monocytogenes*- positive Käseproben:
Bestätigungsproben und ermittelte Keimzahlen

Käseart	Land	Hitze- behandlung	Herkunft der Milch	Bestätigung (nach...Wochen)	Keimzahlen (KbE/ cm ² Käseoberfläche)
hf SK ^a	D	P ^d	Kuh	ja (4, 7, 26)	< 10
WK ^b	F	R ^e	Kuh	n.e. ^f	< 10
WK	D	P	Kuh	nein	< 10
WK	D	P	Kuh	ja (4)	$1,7 \times 10^4$
WK	D	P	Kuh	ja (9,12)	$2,4 \times 10^3$
WK	D	P	Kuh	nein	$> 10^3$
WK	D	P	Kuh	n.e.	< 10
WK	F	R	Kuh	n.e.	< 10
hf SK	I	R	Kuh	nein	< 10
WK	A	R	Kuh	n.e.	< 10
hf SK	D	P	Kuh	nein	2×10^2
WK	D	P	Kuh	ja (9, 12)	$> 3 \times 10^3$
WK	D	P	Ziege	ja (3)	< 10
SHK ^c	D	P	Ziege	ja (8)	< 10
hf SK	I	P	Kuh	nein	< 10
hf SK	D	R	Kuh	nein	< 10
WK	F	P	Kuh	n.e.	?, $> 10^5$
WK	F	R	Kuh	n.e.	5×10^1
WK	F	R	Kuh	n.e.	< 10/
hf SK	I	R	Schaf	ja (2)	8×10^2
hf SK	I	R	Kuh	nein	< 10

^a hf SK: halbfester Schnittkäse

^b WK: Weichkäse

^c SHK: Schnitt- und Hartkäse

^d P: past. Milch

^e R: Rohmilch

^f n.e.: nicht erhältlich

In sieben Käseproben konnte mit Hilfe der Phagentypisierung der selbe *L. monocytogenes*-Stamm über einen Zeitraum von maximal 26 Wochen immer wieder im Produkt nachgewiesen werden. In einigen Fällen standen die Käseproben für weitere Untersuchungen nicht zur Verfügung. Die Ergebnisse sind im Detail Tabelle 3.1.2.4 zu entnehmen.

Tabelle 3.1.2.4: Phagentypisierung von Käseproben, die wiederholt *L. monocytogenes*-positiv waren

Käseart/ Herkunft/ Wärmebehandlung	Woche/ Phagentyp *			
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
halbfester SK/ Deutschland/ p	0/ A	4/ A	7/ A	26/ A
Weichkäse/ Deutschland/ p	0/ B	4/ B		
Weichkäse/ Deutschland/ p	0/ B	9/ B	12/ B	
Weichkäse/ Deutschland/ p	0/ B	9/ B	12/ B	
Weichkäse/ Deutschland/ p	0/ C	3/ C		
Hartkäse/ Deutschland/ p	0/ C	8/ C		
halbfester SK/ Italien/ r	0/ D	2/ D		

p: pasteurisierte Milch

r : Rohmilch

* :Phagentyp [A] : lysiert durch Phage A511

[B] : lysiert durch Phagen A511, A118

[C] : lysiert durch Phagen A118, A502, A620

[D] : lysiert durch Phagen A511, A500, A640, B653

Die Bestimmung der *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche erfolgte bei insgesamt 74 positiven Erst- und Rückstellproben entweder durch eine direkte Keimzahlbestimmung oder durch ein modifiziertes MPN-Verfahren. Die ermittelten Keimzahlen betragen zwischen <10 KbE/cm² und $>10^5$ KbE/cm² (Abb. 3.1.2.1). Davon konnten in fünf Käseproben über 10^3 KbE/cm², in einer Käseprobe mehr als 10^5 KbE/cm² *L. monocytogenes* ermittelt werden. In vier von fünf dieser Käseproben wurden nach Angaben der Hersteller pasteurisierte Milch für die Herstellung verwendet. Insbesondere in einer deutschen Weichkäsesorte konnten unterschiedlich hohe Keimzahlen (zwischen 120 und $>10^5$ KbE/cm²) in den verschiedenen Proben (Erst- und 2 Rückstellproben) in Abhängigkeit vom Mindesthaltbarkeitsdatum nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

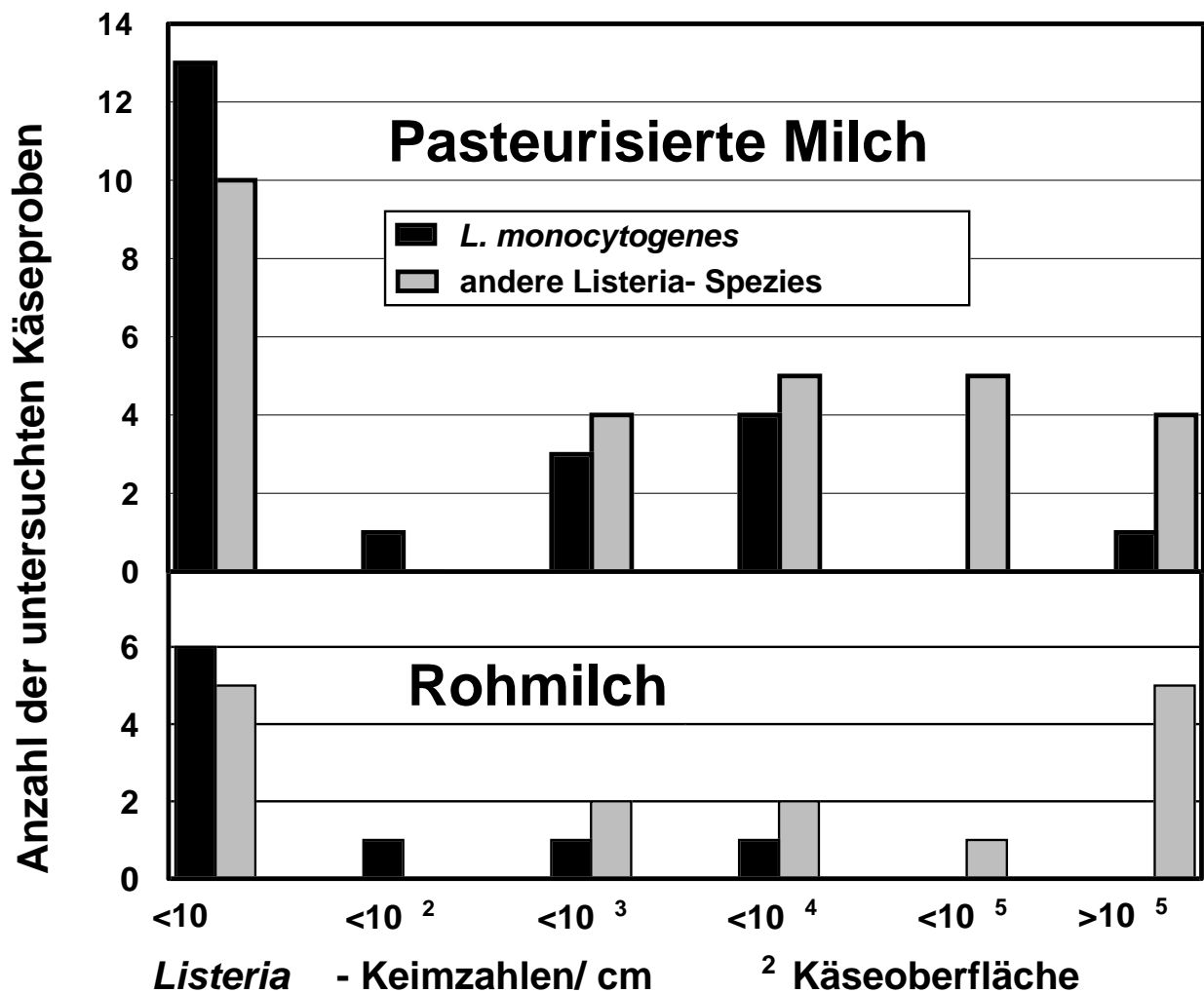


Abbildung 3.1.2.5: Ermittelte *Listeria*- Keimzahlen in 74 untersuchten Käseproben (Erst- und Bestätigungsproben). Die schwarzen Balken stellen die Anzahl der Käseproben dar, in denen *Listeria monocytogenes* und in einigen Fällen auch andere *Listeria*-Spezies nachgewiesen wurden, während in den Proben mit den grauen Balken nur apathogene *Listeria*-Spezies in den Käseproben nachgewiesen werden konnten.

3.2 Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch einen *Pediocin*-bildenden *Lactobacillus plantarum*-Stamm ALC 01

3.2.1 Antilisterielle Aktivität von *Lb. plantarum* ALC 01

In den durchgeführten Versuchen produzierte *Lb. plantarum* ALC 01 klare Hemmhöfe gegenüber allen 12 getesteten *Listeria*-Indikatorstämmen, während der für diese Versuche verwendete Kontrollstamm ATCC 14917 (WS 1033) keine Hemmwirkung zeigte. Die höchste antilisterielle Aktivität konnte dabei erzielt werden, wenn ALC 01 in dem Anzuchtmedium VisStart® TW ALC 01 über einen Zeitraum von 14 Stunden angezüchtet und der Stamm *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 als Indikatorstamm verwendet wurde (siehe Tab. 3.2.1.1).

Tabelle 3.2.1.1: Hemmwirkung (berechnet in AU/ ml) von *Lb. plantarum* ALC 01 gegenüber *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 und WSLC 1685 (Scott A) in Abhängigkeit von Kulturmedium und Inkubationsdauer.

Kulturmedium Inkubationsdauer	WSLC 1364 10 h	WSLC 1364 14 h	WSLC 1685 10 h	WSLC 1685 14 h
VisStart® TW ALC 01	12800	51200	6400	12800
MRS	12800	25600	3200	6400
MRS +	12800	25600	6400	12800
APT	400	3200	200	1600
APT+	12800	25600	3200	12800

+ gibt den Zusatz von 10 g/l Magermilchpulver zum Medium an

Die von ALC 01 verursachten Hemmhöfe enthielten offensichtlich resistente *Listeria*-Zellen, welche mit einer Stichöse leicht isoliert und durch Ausstrich auf PALCAM-Agar gereinigt werden konnten. Zum einen aufgrund der gezeigten starken Hemmeffekte, zum anderen wegen der hohen Anzahl an offensichtlich hervorgerufenen resistenten Zellen und nicht zuletzt wegen seiner Herkunft aus einem durch Rotschmierekäse verursachten Listeriose-Ausbruch (BILLE, 1990), wurde der Stamm *L. monocytogenes* WSLC 1364 für weitere Reifungsversuche ausgewählt (Tab. 3.2.1.2). Weiterhin wurde der wie oben beschrieben, offensichtlich gegen *Pediocin* Ach resistente, isolierte Stamm *Listeria monocytogenes* WSLC 1364^R für weitere Reifungsversuche verwendet. Für alle weiteren Versuche in dieser Arbeit wurden beide *Lb. plantarum*-Stämme für exakt 14 h bei 37°C in 200 ml VisStart®TW ALC 01-Medium angezüchtet um einen End-pH-Wert von 3.9 und ein Maximum der *Pediocin*aktivität zu erhalten.

Tabelle 3.2.1.1: Hemmwirkung und Resistenz verschiedener *Listeria monocytogenes*-Indikatorstämme gegenüber Pediocin AcH

<i>Listeria monocytogenes</i> -Stamm	Serovar	Herkunft des Stammes/ Bezeichnung	Hemmhof (Durchmesser in mm)	Häufigkeit resistenter Zellen
WSLC 1364	4b	Rotschmierkäse Vacherin Mont d'Or	13	+++
WSLC 1685	4b	Scott A	13	+++
WSLC 10179	4b	Käse	10	++++
WSLC 10180	1/2c	Käse	12	++++
WSLC 10181	1/2b	Käse	12	+++
WSLC 10182	1/2a	Käse	13	+++
WSLC 10183	1/2c	Geflügel	10	+
WSLC 10184	1/2a	Milch	10	+
WSLC 10185	1/2a	Rotschmierkäse	12	+
WSLC 10186	4b	Rotschmierkäse	11	++
WSLC 10187	1/2b	Rotschmierkäse	11	+++
WSLC 10188	1/2a	Käse	11	+++

3.2.2 Entwicklung des pH-Wertes und der Keimzahlen bei der Reifung mit *Lb. plantarum* ALC 01

Um davon ausgehen zu können, daß der Verlauf der Reifung unter Laborbedingungen dem der industriellen Produktion entspricht und damit typisch für Rotschmierkäse ist, wurden im Verlauf der gesamten Versuche die Parameter pH-Wert, aerobe Gesamtkeimzahl und auch die Hefenkeimzahlen regelmäßig bestimmt. Die Entwicklung des pH-Wertes auf Weich- und halbfestem Schnittkäse ist in Abb. 3.2.2.1 dargestellt und kann als typisch für die Reifung von Rotschmierkäse angesehen werden (EPPERT et al., 1997). Die aeroben Gesamtkeimzahlen auf der Käseoberfläche vor dem Schmieren lagen bei ca. 2.0×10^6 KbE/cm². Am Ende der Reifung wiesen die Weichkäse eine aerobe Gesamtkeimzahl von 2×10^8 KbE/cm², die halbfesten Schnittkäse jedoch höhere Keimzahlen von 10^9 KbE/cm² auf.

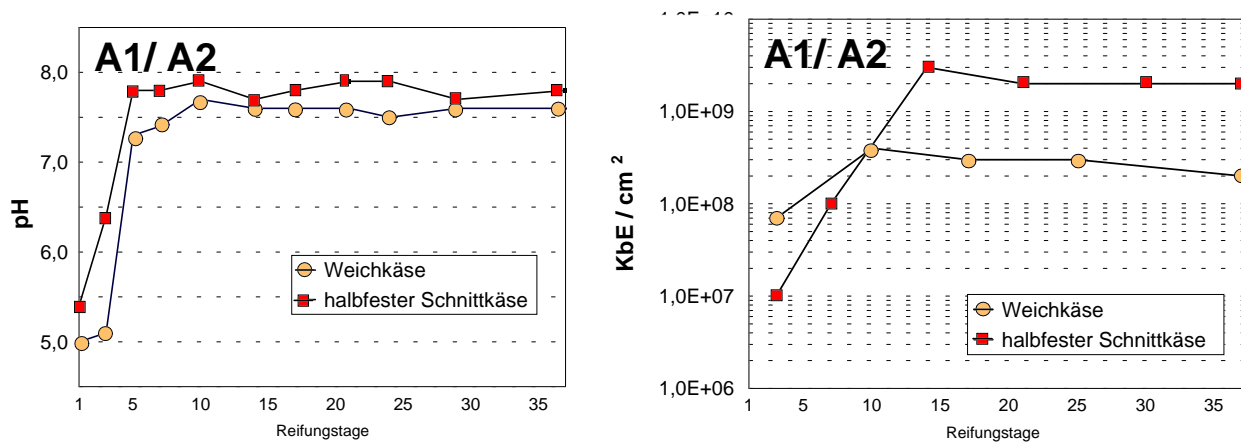


Abbildung 3.2.2.1: Käsereifung mit *Lb. plantarum* ALC 01; Versuche A1 und A2. Entwicklung des pH-Wertes und der Gesamtkeimzahlen auf der Käseoberfläche.

3.2.3 Stabilität von resistenten Mutanten

Die Stabilität der Resistenz der isolierten *Listeria*-Stämme gegenüber Pediocin AcH wurde durch mehrere Transfers der Kolonien in Pediocin-freie BHI-Bouillon überprüft. Dabei konnte beobachtet werden, daß nach fünf Transfers (entsprechend etwa 100 Generationen, bei einer angenommenen Generationszeit von 1 h) noch 13 von 20 überprüften Stämmen eine Resistenz gegenüber Pediocin AcH aufwiesen. Die Resistenz zeigte sich weiterhin in 7 von 20 Stämmen nach 10 Transfers in Pediocin-freiem Medium (ca. 200 Generationen) stabil.

3.2.4 Nachweis von *Lb. plantarum* ALC 01

Die *Lactobacillus*-Keimzahlen auf MRS-Agar erreichten unabhängig vom Untersuchungstag Werte von $1,0 - 8,0 \times 10^7$ KbE/cm², durchschnittlich 4×10^7 KbE/cm². Nur in einigen Fällen waren neben *Lb. plantarum* ALC 01 Fremdkeime auf den MRS-Platten zu finden, wobei diese gut von ALC 01 zu unterscheiden waren. Dagegen war auf den AC-Agar-Platten die Unterscheidung zwischen der Spezies *Lactobacillus* und den vorhandenen Fremdkeimen deutlich schwieriger. Die Keimzahlen auf diesem Agar lagen durchschnittlich im gleichen Bereich, wie auf MRS-Agar (Daten nicht gezeigt). Nach jeder Keimzahlbestimmung wurde mit Hilfe des „spot-on-the-lawn-assay“ das Vorhandensein von *Lb. plantarum* ALC 01 in allen Versuchen bestätigt.

3.2.5 Hemmung von *Listeria monocytogenes*

Im ersten Reifungsversuch konnte bei der Verwendung von Weichkäsen, der entsprechenden undefinierten Reifungsflora und der zusätzlichen Applikation des Pediocin AcH- bildenden Stammes *Lb. plantarum* ALC 01 im Gegensatz zu den Kontrollkäsen (Zusatz von ATCC 14917) eine hemmende Wirkung gegenüber *L. monocytogenes* WSLC 1364 beobachtet werden, deren Ausmaß von der Höhe der Anfangskontamination abhängig war (Versuch A1, Abb. 3.2.5.1): bei einer Anfangskontamination von 4×10^3 KbE/ml Schmierlake konnte lediglich eine leichte Hemmung von *Listeria* beobachtet werden. Die Keimzahlen auf diesen Käsen erreichten Werte bis zu 2×10^4 KbE/cm², während auf den entsprechenden Kontrollkäsen Keimzahlen bis zu 2×10^6 KbE/cm² erreicht wurden. Deutlichere Hemmeffekte waren dagegen bei einer niedrig gewählten Anfangskontamination von 2×10^2 KbE/ml Schmierlake zu beobachten: bis einschließlich Tag 14 war der Nachweis mittels selektiver Anreicherung nicht möglich. Zwischen Tag 25 und 35 stiegen die Keimzahlen auf der Käseoberfläche der mit ALC 01 behandelten Käse auf Werte bis zu 3×10^3 KbE/cm² an, während auf den mit dem Bakteriocin-negativen Kontrollstamm ATCC 14917 behandelten Käsen Keimzahlen bis zu $6,0 \times 10^5$ KbE/cm² erreicht wurden.

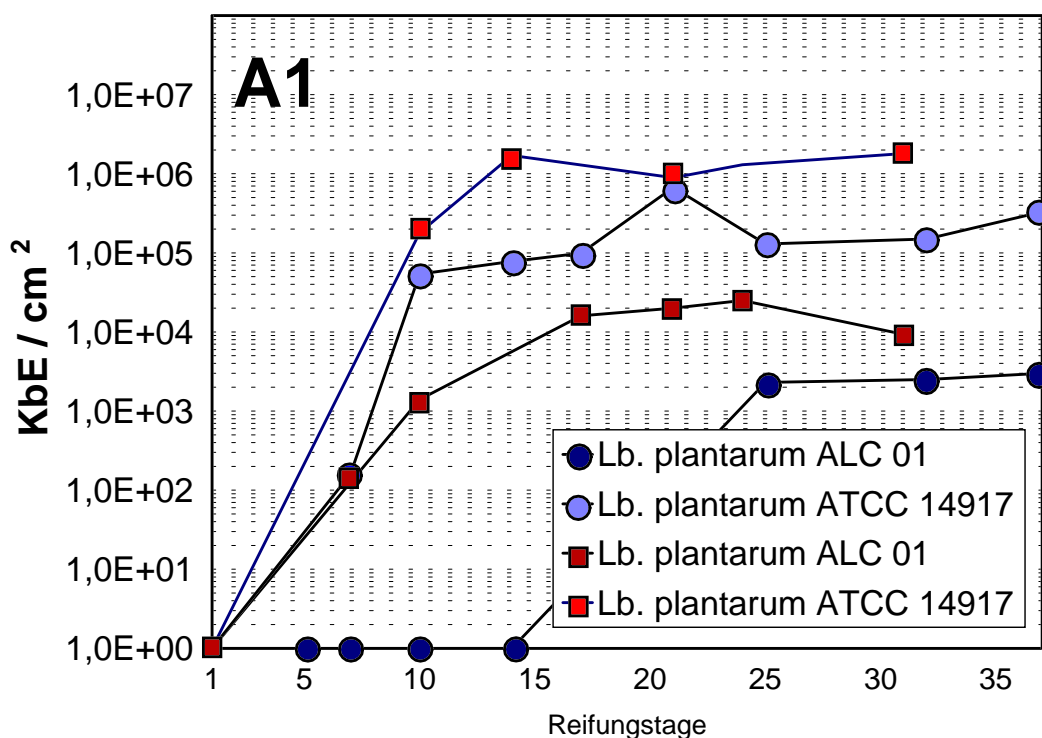


Abbildung 3.2.5.1: Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch *Lb. plantarum* ALC 01 auf Weichkäse. *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche bei Anfangskontaminationen von 2×10^2 KbE/ml (●, ●), bzw. 4×10^3 KbE/ml Schmierlake (■, ■). Kontrollkäse mit dem Zusatz des Pediocin AcH-negativen Kontrollstammes *Lb. plantarum* ATCC 14917.

Bei der Durchführung der entsprechenden Reifungsversuche mit halbfestem Schnittkäse und der Verwendung einer definierten Mehrstammkultur zur Käsereifung (Versuch A2), konnten bei der Anwendung von ALC 01 bei einer Anfangskontamination von 2×10^2 KbE/ml Schmierlake bis Tag 23 keine *Listerien* auf der Käseoberfläche nachgewiesen werden. Die *Listeria*-Keimzahlen am Ende des Untersuchungszeitraumes (Tag 37) erreichten jedoch Werte von bis zu 1×10^4 KbE/cm², während auf den in diesem Versuch verwendeten Kontrollkäsen mit dem Zusatz von ATCC 14917 deutlich höhere Keimzahlen bis zu 3.0×10^7 KbE/cm² ermittelt werden konnten (siehe Abb. 3.2.5.2).

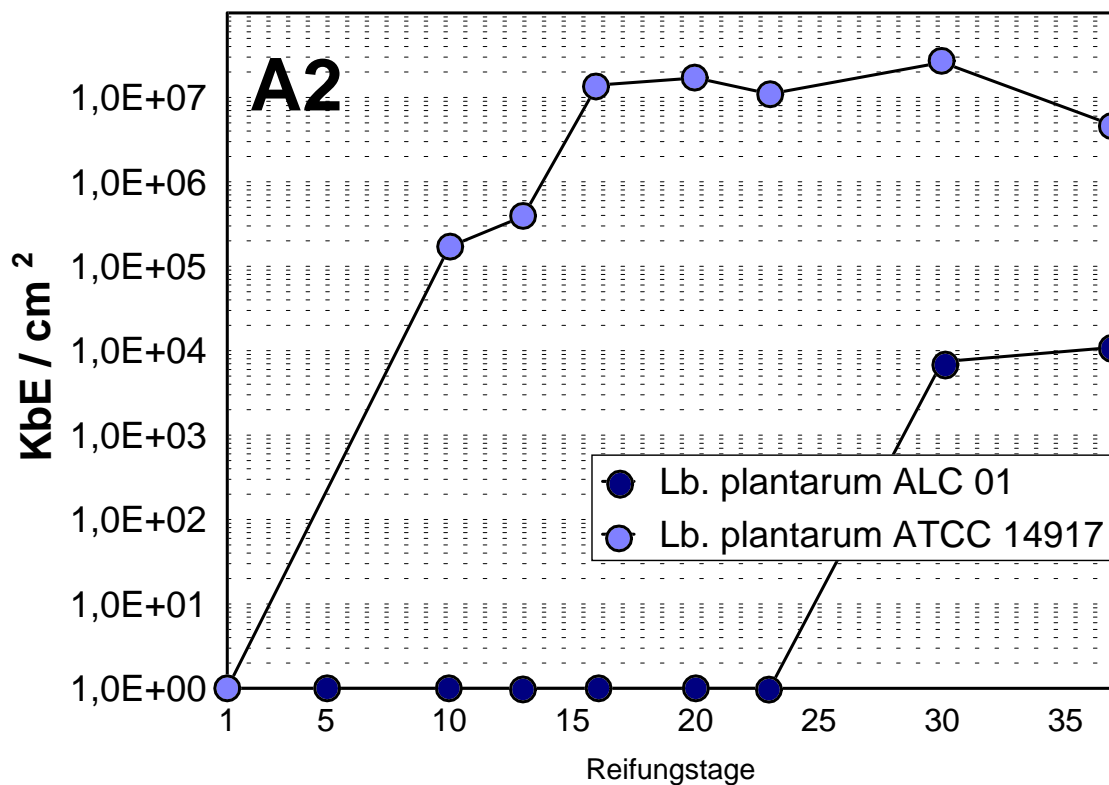


Abbildung 3.2.5.2: Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch *Lb. plantarum* ALC 01 auf halbfestem Schnittkäse. *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche bei einer Anfangskontamination von 2×10^2 KbE/ml Schmierlake, Kontrollkäse mit dem Zusatz des Pediocin AcH-negativen Kontrollstammes *Lb. plantarum* ATCC 14917.

In einem weiteren Reifungsversuch (A3) wurden zusammen mit der definierten Reifungskultur entweder der sterilfiltrierte Überstand der 14 h- Vorkultur oder das in frischem, Pediocin-freien Medium resuspendierte Pellet der Kultur auf die Käseoberfläche aufgebracht. Bei einer Anfangskontamination von 7×10^2 KbE/ml Schmierlake konnten auf der Käseoberfläche der Käse, die mit dem resuspendierten

Pellet behandelt wurden, Keimzahlen bis zu 5×10^5 KbE/cm² ermittelt werden; der qualitative Nachweis in dieser Versuchsreihe durch selektive Anreicherung war außerdem schon an den Tagen 7 und 24 möglich. Hingegen waren auf der Käseoberfläche der Käse, die mit dem Kulturüberstand behandelt wurden, bei gleicher Anfangskontamination der Nachweis selbst durch selektive Anreicherung über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht möglich (Abb. 3.2.5.3).

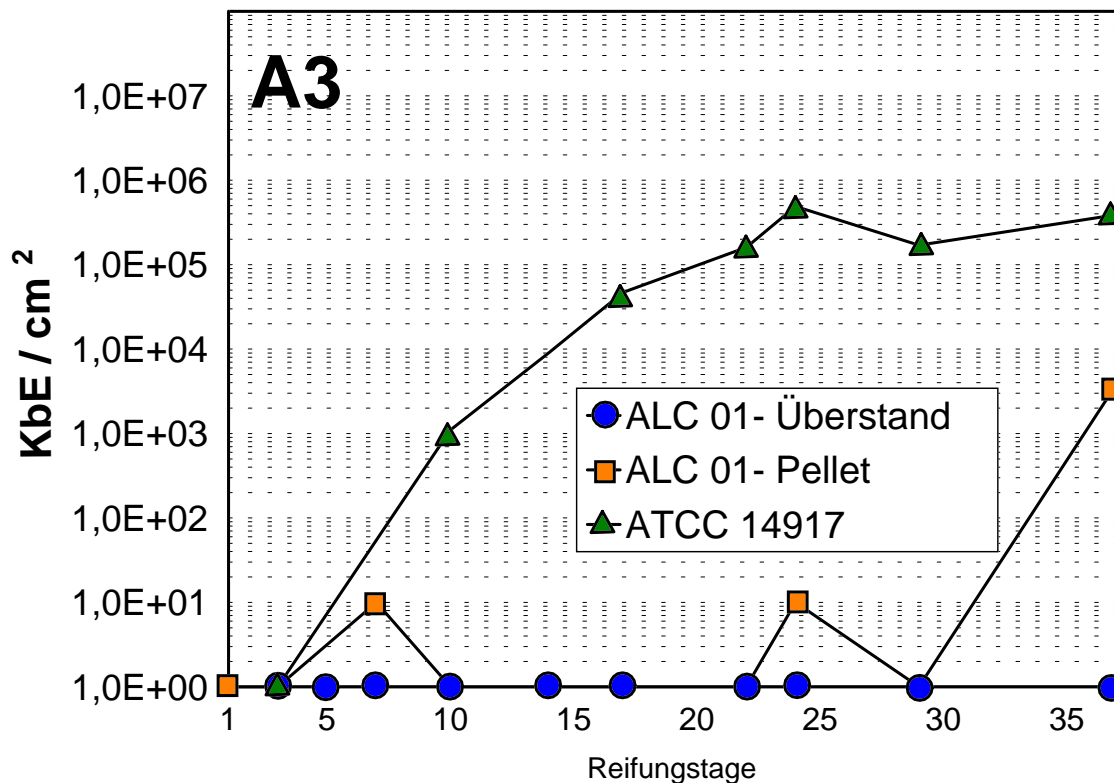


Abbildung 3.2.5.3: Hemmung von *Listeria monocytogenes* auf Weichkäse durch *Lb. plantarum* ALC 01 bei einer Anfangskontamination von 7×10^2 KbE/ml Schmierlake und der Anwendung des Überstandes (●) oder des resuspendierten Pellets (■) der 14h- Vorkultur. Kontrollkäse wurden mit einer Vorkultur des Stammes ATCC 14917 behandelt.

In Versuch A4 wurde zur Reifung der Weichkäse zusätzlich zur Reifungskultur die für ALC 01 verwendeten Anzuchtmedien VisStart®TW ALC 01 und APT, bzw. kein Anzuchtmedium zur Schmierlake zugesetzt. Der *Listeria*-Nachweis führte bereits an den Tagen 1, 5 und 7 in allen drei Versuchsansätzen zu einem positiven Ergebnis; an Tag 14 wurden Werte von ca. 5×10^4 KbE/cm² erreicht. Danach stiegen die *Listeria*-Keimzahlen auf den Käsen, die mit einem Zusatzmedium behandelt wurden, stärker an, als auf den Käsen ohne Zusatz und erreichten max. Keimzahlen bis 5×10^6 KbE/cm² (Abb. 3.2.5.4).

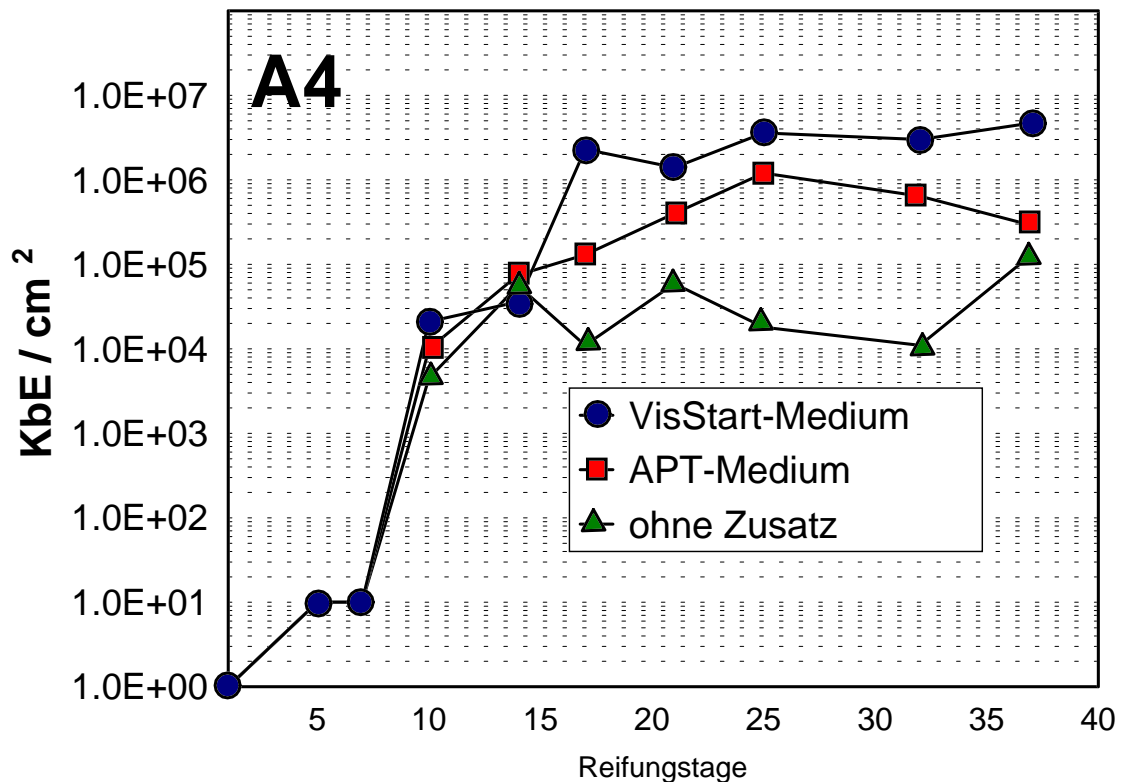


Abbildung 3.2.5.4: Einfluß der Applikation von verschiedenen Anzuchtmedien bei der Reifung von Rotschmierweichkäsen auf die Keimzahlentwicklung von *Listeria monocytogenes* auf der Käseoberfläche.

Für die Ermittlung des Verhaltens von resistenten Mutanten von *Listeria monocytogenes* auf der Käseoberfläche bei der Verwendung einer Schutzkultur, wurde die Pediocin-resistente Mutante WSLC 1364^R für weitere Reifungsversuche verwendet. Die Ergebnisse zeigen, daß die Keimzahlen von *L. monocytogenes* WSLC 1364^R auf der Käseoberfläche bei einer gewählten Anfangskontamination von 10² und 10³ KbE/ml Schmierlake rasch ansteigen (5 x 10⁶ KbE/cm² bzw. 1 x 10⁷ KbE/cm²), während das Wachstum von *L. monocytogenes* WSLC 1364^R komplett unterdrückt werden konnte (Abb. 3.2.5.5).

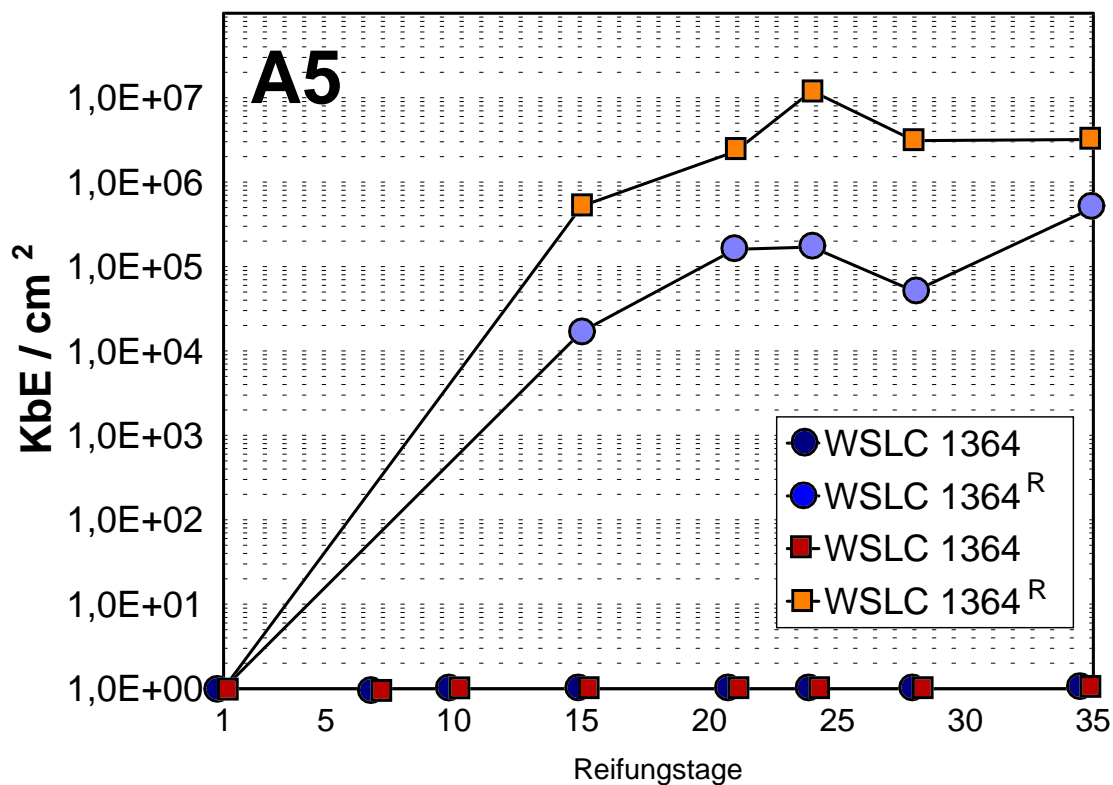


Abbildung 3.2.5.5: Hemmung von *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 und der resistenten Mutante WSLC 1364^R durch *Lb. plantarum* ALC 01 auf Weichkäse. *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche bei Anfangskontaminationen von 10^2 KbE/ml (●, ●), bzw. 10^3 KbE/ml Schmierlake (■, ■) und der Verwendung einer komplexen Reifungsflora.

Um die Entwicklung der resistenten und nicht-resistenten Stämme auf der Käseoberfläche unter den Bedingungen des traditionell in den Käsereien angewendeten „Alt-Jung-Schmierens“ zu bestimmen, wurde ein weiterer Reifungsversuch mit Weichkäse und einer komplexen Reifungsflora durchgeführt. In diesem Versuch wurde lediglich Charge 1 mit *L. monocytogenes* WSLC 1364 bzw. WSLC 1364^R (5×10^2 KbE/ml Schmierlake an Tag 1) kontaminiert. Mit der Schmierflora wurden in diesem Versuch auch die Listerien auf die beiden weiteren Reifungschargen übertragen. Hierbei konnten in Charge II und III beim Vergleich mit der Charge I wie in Abb. 3.2.5.6 gezeigt, leicht höhere Keimzahlen von *L. monocytogenes* WSLC 1364^R während des gesamten Reifungsverlaufs beobachtet werden. Allen drei Chargen gleich war ein starker Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen an Tag 7. Wiederum wurde in diesem Versuch das Wachstum des Stammes WSLC 1364 durch die Verwendung von *Lb. plantarum* ALC 01 wie auch im zuvorigen Experiment komplett unterdrückt.

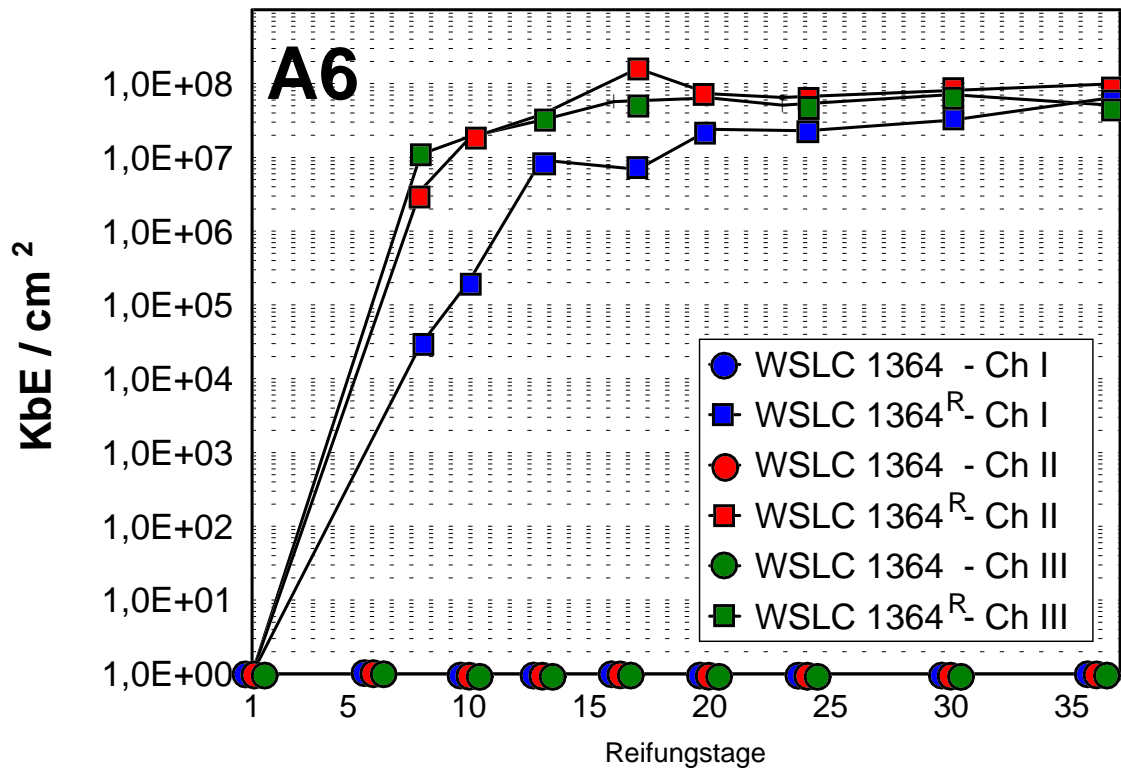


Abbildung 3.2.5.6: Hemmung von *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 und der resistenten Mutante WSLC 1364^R durch *Lb. plantarum* ALC 01 beim „Alt-Jung-Schmier“ von Weichkäse. *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche bei einer Anfangskontaminationen von 5×10^2 KbE/ml Schmierlake der Charge 1.

3.3 Reifung von Rotschmierkäse durch Kombination verschiedener bakteriocinbildender Bakterienstämme

In den in diesem Kapitel beschriebenen Reifungsversuchen sollte überprüft werden, ob durch die Kombination verschiedener bakteriocinbildender Stämme mit verschiedenen Bakteriocinen bei der Reifung von Rotschmierkäsen eine erhöhte antilisterielle Wirkung auf der Käseoberfläche erzielt werden kann.

3.3.1 Kombinationen von *Brevibacterium linens* M18 und *Staphylococcus equorum* WS 2733 (Versuch B1)

Die antilisterielle Wirkung dieser beiden Stämme bei der Reifung von Rotschmierkäsen konnte bereits von EPPERT et al., 1997 und CARNIO et al., 2000 bewiesen werden. Da *S. equorum* WS 2733 gegenüber nahezu allen gram-positiven Bakterien, darunter auch *B. linens*, eine hemmende Wirkung aufweist (CARNIO et al., 2000), wurden die beiden Stämme in den Versuchen in variierenden Verhältnissen (1:10, 1:50) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Schmierens (*B. linens* Tag 1, 3, 5, 7; *S. equorum* Tag 10) auf die Käseoberfläche aufgebracht. In den ersten beiden Ansätzen (Verhältnis 1:10, bzw. 1:50) dominierte nach spätestens 15 Tagen allerdings der Stamm *S. equorum* WS 2733 auf der Käseoberfläche; der Stamm *B. linens* M18 konnte sich in keinem Fall durchsetzen und war schon nach 10 Tagen, wie aus Abbildung 3.3.1.1 ersichtlich, auf der Käseoberfläche nicht mehr nachweisbar.

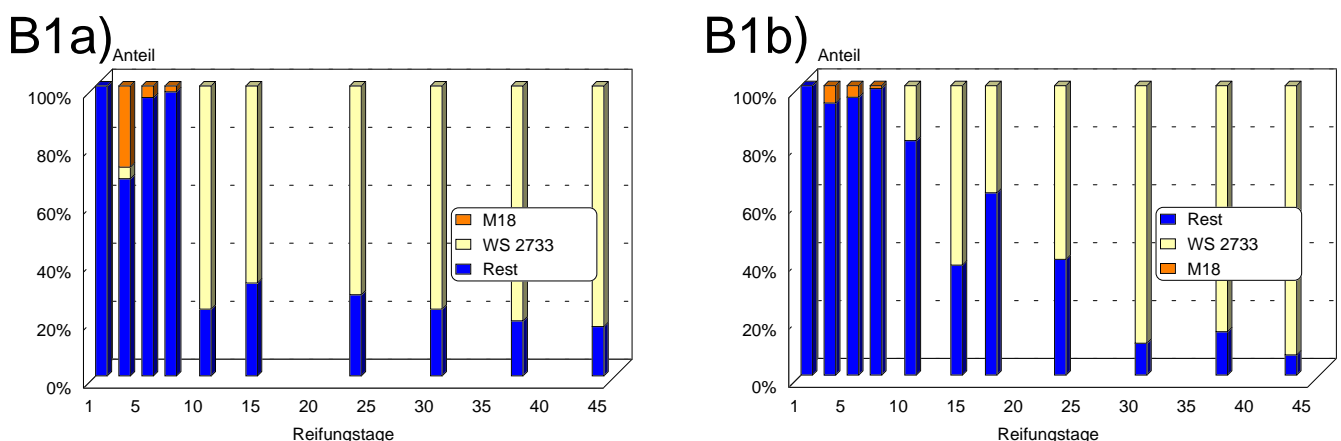


Abb. 3.3.1.1: Versuch B1: Florazusammensetzung bei der Reifung von Rotschmierweichkäsen mit den Stämmen *S. equorum* WS 2733 und *B. linens* M18. **a)** Zugabe zur Schmierlake im Verhältnis 1:10, bzw. **b)** 1:50.

Bei der Verwendung des Stammes *B. linens* M 18 in der Schmierlake an den Tagen 1, 3, 5 und 7 und der einmaligen Zugabe von *S. equorum* an Tag 10 konnte genau der gegenteilige Fall beobachtet werden: von Tag 15 – 35 dominierte *B. linens* stark und *S. equorum* konnte z.T. gar nicht oder nur in geringen Anteilen auf der Käseoberfläche nachgewiesen werden.

B1c)

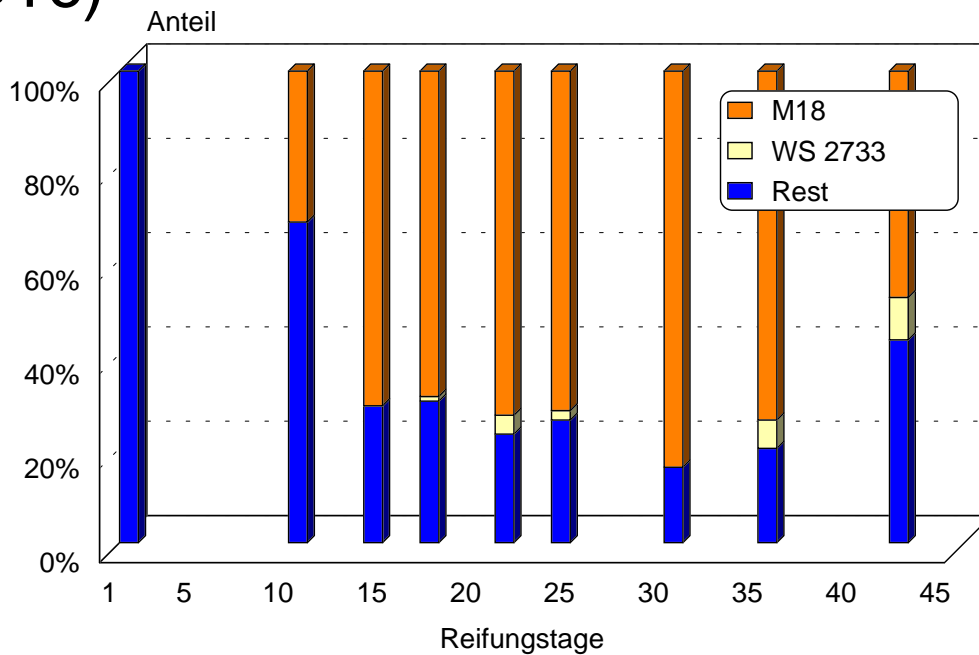


Abb. 3.3.1.2: Versuch B1: Florazusammensetzung bei der Reifung von Rotschmierweichkäsen mit den Stämmen *B. linens* M18 (Applikation an den Tagen 1, 3, 5 und 7) und *S. equorum* WS 2733 (Applikation Tag 10).

Die *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche erreichten in allen drei Ansätzen bei einer Anfangskontamination von 10^4 KbE/ml Schmierlake an Tag 1 Werte von bis zu 10^6 KbE/cm². Ähnliche Werte wurden bei der alleinigen Verwendung von *S. equorum* WS 2733, bzw. *B. linens* M18, die in diesen Versuchen als Kontrollen eingesetzt wurden, ebenfalls erreicht (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Kombination von *Brevibacterium linens* M18, *Microbacterium lacticum* WS 1899 und verschiedenen *Arthrobacter*-Stämmen (Versuch B2)

Folgende Stammkombinationen kamen zum Einsatz:

- a) *B. linens* M18 (Kontrolle)
- b) *B. linens* M18, *Arthrobacter ilicis* WS 2789, WS 2790, WS 2791
- c) *B. linens* M18, *Arthrobacter ilicis* WS 2797, WS 2798, WS 2799
- d) *B. linens* M18, *M. lacticum* WS1899

Auf eine graphische Darstellung der Entwicklung der Reifungsflora der einzelnen Ansätze wurde verzichtet. Bei der Kombination b) (*B. linens* M18, *Arthrobacter ilicis* WS 2789, WS 2790, WS 2791) konnte ab Tag 10 eine zunehmend starke Proteolyse (schmierige, feuchte Oberfläche, rosa Verfärbung, muffiger Geruch) beobachtet werden, die einen Abbruch des Versuches an Tag 24 erforderlich machte, da eine Keimzahlbestimmung aufgrund der Konsistenz der Käse nicht mehr möglich war. Mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie konnten die beiden Stämme *A. ilicis* WS 2789 und WS 2791 als dominant auf der Käseoberfläche ausfindig gemacht werden. Auch bei der Kombination c) (*B. linens* M18, *Arthrobacter ilicis* WS 2797, WS 2798, WS 2799) konnten proteolytische Effekte beobachtet werden, die jedoch weniger stark ausgeprägt waren als bei Kombination b). Die mit *B. linens* M18 und *M. lacticum* WS1899 gereiften Käse (Kombination d)) wiesen deutliche Farbfehler auf: die Käseoberfläche blieb während der gesamten Reifungszeit blaßgelb. Auch konnte *M. lacticum* WS1899 erst ab dem 35. Tag der Reifung und auch nur in geringen Keimzahlen nachgewiesen werden.

Bei einer Anfangskontamination von 4×10^2 KbE/ml Schmierlake lagen die ermittelten *Listeria*-Keimzahlen in allen Ansätzen zwischen Tag 15 und 42 bei Werten zwischen 4×10^4 und 5×10^6 KbE/cm² Käseoberfläche und waren somit vergleichbar oder höher als die Keimzahlen auf denen mit *B. linens* M18 gereiften Käsen (Abb. 3.3.2.1).

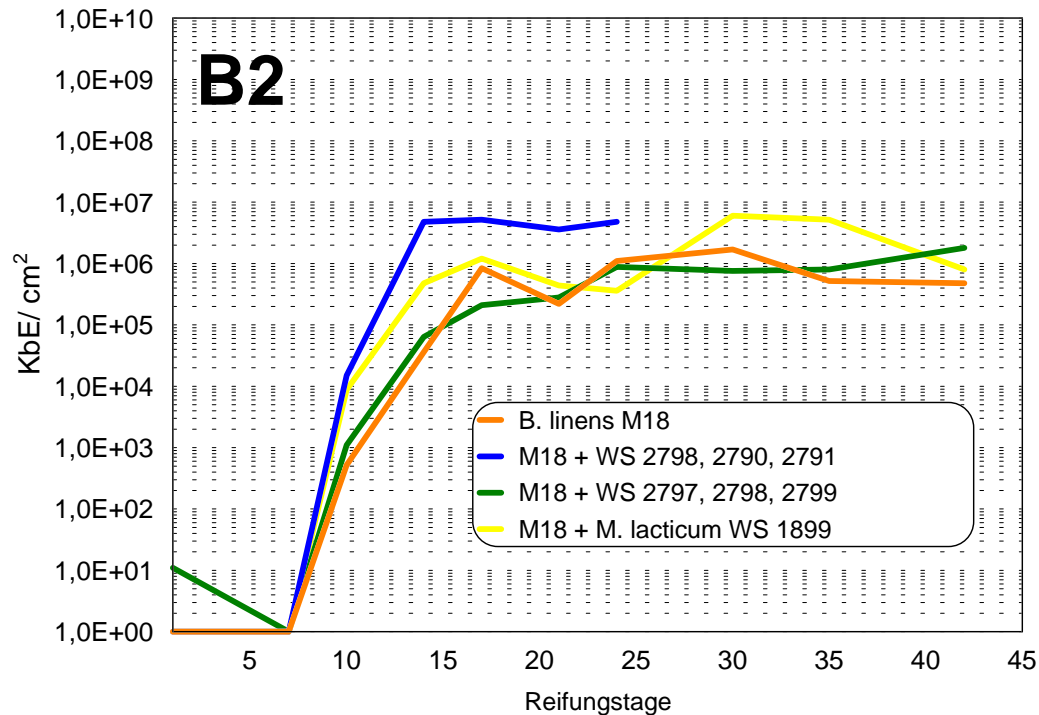


Abb. 3.3.2.1: Versuch B2: *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit *Brevibacterium linens* M18, *Microbacterium lacticum* WS 1899 und verschiedenen *Arthrobacter*-Stämmen

3.3.3 Kombination verschiedener coryneformer Stämme von einem Raclette-Käse (Versuch B3)

Ebenso wie der Stamm *Staphylococcus equorum* WS 2733 konnten sieben coryneforme Bakterienstämme (F.01, F.02, F.03, F.04, F.05, F.07 und F.08) von CARNIO et al. (1999) von der Oberfläche eines französischen Raclette-Käses isoliert werden. Mit Hilfe des „macrocolony-assay“ konnte bei diesen Stämmen keine antilisterielle Aktivität nachgewiesen werden. Die Stämme wiesen eine unterschiedliche Pigmentierung auf und konnten mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie und der vergleichenden 16S rDNA-Sequenzanalyse (OBERREUTER, 2000) wie folgt identifiziert werden.

- F.01 *Brevibacterium linens*
- F.02 *Brevibacterium linens*
- F.03 *Brevibacterium linens*
- F.04 *Brachybacterium alimentarium*
- F.05 *Brevibacterium linens* oder *casei*
- F.07 *Corynebacterium ammoniagenes*
- F.08 *Brachybacterium tyrofermetans*

Eine Kombination der sieben Stämme wurde als Schmierflora mit und ohne Zusatz des Stammes *S. equorum* WS 2733 eingesetzt (Keimzahl: je ca. 10^7 KbE/ml

Schmierlake, gesamt ca. 10^8 KbE/ml Schmierlake). Bei einer vergleichsweise niedrigen Ausgangskontamination von 5×10^2 KbE/ml Schmierlake konnte nur ein langsamer Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen beobachtet werden. In Kombination mit *S. equorum* WS 2733 lag die höchste ermittelte Keimzahl bei 10^3 KbE/cm² (Abb. 3.3.3.1). Die Käse wiesen allerdings nicht das typische Aussehen von Rotschmierekäsen auf. Die Rinde war zwar glatt und trocken, die Farbe jedoch blaßgelb und für Rotschmierekäse viel zu hell, während es bei der Verwendung der sieben Isolate ohne den *S. equorum*-Stamm zur Ausbildung einer typisch orangen Farbe kam.

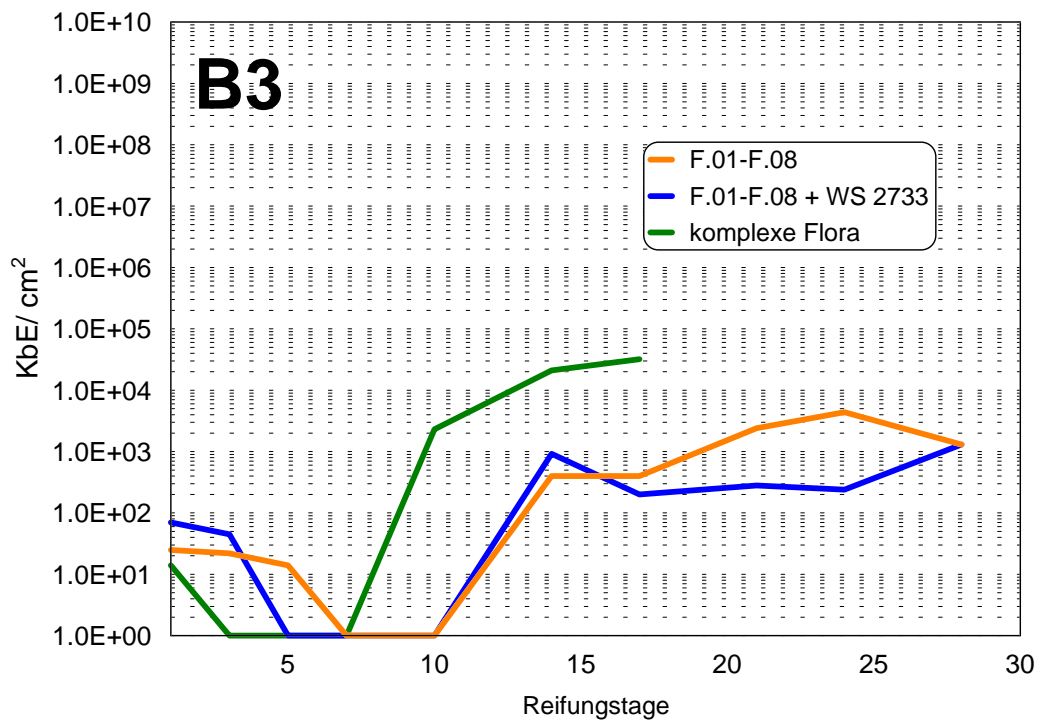


Abb. 3.3.3.1: Versuch B3: *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit 7 Isolaten von einem Raclette-Käse und *S. equorum* WS 2733. Die komplexe Reifungsflora diente in diesem Versuch als Kontrolle.

3.4 Hemmung von *Listeria monocytogenes* auf Rotschmierkäse durch undefinierte komplexe Oberflächenkulturen

Die antagonistische Wirkung gegenüber *Listeria* verschiedener komplexer Reifungsfloren wurde in mehreren Reifungsversuchen ermittelt. Die gezeigten Ergebnisse stellen somit Mittelwerte aus zwei bis drei identisch, aber unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dar.

3.4.1 Allgemeine Reifungsparameter

Die Reifung von unreifen Weichkäsen vom Typ Weinkäse mit unterschiedlichen komplexen undefinierten Reifungsfloren führte in allen durchgeführten Versuchen zu vergleichbaren Entwicklungen des pH- Wertes und ebenfalls ähnlichen Hefen- und aeroben Gesamtkeimzahlen auf der Käseoberfläche. Der pH-Wert der grünen Käse belief sich grundsätzlich auf 5,0. Am 3. Tag lag der gemessene Wert z.T. geringfügig höher als am ersten Tag. Im Verlauf der Reifung kam es zu einem für Rotschmierkäse typischen Anstieg auf Werte bis zu 7,9. Dabei war der steilste Anstieg bei allen 8 verschiedenen Floren zwischen Tag 3 und 7 zu beobachten (Abb. 3.4.1.1). Gegen Ende der Reifung (Tag 35 bis 42) konnte auf allen Käsen pH-Werte zwischen 7,4 und 7,9 ermittelt werden. Dabei waren die fünf auf der Oberfläche gewählten Meßpunkte zum Teil erheblichen Schwankungen unterworfen.

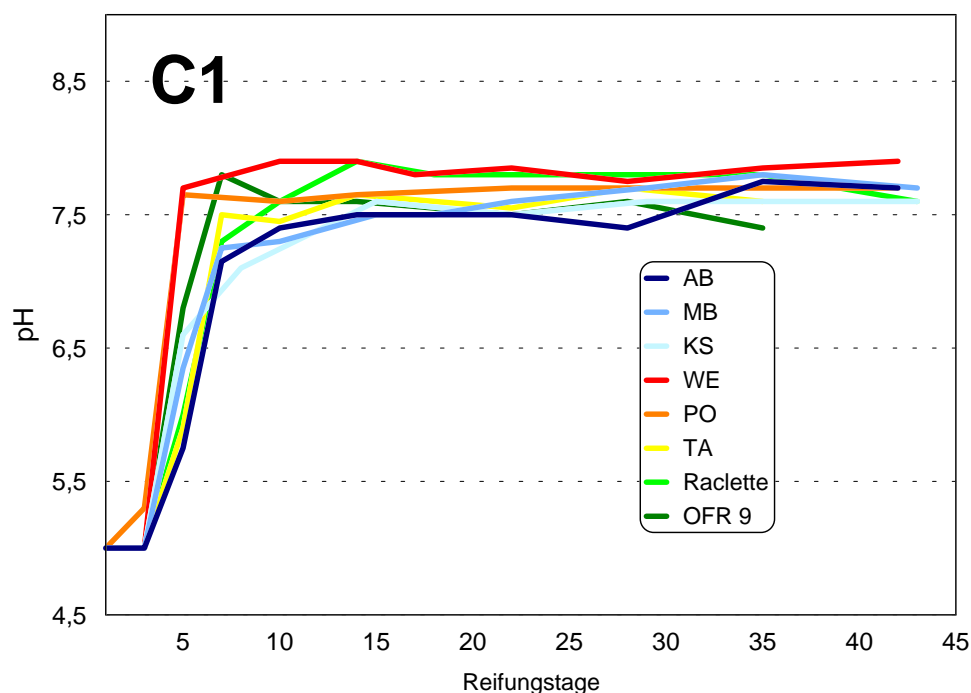


Abbildung 3.4.1.1: Versuch C1: pH-Werte bei der Reifung von Rotschmierweichkäsen mit 8 verschiedenen komplexen Oberflächenfloren

Ebenso typisch für die Reifung von Rotschmierekäsen waren der Verlauf der Hefen- und der aeroben Gesamtkeimzahlen (Abb. 3.4.1.2 und 3.4.1.3). Zu Beginn der Reifung konnte ein starkes Wachstum der Hefen von ca. $2 \times 10^5 - 6 \times 10^6$ KbE/cm² (Tag 3) auf Werte bis zu 2×10^8 KbE/cm² (Tag 7) ermittelt werden. Im Laufe der weiteren Versuche nahmen die Hefenkeimzahlen leicht ab oder blieben konstant. Dahingegen war der deutlichste Anstieg der aeroben Gesamtkeimzahlen zwischen Tag 3 ($2-4 \times 10^7$ KbE/cm²) und Tag 15 zu beobachten (3×10^8 KbE/cm² – 2×10^9 KbE/cm²). Ab Tag 15 veränderten sich die Keimzahlen nur noch kaum und blieben bis zum Ende der Reifung auf Werten zwischen 10^9 und 5×10^9 KbE/cm² vergleichsweise konstant. Lediglich die verwendeten Reifungsfloren der Käse KS und TA lagen hierbei unterhalb der anderen ermittelten Werte.

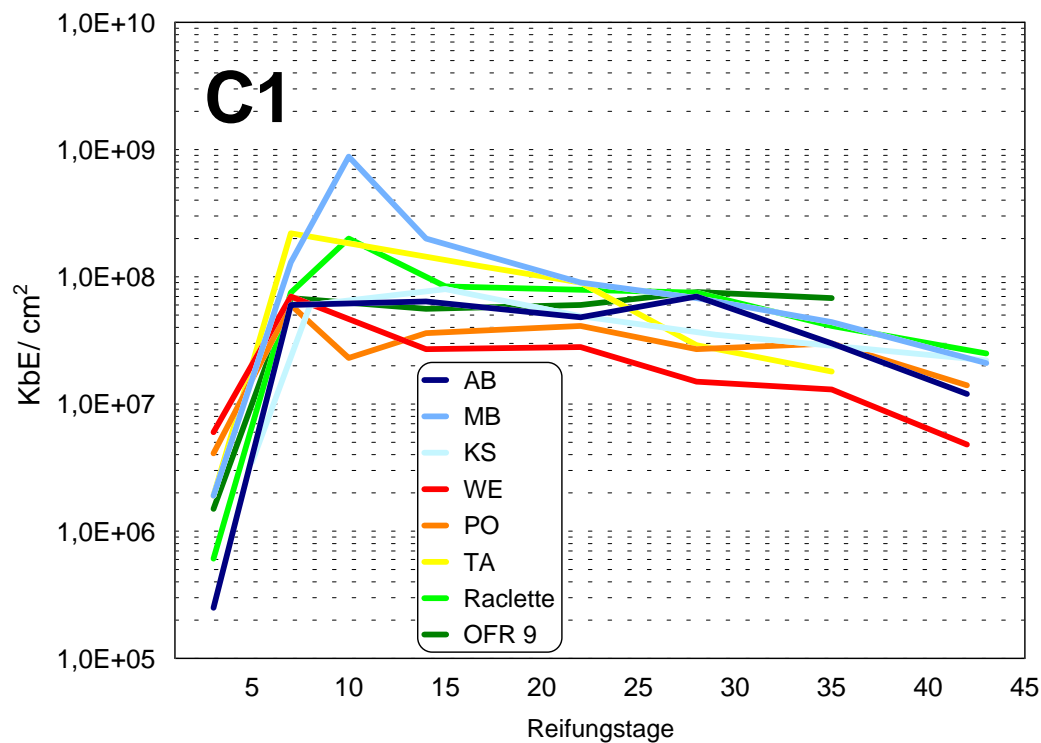


Abbildung 3.4.1.2: Versuch C1: Hefenkeimzahlen bei der Reifung von Rotschmiereweichkäsen mit 8 verschiedenen komplexen Oberflächenfloren

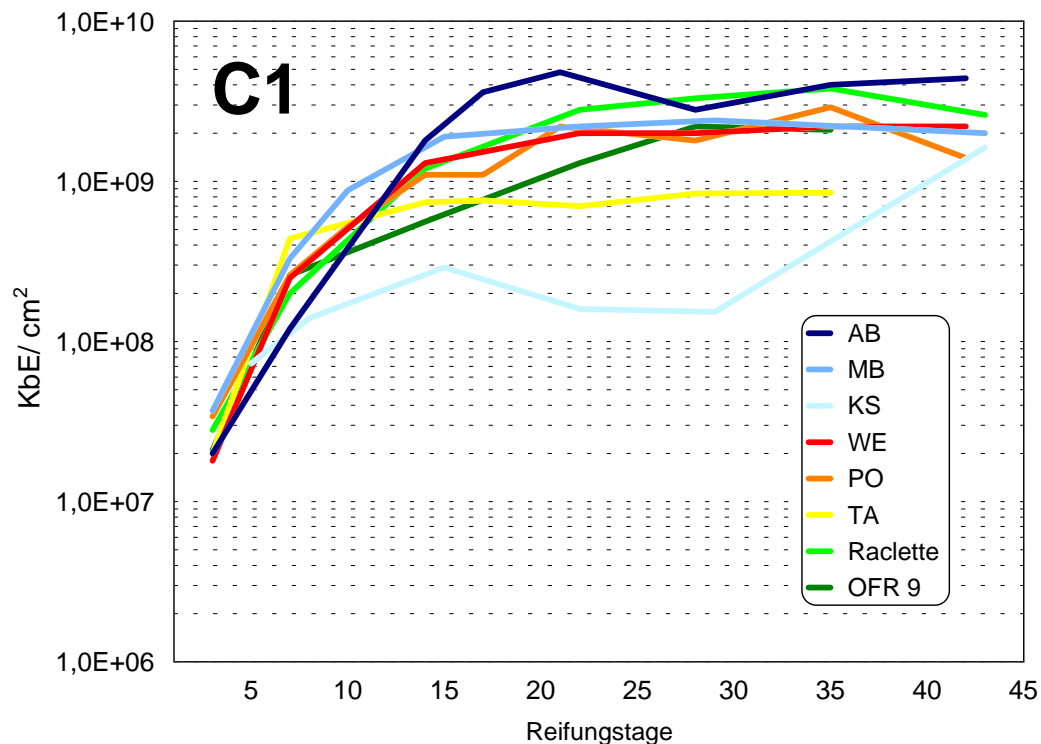


Abbildung 3.4.1.3: Versuch C1: Aerobe Gesamtkeimzahlen bei der Reifung von Rotschmierweichkäsen mit 8 verschiedenen komplexen Oberflächenfloraen

3.4.2 Hemmung von *Listeria monocytogenes*

In den vorliegenden Versuchen wurde *L. monocytogenes* WSLC 1364 jeweils an Tag 1 in unterschiedlichen Keimzahlen über die Schmierlake auf die Käseoberfläche aufgebracht. Bei den in Versuch C1 dargestellten Ergebnissen betrug die Kontaminationsrate ca. $2\text{-}3 \times 10^2$ KbE/ml Schmierlake; die gezeigten Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 3 unabhängig durchgeführten Reifungsversuchen dar. Das Wachstum der Listerien trat in allen Versuchen in den ersten Tagen der Reifung verzögert auf. Bis einschließlich Tag 10 lagen die ermittelten Keimzahlen meist knapp an der Nachweisgrenze. Die weitere Entwicklung der *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche war stark abhängig von der verwendeten Reifungsflora. Bei der Verwendung der Reifungsflora AB, MB und Raclette blieben die Keimzahlen während der gesamten Reifung unter einem Wert von 10^3 KbE/cm² Käseoberfläche, während bei den übrigen Floren Werte oberhalb 10^5 KbE/cm² bereits ab Tag 5 und Höchstwerte bis zu 10^7 KbE/cm² gegen Ende der Lagerung erreicht wurden. Bei einer Anfangskontamination von $2\text{-}3 \times 10^2$ KbE/ml Schmierlake konnten daher drei gut hemmende Floren (MB, AB, Raclette) von fünf nur wenig inhibitorisch wirkenden Floren unterschieden werden (Abb. 3.4.2.1).

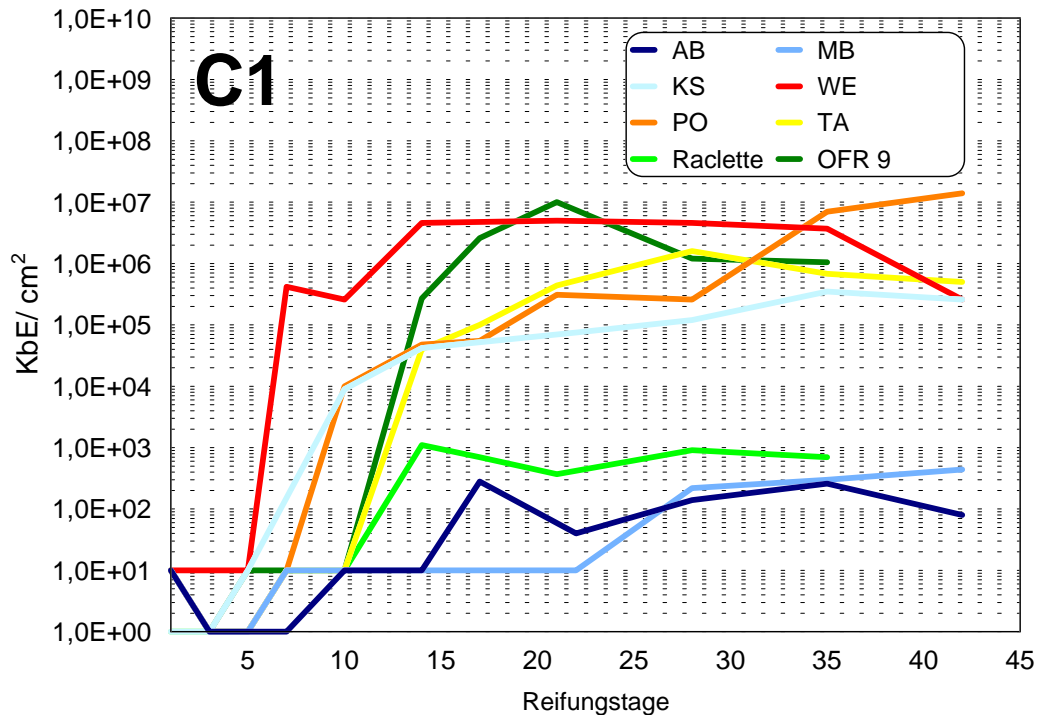


Abbildung 3.4.2.1: Versuch C1: Entwicklung der *Listeria*- Keimzahlen bei der Reifung mit 8 komplexen Reifungsfloren (Anfangskontamination: $2-3 \times 10^2$ KbE/ ml Schmierlake)

Bei einer Anfangskontamination von $2-3 \times 10^3$ KbE *L. monocytogenes* WSLC 1364/ml Schmierlake konnten wiederum zwei nur wenig inhibitorisch wirkende Floren (KS, WE) von zwei Floren mit einer besseren Hemmwirkung gegenüber *Listeria* unterschieden werden. Im Gegensatz zu Versuch C1 waren an Tag 10 bereits vergleichsweise hohe *Listeria*-Keimzahlen auf der Oberfläche zu ermitteln ($3,3 \times 10^2 - 4 \times 10^5$ KbE/cm²). Die Keimzahlen auf den Käse mit der Flora vom Käsetyp MB blieben dabei bis zum Ende der Reifung unter dem Wert von 10^4 KbE/ cm², während auf den Käsen mit den nur wenig inhibitorisch wirkenden Oberflächenfloren Keimzahlen zwischen $1-3 \times 10^6$ KbE/ cm² erreicht wurden. Die Käseflora vom Typ Raclette erreichte ab Tag 22 Keimzahlen von 10^5 KbE/cm² und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende der Reifung konstant. Die gezeigten Werte stellen wiederum Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Reifungsversuchen dar.

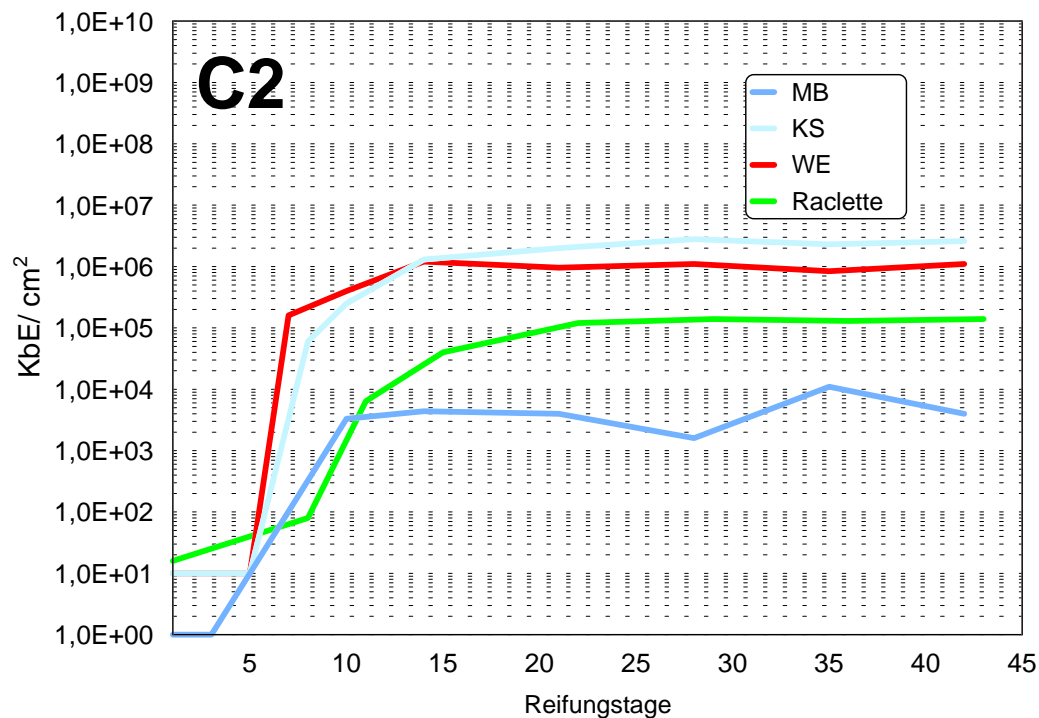


Abbildung 3.4.2.2: Versuch C2: Entwicklung der *Listeria*- Keimzahlen bei der Reifung mit 4 komplexen Reifungsfloren (Anfangskontamination: $2\text{-}3 \times 10^3$ KbE/ml Schmierlake)

In einem weiteren Reifungsversuch C3 wurde die inhibitorische Wirkung gegen *Listeria* dreier komplexer Reifungsfloren bei einer hohen Anfangskontamination der Schmierlake ($1,5 \times 10^4$ KbE/ml) untersucht. Wie aus Abb. 3.4.2.3 ersichtlich war hierbei ein ähnlicher Trend wie in den vorangegangenen Versuchen zu beobachten: die *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche der Käse mit Kultur MB lagen mit 2-3 log Einheiten deutlich unter denen, die mit den Kulturen KS und WE gereift wurden. Insgesamt erreichten die mit der Kultur MB gereiften Käse jedoch vergleichsweise höhere Keimzahlen (6×10^4 KbE/cm²) als in den vorangegangenen Versuchen C1 und C2 mit einer niedrigeren Anfangskontamination (5×10^3 , bzw. 10^4 KbE/cm²). Dahingegen wurden auf den Käsen, die mit der Kultur WE gereift wurden, ähnliche oder sogar vergleichsweise niedrigere *Listeria*-Keimzahlen (3×10^6 KbE/cm²) als in den vorangegangenen Versuchen C1 und C2 (5 bzw. $1,2 \times 10^6$ KbE/cm² Käseoberfläche) ermittelt. Die höchsten Keimzahlen in diesem Versuch konnten auf der Oberfläche der Käse der Kultur KS (2×10^7 KbE/cm²) nachgewiesen werden. In den Versuchen C1 und C2 wurden mit dieser Kultur bei niedrigeren Kontaminationen Keimzahlen von $3,5 \times 10^5$, bzw. 3×10^6 KbE/cm² erreicht.

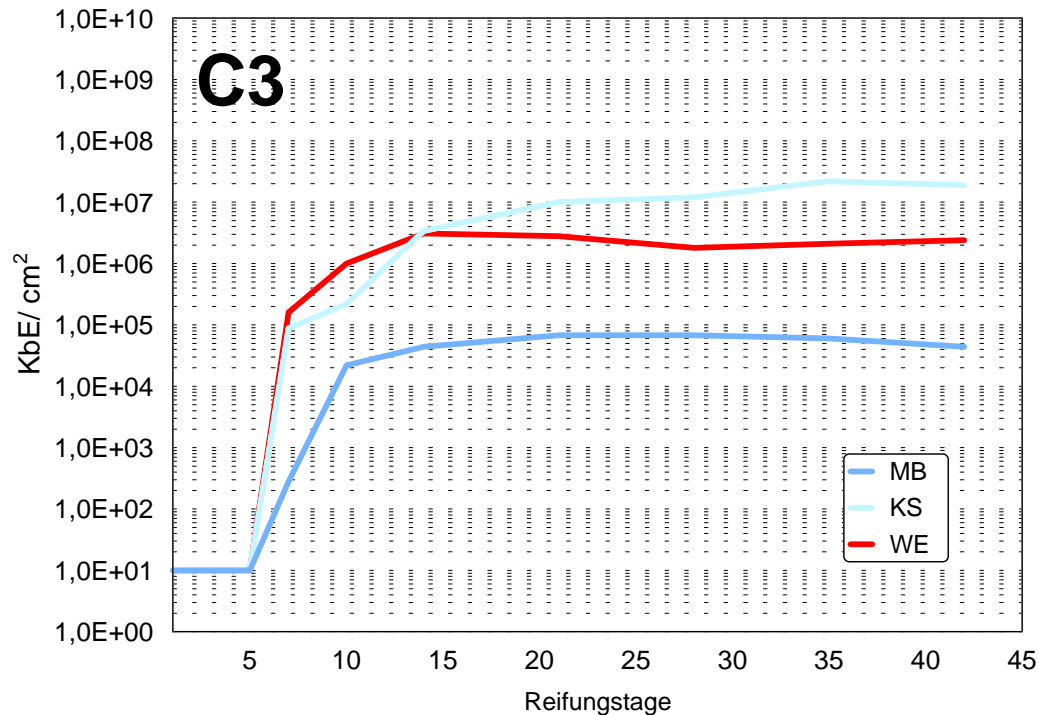


Abbildung 3.4.2.3: Versuch C3: Entwicklung der *Listeria*- Keimzahlen bei der Reifung mit 3 komplexen Reifungsfloren (Anfangskontamination: $1,5 \times 10^4$ KbE/ml Schmierlake)

3.5 Entwicklung von definierten Mehrstammkulturen

Die aus den komplexen Oberflächenfloren der Käse Raclette, MB und WE isolierten Stämme wurden anhand ihrer Koloniemorphologie, des mikroskopischen Bildes und mittels Grobdifferenzierung charakterisiert und mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie identifiziert. Eine Übersicht der von den 3 verschiedenen Käsesorten isolierten Hefen- und Bakterienstämme ist Anhang 1-3 und den Arbeiten von PRECHTER (2000) und MAIER (2000) zu entnehmen. Mit den aus den Einzelstämmen neu zusammengesetzten Kulturen wurden verschiedene Reifungsversuche durchgeführt, auf deren Ergebnisse im Folgenden weiter eingegangen werden soll.

3.5.1 pH-Werte bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen

Die „grünen Käse“ wiesen grundsätzlich pH-Werte zwischen 5,0 und 5,1 auf. Während der Käsureifung kam es zu einem für Rotschmierkäse typischen pH-Anstieg. So war zwischen den Tagen 3 und 6 in der Phase der Entsäuerung der Käseoberfläche ein starker Anstieg festzustellen, während in der Regel ab Tag 6 einheitlich Werte zwischen

7,2 und 7,8 erreicht wurden. Im weiteren Reifungsverlauf blieben die pH-Werte auf einem ähnlichen Niveau mit geringen Schwankungsbreiten innerhalb der einzelnen Chargen. Die höchsten pH-Werte waren auf einigen Käsen am Ende der Lagerung mit Werten von 8,0 bzw. 8,1 zu verzeichnen. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen waren bis auf deutlich unterschiedliche gemessene Werte am jeweils dritten Tag der Reifung äußerst gering. Auf eine graphische Darstellung wurde verzichtet.

3.5.2 Hefen- und Milchsimmelkeimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen

In allen Chargen bei allen Versuchsansätzen konnte eine leichte Abnahme der Hefen- und Milchsimmelkeimzahlen im Verlauf der Reifung beobachtet werden. So wurden an Tag 7 der Reifung zwischen 1×10^7 und 2×10^8 KbE/cm², am Ende der Reifung an Tag 42 lediglich zwischen 5×10^6 und 2×10^7 KbE/cm² nachgewiesen.

3.5.3 Aerobe Gesamtkeimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen

Bei der Entwicklung der salztoleranten aeroben Bakterienflora war zwischen den Tagen 7 und 14 grundsätzlich ein deutlicher Anstieg, im weiteren ab Tag 14 bis zum Ende der Reifung weiterhin ein leichter Anstieg festzustellen. Hierbei erreichten die Käse mit der Reifungskultur MB die höchsten Werte zwischen $2,5 \times 10^9$ und 6×10^9 , während die Kulturen WE bzw. Raclette lediglich Werte zwischen 6×10^8 und 2×10^9 , bzw. 4×10^8 bis 1×10^9 KbE/cm² erreichten.

3.5.4 *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit definierten Mehrstammkulturen

3.5.4.1 *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit einer Raclette-Flora (Kontamination der Charge I)

Wie Abbildung 3.5.4.1. zu entnehmen ist, konnte bei einer Anfangskontamination von 10^2 KbE/ml Schmierlake (Tag 1, Charge 1) mit zunehmenden Chargen ein steiler Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen bis Tag 20 beobachtet werden. Die höchsten ermittelten Keimzahlen in allen Chargen lagen bei 10^6 KbE/cm², wobei beachtet werden muß daß der Nachweis nicht bis zum Ende der Reifung geführt werden konnte (PRECHTER, 2000).

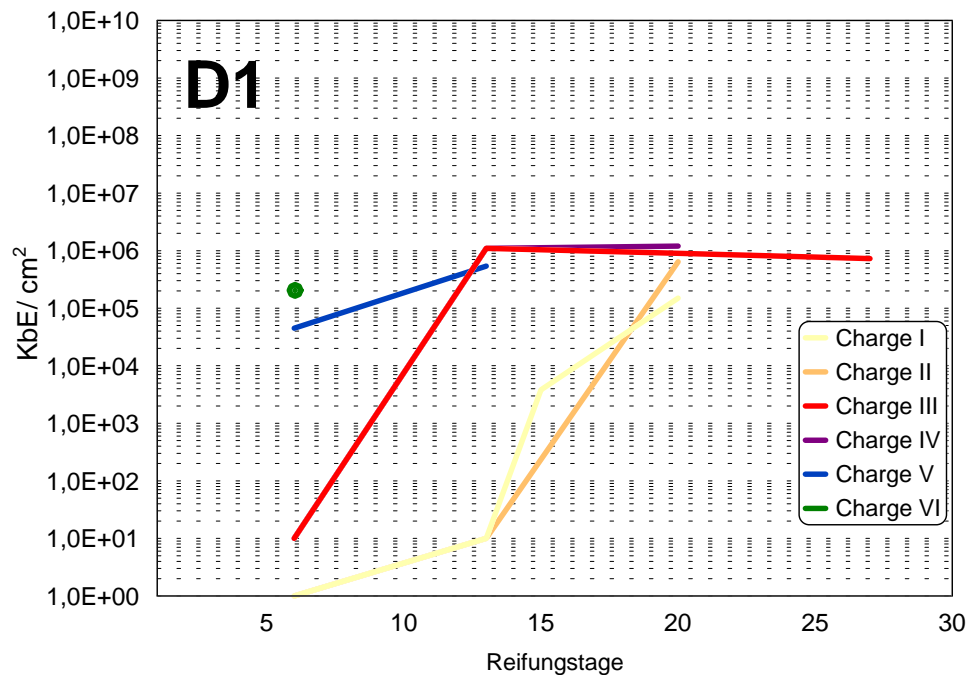


Abb. 3.5.4.1: Versuch D1: Entwicklung der *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit einer Raclette-Flora

3.5.4.2 *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit der Flora MB und WE (Kontamination der Charge I)

Bei der Reifung mit der Flora MB und WE und einer Anfangskontamination von je ca. 10^2 KbE/ml Schmierlake an Tag 1 (einmalig in Charge I) konnte mit zunehmenden Chargen ein deutlicher Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen beobachtet werden (Abb. 3.5.4.2.). Ab Charge III wurden schon ab Tag 9 der Reifung Werte von 10^7 KbE/cm² und mehr erreicht; die höchsten Werte lagen bei 2×10^8 KbE/cm² bei der Reifung mit der Flora MB und bei 5×10^8 KbE/cm² (Charge V, Tag 35) bei der Reifung mit der Flora WE. Weiterhin fiel in beiden Versuchen auf, daß in Charge VI tendenziell niedrigere Keimzahlen als in den Chargen IV und V ermittelt werden konnten.

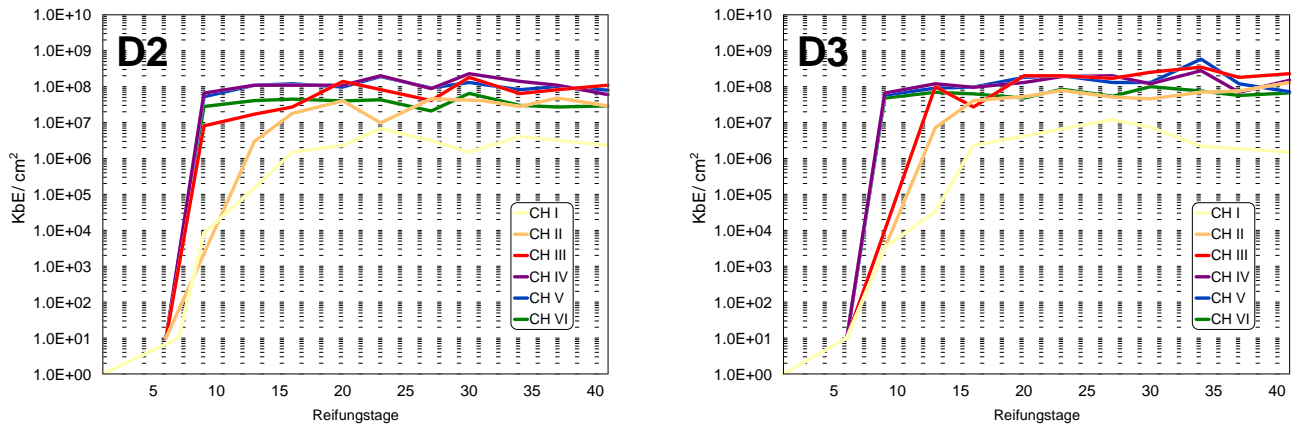


Abb. 3.5.4.2. Entwicklung der *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit der Flora MB (Versuch D2) und Flora WE (Versuch D3).

3.5.4.3 *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit der Flora MB und WE (Kontamination der Chargen I und VI)

In zwei weiteren Reifungsversuchen sollte überprüft werden, ob mit einer Veränderung einer komplexen Flora im Verlaufe des „Alt-Jung-Schmierens“ die Entwicklung einer antilisteriellen Aktivität beobachtet werden kann. Hierfür wurden die Käse in jeweils einem Exsikkator der Chargen I und VI mit $1-4 \times 10^2$ KbE/ml (MB) bzw. ca. 40-80 KbE/ml Schmierlake (WE) *L. monocytogenes* WSLC 1364 kontaminiert. Die gezeigten Versuche wurden zweimal identisch durchgeführt und zeigten tendenziell die gleichen dargestellten Ergebnisse (MAIER, 2000).

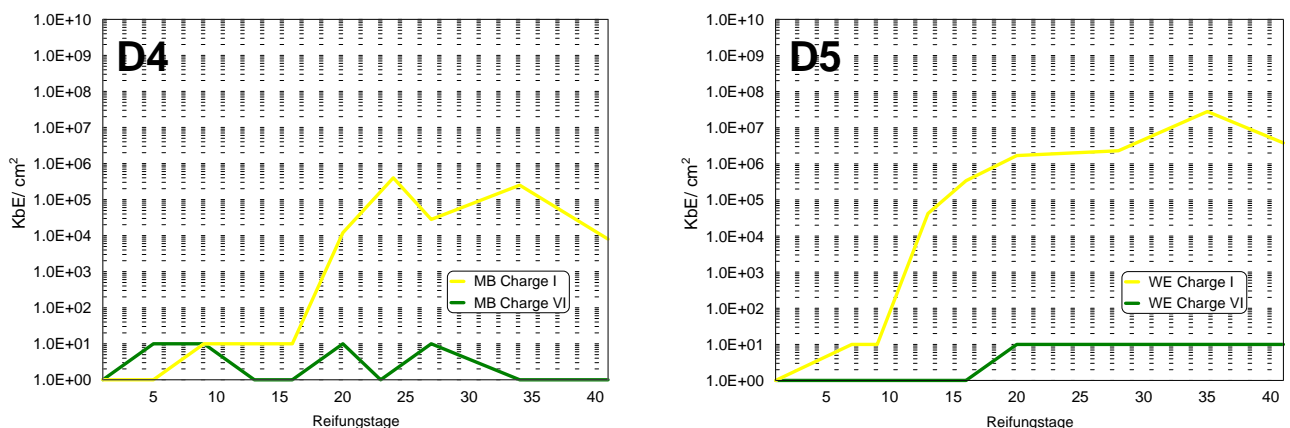


Abb. 3.5.4.3: Entwicklung der *Listeria*-Keimzahlen bei der Reifung mit der Flora MB (Versuch D4) und Flora WE (Versuch D5) und Kontamination der Chargen I und VI

In beiden Reifungsversuchen war in Charge I ein deutliches Wachstum von *Listeria* zu beobachten. Der Zeitpunkt des Anstiegs war dabei nicht identisch und erfolgte bei den mit MB gereiften Käsen ab Tag 16, bei den mit WE gereiften Käsen hingegen bereits ab Tag 9. Ferner wurden bei den mit MB gereiften Käsen eine maximale Zellzahl von 3×10^5 KbE/cm² (Tag 24) erreicht, während auf den mit WE gereiften Käsen deutlich höhere Keimzahlen bis zu 3×10^7 KbE/cm² (Tag 35) erreicht wurden. Bei der Kontamination der Chargen VI konnte kein Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen beobachtet werden. Der *Listeria*-Nachweis konnte -wenn überhaupt- nur qualitativ mittels selektiver Anreicherung geführt werden.

3.5.5 Entwicklung der Reifungskulturen im Verlaufe des „Alt-Jung-Schmierens“

Um den Verlauf der Entwicklung der definierten Reifungskulturen über einen Zeitraum von mehreren Wochen hinweg verfolgen zu können, wurden aus ausgewählten Schmierlaken, bzw. Käseproben jeweils 100 Bakterienstämme isoliert und mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie identifiziert („definierte Reifungskultur“). Konnte keine Zuordnung zu einem der mit der Schmierlake zugegebenen Stämme erfolgen, wurden diese Stämme als „undefinierte Flora“ bezeichnet und ebenso identifiziert.

3.5.5.1 Entwicklung der Reifungskultur Raclette

Die meisten der 29 verschiedenen Bakterien- und Hefenstämmen der Oberflächenkultur wurden mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie als auf Rotschmierekäse regelmäßig anzutreffende Mikroorganismen identifiziert (siehe auch Anhang 1). Nach dem „Alt-Jung-Schmierens“ der Käse bis zum 15. Reifungstag der Charge II bestand die Schmierlake noch zu 75-80 % aus der definierten Reifungskultur, wohingegen in Charge IV nur noch 28% der Stämme und in Charge VI noch lediglich 22 % der Stämme der definierten Reifungskultur zugeordnet werden konnten. Der Stamm F.08-*Brachybacterium tyrofermetans* machte dabei ca. 20% der definierten Reifungskultur aus. Bei den Stämmen der undefinierten Flora handelte es sich überwiegend um Enterobakterien, *Arthrobacter citreus/ sulfureus* und *Lactococcus lactis*. Detaillierte Ergebnisse hierzu sind der Arbeit von PRECHTER (2000) zu entnehmen.

3.5.5.2 Entwicklung der Reifungskultur MB

Die Zusammensetzung der Bakterienflora zeigte deutlich leichtere Veränderungen während des Versuchsverlaufes. So konnten bei der Identifizierung der Oberflächenflora in Charge II 88% und in Charge VI noch 85% der definierten Reifungskultur zugeordnet werden. Von ursprünglich 16 verwendeten Stämmen wurden dabei sieben der ursprünglichen Bakterienstämme auf den Käsen der Charge VI identifiziert. Den Hauptanteil der Oberflächenflora in Charge II bildeten der Stamm MB 8 (74%), der als *Arthrobacter* sp. identifiziert wurde und der Stamm MB 15 (*Corynebacterium ammoniagenes*) mit einem Anteil von 10% auf der Käseoberfläche. In der ursprünglichen Schmierlake waren die beiden Stämme mit Anteilen von 22% bzw. 6% vertreten. In Charge VI hingegen sank der Anteil des Stammes MB 8 auf 34%. Den Hauptanteil an der Flora machten hier die Stämme MB 5/6 (*Curtobacterium flaccumfaciens*) mit 24%, MB 9 (*Rathayibacter rathayi*) mit 13% und MB 15 (*Corynebacterium ammoniagenes*) mit 12% aus. Die nicht-definierte Flora auf der Käseoberfläche setzte sich in Charge II zum größten Teil aus Enterobakterien zusammen. In Charge VI war das Auftreten von Enterokokken mit einem Anteil von 7% auffällig. Detaillierte Ergebnisse hierzu sind der Arbeit von MAIER (2000) zu entnehmen.

3.5.5.3 Entwicklung der Reifungskultur WE

Im Unterschied zu Käse MB wurde die definierte Reifungskultur bis auf einen kleinen Anteil komplett durch eine undefinierte Flora von der Käseoberfläche verdrängt. Während in Charge II 78% der Flora der definierten Reifungskultur zuzuordnen waren, konnte im weiteren Verlauf bis zur Charge VI eine deutliche Abnahme auf nur noch 5% beobachtet werden. Die Flora bestand in Charge II vorherrschend aus den Stämmen WE 4 (*B. linens*) mit 11%, WE 6/7 (*Brachybacterium tyrofermentans*) mit 41% und WE 10 (*Bacillus cohnii*) mit 25%. In Charge VI konnte ausschließlich der Stamm WE 10 (*Bacillus cohnii*) mit einem Anteil von 5% nachgewiesen werden, den Hauptanteil machten Enterokokken und Enterobakterien aus. Detaillierte Ergebnisse hierzu sind der Arbeit von MAIER (2000) zu entnehmen.

4 Diskussion

4.1 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* in Käse

4.1.1 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* auf Sauermilchkäse

Über das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Sauermilchkäse liegen bislang keine statistisch signifikanten Daten vor, obgleich in letzten Jahr einige Rückrufaktionen für diese Produktgruppe durchgeführt werden mußten (VDM, 99a, 99b). Untersuchungen von FEDER (1981) zeigten jedoch, daß der hygienische Status dieses Produktes mit hohen Keimzahlen an *Escherichia coli* (5×10^3 KbE/g), sowie Staphylokokken und Pseudomonaden unzufriedenstellend war. Da für das Vorkommen und Wachstum von Listerien in Sauermilchkäse vom Gelbkäse-Typ ähnliche Bedingungen wie für die Gruppe der rotgeschmierten Käsesorten angenommen werden, können die vorliegenden Daten mit diesen Käsesorten verglichen werden. Über das Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weich- und halbfesten Schnittkäsen wurden Kontaminationsraten von 0.5% (FARBER et al., 1987), 1.24 -1.8% (GLEDEL, 1988), 2.6% (WEBER et al., 1988), 3.4% (TERPLAN et al., 1986), 6% (LONCAREVIC et al., 1995), 6.6% (BREER und SCHOPFER, 1988), 10% (PINI und GILBERT, 1988), 11% (RØRVIK und YNDESTAD, 1991) und 15% (BECKERS et al., 1987) berichtet.

Die Unterscheidung von *Listeria*-Stämmen in verschiedene Phagovare stellt ein effizientes Mittel zur Kontaminationsroutenanalyse von *Listeria*-Kontaminationen in betroffenen Betrieben, bei der Distribution von Käse im Handel und bei Listeriose-Ausbrüchen dar. Ebenso gut können in Betrieben dauerhaft bestehende Kontaminationen von sporadisch auftretenden *Listeria*-Kontaminationen unterschieden werden (LOESSNER, 1991). Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten verschiedene *L. monocytogenes* – und *L. innocua*-Phagovare unterschieden und über längere Zeiträume hinweg in den betroffenen Betrieben nachgewiesen werden. Kontaminationen mit *Listeria* können unterschiedlicher Herkunft sein. Da der Organismus HTST (high-temperature short-time)-Pasteurisierung nicht überstehen kann (LOVETT et al., 1990) ist es wahrscheinlich, daß Kontaminationen bei Käse aus pasteurisierter Milch ausschließlich durch Rekontaminationen zustande kommen und möglicherweise über lange Zeiträume hinweg in den Reifungsräumen einer Käserei bestehen können. Eine Sanierung des Betriebes ist dann nur sehr schwer oder gar nicht durchführbar (HAHN und HAMMER, 1990). Diese Annahme wurde durch die

Tatsache bestätigt, daß der selbe *L. innocua*-Phagovar über einen Zeitraum von mehreren Monaten hinweg isoliert werden konnte, obwohl innerhalb dieses Zeitraum auch Listerien-freie Proben ermittelt wurden. Möglicherweise waren Listerien im Betrieb vorhanden, konnten aber aufgrund der ungenügend hohen Sensitivität ($< 10 \text{ KbE/cm}^2$) der verwendeten Methode nicht nachgewiesen werden. Weiterhin kann die Schwierigkeit des Nachweises von *Listeria* in Sauermilchkäse durch eine mögliche Ansäuerung des Nachweismediums (ANC-Bouillon) während der 48-stündigen Voranreicherung aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Käseproben erklärt werden. In diesem Fall schlagen TERPLAN et al. (1990) eine verlängerte Anreicherung von 7 Tagen oder eine Unteranreicherung (für weitere 24 h in einem weiteren Röhrchen) vor.

4.1.2 Vorkommen von *Listeria* und *Listeria monocytogenes* auf Rotschmierekäse

Vorkommen von Listerien in verschiedenen Käsesorten. Nur 4,4% der untersuchten Hartkäsesorten (eine deutsche und eine italienische Probe) waren mit *Listeria monocytogenes* kontaminiert, darunter eine Probe einer Art Pecorino-Käse, der laut Angaben aus Schafsmilch hergestellt wurde. In Untersuchungen von COMI et al. (1990) und TERPLAN et al. (1986) konnte *L. monocytogenes* aus 0 von 99 italienischen und 2 von 48 deutschen Hartkäsesorten isoliert werden, die ebenfalls aus Schafsmilch hergestellt wurden. Somit stimmen die ermittelten Ergebnisse mit denjenigen aus anderen Studien überein, in denen wiederholt berichtet wird, daß *L. monocytogenes* häufiger in Käsesorten mit einem hohen Wassergehalt nachgewiesen werden konnten (RYSER, 1999). Außerdem wird dieses Ergebnisse durch die Tatsache bestätigt, daß in verschiedenen Proben aus einer Käserei ZW eine Hartkäsesorte keinerlei Kontamination mit *L. monocytogenes* aufwies, obwohl diese Hartkäsesorte unter den gleichen Bedingungen und mit der gleichen Reifungskultur wie die übrigen 5, mit *Listeria monocytogenes* kontaminierten Sorten von Weich- und halbfestem Schnittkäse hergestellt wurden (persönliche Mitteilung der Käserei). Weiterhin wird durch diese Ergebnisse ersichtlich, daß *Listeria monocytogenes* und andere *Listeria* Spezies noch immer häufig in Rotschmierekäse vorhanden sind, selbst wenn für die Herstellung dieser Käse pasteurisierte Milch verwendet wurde. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, daß in den durchgeführten Untersuchungen mehr *L. monocytogenes*-positive Käse aus pasteurisierter Milch (8%) als aus Rohmilch (4.8 %) gefunden werden konnten. In diesem Zusammenhang berichteten BECKERS et al.

(1987) von 9 aus 14 oberflächengereiften Käsen aus Rohmilch, aber jedoch keinem von 36 Weichkäsen aus pasteurisierter Milch, die mit *L. monocytogenes* kontaminiert waren. Acht Jahre später konnten EPPERT et al. (1995) und LONCAREVIC et al. (1995) ebenfalls von einem deutlich höheren Vorkommen von *L. monocytogenes* in Weich- und halbfesten Schnittkäsen aus Rohmilch (32,7% und 42 %) als in solchen Käsen, die aus pasteurisierter Milch hergestellt wurden (8,8% und 2,3 %) berichten. Im Gegensatz dazu wiesen BREER und SCHOPFER (1988) vergleichbare Kontaminationsraten mit *L. monocytogenes* in Käsen aus Roh- und pasteurisierter Milch (13,9 und 12,2 %) nach.

Listeria-Keimzahlen auf der Käseoberfläche. Nach wie vor ist unklar, welche Keimzahlen erforderlich sind, um eine manifeste Listeriose-Infektion hervorzurufen (FARBER und PETERKIN, 1991); wahrscheinlich ist dabei jedoch, daß diese Dosis von Individuum zu Individuum unterschiedlich ist (HOF und ROCOURT, 1992) und das Angehörige der Gruppe der sog. YOPI's zu den anfälligsten Personengruppen gehören. Jedoch können auch immunkompetente Personen, die keiner Risikogruppe angehören, an lebensmittelbedingter Listeriose erkranken (AURELI et al., 2000). Da für den quantitativen Nachweis von *Listeria* in Lebensmitteln selektive Anreicherungsverfahren und Rückstellproben erforderlich sind, gibt es nur wenige Angaben über tatsächliche Keimzahlen von *L. monocytogenes* pro Gramm oder cm^2 Lebensmittel. Abgesehen von zwei Untersuchungen, bei denen die Keimzahlen in künstlich kontaminierten Lebensmittelproben bestimmt wurden (TRAN und HITCHINS, 1996; LOESSNER et al., 1997), gibt es keine systematische Untersuchung über den quantitativen Nachweis von *Listeria* in natürlich kontaminierten Käseproben mittels MPN-Methode. Durch ein direktes Ausplattieren der Käseproben konnten jedoch SWAMINATHAN et al. (1988) in einem natürlich kontaminierten Brie-Käse mehr als $2,4 \times 10^5$ Listerien/g ermitteln, während in anderen Untersuchungen an Weich- und halbfesten Schnittkäsen von $10^3 - 10^7$ KbE/g (MICHARD et al., 1989), bis zu $5,6 \times 10^6$ KbE/g (DATTA et al., 1988) und $10^3 - 10^5$ KbE/g (LONCAREVIC et al., 1995) nachgewiesen werden konnten. Um zu bestimmen, ob ein Unterschied bezüglich der Verteilung der Listerien innerhalb eines Käses vorliegt, ermittelten PINI und GILBERT (1988) bis zu 400 mal höhere Keimzahlen in der Rinde der untersuchten Käse verglichen mit dem Käseinneren. Somit können die unterschiedlich ermittelten Werte verschiedener Studien lediglich als Schätzwerte angesehen werden. Aus diesem Grund wurden in den vorliegenden Untersuchungen nur definierte Teile der Käserinde untersucht und die *Listeria*-Keimzahlen pro cm^2 berechnet. Die hierbei ermittelten *L. monocytogenes*-Keimzahlen im Bereich von $10^1 -$

10^5 KbE/cm² sind somit im Bereich derer, die auch in anderen Untersuchungen angegeben wurden.

Während der Kühlung in Rahmen des Mindesthaltbarkeitsdatums schien eine Vermehrung von *Listeria* auf der Käsoberfläche stattgefunden zu haben, da bei mehreren positiven Erst- und Rückstellproben grundsätzlich höhere Keimzahlen gegen Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatum nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Wie schon von GREENWOOD et al. (1991) berichtet, kann die Kontamination eines Lebensmittels oder auch eine Vermehrung mit pathogenen Organismen durchaus auch innerhalb der Verteilungskette und sogar zu Hause, auch bei niedrigen Temperaturen wie z.B. in Kühlschränken, stattfinden. Eine Exposition des Verbrauchers mit hohen Keimzahlen an pathogenen Organismen ist somit auch dann möglich, wenn die ursprüngliche Kontamination des Lebensmittels niedrig war. Die Fähigkeit von *Listeria monocytogenes* selbst bei niedrigen Temperaturen zu wachsen, die Reifungszeit der Käse und eine Verlängerung bzw. ungenaue Angabe des Mindesthaltbarkeitsdatums einiger Produkte machen somit den kompletten Ausschluß von *L. monocytogenes* in einem Produkt erforderlich.

Phagentypisierung. Da Kreuzkontaminationen in Käsereien und/ oder im Einzelhandel eine bedeutende Rolle im Bezug auf das Vorkommen und die Vielfältigkeit von *Listeria monocytogenes* –Isolaten aus Käseproben zukommt, ist es für epidemiologische Untersuchungen unbedingt erforderlich, jeweils mehrere Isolate einer Probe genauer zu charakterisieren (LONCAREVIC et al., 1998). In den vorliegenden Untersuchungen schienen Kreuzkontaminationen eine wichtige Rolle zu spielen: so wiesen zwei Betriebe von „Ab-Hof-Verkäufern“ häufige Kreuzkontaminationen innerhalb ihrer verschiedenen Käseproben auf. In der Käserei ZS konnte über einen Zeitraum von acht Wochen die Kontamination eines Weichkäses und eines Hartkäses aus Ziegenmilch beobachtet werden. Weiterhin wurden in Käserei ZW Kontaminationen mit *L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. seeligeri* in fünf von sechs untersuchten Käseproben (eine Hartkäsesorte war nicht betroffen) über einen Zeitraum von 12 Wochen festgestellt. In beiden Käsereien wiesen die isolierten Stämme den gleichen Phagovar auf. Eine Kontamination von Käseproben aus pasteurisierter Milch ist höchstwahrscheinlich auf eine Rekontamination im Herstellungsprozess oder ungenügende Hygienemaßnahmen zurückzuführen, können auf diese Weise über lange Zeit in einem Betrieb bestehen bleiben und nur schlecht beseitigt werden (HAHN und HAMMER, 1990). Von einem in einem Betrieb über sieben Jahre hinweg persistierenden *L. monocytogenes*- Klon

berichteten in diesem Zusammenhang auch UNNERSTAD et al. (1996). Auf der anderen Seite spielt in den durchgeführten Untersuchungen Kreuzkontaminationen im Einzelhandel – ein Risikofaktor, der bei FARBER et al. (1987) und RØRVIK und YNDESTAD (1991) hervorgehoben wird – offensichtlich keine Rolle: *Listeria*- positive Proben aus verschiedenen Betrieben, die an der gleichen Ladentheke verkauft wurden, zeigten in keinem Fall den selben Phagovar (Daten nicht gezeigt).

Das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in den letzten 14 Jahren. Insgesamt wurden in 6,4% der untersuchten Käseproben *L. monocytogenes* nachgewiesen. In anderen Untersuchungen von Weich- und halbfesten Schnittkäsen werden für *L. monocytogenes* Häufigkeiten von 1,1% and 22% angegeben, während andere *Listeria*-Spezies in 0,5% - 24% der untersuchten Käse nachgewiesen werden konnten. BECKERS et al. (1987), EPPERT et al. (1995), LONCAREVIC et al. (1995) und PINI und GILBERT (1988) wiesen in 15% (10 von 69), 26,1% (18 von 69), 10% (18 von 174) und 14% (12 von 85) französischen Weichkäseproben *L. monocytogenes* nach. In den vorliegenden Ergebnissen liegt diese Rate niedriger: hier waren nur 3,6% (5 von 149 Weich- und halbfesten Schnittkäsen) der französischen Käseproben positiv. Dahingegen berichteten LONCAREVIC et al. (1995) von einer Häufigkeit an *L. monocytogenes* von nur 3,1% bzw. 2,8% in deutschen bzw. italienischen Weich- und halbfesten Schnittkäsen, während in den vorliegenden Daten deutlich höhere Kontaminationsraten von 9,2% and 17,4% ermittelt werden konnten. Die in den letzten 14 Jahren veröffentlichten Untersuchungen (Tab. 4.1.2.1) beinhalten allerdings sehr unterschiedliche Probenanzahlen, -materialien und Nachweismethoden. Daher ist ein direkter Vergleich der Daten nur schwer möglich. Nichtsdestotrotz gibt es keine Anzeichen dafür, daß das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in europäischen Rotschmierenkäsesorten in den letzten Jahren deutlich und in ausreichender Form abgenommen hat weshalb es noch immer ein Risiko für die öffentliche Gesundheit darstellt. Nicht nur *L. monocytogenes*, sondern auch andere apathogene Spezies wie vor allem *L. innocua* können häufig auf der Käseoberfläche nachgewiesen werden, oftmals sogar zusammen mit dem pathogenen Krankheitserreger. Offensichtlich können das gleich häufige Vorkommen in der Umwelt und die identischen Vermehrungsbedingungen beider Spezies als Argument gewählt werden, um *L. innocua* als Indikator-Organismus für kontaminierte Betriebe einzustufen (HAHN und HAMMER, 1990). Die in der Tabelle zusammengefassten Untersuchungen bezüglich des Vorkommens von *L. innocua* in Käse zeigen die gleiche deutliche Tendenz wie auch die für *L. monocytogenes*. Somit

wird klar, daß es auch hier innerhalb der letzten 14 Jahre nicht möglich war, das Problem der *Listeria*-Kontaminationen auf Rotschmierenkäse zu lösen. Auf jeden Fall ist die Anwesenheit auch apathogener Listerien in einem Produkt ein Anzeiger für einen unzureichenden Produktionsprozeß mit dem Risiko einer *L. monocytogenes*-Kontamination. Aus diesem Grund kann die Untersuchung einer Lebensmittelprobe auf das Vorhandensein jeder Art von Listerien an dieser Stelle nur empfohlen werden.

Tab. 4.1.2.1: Vorkommen von *Listeria* spp. in Käseproben aus verschiedenen Herkunftsländern (1986-2000)

Herkunft der Käse	Käsesorte	Anzahl Proben	<i>L. monocytogenes</i> (%)	andere <i>Listeria</i> spp. (%)	Autoren	Jahr
D, andere Länder	Weichkäse, halbfester Schnittkäse, Hartkäse	420	3,3	3,3	TERPLAN et al.	1986
F	Weichkäse	69	14,5	n.d.	BECKERS et al.	1987
A, DK, FIN, F, D, GR, NL, I, N, P, S, CH	Weichkäse und halbfester Schnittkäse	187	1,1	0,5	FARBER et al.	1987
keine Angabe	Rotschmierekäse	343	9,6	9,6	BREER und SCHOPFER	1988
F	Weichkäse und halbfester Schnittkäse	619	2,1	1,5	GLEDEL	1988
F, UK, I, Zypern, D, DK, RL	Weichkäse	222	10,4	8,6	PINI und GILBERT	1988
D, andere Länder	Weichkäse, halbfester Schnittkäse, Hartkäse	509	5,7	6,1	WEBER et al.	1988
I	Weichkäse	121	1,6	1,6	MASSA et al.	1990
andere Länder	Weichkäse	90	11,0	n.d.	RØRVIK und YNDESTAD	1991
F, D	Weichkäse	91	22,0	24,2	EPPERT et al.	1995
A, DK, UK, F, D, GR, I, NL, N, RO, E, S	Weichkäse und halbfester Schnittkäse	333	6,0	n.d.	LONCAREVIC et al.	1995
A, DK, F, D, I, CH	Weichkäse, halbfester Schnittkäse, Hartkäse	374	6,4	11,8	RUDOLF und SCHERER	2000

A: Österreich, CH: Schweiz, D: Deutschland, DK: Dänemark, E: Spanien, F: Frankreich, FIN: Finnland, GR: Griechenland, I: Italien, N: Norwegen, NL: Niederlande, P: Portugal, RL: Libanon, RO: Rumänien, S: Schweden, UK: England

4.2 Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch einen Pediocin-bildenden *Lactobacillus plantarum*-Stamm ALC 01

4.2.1 Pediocinaktivität

Die in den Versuchen ermittelten Werte für die Aktivität von Pediocin AcH erscheinen hoch. Für die Bewertung der ermittelten Pediocinaktivität liegen jedoch keine direkt vergleichbaren Werte vor, da ENNAHAR et al. (1996) die antilisterielle Aktivität von *Lb. plantarum* mit abweichenden Methoden bestimmten. KANG und FU (1998) ermittelten die Aktivitäten von verschiedenen Milchsäurebakterien gegen *L. monocytogenes* Scott A (WSLC 1685) und erreichten lediglich Werte zwischen 20 und 640 AU/ml. Im Gegensatz dazu erzielten ENNAHAR et al. (1999) bei der Bestimmung der Aktivitäten verschiedener Bakteriocine gegenüber einem *L. innocua*-Stamm bis zu 256 000 Bakteriocineinheiten (BU) für Pediocin AcH. Anhand der gezeigten Beispiele wird deutlich, daß einzelne Veränderungen der Versuchsparameter (Indikatorstamm, Methodik, Berechnung) zur Ermittlung der Aktivität verschiedener Bakteriocine in verschiedenen Studien immer relativ zu betrachten sind und einen Vergleich nicht zulassen.

4.2.2 Reifungsparameter

Bei allen Reifungsversuchen zeigten die pH-Werte der Weich- und Schnittkäse den für die Reifung von Rotschmierekäsen typischen Verlauf (EPPERT, 1997). Bereits in Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte sichergestellt werden, daß der Zusatz eines *Lactobacillus*-Stammes zur Schmiereflora keinen Einfluß auf die Entwicklung des pH-Wertes und auch die Entwicklung der Hefen- und Bakterienkeimzahlen zeigt (STEFFAN, 2000; Daten nicht gezeigt). Ausschlaggebend für die Interpretation der Versuche sind jedoch weniger die genauen Werte der pH-Messung, sondern der zeitliche Verlauf der Entsäuerung. Ebenso muß die Tatsache, daß bei den Schnittkäsen durchschnittlich höhere pH-Werte ermittelt wurden beim Vergleich der *Listeria*-Keimzahlen berücksichtigt werden.

4.2.3 Hemmung von *Listeria monocytogenes*

Aus den vorliegenden Daten wird ersichtlich, daß eine deutlichere Hemmung von *Listeria* auf der Käseoberfläche bei der Verwendung von Weichkäse mit der

entsprechenden komplexen Reifungsflora erzielt werden konnte (siehe dazu auch STEFFAN, 2000) und zwar bis zu einer maximalen Anfangskontamination von 10^3 KbE/ml Schmierlake (Versuch A5). Diese Tatsache ist vermutlich auf den niedrigeren pH-Wert (pH 5,0) der grünen Weichkäse im Gegensatz zu den grünen Schnittkäsen (pH 5,4) zurückzuführen. Die *Listeria*-Zellen werden beim Aufbringen auf die Käseoberfläche durch niedrige pH-Werte und hohe Salzkonzentration stärker subletal geschädigt, als dies bei höheren pH-Werten bei Schnittkäse der Fall ist. Für weitere Versuche wurde daher meist die Kombination Weichkäse und komplexe Reifungsflora gewählt.

Weiterhin kann auch die Bakteriocinaktivität durch die NaCl-Konzentration und den pH-Wert im Lebensmittel beeinflusst werden. GÄNZLE et al. (1999) konnten zeigen, daß die Aktivität von Sakacin P gegenüber *L. innocua* bei 6 %iger NaCl-Konzentration etwa acht mal stärker war als ohne NaCl-Zusatz. Weiterhin zeigten SCANELL et al. (1997), daß Nisin in Kombination mit 2 % Natrium-Lactat auf Brühwurst einen stärkeren Hemmeffekt gegen *Salmonella kentucky* und *Staphylococcus aureus* zeigte, als dies durch den alleinigen Einsatz von Nisin möglich war.

Auffällig war weiterhin, daß in der Regel auf den mit einer definierten Reifungskultur behandelten Käsen unabhängig von der Verwendung von *Lb. plantarum* ALC 01 die höchsten *Listeria*-Keimzahlen von über 10^8 KbE/cm² erreicht wurden, während die mit der komplexen, undefinierten Reifungskultur gereiften Käse deutlich niedrigere Keimzahlen aufwiesen. Ursache hierfür könnten wiederum die in Kap. 3.4 beschriebenen, von komplexen Oberflächenflore ausgehenden Hemmeffekte sein, die auch schon von EPPERT et al. (1997) beobachtet werden konnten. Unter diesen Aspekten ist es denkbar, daß Bakteriocinbildner, die in der Oberflächenflora von Käse vorkommen, am besten durch Zusammenwirken mit einer komplexen Oberflächenflora, innerhalb derer der antilisterielle Effekt verstärkt wird, *Listeria* deutlich hemmen können. Es muß aber auch in Betracht gezogen werden, daß das aufgebrachte Pediocin durch Proteasen auf der Käseoberfläche zerstört werden kann. Beispielsweise können Pepsin und Trypsin, die Pediocin inaktivieren (ENNAHAR et al., 1996), von coryneformen Bakterien produziert werden.

Bei Anfangskontaminationen im Bereich von ca. 2×10^2 - 4×10^3 KbE/ml Schmierlake wurde *Listeria* in einigen Versuchen (A1, A2) zwar nicht vollständig gehemmt, dennoch konnte eine sichtbare Reduktion (2 log-Einheiten) der Keimzahlen beobachtet werden.

Die Wirkungsweise von Bakteriocinen wird als „single-hit-Mechanismus“ beschrieben (TAGG et al., 1976). Nach der Bindung an die Zielzelle werden sie infolgedessen inaktiviert. Somit könnte die applizierte Menge an Pediocin AcH nicht ausreichend gewesen sein, um anfänglich hohe *Listeria*-Kontaminationen auf der Käseoberfläche zu eliminieren. Ein schneller Anstieg der Keimzahlen ist dann auf diejenigen Zellen zurückzuführen, die durch die anfängliche Konzentration an Pediocin nicht inaktiviert wurden. Andererseits könnten auch die Entwicklung von resistenten Mutanten ein Grund für den Keimzahlanstieg darstellen.

Mikroorganismen aus Lebensmitteln zeigen ein breites Spektrum an Resistenzantworten gegenüber natürlicherweise auftretenden und beabsichtigt zugegebenen antimikrobiell wirkenden Substanzen (BOWER und DAESCHEL, 1999). Die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Bakteriocinen kann einerseits durch die Zerstörung oder Inaktivierung des Bakteriocins durch extrazelluläre Moleküle wie Enzyme erfolgen, andererseits kann die Ursache aber auch in einem Bindungsdefekt an der Zielzelle oder einer Veränderung zellulären Rezeptoren liegen (REKHIF et al., 1994). So berichten bereits mehrere Autoren über die Ausbildung von resistenten *Listeria*-Stämmen gegenüber den von Milchsäurebakterien gebildeten Klasse IIa-Bakteriocinen (LARSEN und NØRRUNG, 1993; REKHIF et al., 1994). HOOVER et al. beobachteten bereits 1989 gegen die von *Pediococcus acidilactici* gebildete hemmende Substanz (vermutlich Pediocin PA-1) auftretende, offensichtlich resistente *L. monocytogenes*-Stämme. Der von CRANDALL und MONTVILLE (1998) beschriebene nisin-resistente *L. monocytogenes*-Stamm ATCC 700302 weist zusätzlich Kreuzresistenzen gegenüber Pediocin PA-1 und Leuconocin S auf.

Das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegenüber Bakteriocinen erfordert neue Konzepte zur Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in Rotschmierkäse. Besonders die große Gruppe der Klasse IIa-Bakteriocine bietet zahlreiche Möglichkeiten für die Kombination von verschiedenen Stämmen mit unterschiedlichen Bakteriocinen zu einer Schutzkultur (HANLIN et al., 1993). So konnten MULET-POWELL et al. (1998) bei der Kombination von je zwei von Milchsäurebakterien gebildeten Bakteriocinen zur

Hemmung von *Listeria* sowohl antagonistische als auch synergistische Effekte ermitteln. Vielversprechend erscheint dabei auch die Kombination eines Klasse IIa-Bakteriocins mit einem Bakteriocin, welches nicht dieser Klasse angehört (ENNAHAR et al., 1999). Verschiedene Autoren berichten von der Möglichkeit, bakterielle Stämme als Schutzkultur einzusetzen, die in der Lage sind, zwei oder mehr Bakteriocine zu bilden (BHUGALOO-VIAL et al., 1996; CASAUS et al., 1997; ENNAHAR et al., 1999). CASAUS et al. (1997) konnten bei der gleichzeitigen Verwendung der bakteriocid wirkenden Bakteriocine Enterocin A und B einen synergistischen Effekt bei der Abtötung von *Listeria* beobachten, während die Verwendung von nur einem der beiden Bakteriocine zu resistenten Zellen führte. Bislang gibt es jedoch keine Daten über die Anwendung von zwei verschiedenen Bakteriocinen in einem komplexen System zur Bekämpfung von *Listeria*.

Die teilweise erzielte Hemmung durch das Aufbringen des Pellets von ALC 01 kann möglicherweise auf eine Produktion von Pediocin *in situ* oder durch die Tatsache, daß die vor dem Aufbringen gebildete Pediocinmenge in ausreichender Menge an den Zellen haften blieb, erklärt werden. Diese Folgerung wird durch die Tatsache unterstützt, daß die *Lactobacillus*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt lediglich Werte von $1-8 \times 10^7$ KbE/cm² (durchschnittlich 4×10^7 KbE/cm²) erreichten und ein Wachstum dieses Stammes nicht beobachtet werden konnte.

Die Ursache für die unterschiedliche erzielten Hemmwirkungen innerhalb der Reifungsversuche kann unter Umständen auf die von der ALC 01-Kultur erzeugte Menge an Pediocin liegen. Laut Herstellerangaben (mündliche Mitteilung) können die einzelnen Produktionschargen Schwankungen aufweisen. Es konnte nachträglich jedoch nicht reproduziert werden, ob in Versuchen Chargen mit unterschiedlichen Aktivitäten verwendet wurden.

Durch die vorliegenden Versuche konnte auch gezeigt werden, daß die im VisStart® TW ALC 01- Medium enthaltenen Nährstoffe das Wachstum von *Listeria* auf der Käseoberfläche ganz offensichtlich begünstigen. Allerdings konnten aber wiederum bei der Anzucht in diesem Medium die höchsten Aktivitäten ermittelt werden. Die Aufreinigung und direkte Applikation von Pediocin AcH ohne das zur Anzucht von ALC 01 erforderliche Nährmedium auf die Käseoberfläche könnte eine Lösung dieses

Problemes darstellen – lt. §11 LMBG Zusatzstoffverbote ist die Zugabe von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln jedoch grundsätzlich verboten, während Mikroorganismen (und somit auch die von ihnen *in situ* gebildeten Bakteriocine) von dieser Regelung ausgenommen sind.

Mit den vorliegenden Versuchen konnte die Wirkung eines bacteriocinbildenden Stammes als Schutzkultur gegen geringe Kontaminationen mit *Listeria* im Notfall bestätigt werden. Allerdings stellt die Verwendung einer solchen Kultur keinen Ersatz für ausreichende Hygienekonzepte dar.

4.3 Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch Kombination von Rotschmierebakterien mit unterschiedlicher bacteriocinogener Aktivität

Die antilisterielle Wirkung der beiden Stämme *B. linens* M18 und *S. equorum* WS 2733 bei der Verwendung von Einstammkulturen zur Reifung von Rotschmierekäsen konnte bereits von EPPERT et al. (1997) und CARNIO et al. (2000) gezeigt werden. Da *S. equorum* WS 2733 gegenüber nahezu allen gram-positiven Bakterien, darunter auch *B. linens*, eine hemmende Wirkung aufweist (CARNIO et al., 2000), wurden die beiden Stämme in den Versuchen in variierenden Verhältnissen (1:10, 1:50) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Schmierens (*B. linens* Tag 1, 3, 5, 7; *S. equorum* Tag 10) auf die Käseoberfläche aufgebracht. In den ersten beiden Versuchen dominierte *S. equorum* WS 2733, im dritten Ansatz *B. linens* M18 auf der Käseoberfläche. Der Einsatz von *Arthrobacter*-Stämmen verursachte in zwei Versuchen eine Dominanz der verwendeten Stämme, die vermutlich für die starke Proteolyse verantwortlich gemacht werden können – ähnliche Entwicklungen konnten bereits von WERNEKKE (1996) beobachtet werden. Auch der aus Milch isolierte Stamm *M. lacticum* WS 1899 konnte sich auf der Käseoberfläche ebenfalls nicht durchsetzen. In keinem dieser gezeigten Versuche ist es gelungen, durch Kombination von zwei oder mehreren bacteriocinbildenden Stämmen aus verschiedenen Habitaten auf der Käseoberfläche ein stabiles Gleichgewicht dieser Stämme zu erzielen. In der Regel dominierten einer der eingesetzten Stämme. Die hierbei erzielte antilisterielle Wirkung war in keinem Fall stärker als zuvor bei der Verwendung von Einzelstämmen beobachtet werden konnte. Die Käse wiesen z.T. gravierende Reifungsfehler wie z. B. eine mangelnde Farbentwicklung oder starke Proteolyse auf. Teilweise mußten die Reifungsversuche vorzeitig abgebrochen werden.

Verschiedene Autoren (BHUGALOO-VIAL et al., 1996; BRURBERG et al. 1997; CASAUS et al., 1997; EIJSINK et al. 1998; HANLIN et al., 1993; QUADRI et al., 1994) berichten, daß durch den gleichzeitigen Einsatz von zwei Bakteriocinen ein größerer antibakterieller Effekt erzielt werden kann, als dies beim Einsatz einzelner Bakteriocine möglich ist. Allerdings handelt es sich dabei ausschließlich um die von Milchsäurebakterien gebildeten Bakteriocine. Über die erfolgreiche Kombination von Bakteriocinen coryneformer Bakterien zu einer funktionierenden Reifungskultur liegen bislang keine Daten vor.

Hingegen konnte durch die Kombination des Stammes *S. equorum* WS 2733 mit 7 anderen Stämmen aus dem gleichen Habitat (Raclette-Käse) erhebliche antilisterielle Effekte beobachtet werden. Außerdem war eine deutliche Hemmung durch die alleinige Verwendung der 7 Stämme ohne den Zusatz von *S. equorum* WS 2733 auffällig, die nicht auf das Vorhandensein von Bakteriocinen zurückgeführt werden kann.

4.4 Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch undefinierte komplexe Oberflächenkulturen

Verwendet man die Rotschmiere von verschiedenen industriell gefertigten Käsen für die Oberflächenbehandlung von unreifen Weichkäsen, so ergibt sich, daß die Entwicklung von *Listeria monocytogenes* WSLC 1364 je nach käserispezifischer Flora unterschiedlich lange verzögert bzw. begrenzt wird. Die gezeigten Hemmeffekte sind dabei abhängig von der Anfangskontamination und die betriebsspezifische unterschiedliche Wachstumshemmung ist reproduzierbar (die gezeigten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus jeweils zwei oder drei unabhängig voneinander durchgeführten Reifungsversuchen dar). Im Gegensatz zu den Daten von EPPERT et al. (1997) wurden die Listerien jedoch in keinem Fall vollständig von der Käseoberfläche eliminiert, sondern lediglich mehr oder weniger stark gehemmt. Die gewählten Anfangskontamination sind nicht exakt vergleichbar, da im Falle von EPPERT et al. die Listerien auf die Käseoberfläche aufgesprüht (ca. 10 KbE/cm^2), im vorliegenden Fall jedoch mit der kontaminierten Schmierlake ($2 \times 10^2 - 1,5 \times 10^4 \text{ KbE/ml}$) auf die Käseoberfläche aufgebracht wurden. Die Gründe für diese Hemmwirkung sind nach wie vor unklar. Ein Hinweis auf Stämme in diesem Ökosystem, die nicht kultivierbar und damit mit den üblichen Methoden nicht nachweisbar sind, konnte bislang nicht bestätigt

werden. Vielmehr konnten CARNIO et al. (1999) bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei Methoden (indirektes und direktes Verfahren) zur Keimzahlbestimmung der Oberflächenflora bei Rotschmierkäsen keinen Hinweis auf solche nicht kultivierbare Stämme finden. Bei der Betrachtung der aeroben Gesamtkeimzahlen fällt außerdem auf, daß die Floren mit den besten Hemmeffekten gleichzeitig auch mit die höchsten Gesamtkeimzahlen aufwiesen. Denkbar ist, daß das schnelle Anwachsen der Reifungsflora zur Ausbildung eines stabilen Ökosystemes auf der Käseoberfläche führt, in dem „Fremdkeime“ und somit Erreger wie z. B. *Listeria* keine oder nur schwer eine ökologische Nische finden können. Ganz allgemein müssen somit die vorliegenden Effekte auf andere hemmende Substanzen, unbekannte ökologische Wechselwirkungen, Nährstoffkompetition oder symbiotische Wechselwirkungen zurückgeführt werden.

4.5 Entwicklung definierter Mehrstamm-Reifungskulturen

Die Reifung von grünen Weichkäsen aus industrieller Produktion erfolgte mit den aus der Flora von einem französischen Raclettekäse und zwei deutschen Weichkäsen isolierten verschiedenen Bakterien- und Hefenstämmen („definierte Reifungsflora“). Die Käse wurden unter Laborbedingungen entsprechend der industriellen Käsereifung von Charge I bis Charge VI im Abstand von einer Woche „alt-jung-geschmiert“. Bei der Zusammensetzung einer definierten Reifungskultur kann nicht davon ausgegangen werden, daß sich die Stämme in dem gleichen Verhältnis auf der Käseoberfläche durchsetzen werden, wie sie ursprünglich in der Schmierlake vorhanden waren. Bei der Herstellung der Schmierlake sollten idealerweise sowohl die spezifischen Eigenschaften der Stämme, als auch mögliche Wechselwirkungen zwischen den Stämmen beachtet werden. Dazu muß die Entwicklung der Flora in Reifungsversuchen beobachtet werden.

Das Zerlegen einer komplexen Kultur in Einzelstämme, das anschließende Zusammensetzen der Kultur zu einer definierten Reifungsflora und die anschließende Reifung von Rotschmierkäse wurde bereits von BOCKELMANN et al. (1997b) durchgeführt. Hierbei wurden einzelne Bakterienstämme von der Oberfläche eines Tilsiterkäses isoliert und daraus mehrere definierte Reifungskulturen mit unterschiedlicher Florazusammensetzung hergestellt. Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf der typischen Aromabildung und charakteristischen Farbentwicklung für Tilsiterkäse. Die Entwicklung der Reifungsflora wurde hierbei nur sporadisch verfolgt.

Die Ergebnisse von BOCKELMANN et al. (1997b) zeigen, daß eine Reifung von typischen Tilsiterkäsen unter Laborbedingungen mit einer zufriedenstellenden Entwicklung der Oberflächenflora mit nur wenigen Stämmen grundsätzlich möglich ist. Probleme bereiteten jedoch auch hier Faktoren wie ein Auftreten von unerwünschten Schimmeln und makroskopische Reifungsfehler.

4.5.1 Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora „Raclette“

Für eine einwandfreie Reifung der Käse erwies sich die Kultur als ungeeignet. Es konnten Fehlfärbungen (blasses Aussehen, keine genügende Farbentwicklung) und Fehler bezüglich der Konsistenz (Randweiche, Blähen der Käse) beobachtet werden. Nach sechsmaligem Transfer der Flora von einer Käsecharge auf die nächste (Charge VI) setzte sich der größte Anteil der Schmierlake (78%) aus einer undefinierten Mikroflora zusammen, bei der es sich überwiegend um Enterobakterien, *Arthrobacter citreus/ sulfureus* und *Lactococcus lactis* handelte. Letztere wurden zu 100 % (100 Kolonien) auf grünen Käsen nachgewiesen, jedoch liegt die Vermutung nahe, daß sich ebenso Enterobakterien auf der Käsoberfläche der grünen Käse befanden, die unter den angewandten Methoden nicht erfaßt werden konnten. Enterobakterien können in Weichkäse nur unter großen Schwierigkeiten verhindert werden und sind grundsätzlich unerwünscht (BECKER und TERPLAN, 1987; BUSSE, 1989). Da alle Enterobakterien normalerweise durch eine ordnungsgemäße Pasteurisation der Käsereimilch abgetötet werden (RIEMELT et al., 1996; KESSLER, 1988), muß das Auftreten dieser Keime auf eine nachträgliche Rekontamination zurückgeführt werden.

Auffällig war weiterhin das plötzliche Auftreten von *Arthrobacter*-Spezies, die nicht zur ursprünglichen definierten Reifungskultur gehörten. Diese beiden Stämme müssen bereits auf den grünen Käsen zu einem sehr geringen Anteil angesiedelt gewesen sein und wurden erst nach Vermehrung nach einigen Wochen auf der Käsoberfläche nachgewiesen. Zudem stellt sich die Frage, ob diese *Arthrobacter* -Stämme widerstandsfähiger und anspruchsloser waren als die *Arthrobacter nicotianae* - Stämme der definierten Reifungskultur, die bereits zu einem frühen Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar waren. Eine Dominanz von *Arthrobacter* - Stämmen innerhalb der coryneformen Bakterien ist nicht ungewöhnlich. EL-ERIAN (1972), SAUTER (1986) und VALDES-STAUER et al. (1997) identifizierten die coryneforme Bakterienflora von Rotschmierkäsen überwiegend als *Arthrobacter sp.* So könnte auch die Aktivität von

Proteasen der Spezies *Arthrobacter* (SMACCHI et al., 1999) zu der fehlerhaften Konsistenz der Käse in diesem Versuch beigetragen haben.

Der Großteil (20%) der verbliebenen definierten Flora bestand aus der Spezies *Brachybacterium tyrofermentans*, welches von SCHUBERT et al. (1996) erstmals von der Oberfläche französischer Käse (Gruyère und Beaufort) isoliert wurde. Es handelt sich dabei um den Stamm F.08, der bereits in Versuch B3 vom selben Raclette-Käse einige Monate zuvor isoliert wurde und in Kombination mit sechs bzw. sieben anderen Stämmen in Reifungsversuchen antagonistische Wirkung gegen *Listeria* aufwies.

Bei der industriellen Produktion von Rotschmierkäse erfolgt für eine zufriedenstellende Rotfärbung der Käse in der Regel die Zugabe von kommerziell erhältlichen *B. linens*-Kulturen als Zusatz zum Schmierwasser. Der Anteil an *B. linens* an der Rotschmierflora macht dadurch bis zu 30% aus (EL-ERIAN, 1972; ELISKASES-LECHNER und GINZINGER, 1995a, SEILER, 1986). Diese Vorgehensweise konnte in den vorliegenden Versuchen nicht bestätigt werden. Zwar konnte durch den Zusatz von 10^8 *B. linens* - Zellen pro 100 ml Schmierlake in einer Charge der Anteil der orangefarbenen Kolonien auf der Käseoberfläche erhöht werden, jedoch konnte keine wesentlich intensivere Orangefärbung der Käseoberfläche beobachtet werden (siehe PRECHTER, 2000; Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer wichtiger Aspekt wurde bei der Reifung von Weichkäsen mit der Flora Raclette nicht berücksichtigt. Bei dem französischen Raclettekäse handelte es sich um einen halbfesten Schnittkäse. Die Zusammensetzung der Oberflächenflora verschiedener Käsesorten oder auch der gleichen Sorte unterschiedlicher Herkunft weist eine große Schwankungsbreite auf (PHILIPP, 1993). Offensichtlich herrschten auf der Oberfläche der Weichkäse für die Reifungskultur ungünstige Milieubedingungen.

4.5.2 Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora MB

Bei Käse MB handelte es sich um einen Weichkäse. Erwartungsgemäß konnte sich - gegenüber den für Raclette-Käse gezeigten Ergebnissen - die definierte Reifungsflora auf diesen Käsen durchsetzen und machte nach sechs Transfers noch 85% der ursprünglichen Flora aus. Einen Schwerpunkt bildeten dabei die Stämme *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Arthrobacter* sp. und *Corynebacterium ammoniagenes*.

Curtobacterium flaccumfaciens kommt auf Pflanzen vor und wird als pflanzenpathogenes Bakterium eingestuft (HOLT et al., 1994). Dieser Stamm wurde zwar von der Käseoberfläche des Rotschmierkäses isoliert, ist jedoch kein typisches Bakterium für Käse aber fand als obligat aerobes Bakterium auf der Käseoberfläche jedoch offensichtlich gute Wachstumsbedingungen vor. Die undefinierte Flora hatte am Ende der Reifung einen Anteil von 15% und setzte sich aus Enterobakterien und Enterokokken zusammen. Während Enterobakterien bei der üblichen Hitzebehandlung der Milch mit Sicherheit ausgeschaltet werden, können Enterokokken auch noch in pasteurisierter Milch nachgewiesen werden (ASPERGER, 1976). Nach ASPERGER (1976) sind *Enterobacteriaceae*n bei der Käsereifung kaum auszuschalten. Enterokokken treten durch ihr ubiquitäres Vorkommen häufig in großen Keimzahlen in Milchprodukten und anderen Nahrungsmitteln auf (GIRAFFA et al., 1997). Im Gegensatz zu den Milchsäurebakterien genießen Enterokokken zwar nicht den GRAS-Status („generally recognized as safe“), werden aber dennoch als Starterkulturen und Probiotika eingesetzt (GIRAFFA et al., 1997). Eine Reihe von Studien berichtet weiterhin von bakteriocinbildenden *Enterococcus*- Stämmen, die bereits zur Hemmung von *Listeria* bei der Reifung von Rotschmierkäse im Labor eingesetzt wurden (ENNAHAR et al., 2000; GIRAFFA, 1995). Ob im vorliegenden Fall die Bildung von Bakteriocinen durch Enterokokken eine Rolle spielt, wurde nicht überprüft.

4.5.3 Mehrstammkultur aus Isolaten der Flora WE

Bei den mit der Kultur WE gereiften Käsen war ebenso wie bei der Kultur Raclette eine nahezu vollständige Veränderung der Oberflächenflora zu beobachten. Während in Charge II noch 78% der Flora der definierten ursprünglichen Reifungskultur zuzuordnen waren, konnte im weiteren Verlauf der eine deutliche Abnahme auf 5% in Charge VI beobachtet werden. Der überwiegende Teil der Flora (41%) bestand aus der Spezies *Brachybacterium tyrofermentans*. Der Hauptanteil der nicht-definierten Flora wurde in Charge IV wiederum als *Enterococcus faecalis* (27%) und *Enterococcus flavescens* (21%) identifiziert. GIRAFFA et al. (1997) erwähnten, daß nach Angabe von einigen Autoren Enterokokken in Keimzahlen von 10^7 bis 10^8 KbE/cm² auftreten und in manchen Käsen offensichtlich erwünscht sind. Im vorliegenden Reifungsversuch handelte es sich allerdings um eine Kontamination, da die ursprüngliche Starterkultur keine Enterokokken enthielt.

4.5.4 Hemmung von *Listeria*

Beim Vorgang des Alt-Jung-Schmierens in der Käserei kommen die Käse, wenn eine Kontamination mit *Listeria* vorliegt, i. d. R. beim ersten Schmieren mit den unerwünschten Mikroorganismen in Kontakt. Die Käse wurden deshalb an Tag 1 mit *Listeria* kontaminiert, um den Bedingungen in der Praxis gerecht zu werden. Die Versuche D1 bis D3 veranschaulichen, welches Ausmaß eine einmalige Kontamination mit *Listeria* haben kann. In allen drei gezeigten Beispielen wurden hierbei Keimzahlen zwischen 10^6 und 10^8 *Listeria*-Zellen/cm² Käseoberfläche erreicht. Dabei fällt auf, daß die mit der Kultur Raclette gereiften Käse mit Werten bis max. 10^6 *Listeria*-Zellen/cm² um zwei Zehnerpotenzen niedriger lagen als die beiden anderen Kulturen. Die Kultur Raclette, bzw. sieben verschiedene aus der Kultur isolierte Stämme zeigten bereits in anderen Reifungsversuchen überdurchschnittlich gute hemmende Eigenschaften gegenüber *Listeria*, die nicht auf das Vorhandensein von Bakteriocinen zurückzuführen waren (siehe Kap. 4.4). Allen drei Ansätzen gleich ist die Beobachtung, daß mit höherer Chargenzahl (I - VI) ein Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen zu beobachten war. Durch das „Alt-Jung-Schmier“ der Käse wurden die Listerien mit der jeweiligen Schmierlake von einer Charge auf die nächste übertragen. Die *Listeria*-Keimzahlen in den Schmierlaken wurden in den Versuchen nicht ermittelt; dennoch liegt die Vermutung nahe, daß mit zunehmender Käsecharge eine höhere Kontamination mit *Listeria* vorlag, welches in höheren *Listeria*-Keimzahlen auf der Käseoberfläche resultierte. Zudem dürfte ein Adaptionsvorgang an niedrige pH-Werte und hohe Salzkonzentrationen ebenso zum starken Anstieg der *Listeria*-Keimzahlen beigetragen haben (BAYLES et al., 1996; GAHAN et al., 1996; JORGENSEN et al., 1995). Bei Untersuchungen zur Stressantwort von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln gelang BOLTON und FRANK (1999) in diesem Zusammenhang der Nachweis stress-adaptierter *Listeria*-Zellen auf Weichkäse.

Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Reifungsversuche D4 und D5: hier konnte nach Kontamination der ersten und sechsten Charge in Charge VI eine signifikante Reduktion der *Listeria*-Keimzahlen gegenüber der Charge I ermittelt werden. Die in ihrer Zusammensetzung veränderte Oberflächenflora der Charge VI muß demnach eine *Listeria*-hemmende Wirkung aufgewiesen haben. Dabei war die hemmende Wirkung der Flora MB deutlich stärker als die der Flora WE. Eine Bildung von Bakteriocinen kann als Ursache für diese Hemmwirkung ausgeschlossen werden. Die als Reifungskultur verwendeten Stämme wurden zuvor mittels „macrocolony-assay“ als Bakteriocin-negativ getestet, bzw. der einzige Stamm, der im Test eine geringe

Hemmwirkung aufwies, konnte in Charge VI nicht mehr nachgewiesen werden (siehe MAIER, 2000). Für die beobachteten Effekte kommen somit folgende Gründe in Erwägung gezogen werden:

- die verwendeten Stämme bilden auf der Käsoberfläche ein äußerst stabiles Ökosystem aus, bei dem ein Erreger wie beispielsweise *Listeria monocytogenes* keine ökologische Nische und damit keine Möglichkeit zur Vermehrung findet. Hierzu können auch hohe Oberflächen-Keimzahlen beitragen.
- von der Reifungskultur geht eine antagonistische Wirkung aus, die nicht auf der Bildung von Bakteriocinen beruht und die mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbar war.

Bereits in den Reifungsversuchen mit komplexen Oberflächenflore (C1-C3) konnte gezeigt werden, daß die komplexe Kultur MB einen stärkeren antilisteriellen Effekt aufweist als die komplexe Kultur WE. Dieses Phänomen konnte durch die vorliegenden Versuche auch für die aus den Einzelstämmen zusammengesetzte Kultur bestätigt werden. Der antilisterielle Effekt wird offenbar durch nur wenige Stämme der ursprünglichen Flora auf der Käsoberfläche verursacht. Hierdurch wird deutlich – wie auch schon von CARNIO et al. (1999) beschrieben, daß nicht-kultivierbare Bakterien für die antagonistische Wirkung von komplexen Oberflächenflore offensichtlich keine Rolle spielen. Die vorliegenden Ergebnisse können als Ausgangspunkt für die Entwicklung von definierten Reifungskulturen mit antilisteriellen Eigenschaften genutzt werden.

4.5.5 FT-IR-Spektroskopie

Bislang existierte keine zufriedenstellende Methodik, um die Entwicklung der Oberflächenflora von Rotschmierkäsen über einen längeren Zeitraum anhand einer großen Anzahl isolierter Stämme zu verfolgen. Mit Erstellung einer umfangreichen FT-IR-Spektrenreferenzdatenbank coryneformer Bakterien durch OBERREUTER et al. (2000) wird eine schnelle und eindeutige Identifizierung coryneformer Isolate möglich. Ausschlaggebend für den Erfolg dieser Versuche war hierbei die Tatsache, daß innerhalb kurzer Zeit mit vergleichsweise wenig Material- und Zeitaufwand eine große Anzahl an Stämmen identifiziert werden konnte (siehe: MAIER, 2000; PRECHTER, 2000).

Mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie war in der vorliegenden Arbeit eine Identifizierung auf Speziesebene möglich. Auf Stammebene war in einigen Fällen jedoch kein eindeutiges Ergebnis zu erzielen. Zudem war von entscheidender Bedeutung, wieviele und welche Bakterienstämme in der individuellen Bibliothek einer Käsesorte vorhanden waren. So bildete beispielsweise der als „*S. equorum* WS 2733“ aus der Raclette-Flora identifizierte Stamm nach Überprüfung kein Micrococcin. Die Identifizierung dieses Stammes ist damit davon abhängig, aus wievielen *S. equorum* -Stämmen die Bibliothek besteht. Folglich ist die Identifizierung des Stammes als „*S. equorum*“ vermutlich richtig, nicht aber „WS 2733“.

Die Entwicklung der definierten Bakterienflora während des gesamten Reifungsverlaufes der Käsechargen I - VI konnte durch eine Identifizierung der Bakterienflora von ausgewählten Schmierlaken überraschend gut verfolgt werden. Die Bakterienstämme der verschiedenen Schmierlaken konnten in den Dendrogrammen der definierten Bakterienflora einfach wieder zugeordnet werden. Die „nicht-definierten“ Bakterienstämme in den Schmierlaken wurden erwartungsgemäß als andere Spezies bzw. Stämme identifiziert. Da jedoch lediglich 100 Stämme identifiziert wurden, gaben die Ergebnisse nur einen groben Anhaltspunkt über die Florazusammensetzung bzw. die Anteile der einzelnen Bakterienstämme an der gesamten Bakterienflora wieder.

Im Vergleich zur Identifizierung von coryneformen Isolaten mit anderen Methoden wie z.B. der 16 S rRNA -Analyse, mit der bereits BOCKELMANN et al. (1997a) einzelne Stämme der Oberflächenflora von Tilsiterkäsen differenzierten, konnte in diesen Versuchen mit Hilfe der FT-IR-Spektroskopie mit geringerem Aufwand und in kürzerer Zeit bis zu 60 Stämme pro Arbeitstag unter idealen Bedingungen identifiziert werden.

4.6 Durchführung von Reifungsversuchen

Die Durchführung von Reifungsexperimenten mit Rotschmierkäsen unter den beschriebenen Bedingungen im Labor ist nach wie vor vergleichsweise material- und zeitaufwendig, dennoch bestätigen die Experimente die Vermutung, daß eine Entwicklung von Reifungskulturen nur mit Reifungsversuchen „in vivo“ selber möglich und effektiv sind. Die Reifungsversuche wurden unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Als mögliche Kontaminationsquelle sind die industriell bezogenen „grünen Käse“ jedoch nicht auszuschließen. Auf den mikrobiellen Status der Käserohlinge

konnte keinen Einfluß genommen werden, da diese erst nach dem Trockensalzen bezogen wurden. PRECHTER (2000) konnte bei der Identifizierung der Oberflächenflora der „grünen Käse“ mit Hilfe der FT-IR – Spektroskopie zeigen, daß die Flora der ungereiften Käse zu 100% aus *Lactococcus lactis* bestand. Es ist jedoch möglich, daß die Käseoberfläche auch mit weiteren Bakterien besiedelt war. Die Keimzahlen könnten jedoch zu gering gewesen sein, um bei der für die FT-IR-Messung ausgespatelten Verdünnung erfaßt zu werden. Eine Kontamination der Käserohlinge ist allerdings nicht auszuschließen (EPPERT, 1997), genausowenig wie eine Rekontamination im Labor durch ungenügend steriles Arbeiten ausgeschlossen werden kann. Ferner können äußere Faktoren, wie z.B. das Konstanthalten der Luftfeuchtigkeit in den Exsikkatoren bei der Reifung Probleme bereiten. Diese wurde in den Versuchen dieser Arbeit zwar durch Einbringen einer Kochsalzlösung im Exsikkator eingestellt, jedoch nicht überprüft. BOCKELMANN et al. (1997b) wiesen in ihren Arbeiten auf ähnliche Probleme hin, eine konstante relative Luftfeuchtigkeit über die gesamte Reifungsperiode aufrechtzuerhalten. Kleine Käse, die auch in dieser Arbeit für Reifungszwecke verwendet wurden, reagieren sehr empfindlich auf Schwankungen der relativen Luftfeuchtigkeit und sind somit schwierig handzuhaben.

Für eine Absicherung der in den Reifungsversuchen ermittelten Ergebnisse ist eine Reproduzierbarkeit unerlässlich. Zwar konnten die meisten der in dieser Arbeit gezeigten Daten in einem zweiten Versuch reproduziert werden, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß aufgrund der vielen variablen Parameter in einem Versuch eine Wiederholung mit den exakt selben Ergebnissen nur schlecht möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Käse nur nach makroskopischen Gesichtspunkten beurteilt. Neben diesen Eigenschaften müßten noch weitere wichtige Parameter, wie Geschmack oder Gehalt an bestimmten Inhaltsstoffen beurteilt werden, um beispielsweise eine definierte Reifungskultur als geeignet zu bewerten. Die durchgeführten Reifungsversuche stellen aber sicherlich einen guten Ansatz dar.

4.7 Ausblick

Eine Kombination verschiedener antimikrobiell wirkender Maßnahmen in subinhibitorisch wirkenden Konzentrationen für eine effektive Kontrolle von

Mikroorganismen in Lebensmitteln wird als Barrieren- oder Hürdenkonzept bezeichnet („multiple hurdle concept“, LEISTNER und GORRIS, 1995). Unter dem Begriff „Hürden“ werden dabei sowohl physikalische Faktoren wie Temperatur oder modifizierte Atmosphäre, als auch physikalisch-chemische Faktoren wie die Zusammensetzung des Produktes, Wasseraktivität, pH-Wert und Zusatzstoffe verstanden. Bei der gemeinsamen Anwendung dieser Faktoren kann es zu synergistischen Interaktionen kommen, die es möglich machen, dass die einzelnen Faktoren in niedrigeren Intensitäten angewendet werden können, als es beim alleinigen Einsatz der Fall wäre (MARTH, 1998). Unter diesen Gesichtspunkten kann durch die vorliegenden Versuche die Wirkung eines bacteriocinbildenden Stammes als Schutzkultur gegen geringe Kontaminationen mit *Listeria* im Notfall bestätigt werden. Allerdings stellt die Verwendung einer solchen Kultur keinen Ersatz für ausreichende Hygienekonzepte dar. Da es bei der längerfristigen Anwendung von Schutzkulturen in Betrieben zur verstärkten Ausbildung und Vermehrung von resistenten *Listeria*-Stämmen kommen kann, müssen neue Konzepte zur Bekämpfung des Krankheitserregers geschaffen werden. Dazu gehören beispielsweise der alternierende oder gleichzeitige Einsatz verschiedener Bacteriocinbildner.

Die antagonistische Wirkung von komplexen Oberflächenkulturen konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, deren Mechanismen allerdings nicht geklärt werden. Nach wie vor ist unklar, welche ökologischen Wechselwirkungen in einem komplexen System wie der Oberfläche von Rotschmierekäse herrschen. Allerdings konnte gezeigt werden, daß eine Kombination von Stämmen aus einem Habitat (Käsesorte) ebensolche antagonistische Wirkungen aufweisen kann, die nicht auf das Vorhandensein von Bacteriocinen zurückzuführen sind. Dagegen lieferte die Kombination verschiedener bacteriocinbildender Stämme aus verschiedenen Habitaten kein verwertbares Ergebnis.

Selbst wenn eine aus Einzelstämmen aus einem Habitat zusammengesetzte, definierte Kultur keine hemmenden Effekte gegenüber *Listeria* zeigt, so ermöglicht die Verwendung einer solchen Kultur zumindest die Herstellung eines qualitativ hochwertigen, listeriengeschützten Produktes und stellt andererseits einen vielversprechenden Ansatz zur Sanierung einer listerienkontaminierten Produktionslinie mit Erhalt der typischen Hausflora dar.

5 Literaturverzeichnis

- Abee, T., L. Krockel, C. Hill. 1995.** Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- Asperger, H. 1976.** Enterobacteriaceen und Enterokokken als Hygieneindikatoren. *Milchwirt. Berichte* 49, 261-268.
- Asperger, H., H. Heistingering. 1998.** Zur Bedeutung des Salzbadens für das Vorkommen von Listerien in Käse. *Dtsche. Milchwirtsch.* 3, 108-111.
- Aureli, P., G.C. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L. Leone, S. Salmaso. 2000.** An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342(17), 1236-1241.
- Batt, C. 1999.** *Listeria* not gone, not forgotten. *Food Microbiol.* 16, 103.
- Barry, A.L. 1980.** Procedure for testing antibiotics in agar media: theoretical considerations. S. 1-23. In: Lorian, V. (Hrsg.): *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Bayles, D.O., B.A. Annous, B.J. Wilkinson. 1996.** Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1116-1119.
- Becker, H. und Terplan, G. 1987.** Bedeutung und Systematik von *Enterobacteriaceae* in Milch und Milchprodukten. *Dtsche. Molkereizeitung* 8: 204-210.
- Beckers, H.J., P.S.S. Soentoro, E.H.M. Delfgou-van Axx. 1987.** The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 249-256.
- Bhugaloo-Vial, P., X. Dousset, A. Métivier, O. Sorokine, P. Anglade, P. Boyaval, D. Marion. 1996.** Purification and amino acid sequences of pisciocins V1a and V1b, two class IIa secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4410-4416.
- Bille, J. 1990.** Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller, Smith & Somkuti (eds.). *Foodborne listeriosis*. Amsterdam
- Bockelmann, W., U. Krusch, G. Engel, N. Klijn, G. Smit, K.J. Heller. 1997a.** The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Nahrung* 41, 208-212.
- Bockelmann, W., T. Hoppe-Seyler, U. Krusch, W. Hoffmann, K.J. Heller. 1997b.** The microflora of Tilsit cheese. Part 2. Development of a smear starter culture. *Nahrung* 41, 213-218.
- Bolton, L.F., J.F. Frank. 1999.** Simple method to observe adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 350-353.
- Bower, C.K., M.A. Daeschel. 1999.** Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 33-44.
- Breer, C. 1986.** Das Vorkommen von Listerien in Käse. *Proceedings of the 2nd World congress foodborne infections and intoxications*, Berlin. Vol. I, 230-233.

- Breer, C., K. Schopfer.** 1988. *Listeria* and food. Lancet i, 1022.
- Brurberg, M.B., I.F. Nes, V.G.H Eijsink.** 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. Mol. Microbiol. 26, 347-360.
- Busse, M.** 1990. Listerien Prophylaxe. Eur. Dairy Magazine. 1, 66-72.
- Busse, M.** 1989. Die Oberflächenflora von geschmiertem Käse. Milchwirt. Berichte 99, 137-141.
- Bycroft, B.W., M.S. Gowland.** 1978. The structures of the highly modified peptide antibiotics Micrococcin P₁ and P₂. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 256-258.
- Canillac, N., A. Mourey.** 1993. Sources of contamination by *Listeria* during the making of semi-soft surface-ripened cheese. Sciences des Aliments 13: 533-544.
- Carnio, M.C., I. Eppert, S. Scherer.** 1999. Analysis of the bacterial surface ripening flora of german and french smeared cheese with respect to their anti-listerial potential. Int. J. Food Microbiol. 47, 89-97.
- Carnio, M. C., A. Höltzel, M. Rudolf, T. Henle, G. Jung, S. Scherer.** 2000. The macrocyclic peptide antibiotic Micrococcin P₁ is secreted by the food-borne *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2378-2384.
- Casaus, P., T. Nilsen, L.M. Cintas, I.F. Nes, P.E. Hernandez, H. Holo.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology 143, 2287-2294.
- Chen, Y., R. Shapira, M. Eisenstein, T.J. Montville.** 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. Appl. Environ. Microbiol. 63, 524-531.
- Cheroutre-Vialette, M., I. Lebert, M. Hebraud, J.C. Labadie, A. Lebert.** 1998. Effects of pH or a_w stress on growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 42, 71-77.
- Chikindas M.L., K. Vendema, A.M. Ledebøer, G. Venema, J. Kok.** 1995. Expression of lactococcin and pediocin PA-1 in heterologous hosts. Lett. Appl. Microbiol. 21, 183-189.
- Choisy, C., M. Gueguen, L. Lenoir, L.L. Schmidt, C. Tourneur.** 1987. The ripening of cheese: Microbiological aspects in cheesemaking. In: Eck, A. (Hrsg.). Cheesemaking. Science and Technology, Lavoisier publishing, Frankreich.
- Cole, M.B., M.V. Jones, C. Holyoak.** 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 69, 63-72.
- Comi, G., C. Cantoni, M. Valenti, M. Civilini.** 1990. *Listeria* species in Italian cheese. Microbiol. Aliments Nutr. 8, 377-382.
- Crandall A.D., T.J. Montville.** 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. Appl. Environ. Microbiol. 64, 231-237.
- Curtis, G.D.W., G. Mitchell, A.F. King, E.J. Griffin.** 1989. A selective differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 8, 95-98.
- Datta, A.R., B.W. Wentz, W.E. Hill.** 1988. Identification and enumeration of beta-hemolytic *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated dairy products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 673-675.

- De Man, J.D., M. Rogosa, M.E. Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bact. 23, 130-135.
- Dulmovits, A.** 1993. Käsebehandlung-Herstellung von Rotschmierekäse. Milchwirt. Berichte 114: 27-29.
- Eijsink, V.G.H., M. Skeie, P.H. Middelhoven, M.B. Brurberg, I.F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3275-3281.
- El-Erian, A.F.M.** 1972. Bacteriological studies on Limburger cheese. PhD-Thesis. Neth. Milk Dairy J. 26, 113-116.
- Eliskases-Lechner, F. W. Ginzinger.** 1995a. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. Lait 75, 571-583.
- Elsser, D.** 1997. Minimierung des Hygienerisikos durch toxiinfektiöse und toxinogene Bakterien bei nitritverminderten Brühwurstzeugnissen durch den Einsatz von Schutzkulturen. Dissertation. Institut für Ernährungswissenschaften, Technische Universität München.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Sorokine, A. van Dorsselaer, F. Bringel, J.-C. Hubert, C. Hasselmann.** 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4381-4387.
- Ennahar, S., O. Assobhei, C. Hasselmann.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. J. Food Prot. 61, 186-191.
- Ennahar, S., K. Sonomoto, A. Ishizaki.** 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. J. Biosci. Bioeng. 87, 705-716.
- Ennahar, S., N. Deschamps.** 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 88, 449-457.
- Eppert, I.,** 1997. Antilisterielle Wirkung von coryneformen Bakterien auf Rotschmierekäsen. Dissertation. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.
- Eppert, I., E. Lechner, R. Mayr, S. Scherer.** 1995. Listerien und coliforme Keime in „echten“ und „fehldeklarierten“ Rohmilchweickäsen. Arch. Lebensmittelhyg. 4, 85-88.
- Eppert, I., N. Valdes-Stauber, H. Götz, M. Busse, S. Scherer.** 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4812-4817.
- Europäische Kommission.** 1999. Stellungnahme des Scientific Committee on Veterinary Measures, Relating to Public Health zu *Listeria monocytogenes*, Brüssel 23. Sept. 1999.
- Farber, J.M. P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55, 476-511.
- Farber, J.M., M.A. Johnson, U. Purvis, A. Loit.** 1987. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 5, 157-163.
- Feder, H.** 1981. Zum Keimprofil des Sauermilchkäses und des Ausgangsproduktes Sauermilchquark. Dtsch. tierärztl. Wschr. 88, 30-31.

- Gahan, C.G.M., B. O`Driscoll, C. Hill. 1996.** Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3128-3132.
- Gänzle, M. G., S. Weber, W. P. Hammes. 1999.** Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 207-217.
- Giraffa, G. 1995.** Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12, 291-299.
- Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E. 1997.** *Enterococci* isolated from dairy products: A review of risks and potential technological use. *J. Food Protect.* 6: 732-738.
- Gledel, J. 1988.** *Listeria* and the dairy industry in France. S. 73-82. In: Proc. of a Symp. on Foodborne Listeriosis, Wiesbaden, FRG, Sept.7, 1988. B. Behr's Verlag GmbH & Co, Hamburg.
- Goebel, W., T. Chakraborty, E. Domann, S. Köhler, M. Kuhn, M. Leimeister-Wächter, Z. Sokolovic, M. Wuenschler. 1991.** Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. *Infection* 19, Suppl. 4, 195-197.
- Graves, L.M., B. Swaminathan, S. Hunter. 1999** Subtyping *Listeria monocytogenes*. S. 279-298. In: *Listeria, Listeriosis, und Food Safety.* E.T. Ryser und E.H. Marth (Hrsg). Marcel Dekker, New York.
- Gray, H.L., H.H. Killinger. 1966.** *Listeria monocytogenes* and listeric infection. *Bacteriol. Rev.* 30, 309-382.
- Greenwood, M.H., D. Roberts, P. Burden. 1991.** The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 197-206.
- Hahn, G., P. Hammer. 1990.** Listerien-freie Käse - höhere Sicherheit für den Verbraucher. *Dtsch. Milchwirtsch.* 33, 1120-1125.
- Hanlin, M.B., N. Kalchayanand, P. Ray, B. Ray. 1993.** Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antimicrobial activity. *J. Food Protect.* 56, 252-255.
- Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn, D. Naumann. 1991.** Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* 13, 69-79.
- Henderson, J.T., A.L. Chopko, P.D. van Wassenaar. 1992.** Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 5-12.
- Henry, B. S. 1933.** Dissociation in the genus *Brucella*. *J. Infect. Dis.* 52, 374-402.
- Hof, H., J. Rocourt. 1992.** Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? *Int. J. Food Microbiol.* 16, 173-182.
- Hof, H. 1999.** Listeriose - Was Ärzte über Infektionsrisiken und Erkrankung wissen sollten. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz.* 7, 558-561.
- Hof, H., H.P.R. Seeliger, A. Schrettenbrunner, S. Chatzipanagiotou. 1986.** The role of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in foodborne infections. S. 220-223. Proc. 2nd World Congr. Foodborne Infections and Intoxications. Institute of Veterinary Medicine. Robert von Ostertag- Institut, Berlin.

- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994.** *Curtobacterium* sp. S. 576. In: Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Band 2, 8. Aufl. Williams and Wikins, Baltimore, USA
- Holzappel, W.H., R. Geisen, U. Schillinger. 1995.** Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J of Food Microbiology* 24, 343-362.
- Hoover, D.G. 1993.** Bacteriocins with potential for use in foods. In: *Antimicrobials in Foods*, S. 411. P. M. Davidson, A. L. Branen (Hrsg.), Marcel Dekker, New York.
- Hoover, D.G., K.J. Dishart, M.A. Hermes. 1989.** Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnol.* 3(2), 183-196.
- Horn, N., M.I. Martinez, J.M. Martinez, P.E. Hernandez, M.J. Gasson, J.M. Rodriguez, H.M. Dodd. 1998.** Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 818-823.
- Huelphers, G. 1911.** Lefvernekros hos kanin orsakad af en ej förut beskrifven bakterie. *Svensk Vet. Tidskr.* 16: 265-273.
- Hunger, W. 1986.** Äsculin-Cellobiose-Agar für die Isolierung und Keimzahlbestimmung von *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft* 41: 283-285.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, B. Ray. 1995.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
- Jay, J. M. 1991** Foodborne Listeriosis, In: *Modern Food Microbiology*, 4. Aufl., Van Nostrand Reinhold, New York, USA, S. 510-552.
- Jones, D., R. Keddie. 1986.** Genus *Brevibacterium*, S. 1301 – 1313. In: Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Band 2, 8. Aufl. Williams and Wikins, Baltimore, USA.
- Jorgensen, F., P.J. Stephens, S. Knochel. 1995.** The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 274-281.
- Kaiser, A.L., T.J. Montville. 1997.** Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4529-4535.
- Kammerlehner, J. 1986.** Labkäse-Technologie, Band I, Fachbuch aus der Schriftenreihe „molkereitechnik“ Band 74/75. Gelsenkirchen-Buer.
- Kang, D.-H., D.Y.C. Fung. 1998.** Isolation and characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocin active against *Listeria monocytogenes* with microtiter plate method. *Food Sci. Biotechnol.* 7, 172-176.
- Kessler, W. 1988.** Möglichkeiten der Rekontamination bei der Weichkäseherstellung. *Dtsche. Molkereizeitung* 27, 826-832.
- Klaenhammer, T. R. 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39-86.
- Krämer, J. 1997.** *Lebensmittelmikrobiologie*. 3. Aufl. Ulmer, Stuttgart.

- Kreft, J. 1992.** *Listeria monocytogenes* - ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. BioEngineering 1, 65-71.
- Kümmerle, M., S. Scherer, H. Seiler. 1998.** Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2207-2214.
- Kuhn, M., W. Goebel. 1999** Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, und Food Safety*. Ryser, E.T., und Marth, E.H. (Hrsgb). New York: Marcel Dekker, S. 97-130.
- Larsen, A.G., B. Nørrung. 1993.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A , a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. Lett. Appl. Microbiol. 17, 132-134.
- Leistner, L., L.G.M. Gorris. 1995.** Food preservation by hurdle technology. Trends Food Sci. 6, 41-46.
- Loessner, M. J. 1991.** Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. Appl. Environ. Microbiol. 57, 882-884.
- Loessner, M.J., M. Busse. 1990a.** Bacteriophage typing of *Listeria* species. Appl. Environ. Microbiol. 56,1912-1918.
- Loessner, M.J., M. Rudolf, S. Scherer. 1997.** Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2961-2965.
- Loncarevic, S., M. Danielsson-Tham, W. Tham . 1995.** Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. Int. J. Food Microbiology 26, 245-250.
- Loncarevic, S., E. Bannermann, J. Bille, M. Danielsson-Tham, W. Tham. 1998.** Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. Food Microbiology 15, 521-525.
- Lovett, J., I. V. Wesley, M. J. Vandermaaten, J. G. Bradshaw, D. W. Francis, R. G. Crawford, C. W. Donnelly, J. W. Messer. 1990.** High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. 53, 734-738.
- Maier, B. 2000.** "Alt-Jung-Schmierer" bei Rotschmiereweichkäse mit drei verschiedenen komplexen Reifungsfloren. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.
- Maisnier-Patin, S., J. Richard. 1995.** Activity and purification of Linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1847-1852.
- Marth, E.H. 1998.** Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. Food Technol. 52, 57-62.
- Martin, F.; K. Friedrich, F. Beyer, G. Terplan. 1995.** Antagonistische Wirkungen von *Brevibacterium linens*-Stämmen gegen Listerien. Arch. Lebensmittelhyg. 46, 1-24.
- Mayr-Harting, A., A.J. Hedges, R.C.W. Berkeley. 1972.** Methods for studying bacteriocins. In *Methods in Microbiology*, pp. 318-320. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. NY: Academic Press
- McLauchlin, J. 1993.** Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Environ. Policy Practice. 3.

McLauchlin, J., A. Audurier, A. Frommelt, P. Gerner-Smidt, Ch. Jacquet, M.J. Loessner, N. van der Mee-Marquet, J. Rocourt, S. Shah, D. Wilhelms. 1996. WHO study on subtyping of *Listeria monocytogenes*: Results of phage typing. Int. J. Food Microbiol. 32, 289-299.

Michard, J., N. Jardy, J.L. Gey. 1989. Enumeration and localization of *Listeria monocytogenes* in soft surface-ripened cheese made from raw milk. Microbiol. Aliments Nutr. 7, 131-137.

Motlagh, A.M., A.K. Bhunia, F. Szostek, T.R. Hansen, B. Ray. 1992. Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH-producing) in *Pediococcus acidilactici* H. Lett. Appl. Microbiol. 15, 45-48.

Müller, G., H. Weber, H., unter Mitarbeit von Müller, C. 1996. Grundlagen. Mikrobiologie der Lebensmittel. 8. Auflage, Hamburg. Behr's Verlag: 389.

Mulet-Powell, N., A.M. Lacoste-Armynot, M. Vinas, M. Simeon de Buochberg. 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactid acid bacteria. J. Food Protect. 61, 1210-1212.

Muriana, P. M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in foods. J. Food Protect. Suppl. 54-63.

Murray, E.G.D., R.E. Webb, M.B.R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29, 407.

Oberreuter, H., H. Seiler, S. Scherer. 2000. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier-transformed infrared (FT-IR) spectroscopy. Int. J. Systematic. Evolution. Microbiol. (zur Publikation eingereicht).

Oberreuter, H. 2000. Mündliche Mitteilung. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.

Oblinger, J.L., J.A. Koburger. 1984. The most probable number technique., S. 99-111. In: M.L. Speck (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association, Washington, D.C.

Palsson, P. A. 1963. Relation of silage feeding to listeric infection in sheep. In: Gray, M. L. (Hrsg.) 2nd Symposium of Listeric infection, Montana State Coll., 73-84.

Philipp, S. 1993. Einsatz von Reinkulturen bei der Reifung von Rotschmierkäsen. Milchwirt. Berichte 114, 33-35.

Piard, J.-C., M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactid acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait 72, 113-142.

Pini, P. N., R. J. Gilbert .1988. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6, 317-326.

Prechter, B. 2000. "Alt-Jung-Schmierer" von Weichkäsen mit einer komplexen Raclette-Flora. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.

Quadri, L.E.N., M. Sailer, K.L. Roy, J.C. Vederas, M.E. Stiles. 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. J. Biol. Chem. 269, 12204-12211.

- Rekhif, N., A. Atrih, G. Levebre. 1994.** Selection and spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Current Microbiol.* 28, 237-241.
- Reps, A. 1987.** Bacterial surface-ripened cheeses. S. 151-184. In: P. F. Fox (Hrsg.) *Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2: Major Cheese Groups.* Elsevier Applied Science, London.
- Riemelt, I.[Hrsg.], Bartel, B., Malczan, M. 1996.** *Milchwirtschaftliche Mikrobiologie.* 1. Auflage, Hamburg, Behr's Verlag.
- Rocourt, J. 1991.** Human Listeriosis – 1989. WHO/ HPP/ FOS/ 91.3, World Health Organization, Genf.
- Rocourt, J. 1994.** *Listeria monocytogenes: the State of the Science.* Dairy, Food and Environmental Sanitation 14, 70-82.
- Rocourt, J., P.A.D. Grimont. 1983.** *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 866-869.
- Rocourt, J., R. Brosch. 1991.** Human Listeriosis – 1990. WHO/ HPP/ FOS/ 91.3
- Rocourt, J., P. Boerlin, F. Grimant, C. Jaquet, J.C. Piffaretti. 1992.** Assignment of *L. grayi* and *L. murrayi* to a single species, *L. grayi*, with a revised description of *L. grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 171-174.
- Rocourt, J., P. Cossart. 1997.** Foodborne pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* Doyle, M.P., Beuchat, L.R., und Montville, T.J. (Hrsg). Washington, D.C., USA: ASM Press, S. 337-352.
- Rodriguez, E., J. Tomillo, M. Nunez, M. Medina. 1997.** Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. *J. Appl. Microbiol.* 83, 389-395.
- Rørvik, L.M., M. Yndestad. 1991.** *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 97-104.
- Rudolf, M., S. Scherer. 2000.** Incidence of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in acid curd cheese. *Arch. Lebensmittelhyg.* 51, 118-120.
- Rudolf, M., S. Scherer. 2000.** High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int. J. Food Microbiol.* (im Druck).
- Ryser, E.T., S. Maisnier-Patin, J.J. Gratadoux, J. Richard. 1994.** Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 21, 237-246.
- Ryser, E.T. 1999.** Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. S. 411-503. In: E.T. Ryser E.H. Marth (Hrsg.). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety,* Marcel Dekker, New York.
- Sahl, H. G. 1994.** Staphylococcin 1580 is identical to the lantibiotic epidermin: Implications for the nature of bacteriocins from gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 752-755.
- Sahl, H. G., H. Brandis. 1981.** Production, purification and chemical properties of an anti-staphylococcal agent produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* 127, 377-384.

Sauter, H. 1986. Die Oberflächenflora von Weinkäse - Reifungsfehler und ihre Ursachen. Dissertation. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan. Technische Universität München.

Saxbe, W.B.Jr. 1972. *Listeria monocytogenes* and the Queen Anne. Pediatrics. 49, 97-101.

Scanell, A.G.M., C. Hill, D.J. Buckely, E.K. Anrendt. 1997. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage. J. Appl. Microbiol. 83, 407-412.

Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower, S. E. Johnson, E. S. Nicholls, C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. New. Engl. J. Med. 308, 203-206.

Schubert, K., W. Ludwig, N. Springer, R.M. Kroppenstedt, J.P. Accolas, F. Fiedler. 1996. Two coryneform bacteria isolated from the surface of French Gruyère and Beaufort cheese are new species of the genus *Brachybacterium*: *Brachybacterium alimentarium* sp. nov. and *Brachybacterium tyrofermentans* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol. 1, 81-87.

Schved, F., A. Lalazar, Y. Henis, B.J. Juven. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 74,; 67-77.

Schved, F. A. Lalazar, P. Lindner, B.V. Juven. 1994. Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. Lett. Appl. Microbiol. 19, 281-183.

Seeliger, H. P. R. 1981. Nonpathogenic listeriae: *L. innocua* sp. n. Zbl. Bakt. Parasit. Infect. I. Abt. Orig. A. 249: 487-493.

Seeliger, H.P.R. 1989. *Listeria monocytogenes*. Forum Mikrobiologie 6: 300-305.

Seeliger, H. P. R., J. Rocourt, A. Schrettenbrunner, P.A.D. Grimont, D. Jones. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 336-337.

Seeliger, H.P.R., D. Jones. 1986. Genus *Listeria*. S. 1235-1237. In: Sneath, P.H., N.S. Mair, M.E. Sharp, J.G. Holt (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Band 2, 8. Aufl. Williams and Wikins, Baltimore, USA

Seiler, H. 1986. Identification of cheese smear coryneform bacteria. J. Dairy Research 53, 439-449.

Slutsker, L., A. Schuchat. 1999. Listeriosis in humans. In: *Listeria, Listeriosis, und Food Safety*. Ryser, E.T., und Marth, E.H. (Hrsg). New York: Marcel Dekker, S. 75-95.

Smacchi, E., P.F. Fox, M. Gobbetti. 1999. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. FEMS Microbiol. Lett. 170, 327-333.

Song, H., J. Richard. 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. Int. J. Food Microbiol. 36, 155-161.

Steffan, S. 2000. Hemmung von *Listeria monocytogenes* auf Rotschmierekäsen durch einen pediocinbildenden *Lactobacillus plantarum* -Stamm. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.

- Sulzer, G., M. Busse. 1991.** Growth inhibition of *Listeria* spp. on camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Food. Microbiol.* 14, 287-289.
- Swaminathan, B., P.S. Hayes, V.A. Przybyszewski, B.D. Plikaytis. 1988.** Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 664-668.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani, L. W. Wannamaker. 1976.** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40, 722-756.
- Terplan, G., R. Schoen, W. Springmeyer, I. Degle, H. Becker. 1986.** Occurrence, behaviour and significance of *Listeria* in milk and dairy products. (Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten.) *Arch. Lebensmittelhyg.* 37, 131-137.
- Terplan, G., W. Schoen, W. Springmeyer, I. Degle, H. Becker. 1989.** *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten. *Dtsch.Molkereizeitung.* 41, 1358-1368.
- Terplan, G., S. Steinmeyer, H. Becker, K. Friedrich. 1990.** Nachweis von Listerien in Milch und Milchprodukten - ein Beitrag zum Stand 1990. *Arch. Lebensmittelhyg.* 41, 97-128.
- Tran, T.T., A.D. Hitchins. 1996.** Evaluation of selective enrichment most probable number enumeration method for viable *Listeria* spp. in dairy products. *J. Food Protect.* 59, 928-931.
- Unnerstad, H., E. Bannermann, J. Bille, M. Danielsson-Tham, E. Waak, W. Tham. 1996.** Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Neth. Milk Dairy J.* 50, 493-499.
- Valdés-Stauber, N., H. Götz, M. Busse. 1991.** Antagonistic effects of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 119-130.
- Valdes-Stauber, N., S. Scherer. 1994.** Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3809-3814.
- Valdes-Stauber, N., S. Scherer. 1996.** Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocine gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1283-1286.
- Valdes-Stauber, N., S. Scherer, H. Seiler. 1997.** Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface flora of red smear cheese. *Int. J. Food. Microbiol.* 34, 115-129.
- VDM – Verband der deutschen Milchwirtschaft. 1999a.** Nachweis von *Listeria monocytogenes*. *VDM - Schnellmitteilungen* 24/99, 4.
- VDM - Verband der deutschen Milchwirtschaft.. 1999b.** Nachweis von *Listeria monocytogenes* jetzt auch in deutschem Käse. *VDM - Schnellmitteilungen* 51/99, 10.
- Vierling-Drewes, B. 1993.** Oberflächenkulturen in Käsereien. *Milchwirt. Berichte* 114: 30-32.
- Weber, A., C. Baumann, J. Potel, H. Friess. 1988.** Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in cheese. (Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* in Käse). *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 101, 373-375.
- Wernecke, B. 1996.** Antilisterielle Wirkung von coryneformen Bakterien auf Rotschmierekäsen. Diplomarbeit. Institut für Mikrobiologie, Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan, Technische Universität München.

Anhang 1:

FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme der Reifungskultur Raclette

Stamm	FT-IR-Identifizierung
BP 1	<i>Brevibacterium linens</i>
BP 2	<i>Kocuria varians</i>
BP 3	<i>Staphylococcus klossii/ gallinarum</i>
BP 4	<i>Kocuria varians</i>
BP 5	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
BP 6	<i>Micrococcus freudenreichii</i>
BP 7	<i>Micrococcus freudenreichii</i>
BP 8	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
BP 9	<i>Klebsiella sp.</i>
BP 10	<i>Arthrobacter nicotianae</i>
BP 11	Coryneformes Bakterium, nicht identifizierbar
BP 12	<i>Staphylococcus equorum</i>
BP 13	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
BP 14	<i>Corynebacterium variabilis</i>
BP 15	Coryneformes Bakterium, nicht identifizierbar
BP 16	Gramnegatives Bakterium, nicht identifizierbar
BP 17	<i>Staphylococcus pulverii</i>
BP 18	Coryneformes Bakterium, nicht identifizierbar
BP 19	<i>Brachybacterium tyrofermetans</i> „F.08“
BP 20	<i>Micrococcus freudenreichii</i>
BP 21	aus der Gruppe der Mikrokokken
BP 22	<i>Enterococcus faecalis</i>

Anhang 2:

FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme der Reifungskultur MB

Stamm	Hit-Qualität	FT-IR-Identifizierung
MB 5	1,5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
MB 6	1,7	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
MB 7	3,8	Keine eindeutige Identifizierung
MB 8	1,7	<i>Arthrobacter</i> sp.
MB 9	1,5	<i>Rathayibacter rathayi</i>
MB10		keine Identifizierung möglich ^a
MB 11	0,6	<i>Microbacterium oxidans</i>
MB 12	5,6	Keine eindeutige Identifizierung
MB 13	0,7	<i>Brevibacterium linens</i>
MB 14	0,2	<i>Corynebacterium variabilis</i>
MB 15	0,7	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>
MB 16		keine Identifizierung möglich ^a

^a kein Wachstum auf CaSo-Agar

Anhang 3:

FT-IR- Identifizierung der Bakterienstämme der Reifungskultur WE

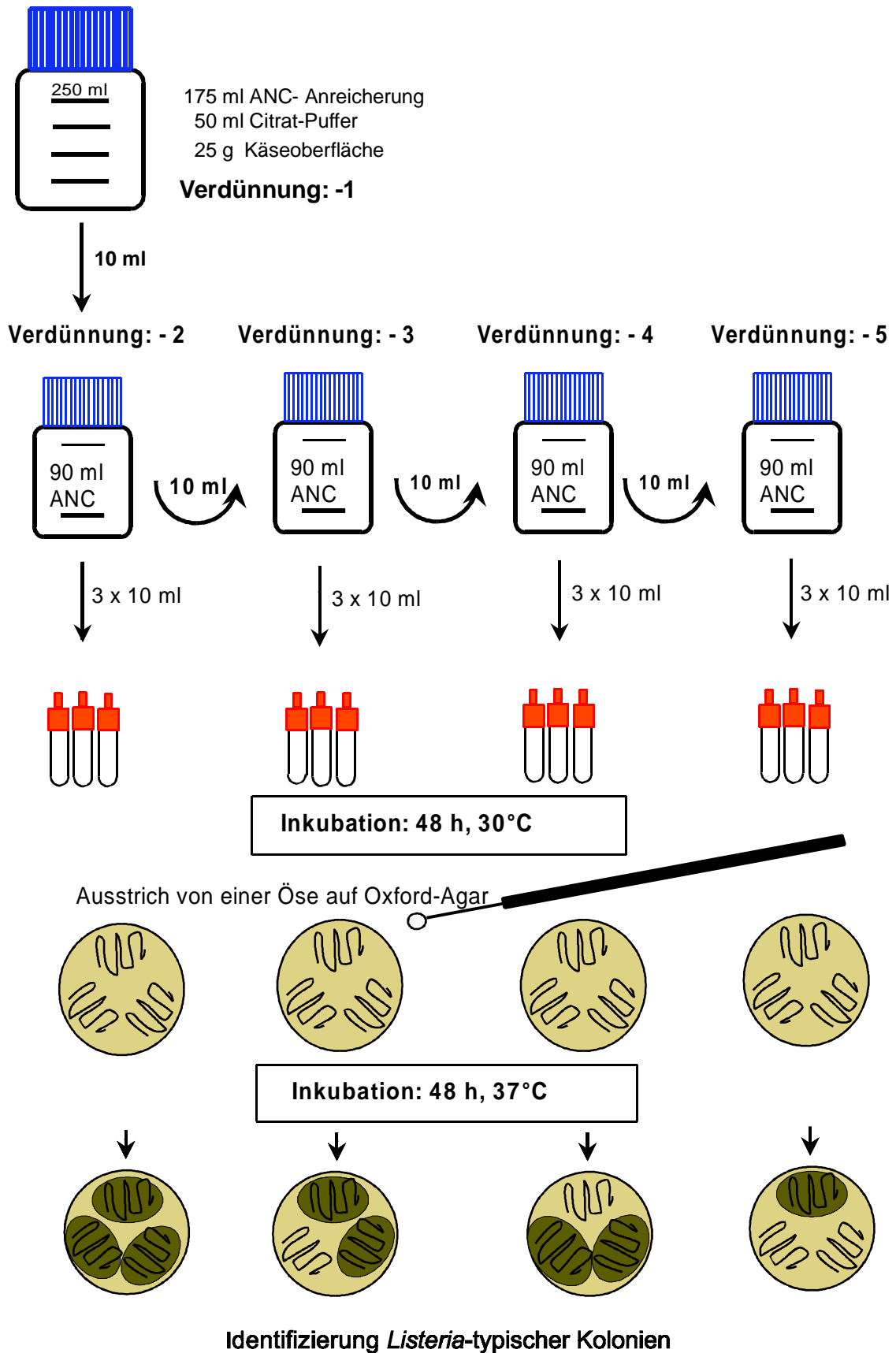
Stamm	Hit-Qualität	FT-IR-Identifizierung
WE 3	0,2	<i>Brevibacterium linens</i>
WE 4	1,1	<i>Brevibacterium linens</i>
WE 6	0,2	<i>Brachybacterium fermentans</i>
WE 7	1,3	<i>Brachybacterium fermentans</i>
WE 8	0,5	<i>Brevibacterium linens</i>
WE 9	6,1	Keine eindeutige Identifizierung
WE10	0,8	<i>Bacillus cohnii</i>
WE 11	2,7	Keine eindeutige Identifizierung
WE 12		keine Identifizierung möglich ^a
WE 13	2,8	<i>Staphylococcus sp.</i> ^b
WE 14	1,4	<i>Brevibacterium linens</i>
WE 15		keine Identifizierung möglich ^a

^a kein Wachstum auf CaSo-Agar

^b aufgrund des mikroskopischen Bildes, KOH- und Katalasetest für wahrscheinlich befunden

Anhang 4:

Quantitative *Listeria*-Keimzahlbestimmung mittels MPN-Verfahren



Lebenslauf

Melanie Loessner (geb. Rudolf)

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 5. 6. 1970
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsort: Gütersloh

Ausbildung

Eduard-Spranger-Gymnasium (September 1980- Mai 1989)

Filderstadt

Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Lehranstalt für Technische Assistenten in der Medizin (Sept.1990 - Sept. 1992)

Katharinenhospital Stuttgart

Ausbildung zur Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin

Studium

Technische Universität München-Weihenstephan (November 1992 - April 1997)

Freising-Weihenstephan

Studium der Ökotoxologie mit Abschluß zur Diplom-Ökotoxologin (Dipl. oec. troph)

Technische Universität München (November 1997 - Juni 1999)

Aufbaustudiengang Biotechnologie mit Abschluß 6/99

Technische Universität München (Mai 1997 – Januar 2001)

Institut für Mikrobiologie

Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel Weihenstephan

Anfertigen der Promotion im Fach Lebensmittelmikrobiologie