

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 83 (1992)

Heft: 1

Artikel: Mikrobieller Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch und Ammoniakbildung = Microbial spoilage of refrigerated stored beef and formation of ammonia

Autor: Meyns, Silke / Schmidt-Lorenz, W.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982252>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 15.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Mikrobieller Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch und Ammoniakbildung

Microbial Spoilage of Refrigerated Stored Beef and Formation of Ammonia

Silke Meyns und W. Schmidt-Lorenz

Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

Einleitung

Rindfleisch ist ein idealer Nährboden für Mikroorganismen und ist damit stark dem bakteriellen Verderb ausgesetzt, was zu grossen wirtschaftlichen Verlusten führen kann. Um die Haltbarkeit von Rindfleisch zu verlängern und gleichzeitig eine gewisse Reifung zu bewirken, werden heute grössere Fleischstücke häufig vakuumverpackt im Grosshandel angeboten.

Interessant für Wirtschaft und untersuchende Behörden wäre eine Möglichkeit, die Frische von Fleisch objektiv mit Hilfe von chemischen Parametern beurteilen zu können, da mikrobiologische Methoden in der Regel sehr zeitaufwendig sind. In der Literatur (1) wurde bereits eine ganze Reihe von chemischen, biochemischen und physikalischen Verfahren zur Erkennung des Frische- oder Alterungszustandes von Fleisch vorgeschlagen. Allerdings hat sich bisher keine dieser Methoden in der Praxis durchgesetzt, weil sie eigentlich alle erst dann eindeutig ansprachen, wenn der Verderb bereits sensorisch deutlich erkennbar war.

In dieser Arbeit werden die bei offen oder vakuumverpackt kühlgelagertem Rindfleisch unterschiedlich verlaufenden Verderbsvorgänge untersucht und wird gleichzeitig geprüft, ob und inwieweit sich die Bildung von Ammoniak als Verderbsindikator eignet.

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial und Probenvorbereitung für die Lagerung

Als Untersuchungsmaterial diente ein Muskel aus dem Hinterviertel des Rindes, die Unterspälte oder das Schwanzstück (*Musculus glutaeobiceps*). Die Tiere wur-

den im Schlachthof Zürich geschlachtet, die Rinderviertel bei 0 bis 2 °C gelagert und 3 Tage später zerlegt. Die Unterspälte gelangte undressiert am Tag der Zerlegung zur Untersuchung. Auf einer Seite des Muskels befanden sich noch Muskelhäute (Epimysium) und Fettschichten, auf der anderen Fett und Sehnen.

Bei der Probenvorbereitung wurden zunächst alle Häute, Sehnen und Fett soweit notwendig von der Oberfläche entfernt und das rote Muskelfleisch freigelegt. Der ganze Muskel wurde zu einem möglichst gleichmässig dicken Stück zurechtgeschnitten, dann horizontal in 2 Hälften geteilt und jede Hälfte in 3 bis 4 Stücke zerlegt. Es resultierten 6 bis 8 Stücke von ca. 5 cm Dicke, ca. 100 cm² Fläche an der Oberseite und 400 bis 500 g Gewicht. Bei der Oberseite dieser Stücke handelte es sich um die von Häuten, Fett und Sehnen befreite Aussenseite des Muskels. Die Muskelfasern verliefen auf dieser Fläche in Längsrichtung. Die anderen Oberflächen wurden beim Zerschneiden des Muskels frisch angeschnitten.

Lagerung des Fleisches

Offene Lagerung im Exsikkator

Die einzelnen Rindfleischstücke wurden mit der ursprünglich aussen liegenden Muskeloberfläche nach oben auf ein Edeltahlgitter in einen Exsikkator (2,5 l Inhalt) gelegt. Auf dem Boden des Exsikkators befand sich eine Petrischale mit 8 g Natronkalk (Merck 6839) zur Bindung von CO₂. Die Exsikkatoren wurden in einem Umluftkühlschrank bei 4 °C ± 0,5 °C gelagert. An den Probenahmetagen wurden die nicht zur Probenahme benötigten Exsikkatoren geöffnet und während einer Minute mit Hilfe eines Schlauches mit Pressluft belüftet.

Lagerung in der Vakuumpackung

Für diese Lagerart wurden die vorbereiteten Fleischstücke in Vakuumbbeutel (21 x 30 cm), wie sie auch im Metzgereigewerbe Verwendung finden, verpackt. Bei den Beuteln der Firma Vacopack (Steinach, St. Gallen) handelte es sich um einen Verbundkunststoff, der aus 20 µm Polyamid und 70 µm Polyethylen bestand. Die Gasdurchlässigkeit betrug für O₂ 40 bis 60 ml m⁻² 24 h⁻¹, für CO₂ 100 bis 150 ml m⁻² 24 h⁻¹ und für N₂ 15 bis 20 ml m⁻² 24 h⁻¹, jeweils bei 1013 mbar und 25 °C. Die Herstellung der Vakuumpackungen erfolgte mit dem Gerät VC 99902 (Inauen Maschinen AG, Herisau). Die so verpackten Stücke wurden ebenfalls in einem Umluftkühlschrank bei 4 °C ± 0,5 °C gelagert.

Mikrobiologische Untersuchungen

Untersuchungsplan

Die Fleischstücke wurden immer frisch, d. h. am Tag des Zerlegens und der Einlagerung untersucht. Die weiteren Untersuchungstage richteten sich nach dem

Verlauf des Verderbs während der jeweiligen Versuche. Wichtig war es, den Verderbsbeginn sowohl sensorisch als auch mikrobiologisch zu erfassen.

Für die chemischen Untersuchungen wurden die Proben an den gleichen Tagen wie für die mikrobiologischen Untersuchungen entnommen.

Probenahmen

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurde mit Hilfe eines Stanzeisens von 3,6 cm Durchmesser aus dem Fleischstück ein Zylinder von 10 cm² Oberfläche ausgestanzt und mit einem Skalpell eine ca. 0,5 cm dicke Oberflächenschicht der Fleischoberseite abgeschnitten. Es wurden jeweils zwei 10 cm² grosse Oberflächenschichten entnommen, beide zusammen mit 20 ml Verdünnungslösung (0,8% NaCl und 0,1% Sojapepton (Oxoid L44) in dest. Wasser) versetzt und im Colworth Stomacher 400 (Bender und Hobein, Zürich) 2 min homogenisiert. Dabei blieben die Fleischstücke weitgehend intakt. Im fortgeschrittenen Verderbsstadium zerfiel das Fleisch in Fleischfasern.

Für die chemischen Untersuchungen wurden die Proben in gleicher Weise von der Fleischoberfläche entnommen und anschliessend bei -18 °C tiefgefroren.

Bestimmung der Artenzusammensetzung mit Selektivplattenverfahren

Aus dem Fleischhomogenisat wurden dezimale Verdünnungsreihen angelegt und damit folgende Kulturmedien beimpft:

im Oberflächenverfahren mit 0,1 ml:

- Plate-Count-Agar (PC-Agar, BBL 11638) zur Erfassung der Gesamtkoloniezahl
- Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein (GSP-Agar, Merck 10230), mit Zusätzen von 100000 I.E./l Penicillin-Kalium und 0,01 g/l Pimaricin zur Erfassung der Pseudomonaden und Aeromonaden
- *Lactobacillus*-Agar nach DeMan, Rogosa und Sharpe (MRS-Agar, Merck 10660) zur Erfassung von Milchsäurebakterien
- Streptomycin-Nalidixinsäure-PolymyxinB-Pimaricin-Agar nach Mertin (2) (SNaPP-Agar) für die Erfassung von *Brochothrix thermosphacta*

als Gusskultur mit Overlay mit 1 ml:

- Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar nach Mossel (VRBG-Agar, Oxoid CM485) zur Erfassung der Enterobacteriaceen

Die Kulturmedien wurden folgendermassen bebrütet:

- PC- und GSP-Agar: 20 °C, 2 Tage
- MRS-Agar: 20 °C, 3 Tage, anaerob
- SNaPP-Agar: 20 °C, 3 Tage
- VRBG-Agar: 37 °C, 1 Tag

Die Nachweisgrenze betrug für PC-, GSP-, MRS- und SNaPP-Agar jeweils 10 KBE cm⁻² Fleisch sowie für VRBG-Agar 1 KBE cm⁻².

Pro Verdünnungsstufe wurden zwei Platten angelegt. Die Auszählung der Kolonien folgte den Vorschriften der jeweiligen Autoren. Es wurden nur Platten mit Koloniezahlen zwischen 30 und 300 ausgewertet und, soweit möglich, das gewogene arithmetische Mittel berechnet. Die auf dem SNaPP-Medium gewachsenen Kolonien wurden mikroskopisch auf die typische Morphologie von *Brochothrix thermosphacta* überprüft und zusätzlich der Oxidase-Test durchgeführt. Oxidasenegative Kolonien wurden als *Brochothrix thermosphacta* gewertet.

Bestimmung der Artenzusammensetzung durch Florenanalyse

Für die Bestimmung der Artenzusammensetzung wurde eine Grobidentifizierung der auf dem Rindfleisch vorkommenden Bakteriengattungen vorgenommen. Dazu wurden 50 Kolonien von einer PC-Zählplatte zufällig entnommen und die Isolate auf folgende Kriterien untersucht: Morphologie, Beweglichkeit, Amino-peptidase (3) bzw. Gramverhalten bei Gelbfärbung der Kolonien, Oxidase (4), Katalase und Glucoseverwertung (O/F-Test) nach *Hugh* und *Leifson* (5). Bei einigen Isolaten, die während der Lagerung in der Vakuumpackung isoliert wurden, erfolgte der Test auf Gasbildung in MRS-Bouillon (Merck 10661) mit Durham-Röhrchen. Anschliessend erfolgte die Grobidentifizierung gemäss *Schmidt-Lorenz* (6) und *Vanderzant* und *Nickelson* (7).

Bestimmung von Ammoniak

Für die Bestimmung von Ammoniak in Rindfleisch wurden die Proben auf dieselbe Weise, wie oben beschrieben, entnommen. Es resultierte ein Fleischstück von 10 cm² Oberfläche, mehr oder weniger 0,5 cm Dicke und 4 bis 7 g Gewicht.

Für die Untersuchung der Ammoniakgehalte in verschiedenen Schichten des Fleischinneren wurde eine andere Probenahmetechnik verwendet. Hierfür wurden Fleischstücke separat in zwei Exsikkatoren bzw. Vakuumpackungen gelagert. Die Probenahme für die Ammoniakbestimmung erfolgte erstmals am 5. Lagertag. Dazu wurden aus dem Zentrum eines der ca. 5 cm dicken Fleischstücke 2 Stücke von ca. 10 cm² Oberfläche geschnitten. Es resultierten 2 Quader von ca. 3 x 3 x 5 cm Ausmass, bei deren Ober- und Unterseiten es sich um die mit Mikroorganismen bewachsenen Oberflächen handelte. Die Quader wurden anschliessend parallel zur ursprünglichen Fleischoberfläche in 5 jeweils ca. 1 cm dicke Stücke geschnitten.

Für die Bestimmung des Ammoniaks wurden ca. 5 g Fleisch (entsprechend 10 cm²) einer Perchlorsäureextraktion unterworfen und der Ammoniakgehalt des Extraktes mit der Reaktion von Berthelot nach *Searcy* et al. (8) modifiziert von *Schmitt* (9) photometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Mikrobiologische Untersuchungen

Bakterienflora beim frisch zerlegten Rindfleisch

Die Florenanalyse erfolgte bei acht verschiedenen Rindfleischstücken von acht verschiedenen Schlachttagen. Dazu wurden jeweils 50 Isolate aus der Bestimmung der Gesamtkoloniezahl herangezogen. Die Flora des frisch zerlegten Rindfleisches zeigte eine grosse Variationsbreite. Die Pseudomonaden, Hauptverderbskeime beim aeroben Verderb, kamen in sehr unterschiedlichen Anteilen vor. Bei drei Proben bestanden nur 0 bis 2% der Gesamtflora aus *Pseudomonas*-Arten, während sie bei zwei anderen 60 bzw. 84% ausmachten. Andere gramnegative Bakterien wie *Aeromonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes* sowie Enterobacteriaceen und *Chromobacterium* wurden nur in geringer Anzahl nachgewiesen. Nur bei einer Probe kamen die Gattungen *Aeromonas* und *Vibrio* zu 40% vor.

Die Flora des frischen Fleisches wurde meistens von den grampositiven Bakterien, hauptsächlich Micrococcaceen, dominiert. Neben Coryneformen und *Brevibacterium* spielten andere grampositive Keime wie Milchsäurebakterien, *Brochothrix thermosphacta* und *Listeria* nur eine untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1. Bakterienflora von frisch zerlegtem Rindfleisch (3 Tage nach der Schlachtung bei 0 bis 2 °C gelagert)

Versuch Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Gramnegative Bakterien (%)								
<i>Pseudomonas</i>	29	60	13	—	22	2	2	84
<i>Acinetobacter</i> und <i>Moraxella</i>	—	2	9	2	—	8	2	—
<i>Alcaligenes</i>	2	6	—	—	—	—	—	—
<i>Flavobacterium</i>	9	16	—	4	6	—	6	2
<i>Aeromonas</i> und <i>Vibrio</i>	9	2	2	6	—	40	4	—
Enterobacteriaceae	2	—	—	6	2	7	9	—
<i>Chromobacterium</i>	7	2	—	—	—	—	—	—
Grampositive Bakterien (%)								
Micrococcaceae	11	4	50	37	48	16	31	—
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	—	2	—	10	7	—	7	4
Coryneforme, <i>Brevibacterium</i>	11	4	9	12	6	9	2	—
Milchsäurebakterien	4	—	2	10	6	—	35	10
<i>Listeria</i>	—	—	9	—	—	7	2	—
Hefen	16	2	6	8	2	11	—	—

Koloniezahlen in Oberflächenschichten von bei 4 °C gelagertem Rindfleisch

Offene Lagerung im Exsikkator

Die Resultate der Koloniezahlbestimmungen mittels Selektivmedien während der 14tägigen Lagerung in Exsikkatoren bei 4 °C sind in Abbildung 1a) und b) dargestellt. Es handelt sich dabei um den Mittelwert aus 11 Lagerreihen.

Die Gesamtkoloniezahlen lagen beim frisch zerlegten Fleisch bei etwa 10^4 KBE cm^{-2} . Nach 6 Lagertagen stiegen sie rasch auf 10^8 KBE cm^{-2} . Bis zum 4. Lagertag war der Geruch des Fleisches milchig, butterig, fruchtig. Am 6. Lagertag stellte sich meist ein erster Verderbsgeruch ein, der als muffig, erdig, ranzig zu bezeichnen war. Die Gesamtkoloniezahlen lagen zu diesem Zeitpunkt über 10^8 KBE cm^{-2} . Der Verderbsgeruch verstärkte sich zunehmend bis zum Ende der Lagerung. Gelegentlich trat zusätzlich ein säuerlicher Geruch auf. Nach 14 Lagertagen betragen die Gesamtkoloniezahlen etwa 10^9 KBE cm^{-2} .

Die Gesamtkoloniezahlen wurden insgesamt vorwiegend von Pseudomonaden bestimmt. Die Koloniezahlen der Pseudomonaden entsprachen weitgehend den Gesamtkoloniezahlen.

Die Zahl der Enterobacteriaceen betrug beim frischen Fleisch ca. 10^3 KBE cm^{-2} . Sie stieg während der Lagerung kontinuierlich bis auf etwa 10^6 KBE cm^{-2} am 14. Lagertag an. Die Koloniezahlen von *Brochothrix thermosphacta* sowie der Milchsäurebakterien nahmen von 10^3 bis 10^4 KBE cm^{-2} auf etwa 10^7 KBE cm^{-2} am Ende der Lagerung zu.

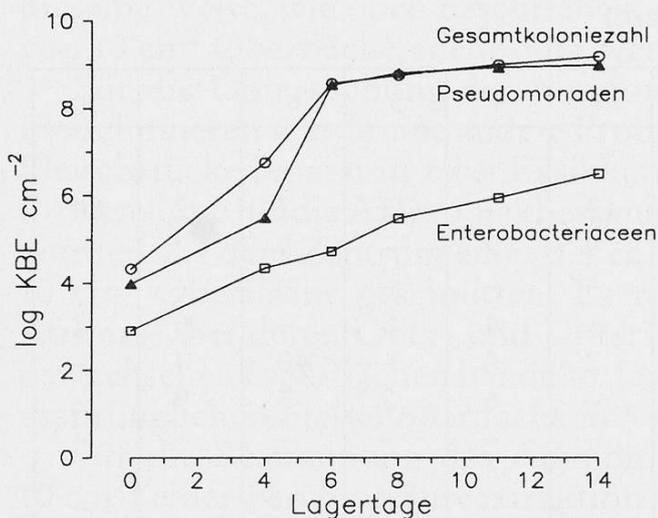


Abb. 1a. Gesamtkoloniezahlen, Pseudomonaden und Enterobacteriaceen in den Oberflächenschichten von offen im Exsikkator bei 4 °C gelagertem Rindfleisch (Mittelwerte aus 11 Lagerreihen)

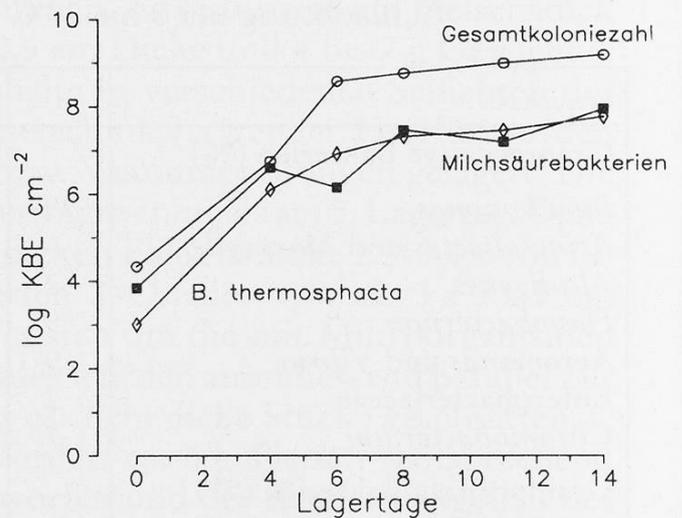


Abb. 1b. Gesamtkoloniezahlen, Milchsäurebakterien und *Brochothrix thermosphacta* in den Oberflächenschichten von offen im Exsikkator bei 4 °C gelagertem Rindfleisch (Mittelwerte aus 11 Lagerreihen)

Lagerung in der Vakuumpackung

Die Resultate der Koloniezahlbestimmungen auf Selektivmedien während der Lagerung der vakuumverpackten Fleischstücke bei 4 °C sind in Abbildung 2a) und b) dargestellt. Es handelt sich dabei um den Mittelwert aus 6 Lagerreihen.

Die Gesamtkoloniezahlen des frischen Fleisches nahmen in den ersten 7 Lagertagen von anfangs 10^4 bis 10^5 KBE cm^{-2} auf über 10^7 KBE cm^{-2} zu und blieben bis zum Ende der Lagerung nach 25 Tagen auf diesem Niveau. Nach 7 Lagertagen machte sich auch erstmals ein säuerlicher Geruch bemerkbar. Nach 14 Lagertagen war neben dem nunmehr deutlich sauren Geruch ein muffiger, putrider Geruch, der sich bis Lagerende noch verstärkte, erkennbar.

Bei der Vakuumlagerung dominierten die Milchsäurebakterien. Ihre höchsten Koloniezahlen wurden nach 14 Lagertagen mit über 10^7 KBE cm^{-2} erreicht. Sie blieben bis zum Ende der Lagerung weitgehend konstant. Pseudomonaden spielten bei dieser Lagerart nur eine untergeordnete Rolle.

Ihre Zahl stagnierte nach 7 Lagertagen bei etwa 10^5 KBE cm^{-2} . Enterobacteriaceen waren zu Beginn der Lagerung bei einer unteren Nachweisgrenze von 1 KBE cm^{-2} nicht nachweisbar. Ab dem 11. Lagertag bis Lagerende blieb ihre Zahl zwischen 5×10^2 und 10^3 KBE cm^{-2} . Die Koloniezahlen von *Brochothrix thermosphacta* nahmen von 10^3 KBE cm^{-2} zu Beginn der Lagerung auf 10^4 KBE cm^{-2} am 7. Tag zu. Bis zum 25. Lagertag erfolgte keine weitere Zunahme.

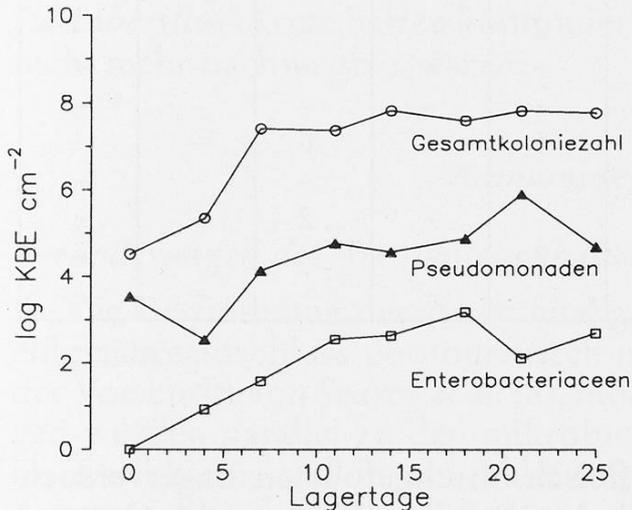


Abb. 2a.

Gesamtkoloniezahlen, Pseudomonaden und Enterobacteriaceen in den Oberflächenschichten von vakuumverpackt bei 4 °C gelagertem Rindfleisch (Mittelwerte aus 6 Lagerreihen)

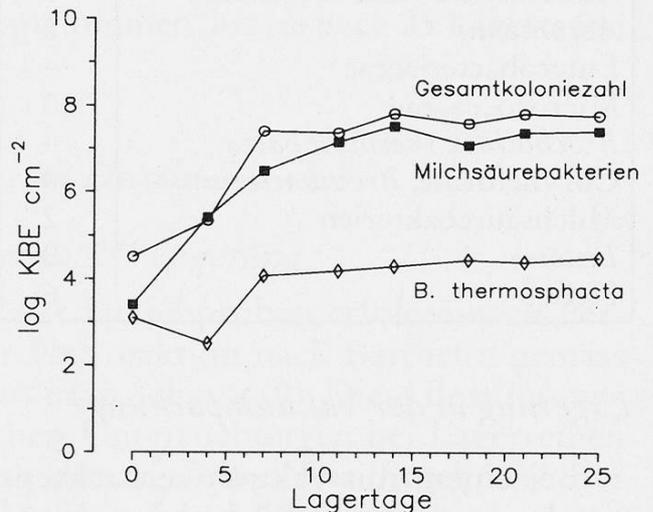


Abb. 2b.

Gesamtkoloniezahlen, Milchsäurebakterien und *Brochothrix thermosphacta* in den Oberflächenschichten von vakuumverpackt bei 4 °C gelagertem Rindfleisch (Mittelwerte aus 6 Lagerreihen)

Bakterienfloren

Offene Lagerung im Exsikkator

Bei einem Lagerversuch wurden von jeweils 50 Isolaten der Gesamtkoloniezahlbestimmung die Gattung bestimmt (Tabelle 2).

Die Initialflora des Fleischstückes bestand hauptsächlich aus grampositiven Bakterien, wobei die Micrococcaceen mit 50% der Gesamtflora dominierten. 13% der Gesamtflora bestand aus Pseudomonaden. Am 2. Lagertag machten die Pseudomonaden bereits 65% der Gesamtflora aus. Micrococcaceen konnten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden. Nach 6 Lagertagen sowie an den Lagertagen 10 und 14 bestand die Flora zu 100% aus Pseudomonaden. An den Tagen 2, 4 und 8 waren noch bis zu 10% *Brochothrix thermosphacta* vertreten. Bis zum Lagertag 4 wurde *Listeria* in Anteilen von 2 bis 14% der Gesamtflora gefunden. Alle anderen Gattungen traten nur vereinzelt auf.

Tabelle 2. Veränderung der Bakterienflora von offen im Exsikkator bei 4 °C gelagertem Rindfleisch in Abhängigkeit von der Lagerdauer (Prozentanteile der wichtigsten Artengruppen)

Lagertag	0	2	4	6	8	10	14
Keim (%)							
<i>Pseudomonas</i>	13	65	89	100	88	100	100
<i>Acinetobacter</i> und <i>Moraxella</i>	9	2	—	—	—	—	—
<i>Aeromonas</i>	2	2	2	—	4	—	—
Enterobacteriaceae	—	2	—	—	—	—	—
Micrococcaceae	50	—	—	—	—	—	—
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	—	10	6	—	6	—	—
Coryneforme, <i>Brevibacterium</i>	9	2	—	—	—	—	—
Milchsäurebakterien	2	—	—	—	2	—	—
<i>Listeria</i>	9	14	2	—	—	—	—
Hefen	6	2	—	—	—	—	—

Lagerung in der Vakuumpackung

Bei einem mit vakuumverpacktem Rindfleisch durchgeführten Lagerversuch wurden von jeweils 50 Isolaten der Gesamtkoloniezahlbestimmung die Gattung bestimmt (Tabelle 3).

Bei diesem Fleischstück bestand die Initialflora ebenfalls überwiegend aus grampositiven Bakterien. Micrococcaceen kamen zu 37% vor, Coryneforme und *Brevibacterium* zu 12%. *Brochothrix thermosphacta* und Milchsäurebakterien waren zu je 10% vertreten. Alle anderen Gattungen kamen nur in Anteilen von unter 10% vor. Pseudomonaden konnten nicht nachgewiesen werden.

Nach 4 Lagertagen bestand die Flora schon zu 90% aus Milchsäurebakterien, wobei die Gruppe der katalasen negativen Kokken mit einem Anteil von 62%

Tabelle 3. Veränderung der Bakterienflora von vakuumverpackt bei 4 °C gelager-tem Rindfleisch in Abhängigkeit von der Lagerdauer (Prozentanteile der wichtigsten Artengruppen)

Lagertage	0	4	7	11	14	18	21	25
Keim (%)								
<i>Pseudomonas</i>	—	6	—	—	—	—	—	—
<i>Acinetobacter</i> und <i>Moraxella</i>	2	—	—	—	—	—	—	—
<i>Flavobacterium</i>	4	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aeromonas</i>	6	—	—	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae	6	—	2	—	—	—	—	—
Micrococcaceae	37	2	—	—	—	—	—	—
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	10	2	—	—	—	—	—	—
Coryneforme, <i>Brevibacterium</i>	12	—	—	—	—	—	—	—
katalasenegative Kokken	6	62	88	78	96	92	98	100
<i>Lactobacillus</i>	4	28	10	22	4	8	2	—
<i>Bacillus</i>	4	—	—	—	—	—	—	—
Hefen	8	—	—	—	—	—	—	—

dominierte und Bakterien der Gattung *Lactobacillus* nur zu 28% vorhanden waren. Am 14. und 21. Lagertag wurden die Isolate der katalasenegativen Kokken auf Gasbildung in MRS-Bouillon untersucht. Etwa 5% zeigten dabei Gasbildung und waren demnach der Gattung *Leuconostoc* zuzuordnen. Am Ende der Lagerung nach 25 Tagen bestand die Flora zu 100% aus katalasenegativen Kokken. Die *Lactobacillus*-Arten hatten kontinuierlich abgenommen, bis sie nach 25 Lagertagen nicht mehr nachweisbar waren.

Ammoniakgehalte im Fleisch

Veränderungen des Ammoniakgehaltes während der Lagerung

Die Bestimmung der Ammoniakgehalte der Fleischproben erfolgte nach Perchlorsäureaufschluss photometrisch mit der Farbreaktion nach Berthelot gemäss der Vorschrift von Searcy et al. (8), modifiziert nach Schmitt (9). Diese Bestimmungen wurden parallel zu den mikrobiologischen Untersuchungen bei Lagerreihen im Exsikkator und in der Vakuumpackung durchgeführt. Die Ergebnisse der Ammoniakbestimmungen sind in den Abbildungen 3 und 4 dargestellt.

Beim offen im Exsikkator gelagerten Rindfleisch nahm der Ammoniakgehalt bis zum 5. Lagertag nur wenig zu, während die Gesamtkoloniezahlen bereits auf etwa 3×10^8 KBE cm^{-2} angestiegen waren. Eine deutliche Zunahme, d. h. eine Verdoppelung des Ammoniakgehaltes, war dann am 7. Lagertag bei Gesamtkoloniezahlen von etwa 3×10^9 KBE cm^{-2} nachweisbar. Den Hauptanteil der mikrobiellen Flora bildeten die Pseudomonaden und Milchsäurebakterien. Die Koloniezahlen der Enterobacteriaceen und von *Brochothrix thermosphacta* entsprachen denen in Abbildung 1a) und b).

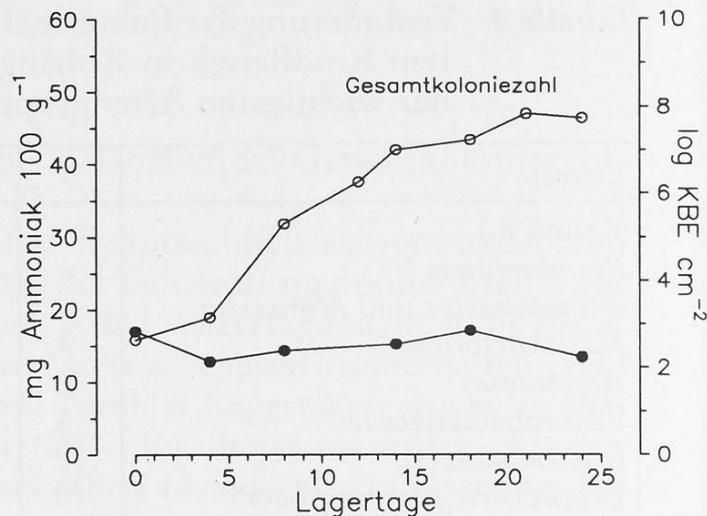
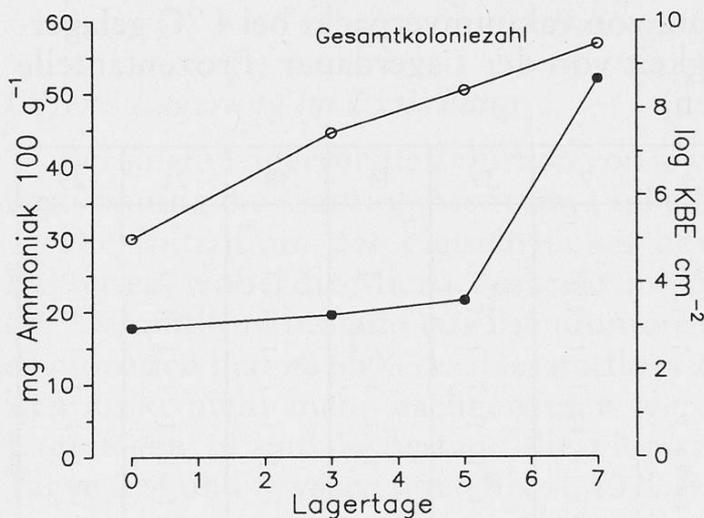


Abb. 3. Ammoniakgehalte von 0,5 cm dicken Oberflächenschichten und Gesamtkoloniezahlen von offen im Exsikkator bei 4 °C gelagertem Rindfleisch

Abb. 4. Ammoniakgehalte von 0,5 cm dicken Oberflächenschichten und Gesamtkoloniezahlen von vakuumverpackt bei 4 °C gelagertem Rindfleisch

Bei der Lagerung des Fleisches in der Vakuumpackung veränderte sich die Ammoniakkonzentration in den Oberflächenschichten im Laufe der Lagerung nur kaum. Die Gesamtkoloniezahlen, deren Hauptteil die Milchsäurebakterien bildeten, lagen gegen Ende der Lagerung bei etwa 5×10^7 KBE cm⁻². Die Pseudomonaden blieben unter 10^5 KBE cm⁻².

Ammoniakgehalte im Profil

Die Ergebnisse der Ammoniakbestimmungen in jeweils fünf 1 cm dicken Querschnitten von 10 cm² Oberfläche nach 5 und 7 Tagen offener Lagerung im Exsikkator sind in Abbildung 5 dargestellt.

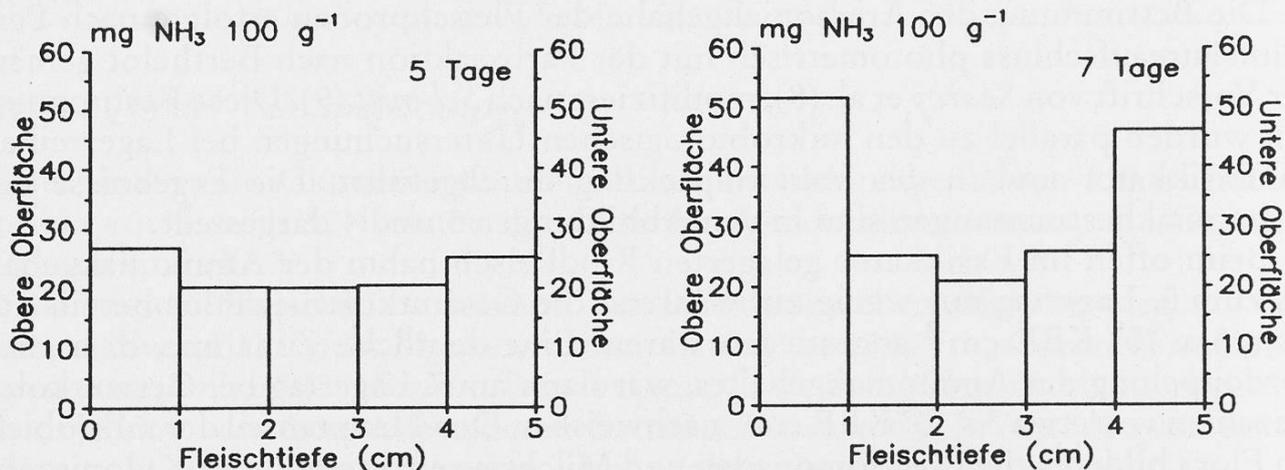


Abb. 5. Konzentrationsprofile des Ammoniaks durch 5 cm dicke Fleischstücke während der offenen Lagerung im Exsikkator bei 4 °C nach 5 und 7 Lagertagen

Nach 5 Lagertagen war die Verteilung des Ammoniaks im ganzen Stück relativ gleichmässig. Nur in den Oberflächenschichten war etwas mehr Ammoniak als im Zentrum nachweisbar. Nach 7 Lagertagen und einer Gesamtkoloniezahl von 3×10^9 KBE cm^{-2} waren in beiden Oberflächen doppelt so hohe Ammoniakgehalte als im Zentrum festzustellen. Im Zentrum blieb der Ammoniakgehalt etwa gleich gross wie nach 5 Lagertagen.

Diskussion

Methodik

Untersuchungsmaterial

Rindfleisch ist im Gegensatz zu Schlachtgeflügel praktisch nicht aus kontrollierter Aufzucht erhältlich. Deshalb wurde in dieser Untersuchung Rindfleisch verwendet, wie es auch der Metzger im Schlachthof beziehen kann, d.h. Rasse und Haltungsbedingungen der jeweiligen Tiere waren nicht bekannt.

Das Gewicht des untersuchten Muskels (*M. glutaebiceps*) variierte zwischen 4 und 5,5 kg. Der Muskel wurde vom Zerlegebetrieb immer zum gleichen Zeitpunkt nach der Schlachtung im gleichen Verarbeitungszustand geliefert. Der Muskel war noch nicht ladenfertig enthäutet und dressiert.

Wichtig für die Untersuchung war eine normale hygienische Gewinnung des Fleisches, d.h. Stücke, die während des Schlachtens und Zerlegens offensichtlich kontaminiert worden waren, sollten nicht zur Untersuchung gelangen. Das schloss aber Inhomogenitäten der Proben bezüglich Höhe und Art der Initialkontamination mit Mikroorganismen nicht aus. Tatsächlich variierte sowohl die Höhe als auch die Art der Flora von Probe zu Probe beträchtlich (Tabelle 1), obwohl das Fleisch immer im gleichen Betrieb geschlachtet und zerlegt wurde. Hinsichtlich des Verderbsverlaufs spielte aber die Höhe und Art der initialen Mikroflora keine Rolle. Damit hatte das anfangs inhomogene Probenmaterial praktisch keinen Einfluss auf die Art des mikrobiellen Verderbs.

Lagerbedingungen

Die Muskelstücke wurden bei 4 °C in Exsikkatoren gelagert, wie es sich bereits in früheren Untersuchungen an Schlachtgeflügel (9–12) gut bewährt hatte. Diese Lagerart entspricht annähernd einer offenen Lagerung, wie sie im Detailhandel üblich ist. Mit Hilfe von Natronkalk musste das von den Bakterien gebildete CO_2 abgebunden und zusätzlich durch Frischluftzufuhr reduziert werden, weil sonst im abgeschlossenen Raum des Exsikkators eine Hemmung der Bakterienvermehrung erfolgt wäre. Im Exsikkator erfolgte allerdings keine oberflächliche Austrocknung der Proben, so dass im Gegensatz zu den Verhältnissen im Detailhandel, wo die Abtrocknung der Stücke einen hemmenden Effekt auf die Mikroflora haben kann, hier optimale Bedingungen für die Bakterienvermehrung gegeben waren.

Die Vakuumpackung wurde mit den im Metzgereigewerbe erhältlichen Folien und Geräten ohne Schutzgasbegasung hergestellt. Diese Packung ist besonders für grössere Fleischstücke handelsüblich.

Probenahme und -aufbereitung

Der bakterielle Verderb von Rindfleisch erfolgt ausschliesslich auf den Oberflächen (13, 14). Bakterien, die gelegentlich im Inneren des Fleisches vorkommen können, spielen praktisch keine Rolle (15). Aus diesem Grund müssen zur Bestimmung von Koloniezahlen auf Fleisch Proben von der Oberfläche entnommen werden.

Die Ergebnisse mikrobiologischer Untersuchungen von Fleischoberflächen sind in hohem Mass von der Art der Probenahme abhängig. Es wird grundsätzlich zwischen destruktiven und nicht destruktiven Verfahren unterschieden. *Reuter* (16) nennt als nicht destruktive Verfahren zur Bestimmung von Oberflächenkeimzahlen das Abspülverfahren, das Abklatsch- sowie das Tupfervverfahren. Als destruktive Verfahren kommen Abtrageverfahren in Frage, bei denen definierte Oberflächenschichten entfernt und anschliessend in verschiedenen Mixertypen oder im Stomacher zerkleinert werden.

Lazarus et al. (17), *De Zutter et al.* (18), *Reuter* (16) und *Snijders et al.* (19) haben die Ergebnisse von Keimzahlbestimmungen, die mit Hilfe von nicht destruktiven Verfahren durchgeführt wurden, mit denen destruktiver Verfahren verglichen. Sie kommen zu dem Schluss, dass mit Abtrageverfahren und anschliessender Homogenisierung im Mixer bzw. im Stomacher höhere Keimzahlen gefunden werden als mit den verschiedenen nicht destruktiven Verfahren.

Hinsichtlich der Zerkleinerungsmethode ist in der Literatur die Homogenisierung mit verschiedenen elektrischen Schneidmischern, wie z. B. Ultra-Turrax (16) oder Waring Blendor (20), beschrieben. Den Stomacher verwendeten *Gerats* und *Snijders* (20) sowie *Snijders et al.* (19). In der Untersuchung von *Gerats* und *Snijders* (20) wird das Stomacher-Verfahren und die Homogenisierung mit dem Waring Blendor verglichen. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass der Stomacher eine gute Alternative zu den herkömmlichen Zerkleinerungsmethoden ist. Bereits nach einer Homogenisierungszeit von 1 Minute wurden mit dem Stomacher gleich hohe Keimzahlen gefunden wie bei der Blendor-Methode. Daher wurde in dieser Arbeit das Abtrageverfahren in Kombination mit dem Stomacher-Verfahren angewandt.

Bei der Bestimmung von chemischen Inhaltsstoffen, die von Mikroorganismen an der Fleischoberfläche gebildet werden, wie z. B. Ammoniak, ergaben sich spezielle Probleme durch die Probenahmetechnik. Mit Hilfe des Stanzeisens konnten zwar Proben mit konstanter Oberfläche (10 cm^2) entnommen werden, aber die Schnitttiefe und damit das Gewicht variierten, da mit einem Skalpell und nicht mit einem Mikrotom geschnitten wurde. Das Gewicht eines 10 cm^2 grossen Stückes betrug bei einer Schnitttiefe von ungefähr $0,5 \text{ cm}$ etwa $5 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$.

Für die an der Oberfläche gebildeten Stoffe wurden bei höheren Konzentrationen, d. h. speziell gegen Ende der Lagerung, ein deutliches Konzentrationsgefälle

in Richtung Fleischzentrum beobachtet. Dies hatte zur Folge, dass bei tieferer Schnittführung, d. h. bei Proben mit höherem Gewicht, die ermittelten Werte für Ammoniak niedriger waren bezogen auf das Gewicht als bei flacherem Schnitt. Daraus ergaben sich leichte Ungenauigkeiten der Ergebnisse, die aber aufgrund der angewandten Schnittechnik unvermeidlich waren.

Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

Bei allen Untersuchungen wurde neben Gesamtkoloniezahl-Bestimmungen das Selektivplattenverfahren angewendet. Bei der Untersuchung der Initialflora sowie bei je einer Lagerreihe im Exsikkator bzw. in der Vakuumpackung wurde die Artenzusammensetzung bestimmt.

Beim Selektivplattenverfahren sollte für jede relevante Keimart ein geeignetes Selektivmedium zur Verfügung stehen. In dieser Untersuchung wurden mit den verwendeten Nährmedien die meisten Keimarten erfasst. Micrococcaceen, die bei einigen Proben den Hauptteil der Initialflora ausmachten, wurden allerdings nicht mit den verwendeten Selektivmedien bestimmt. Gerade bei der Initialflora wurde nach Florenanalyse deren vielfältige Zusammensetzung deutlich. Bei einer sehr differenzierten Zusammensetzung der Flora bietet die Grobidentifizierung eindeutig Vorteile.

Im Laufe der Lagerung wurde die Flora im wesentlichen von einer Keimgruppe dominiert (*Pseudomonas* bzw. Milchsäurebakterien). Hier wurden die Nachteile der Florenanalyse deutlich. Durch das Isolieren der Keime von einer geeigneten PC-Zählplatte wurden Keime, deren Anteil unter 2% der Flora ausmachten bzw. deren Zahl um 2 Zehnerpotenzen unter der Gesamtkoloniezahl lag, nicht mehr erfasst. Dies war hingegen mit der Selektivplattenmethode ohne weiteres möglich.

Da auch Keimgruppen, die in relativ geringen Anteilen vorkommen, einen wichtigen Beitrag zum Verderb leisten können, wie z.B. *Brochothrix thermosphacta* (21), ist auch die Erfassung ihrer Zahl wichtig. Dies war der Grund, weshalb die Selektivplattenmethode für die Erfassung der Koloniezahlen gewählt wurde.

Als Bebrütungstemperatur (ausser für VRBG-Agar) wurde 20 °C gewählt. Barnes und Impey (22) fanden bei dieser Temperatur auf Truthahn höhere Koloniezahlen als bei 30 °C. Auch Gallo et al. (23) erzielten bei Schlachtgeflügel bei 20 °C bessere Ergebnisse als bei 35 °C. Ingram und Simonsen (24) berichten, dass bei kühlgelagertem Fleisch die höchsten Koloniezahlen bei 25 °C gefunden werden, da bei dieser Temperatur gleichzeitig psychrotrophe und mesophile Keime erfasst werden. Für die separate Bestimmung der psychrotrophen Keime haben Ingram und Simonsen (24) Temperaturen zwischen 17 und 22 °C empfohlen. Bei der Anwendung einer Bebrütungstemperatur von 20 °C sollten damit die verderbsrelevanten psychrotrophen Keime weitgehend erfasst werden.

Bakterienflora von frisch zerlegtem Rindfleisch

Um festzustellen, ob und inwieweit die Flora des frischen Rindfleisches einen Einfluss auf den Verderbsverlauf hatte, wurde bei 8 frischen Proben die Artenzu-

sammensetzung mittels Florenanalyse nach Gesamtkoloniezahl-Bestimmungen untersucht. Die Mikroorganismen auf frischem Rindfleisch können von sehr unterschiedlicher Herkunft sein. Sie gelangen während des Schlachtprozesses auf das an sich weitgehend sterile Muskelfleisch. Das sachgemäße Enthäuten und das Ausweiden der Schlachtkörper gelten als die kritischsten Momente während des Schlachtprozesses (25), weil Häute und Intestinaltrakt besonders stark mit Mikroorganismen kontaminiert sind. Bei den Mikroorganismen auf der Haut handelt es sich meist um grampositive, mesophile Keime wie *Staphylococcus*, *Micrococcus* und *Bacillus*. Nur ein geringer Teil der Mikroorganismen der Häute besteht aus gramnegativen psychrotrophen Arten, die von Boden, Wasser und Vegetation stammen (26), die Enterobacteriaceen vor allem aus dem Intestinaltrakt. Die Hauptkontaminationsquelle für psychrotrophe Mikroorganismen, die den Verderb verursachen, sind die Oberflächen und Gerätschaften, mit denen das Fleisch während des Zerlegeprozesses in Berührung kommt, d. h. Tische, Förderbänder, Messer usw. (27).

Entsprechend vielfältig ist die Primärkontamination von frischem Rindfleisch. Jay (1) nennt als hauptsächlich auf frischem Rindfleisch vorkommende Bakteriengattungen *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella* und *Pseudomonas*. Daneben wurden zahlreiche weitere grampositive und -negative Arten nachgewiesen. Vanderzant und Nickelson (7) untersuchten Rindfleischproben nach 3tägiger Lagerung bei 1 °C, d. h. das Fleisch wurde zum gleichen Zeitpunkt untersucht wie die Proben in dieser Arbeit. Bei über 50% der isolierten Bakterienstämme handelte es sich um solche der Gattung *Staphylococcus*. Etwa 30% waren Coryneforme, 14% *Micrococcus*-Arten. Christopher et al. (28) fanden auf dem frischen *M. longissimus dorsi* vom Rind zu 60% *Moraxella* und *Acinetobacter* sowie zu 26% *Pseudomonas*. Stringer et al. (29) untersuchten 2 bis 4 Tage bei 1 bis 2 °C gelagertes Rindfleisch und fanden zu 51% Pseudomonaden und zu 39% *Micrococcus*-Arten. Der Rest verteilte sich auf die Gattungen *Flavobacterium*, *Bacillus* und *Aspergillus*. Die Befunde der verschiedenen Autoren weichen recht stark voneinander ab. Bei frischem Rindfleisch wurde entweder eine grampositive von Micrococcaceen dominierte Mikroflora oder eine von *Pseudomonas*-Arten beherrschte gramnegative Flora nachgewiesen.

Die hier untersuchten Proben zeigten ein ähnlich uneinheitliches Bild der initialen Mikroflora. Bei drei der acht Proben wurde die Flora von Micrococcaceen dominiert. Bei drei weiteren Proben herrschten *Pseudomonas*-Arten vor. Je einmal waren als am häufigsten vorkommende Bakterienarten Milchsäurebakterien bzw. *Aeromonas* und *Vibrio* vertreten.

Die Art der Initialflora stand in keinem Zusammenhang mit der Höhe der Ausgangskoloniezahl. Es wäre denkbar, dass Fleisch mit einem hohen Anteil an Pseudomonaden in der Initialflora auch eine relativ hohe Gesamtkoloniezahl aufweist, weil es besonders stark im Laufe des Zerlegeprozesses kontaminiert wurde. Dies war aber offensichtlich nicht der Fall.

Die Zusammensetzung der Initialflora hatte praktisch keinen Einfluss auf den Verlauf des Verderbs, obwohl Dainty et al. (30) erwähnen, dass die Art der Initialflora durchaus Veränderungen in der Florenzusammensetzung während der Lagerung beeinflussen kann. Die entscheidenden Faktoren für die Entwicklung der

Verderbsflora sind aber die Lagerbedingungen, d. h. Lagertemperatur und Gaszusammensetzung der umgebenden Atmosphäre. Bei Proben, auf denen zu Beginn nur sehr wenig Pseudomonaden nachgewiesen wurden, machten Pseudomonaden bereits nach 4 Lagertagen die Hauptflora aus. Eine überwiegend von grampositiven Micrococcaceen bestimmte Initialflora hatte sich bereits nach 2 Lagertagen zu einer gramnegativen *Pseudomonas*-Flora verändert.

Die Höhe der Initialkontamination ist abhängig von der Schlachthygiene. *De Zutter* und *Van Hoof* (25) fanden auf schlachtfrischem Rindshinterviertel mesophile Gesamtkoloniezahlen von 10^3 bis 10^4 KBE cm^{-2} . *Newton* et al. (27) stellten nach dem Entbeinen Gesamtkoloniezahlen von etwa 10^3 KBE cm^{-2} fest. *Reuter* (31) fand auf schlachtwarmem Rindfleisch Keimzahlen von $<10^3$ KBE cm^{-2} und nach dem Durchkühlen der Schlachtkörper etwa 10^4 bis 10^5 KBE cm^{-2} . Nach dem Zerlegen lagen die Koloniezahlen sogar zwischen 10^5 und 10^6 KBE cm^{-2} .

Auf den in dieser Arbeit untersuchten Proben wurde eine Ausgangskoloniezahl von durchschnittlich 10^4 KBE cm^{-2} mit einer Schwankungsbreite zwischen 10^2 und 10^5 KBE cm^{-2} gefunden. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass das Fleisch jeweils erst 3 Tage nach der Schlachtung und Kühlung zerlegt und untersucht wurde. Verglichen mit den Angaben der Literatur ist festzustellen, dass das hier für die Versuche zur Verfügung stehende Fleisch unter guten hygienischen Bedingungen gewonnen wurde.

Verderbsflora von kühlgelagertem Rindfleisch

Offene Lagerung im Exsikkator

Der Verderb von aerob gelagertem Rindfleisch wird von *Pseudomonas*-Arten verursacht (13, 14, 30, 32–34). Früher wurde von der *Pseudomonas-Achromobacter*-Assoziation gesprochen (35). Nach Aufteilung der Gattung *Achromobacter* in nicht pigmentierte Pseudomonaden, *Acinetobacter* und *Alcaligenes* (36) findet man in der Literatur den Begriff *Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella*-Assoziation (24).

Auch in dieser Untersuchung dominierten beim aeroben Verderb die Pseudomonaden. Bakterien der Gattungen *Acinetobacter* und *Moraxella* konnten nur selten nachgewiesen werden. Bereits bei der Initialflora kamen sie nur in Anteilen von unter 10% vor. Auch während der Lagerung wurden sie nur am 2. Lagertag nachgewiesen. Die Koloniezahlen dieser Keime mussten also im Vergleich zu den Pseudomonaden mindestens 2 Zehnerpotenzen niedriger liegen. *Gill* (21) hat festgestellt, dass Bakterien der Gattungen *Acinetobacter* und *Moraxella* nur wenig zum Verderbsprozess bei einer von Pseudomonaden dominierten Flora beitragen. *Eribo* und *Jay* (37) fanden bei frischem und verdorbenem Rindfleisch, dass nur 10% der gramnegativen Bakterien auch oxidasenaktiv waren. Davon waren nur 15% der Gattung *Acinetobacter* zuzurechnen, d. h. absolut nur etwa 2% der isolierten Stämme. Wenn diese Keime tatsächlich relativ selten auf Fleisch vorkommen, wäre zu überdenken, ob die Bezeichnung «*Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella*-Assoziation» überhaupt gerechtfertigt ist.

Erste Verderbsgerüche und beginnende Schleimbildungen waren in der Regel nach 6 Lagertagen bei 4 °C bei Gesamtkoloniezahlen über 10^8 KBE cm^{-2} erkennbar. Dasselbe hatte auch Gill (13) festgestellt. Ayres (32) beobachtete ab 10^7 KBE cm^{-2} die Bildung von Fehlgerüchen. Die maximalen Koloniezahlen lagen in der Größenordnung von 10^9 KBE cm^{-2} , was auch von Ayres (32), Ingram und Dainty (34) und Gill (13) gefunden wurde.

Ein weiterer typischer Vertreter der Verderbsflora von Fleisch ist *Brochothrix thermosphacta*. Die Koloniezahlen lagen bei den vorliegenden Versuchen etwa um 2 Zehnerpotenzen niedriger als die der Pseudomonaden. Trotzdem ist dieser Keim hinsichtlich seiner Beteiligung am Verderb des Fleisches nicht zu unterschätzen, da er nach Dainty und Hibbard (38) auf Fleisch einige geruchlich sehr intensive Verbindungen produziert, was auch von Viehweg et al. (39) bei deren Untersuchungen an Schlachtgeflügel bestätigt wird.

Milchsäurebakterien, speziell *Lactobacillus*, gelten als normaler Bestandteil der Flora von frischem Fleisch (13, 30). In dieser Untersuchung erreichten die auf MRS-Agar erfassten Milchsäurebakterien gleich hohe Koloniezahlen wie *Brochothrix thermosphacta*. Auch deren Beitrag zum Verderb, d. h. hauptsächlich eine Säuerung, war gelegentlich gegen Ende der Lagerung zu bemerken.

Die Enterobacteriaceen konnten sich bei dieser Untersuchung nicht so stark vermehren. Obwohl im Laufe der Lagerung ein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen war, blieb ihre Zahl am Ende der Lagerung gegenüber der Gesamtkoloniezahl um etwa 3 Zehnerpotenzen zurück. Ihr Beitrag zum Verderb scheint daher eher gering. Dies wird auch von Gill (26) bestätigt. Hingegen können nach Hechelmann et al. (40) auch psychrotrophe Enterobacteriaceen erheblich zum Verderb von kühlgelagertem Fleisch beitragen.

Lagerung in der Vakuumpackung

Grössere ausgebeinte Rindfleischstücke gelangen heute praktisch nur noch in Vakuumpackungen in den Handel. Die Fleischteile werden in der Regel vakuumverpackt und bei Temperaturen um den Gefrierpunkt gelagert und im internationalen Handel über Wochen in Kühlschiffen von den Erzeugerländern zu den Verbrauchern transportiert, z. B. von Südamerika nach Europa (41, 42).

Die Vorteile dieser Verpackungsart sind bekannt. Durch Verwendung von Folien mit einer niedrigen O_2 -Durchlässigkeit, wobei Transmissionsraten von 10 bis 150 bzw. 5 bis 90 $\text{cm}^3 \text{m}^{-2} 24 \text{h}^{-1}$ bei 1013 mbar und 25 °C als niedrig gelten (30, 41), kann die Haltbarkeit von kühlgelagertem Fleisch wesentlich verlängert werden. Ausserdem wird die Farbe des Fleisches besser erhalten und eine Austrocknung verhindert. Nachteile dieses Verfahrens sind die höheren Kosten und eventuelle Verluste durch undichte Packungen (43).

In der Vakuumpackung wird noch vorhandener Restsauerstoff durch die Gewebeatmung und die Aktivität der Mikroorganismen schnell verbraucht. Dadurch wird CO_2 gebildet, so dass bei der Analyse von Restgas bei vakuumverpacktem Rindfleisch dieses bereits am Tage der Verpackung nach Seideman et al. (44) zu über 80% aus CO_2 bestand, während der O_2 -Gehalt unter 1% lag. Dainty et al. (45)

fanden nach einwöchiger Lagerung von vakuumverpacktem Rindfleisch bei 0 bis 1 °C eine CO₂-Konzentration von 20% in der Packung bzw. maximal 30–40% nach 4 Wochen. Der O₂-Gehalt fiel auch hier auf unter 1%.

Ein erhöhter CO₂-Partialdruck hemmt das Wachstum von Mikroorganismen (46), wobei gramnegative Bakterien stärker gehemmt werden als grampositive (47). *Gill* und *Tan* (48) fanden allerdings, dass gramnegative Mikroorganismen, die beim Fleischverderb eine Rolle spielen, zum Teil nicht bzw. nur wenig von CO₂ gehemmt wurden.

Durch die gegenüber der offenen Lagerung völlig verschiedenen Umgebungsbedingungen ergibt sich deshalb bei vakuumverpacktem Rindfleisch ein vollkommen anderer Verlauf des Verderbs. Für kühlgelagertes Fleisch, in Folien mit einer niedrigen O₂-Transmissionsrate verpackt, wie auch bei diesen Untersuchungen erfolgt, werden in der Literatur als dominierende Bakteriengruppe die Milchsäurebakterien genannt (28, 45, 49–51). Auch bei den hier durchgeführten Versuchen machten die auf MRS-Agar erfassten Milchsäurebakterien den Hauptanteil der Flora aus. Die Vermehrung von Milchsäurebakterien wird auch durch hohe CO₂- bzw. niedrige O₂-Konzentrationen nicht gehemmt. Bei einer Florenanalyse wurde bereits nach 4 Lagertagen bei 4 °C eine Dominanz der Flora durch Milchsäurebakterien festgestellt. An der Initialflora war diese Bakteriengruppe nur zu 10% beteiligt, nach 4 Lagertagen betrug ihr Anteil aber bereits 90%.

Die maximalen Koloniezahlen der auf MRS-Agar erfassten Milchsäurebakterien lagen bei etwa 10⁷ KBE cm⁻², die nach etwa 11 bis 14 Tagen Lagerung erreicht wurden. Die Gesamtkoloniezahlen waren jeweils etwa um 0,5 Zehnerpotenzen höher. Dieser Effekt ist möglicherweise auf das teilweise selektiv wirkende MRS-Medium zurückzuführen. Das Vorhandensein anderer Bakterien, die auf den verwendeten Selektivmedien nicht erfassbar waren, konnte weitgehend ausgeschlossen werden, da bei der Untersuchung der Artenzusammensetzung bereits nach 7 Lagertagen praktisch ausschliesslich Milchsäurebakterien gefunden wurden. *Hitchener* et al. (52) fanden auf MRS-Agar ebenfalls nur 75 bis 100% der Koloniezahlen, die auf einem nicht selektiven Medium wie APT-Agar gefunden wurden. Dieses Phänomen trat besonders bei der Lagerung von Rindfleisch in Folien mit O₂-Transmissionsraten <30 cm³ m⁻² 24 h⁻¹ auf. Die Autoren nehmen an, dass es offensichtlich eine gewisse Anzahl von Bakterien auf vakuumverpackt gelagertem Rindfleisch gibt, die auf dem MRS-Medium nicht wachsen können.

Auch in der Literatur wurden auf vakuumverpacktem, kühlgelagertem Rindfleisch nach mehr oder weniger langer Lagerung, abhängig von der Lagertemperatur, meist maximale Koloniezahlen zwischen 10⁷ und 10⁸ KBE cm⁻² gefunden (49, 53–55).

Sensorisch wird beim Öffnen der Vakuumpackungen nach mehrwöchiger Kühlagerung bei Rindfleisch ein Geruch beobachtet, der in der Literatur als sauer, milchartig, käsig beschrieben wird (13, 30). *Lücke* und *Schillinger* (56) beobachteten nach 3wöchiger Lagerung von vakuumverpacktem Rindfleisch bei 2 °C einen schwach fauligen Geruch. Diese Angaben können durch diese Untersuchung bestätigt werden, wobei hier der nach 14 Lagertagen auftretende abweichende Geruch als deutlich muffig, putrid charakterisiert wurde.

Bei der Bestimmung der Artenzusammensetzung auf vakuumverpacktem Rindfleisch wurden hauptsächlich katalasenegative Kokken nachgewiesen. Der Anteil der Gattung *Lactobacillus*, der nach 4 Lagertagen 28% der Gesamtflora ausmachte, nahm im Laufe der Lagerung kontinuierlich ab. Diese Gattung war nach 25 Lagertagen nicht mehr nachweisbar. *Lücke* und *Schillinger* (56) fanden auf vakuumverpackten und bei 2 °C gelagertem Rindfleisch hauptsächlich die homofermentativen Lactobacillen, *Lactococcus* und *Leuconostoc*. Sie beobachteten, dass die Artenzusammensetzung der Mikroflora von der Tierart, Lagertemperatur und Sauerstoffdurchlässigkeit der Folie (im Bereich von <1 bis $25\text{ cm}^3 \text{ O}_2 \text{ m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1}$ bei 1013 mbar) praktisch nicht beeinflusst wurde. Entscheidend scheint hingegen die «Hausflora» des Zerlegeraumes zu sein. *Lücke* und *Schillinger* (56) beschreiben auch, dass sich während der Lagerung von vakuumverpacktem Rindfleisch bei 2 °C *Lactococcus* und *Leuconostoc* gegen Ende der Lagerfähigkeit nach 32 Tagen gegenüber der Gattung *Lactobacillus* durchgesetzt hatten.

Die anderen in dieser Arbeit auf Selektivmedien erfassten Keimarten erreichten während der Lagerung des Fleisches in der Vakuumpackung nur Koloniezahlen um 10^4 KBE cm^{-2} . Die Koloniezahlen von *Brochothrix thermosphacta* stagnierten bereits nach 7 Lagertagen, danach fand praktisch keine Vermehrung mehr statt. Nach *Dainty* et al. (45) vermehrt sich *Brochothrix thermosphacta* bis etwa 14 Tagen Lagerdauer. *Pierson* et al. (49) sowie *Roth* und *Clark* (53, 57) hingegen fanden, dass sich *Brochothrix thermosphacta* auf vakuumverpackt, kühlgelagertem Rindfleisch nicht vermehren konnte. *Roth* und *Clark* (57) wiesen durch Beimpfungsversuche nach, dass Lactobacillen das Wachstum von *Brochothrix thermosphacta* auf Rindfleisch deutlich hemmten, hohe CO_2 -Konzentrationen (bis 75%) aber nur wenig Einfluss hatten. *Campbell* et al. (58), *Grau* (59) sowie *Egan* und *Grau* (60) stellten fest, dass *Brochothrix thermosphacta* anaerob bei pH-Werten von $<5,8$ auf Rindfleisch bzw. $<5,5$ in APT-Bouillon nicht mehr wuchs. Nach *Grau* (59) lag dies an der L-Milchsäure, die das Wachstum unterbindet. Im Gegensatz dazu beobachteten *Sutherland* et al. (54), *Dainty* et al. (45) sowie *Erichsen* und *Molin* (51) bei vakuumverpacktem und kühlgelagertem Rindfleisch eine Vermehrung von *Brochothrix thermosphacta* bis etwa 10^6 KBE cm^{-2} .

Pseudomonaden vermehrten sich bei Verwendung einer Verpackungsfolie mit einer O_2 -Durchlässigkeit von $40 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1}$ in der vorliegenden Untersuchung nur wenig. Die Koloniezahlen schwankten geringfügig um 10^4 KBE cm^{-2} . Die Vermehrung von Pseudomonaden wird nach *Newton* und *Rigg* (50) von der O_2 -Durchlässigkeit der Verpackungsfolie beeinflusst. *Sutherland* et al. (54) konnten eine langsame Vermehrung von gramnegativen, nicht fermentativen Stäbchen bis auf etwa 10^6 KBE cm^{-2} auf Rindfleisch nach 9 Wochen Lagerung bei 0 bis 2 °C beobachten. Die Autoren verwendeten Verpackungsfolie mit einer O_2 -Durchlässigkeit von $30 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} 24 \text{ h}^{-1}$. *Pierson* et al. (49) sowie *Roth* und *Clark* (53) beobachteten keine Vermehrung von fluoreszierenden Pseudomonaden, ohne nähere Angaben über die verwendete Folie zu machen.

Dainty et al. (45) fanden nach 4wöchiger Lagerung von vakuumverpacktem Rindfleisch bei 0 bis 1 °C bis zu 10^6 KBE cm^{-2} Enterobacteriaceen. *Beebe* et al. (61) beobachteten nach 35tägiger Lagerung von vakuumverpacktem Rindfleisch bei

5,5 °C, dass Enterobacteriaceen zwischen 24 und 41% der Gesamtflora ausmachten. Bei einer Lagertemperatur von 1 °C lag der Anteil bei 13%. Die Lagertemperatur hat demnach einen Einfluss auf die Vermehrung der Enterobacteriaceen. In der vorliegenden Untersuchung vermehrten sich die Enterobacteriaceen nur sehr langsam. Nach 18 Lagertagen wurden etwa 10^3 KBE cm^{-2} erreicht. Trotz der Lagerung bei 4 °C, einer für Fleisch relativ hohen Lagertemperatur, konnten nur sehr wenig Enterobacteriaceen gefunden werden. Sicher ist für das Vorkommen von Enterobacteriaceen auf Rindfleisch die Initialkontamination während des Schlachtvorgangs entscheidend.

Ammoniakgehalte in frischem und verdorbenem Rindfleisch

Beim Verderb von Frischfleisch wird Ammoniak von den beteiligten Mikroorganismen durch Desaminierung freier Aminosäuren, Peptiden oder Aminen gebildet. Nach *Schmitt* (9) besaßen die Hälfte der auf Schlachtgeflügel gefundenen Pseudomonaden Desaminase-Aktivität, so dass Pseudomonaden sicher auch an der Bildung von Ammoniak in Rindfleisch beteiligt sind.

Die Angaben über den Ammoniakgehalt in Frischfleisch schwanken etwas, bedingt durch unterschiedliche Methoden. *Rogers* und *McCleskey* (62) fanden in frischem Rindfleisch 15 mg NH_3 100g^{-1} , *Gardner* und *Stewart* (63) 3 bis 6 mg. Neuere Angaben von *Fischer* et al. (64) nennen 10 mg NH_3 100g^{-1} bei frischem gemischtem Hackfleisch (Rind und Schwein). *Gerhardt* und *Dam Quang* (65) fanden bei frischem Fleisch ohne nähere Bezeichnung der Tierart 18 mg NH_3 100g^{-1} . *Schmitt* (9) konnte bei frischem Schlachtgeflügel 6 bis 13 mg NH_3 100g^{-1} nachweisen. Bei den eigenen Untersuchungen wurden Werte zwischen 14 bis 22 mg 100g^{-1} gefunden. Diese Werte liegen alle auf einem ähnlichen Niveau, so dass die Tierart demnach keinen wesentlichen Einfluss auf den Ammoniakgehalt von Frischfleisch zu haben scheint.

Nach 5tägiger offener Lagerung von Rindfleisch bei 7 °C beobachteten *Rogers* und *McCleskey* (62) bei einer Gesamtkoloniezahl von etwa 10^8 KBE cm^{-2} einen deutlichen Anstieg der Ammoniakkonzentration auf etwa 40 mg NH_3 100g^{-1} . *Fischer* et al. (64) fanden nach 12tägiger Lagerung bei 4 °C zwischen 50 und 80 mg 100g^{-1} , gaben allerdings keine Koloniezahlen an. Bei den eigenen Untersuchungen war der Anstieg der Ammoniakkonzentration beim Erreichen von etwa 10^8 KBE cm^{-2} noch nicht deutlich. Erst bei 10^9 KBE cm^{-2} konnte ein ausgeprägter Anstieg auf etwa 54 mg 100g^{-1} festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt war das Fleisch sensorisch bereits eindeutig verdorben. *Gill* (66) beimpfte kleine Lammfleischstücke mit einem von Lammfleisch isoliertem fluoreszierendem *Pseudomonas*-Stamm und lagerte diese bei 10 °C. Bei einer Koloniezahl von 6×10^8 KBE cm^{-2} lag der Ammoniakgehalt an der Fleischoberfläche bei etwa 18 mg 100g^{-1} und entsprach damit in etwa dem Gehalt von frischem Rindfleisch. Erst bei einer Koloniezahl von 3×10^9 KBE cm^{-2} hatte sich der Ammoniakgehalt auf etwa 36 mg 100g^{-1} verdoppelt. In dem die Oberfläche bedeckenden Schleim wurden sogar Werte von über 72 mg 100g^{-1} gefunden.

Ein paralleler Anstieg von Koloniezahlen und Ammoniakkonzentration, wie von *Gill* und *Newton* (67) beschrieben, konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet werden. Der Anstieg der Ammoniakkonzentration schien zeitverzögert abzulaufen und erst bei Erreichen der maximalen Koloniezahl deutlich zu werden. Ähnliches wurde von *Gardner* und *Stewart* (63) festgestellt, die ebenfalls erst bei Koloniezahlen von über 10^9 KBE cm^{-2} einen Anstieg der Ammoniakkonzentration beobachteten.

In Übereinstimmung mit den Literaturangaben lässt sich also feststellen, dass eine signifikante Erhöhung des Ammoniakgehaltes von aerob kühlgelagertem Frischfleisch erst nach Beginn des sensorisch wahrnehmbaren Verderbs einsetzt. Ammoniak ist demnach bei aerob gelagertem Rindfleisch als Indikator für den beginnenden Verderb ungeeignet, aber als objektiver Indikator für den bereits eingetretenen mikrobiellen Verderb geeignet.

Bei der Lagerung von Rindfleisch in der Vakuumpackung war ein signifikanter Anstieg der Ammoniakkonzentration nicht erkennbar. Die bei dieser Lagerart hauptsächlich vorkommenden Milchsäurebakterien konnten, zumindest unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen, keinen Ammoniak freisetzen. Die noch vorhandenen Pseudomonaden waren offensichtlich in zu geringer Zahl vorhanden, um einen Anstieg der Ammoniakkonzentration zu verursachen.

Bei Hackfleisch, das in einer Atmosphäre von 30% CO_2 und 70% O_2 und bei 4 °C gelagert wurde, stellten *Fischer* et al. (64) ebenfalls keinen Anstieg der Ammoniakkonzentration fest. Bei 8 °C konnte eine leichte Erhöhung nur während eines Versuchs beobachtet werden. Bei mit einem Gemisch aus *Pseudomonas fluorescens* und *Salmonella typhimurium* beimpftem Hackfleisch wurde während der Kühllagerung ebenfalls praktisch kein Anstieg der Ammoniakkonzentration in den begasten Packungen bemerkt. Der Anstieg der Ammoniakkonzentrationen bei Lagerung der Fleischproben in Luft war hingegen sehr deutlich. Obwohl die Koloniezahlen der Pseudomonaden nach der Beimpfung wahrscheinlich sehr hoch waren, nähere Angaben wurden hierzu nicht gemacht, wurde bei einem erhöhten CO_2 -Gehalt, wie er auch in Vakuumpackungen beobachtet wird, kein Anstieg der Ammoniakkonzentration nachgewiesen. Unklar bleibt allerdings, ob der verwendete *Pseudomonas*-Stamm überhaupt eine Desaminase-Aktivität aufwies.

Im Gegensatz dazu fand *Schmitt* (9) während der Kühllagerung von originalverpacktem Schlachtgeflügel einen Anstieg der Ammoniakkonzentration. Allerdings unterschied sich die Zusammensetzung der Flora deutlich von der auf vakuumverpacktem Rindfleisch, da bei Schlachtgeflügel Pseudomonaden, Enterobacteriaceen und *Brochothrix thermosphacta* in sehr viel höheren Anteilen vorkamen.

Ammoniakgehalte im Profil

Bei der Untersuchung der Ammoniakgehalte quer durch ein Fleischstück wurde festgestellt, dass Ammoniak nur sehr langsam in das Fleischinnere diffundiert. 90% dieses an der Oberfläche von den Bakterien gebildeten Stoffes befinden sich

im ersten Zentimeter unter der Fleischoberfläche. Das Konzentrationsgefälle in Richtung Fleischzentrum war um so ausgeprägter, je höher der Ammoniakgehalt an der Oberfläche und damit verbunden auch die Gesamtkoloniezahl war. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt Gill (66), der bei mit *Pseudomonas sp.* beimpften kleinen Lammfleischstücken den Ammoniakgehalt im Profil untersuchte. Er erhielt ebenfalls erst bei höheren Koloniezahlen ein ausgeprägteres Konzentrationsgefälle in Richtung Fleischzentrum, wobei die höchsten Werte bei der Untersuchung des von der Oberfläche abgekratzten Schleims gefunden wurden. Im Fleisch selbst waren die Unterschiede nicht so ausgeprägt. Ab 0,5 cm Fleischtiefe waren praktisch keine Unterschiede mehr im Vergleich zu 1,5 cm tief geschnittenen Stücken zu beobachten, was in etwa den eigenen Ergebnissen entspricht.

Zusammenfassung

Der mikrobielle Verderb von bei 4 °C kühlgelagertem Rindfleisch war abhängig von der Verpackungsart. Bei aerober Lagerung dominierten Pseudomonaden in der Flora. Das Fleisch war beim Auftreten erster Fehlgerüche, nach etwa 6 Lagertagen und Gesamtkoloniezahlen von über 10^8 KBE cm^{-2} , als verdorben einzustufen. Ein signifikanter Anstieg der Ammoniakkonzentration im Fleisch war erst nach diesem Zeitpunkt nachweisbar. Ammoniakkonzentrationsprofile quer durch ein Fleischstück zeigten, dass Ammoniak von den Bakterien an der Oberfläche gebildet wurde und nur langsam in das Fleischinnere hineindiffundierte. Bei vakuumverpacktem Rindfleisch wurde die Flora von Milchsäurebakterien beherrscht. Diese verursachten eine sensorisch deutlich wahrnehmbare Säuerung des Fleisches. Nach 14 Lagertagen, d. h. 7 Tage nach Erreichen der maximalen Gesamtkoloniezahlen, setzte der Verderb ein, der durch das Auftreten von Fehlgerüchen gekennzeichnet war. Bei der Lagerung in der Vakuumpackung wurde kein Anstieg der Ammoniakkonzentration im Fleisch beobachtet. Ammoniak ist nach diesen Ergebnissen als Indikator für den beginnenden Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch bei beiden Lagerarten nicht geeignet.

Résumé

L'altération microbiologique de viande de boeuf conservée sous réfrigération à 4 °C dépend du type d'emballage utilisé. La flore microbienne lors d'un entre-posage en aérobie était principalement dominée par des pseudomonades. Après 6 jours de stockage, le nombre des germes totaux s'est élevé à 10^8 par cm^2 et des mauvais odeurs ont été constatées. Cette viande devait être considérée comme altérée. Ce n'est qu'après ces 6 jours qu'une augmentation significative de la concentration en ammoniac dans la viande a pu être détectée. Les profils de concentration en ammoniac, établis à travers un morceau de viande, ont démontré que l'ammoniac est formé à la surface et ne diffuse que lentement vers l'intérieur de la viande. La flore microbienne de viande de boeuf emballée sous vide a été caractérisée par une présence dominante de lactobacilles. Ces bactéries ont provoqué une acidification de la viande, nettement détectable à l'examen organoleptique. Le début du stade de détérioration, accompagné par de mauvais odeurs, a été observé après 14 jours d'entreposage, c'est-à-dire 7 jours après que le nombre de germes totaux avait atteint son maximum. Lors du stockage en emballage sous vide, aucune augmentation de la concentration en ammoniac de la viande n'a

pu être déterminée. Indépendamment du type d'emballage utilisé, l'ammoniac n'est donc pas, selon les résultats obtenus, un indicateur convenable du début d'une détérioration de viande de boeuf conservée sous réfrigération.

Summary

Microbial spoilage of refrigerated beef stored at 4 °C depended on the type of packaging. The microbial flora of aerobically stored beef consisted mainly of pseudomonads. After 6 days of storage with total viable counts of 10^8 cfu cm⁻² and the occurrence of off-flavours, the beef could be considered spoiled. A significant increase of the concentration of ammonia could only be detected after this time. Crosssections of the meat were made for the analysis of ammonia concentration profiles. It was observed that ammonia was produced by bacteria on the meat surface and only slowly diffused towards the centre of the meat. The flora of beef packaged under vacuum was dominated by lactic acid bacteria. They were responsible for the sensorically detectable acidification of the meat. Off-flavours, signifying spoilage, occurred after 14 days of storage even though the maximum total viable counts were already reached after 7 days. An increase of the concentration of ammonia could not be observed. According to these results, ammonia is not a suitable indicator of the beginning spoilage of refrigerated stored beef independent of the packaging conditions.

Literatur

1. Jay, J.M.: Modern food microbiology, 3rd edition, pp. 205–222. Van Nostrand Reinhold, New York 1986.
2. Mertin, F.: Entwicklung eines verbesserten Selektiv-Mediums für die Erfassung von *Brochothrix thermosphacta* in Lebensmitteln. Diplomarbeit ETH Zürich 1984.
3. Cerny, G.: Method for distinction of gramnegative from grampositive bacteria. European J. Appl. Microbiol. **3**, 223–225 (1976).
4. Daubner, I. und Mayer, J.: Die Anwendung des Oxidase-Testes bei der hygienisch-bakteriologischen Wasseranalyse. Arch. Hyg. Bakteriol. **152**, 302–305 (1968).
5. Hugh, R. and Leifson, E.: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gramnegative bacteria. J. Bacteriol. **66**, 24–26 (1953).
6. Schmidt-Lorenz, W.: Methoden zur quantitativen Isolierung und Bestimmung von in Lebensmitteln vorkommenden Bakterien. Zentralbl. Bakteriol. I, Suppl. 1, 270–324 (1965).
7. Vanderzant, C. and Nickelson, R.: A microbiological examination of muscle tissue of beef, pork and lamb carcasses. J. Milk Food Technol. **32**, 357–361 (1969).
8. Searcy, R.L., Reardon, J.E. and Foreman, J.A.: A new photometric method for serum urea nitrogen determination. Am. J. Med. Technol. **33**, 15–20 (1967).
9. Schmitt, R.E.: Die Veränderungen N-haltiger Verbindungen beim mikrobiellen Verderb von kühlgelagertem Schlachtgeflügel. Diss. ETH Nr. 7968, Zürich 1986.
10. Viehweg, S.H.: Die Bildung flüchtiger Stoffwechselprodukte beim mikrobiellen Verderb von kühlgelagertem Schlachtgeflügel. Diss. ETH Nr. 7055, Zürich 1982.

11. *Keller-König, B.H.*: Veränderungen der Gehalte an Glucose, Milchsäure, Lipiden und Carbonylverbindungen beim mikrobiellen Verderb von kühlgelagertem Schlachtgeflügel. Diss. ETH Nr. 8406, Zürich 1987.
12. *Gantenbein-Demarchi, C.H.*: Flüchtige Stoffwechselprodukte als Frische-Indikatoren von kühlgelagertem Schlachtgeflügel. Diss. ETH Nr. 8549, Zürich 1988.
13. *Gill, C.O.*: Microbial interaction with meats. In: Brown, M.H. (ed.), *Meat microbiology*, pp. 225–264. Applied Science Publishers, London 1982.
14. *Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T. und Sinell, H.-J.*: Fleisch. Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung, pp. 184–197. Ulmer Verlag, Stuttgart 1988.
15. *Gill, C.O.*: Intrinsic bacteria in meat. *J. Appl. Bacteriol.* **47**, 367–378 (1979).
16. *Reuter, G.*: Ermittlung des Oberflächenkeimgehaltes von Rinderschlacht tierkörpern. *Fleischwirtsch.* **64**, 1247–1252 (1984).
17. *Lazarus, C.R., Abu-Bakar, A., West, R.L. and Oblinger, J.L.*: Comparison of microbial counts on beef carcasses by using the moist-swab contact method and secondary tissue removal technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 217–218 (1977).
18. *De Zutter, L., Abrams, R. and Van Hoof, J.*: Bacteriological survey of beef carcasses: Correlation between swab and maceration method. *Arch. Lebensmittelhyg.* **33**, 36–38 (1982).
19. *Snijders, J.M.A., Janssen, M.H.W., Gerats, G.E. and Corstiaensen, G.P.*: A comparative study of sampling techniques for monitoring carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* **1**, 229–236 (1984).
20. *Gerats, G.E. und Snijders, J.M.A.*: Bestimmung von Keimzahlen in der Fleischindustrie. III. Das Stomacherverfahren und das Spiralverfahren. *Arch. Lebensmittelhyg.* **29**, 57–61 (1978).
21. *Gill, C.O.*: Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J. Food Prot.* **46**, 444–452 (1983).
22. *Barnes, E.M. and Impey, C.S.*: Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* **31**, 97–107 (1968).
23. *Gallo, L., Schmitt, R.E. and Schmidt-Lorenz, W.*: Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. I. Bacterial flora and growth during storage. *Lebensm.-Wiss. -Technol.* **21**, 216–223 (1988).
24. *Ingram, M. and Simonsen, B.*: Meat and meat products. In: ICMSF, *Microbial ecology of foods*, Vol. 2, Food commodities, pp. 333–409. Academic Press, New York 1980.
25. *De Zutter, L. und Van Hoof, J.*: Einfluss der Schlachtmethode auf die bakteriologische Beschaffenheit von Rinder-Schlacht tierkörpern. *Fleischwirtsch.* **62**, 501–504 (1982).
26. *Gill, C.O.*: The control of microbial spoilage in fresh meats. In: Pearson, A.M. and Dutson, T.R. (eds.), *Advances in meat research*, Vol. 2, pp. 49–88. Avi Publishing Company, Westport 1986.
27. *Newton, K.G., Harrison, J.C.L. and Wauters, A.M.*: Sources of psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *J. Appl. Bacteriol.* **45**, 75–82 (1978).
28. *Christopher, F.M., Seideman, S.C., Carpenter, Z.L., Smith, G.C. and Vanderzant C.*: Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. *J. Food Prot.* **42**, 240–244 (1979).
29. *Stringer, W.C., Bilskie, M.E. and Naumann, H.D.*: Microbial profiles of fresh beef. *Food Technol.* **23**, 97–102 (1969).
30. *Dainty, R.H., Shaw, B.G. and Roberts, T.A.*: Microbial and chemical changes in chill-stored red meats. In: Roberts, T.A. and Skinner, F.A. (eds.), *Food microbiology: Advances and prospects*, pp. 151–178. Academic Press, London 1983.

31. Reuter, G.: Hygiene der Fleischgewinnung und Verarbeitung. Zbl. Bakt. Hyg. B **183**, 1–22 (1986).
32. Ayres, J.C.: The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. J. Appl. Bacteriol. **23**, 471–486 (1960).
33. Jay, J.M.: Nature, characteristics, and proteolytic properties of beef spoilage bacteria at low and high temperatures. Appl. Microbiol. **15**, 943–944 (1967).
34. Ingram, M. and Dainty, R.H.: Changes caused by microbes in spoilage of meats. J. Appl. Bacteriol. **34**, 21–39 (1971).
35. Mossel, D.A.A. and Ingram, M.: The physiology of the microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol. **18**, 232–268 (1955).
36. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds.): Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore 1974.
37. Eribo, B.E. and Jay, J.M.: Incidence of *Acinetobacter* spp. and other gram-negative, oxidase-negative bacteria in fresh and spoiled ground beef. Appl. Environ. Microbiol. **49**, 256–257 (1985).
38. Dainty, R.H. and Hibbard, C.M.: Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. J. Appl. Bacteriol. **48**, 387–396 (1980).
39. Viehweg, S.H., Schmitt, R.E. and Schmidt-Lorenz, W.: Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. Part VII. Production of off-odours from poultry skin by bacterial isolates. Lebensm.-Wiss. -Technol. **22**, 356–367 (1988).
40. Hechelmann, H., Bem, Z., Uchida, K. und Leistner, L.: Vorkommen des Tribus Klebsiellae bei kühlgelagertem Fleisch und Fleischwaren. Fleischwirtsch. **54**, 1515–1517 (1974).
41. Grau, F.H.: The spoilage of meat and meat products. Food Technol. (Austr.) **30**, 385–388 (1978).
42. Heinz, G.: Fleischexporte aus den wichtigsten Produktionsländern Südamerikas. Fleischwirtsch. **61**, 14–22 (1981).
43. Seideman, S.C. and Durland, P.R.: Vacuum packaging of fresh beef: a review. J. Food Quality **6**, 29–47 (1983).
44. Seideman, S.C., Smith, G.C., Carpenter, Z.L., Dutson, T.R. and Dill, C.W.: Modified gas atmospheres and changes in beef during storage. J. Food Sci. **44**, 1036–1040 (1979).
45. Dainty, R.H., Shaw, B.G., Harding, C.D. and Michanie, S.: The spoilage of vacuum-packed beef by cold tolerant bacteria. In: Russell, A.D. and Fuller, R. (eds.), Cold tolerant microbes in spoilage and the environment, pp. 83–100. Academic Press, London 1979.
46. Dixon, N.M. and Kell, D.B.: The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. J. Appl. Bacteriol. **67**, 109–136 (1989).
47. Sutherland, J.P., Patterson, J.T., Gibbs, P.A. and Murray, J.G.: The effect of several gaseous environments on the multiplication of organisms isolated from vacuum-packaged beef. J. Food Technol. **12**, 249–255 (1977).
48. Gill, C.O. and Tan, K.H.: Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **39**, 317–319 (1980).
49. Pierson, M.D., Collins-Thompson, D.L. and Ordal, Z.J.: Microbiological, sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. Food Technol. **24**, 1171–1175 (1970).
50. Newton, K.G. and Rigg, W.J.: The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum-packed meat. J. Appl. Bacteriol. **47**, 433–441 (1979).
51. Erichsen, I. and Molin, G.: Microbial flora of normal and high pH beef stored at 4 °C in different gas environments. J. Food Prot. **44**, 866–869 (1981).

52. Hitchener, B.J., Egan, A.F. and Rogers, P.J.: Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 31–37 (1982).
53. Roth, L.A. and Clark, D.S.: Studies on the bacterial flora of vacuum-packaged fresh beef. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1761–1766 (1972).
54. Sutherland, J.P., Patterson, J.T. and Murray, J.G.: Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **39**, 227–237 (1975).
55. Grau, F.H.: Microbial growth on fat and lean surfaces of vacuum-packaged chilled beef. *J. Food Sci.* **48**, 326–328, 336 (1983).
56. Lücke, F.K. und Schillinger, U.: Die Milchsäurebakterien-Flora auf vakuumverpacktem Fleisch und ihr Einfluss auf die Haltbarkeit. *Mitteilungsbl. BA Fleischforschung Kulmbach* **92**, 6941–6946 (1986).
57. Roth, L.A. and Clark, D.S.: Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. *Can. J. Microbiol.* **21**, 629–632 (1975).
58. Campbell, R.J., Egan, A.F., Grau, F.H. and Shay, B.J.: The growth of *Microbacterium thermosphactum* on beef. *J. Appl. Bacteriol.* **47**, 505–509 (1979).
59. Grau, F.H.: Inhibition of the anaerobic growth of *Brochothrix thermosphacta* by lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 433–436 (1980).
60. Egan, A.F. and Grau, F.H.: Environmental conditions and the role of *Brochothrix thermosphacta* in the spoilage of fresh and processed meat. In: Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. and Skovgaard, N. (eds.), *Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity*, pp. 211–221. Academic Press, London 1981.
61. Beebe, S.D., Vanderzant, C., Hanna, M.O., Carpenter, Z.L. and Smith, G.C.: Effect of initial temperature and storage temperature on the microbial flora of vacuum packaged beef. *J. Milk Food Technol.* **39**, 600–605 (1976).
62. Rogers, R.E. and McCleskey, C.S.: Objective tests for quality of ground beef. *Food Technol.* **15**, 210–212 (1961).
63. Gardner, G.A. and Stewart, D.J.: Changes in the free amino and other nitrogen compounds in stored beef muscle. *J. Sci. Food Agric.* **17**, 491–496 (1966).
64. Fischer, A., Hammes, W.P., Baur, A. und Schramm, A.: Lagerfähigkeit von Hackfleisch in kontrollierter Atmosphäre. I. Einfluss auf physikalisch-chemische und sensorische Veränderungen. *Fleischwirtsch.* **63**, 1593–1602 (1983).
65. Gerhardt, U. und Dam Quang, T.: Methoden zur Ammoniakbestimmung in Fleisch und Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* **59**, 946–948 (1979).
66. Gill, C.O.: Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 401–410 (1976).
67. Gill, C.O. and Newton, K.G.: Development of bacterial spoilage at adipose tissue surfaces of fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 1076–1077 (1980).

Dr. Silke Meyns
 Eidg. Anstalt für Wasserversorgung,
 Abwasserreinigung und Gewässerschutz
 Abteilung Limnologie
 Überlandstrasse 133
 CH-8600 Dübendorf