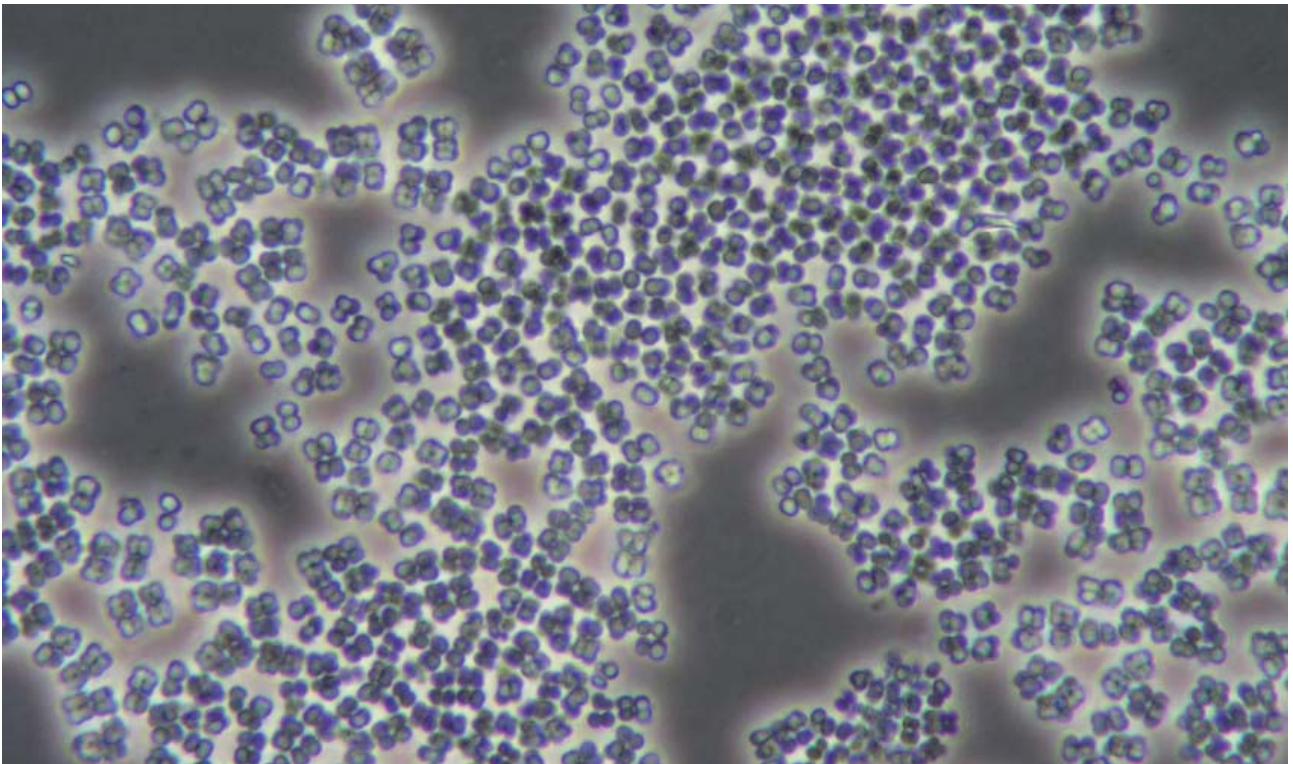


ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MIKROORGANISMEN AUS SPONTAN GEGÄRTEN SCHWEIZER ROHWÜRSTEN

Technisch-wissenschaftliche Informationen



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches
Volkswirtschaftsdepartement EVD
Forschungsanstalt
Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Inhalt

1. Einführung	3
2. Material und Methoden	3
2.1 Rohwürste	3
2.2 Isolierung und Konservierung	4
2.3 Identifizierung	4
2.4 Wachstum und Säuerung der Milchsäurebakterien	4
2.5 Bestimmung der Nitrat-Reduktase-Aktivität bei den Staphylokokken	4
2.6 Bestimmung des Genotyps	5
3. Resultate	5
3.1 Identifizierung	5
3.2 Charakterisierung	7
Wachstum und Säuerung der Milchsäurebakterien	7
Nitrat-Reduktase (NAR)-Aktivität	8
Bestimmung des Genotyps	10
4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	12
5. Literatur	12

ALP science

Titelbild

Staphylokokkus carnosus - ein in Rohwürsten typischer Vertreter von Mikrokokkazeen (Bild: Monica Gross, ALP)

Erstveröffentlichung

Autoren:

D. Isolini, J. Hummerjohann, A. Roetschi, H. Berthoud

Herausgeber

Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Schwarzenburgstrasse 161

CH-3003 Bern

Telefon +41 (0)31 323 84 18

Fax +41 (0)31 323 82 27

http: www.alp.admin.ch

e-mail: science@alp.admin.ch

Kontakt Rückfragen

Dino Isolini

e-mail dino.isolini@alp.admin.ch

Telefon +41 (0)31 323 82 59

Fax +41 (0)31 323 82 27

Gestaltung

Müge Yildirim (Layout)

Helena Hemmi (Konzept)

Erscheinung

Mehrmals jährlich in unregelmässiger Folge

ISBN 978-3-905667-43-1

ISSN 1660-7856 (online)

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MIKROORGANISMEN AUS SPONTAN GEGÄRTEN SCHWEIZER ROHWÜRSTEN

Keywords: Raw sausages, Spontaneous fermentation, Starter cultures, Lactobacilli, Staphylococci, Acidification, Growth, Nitrate reduction, Genotyping

1. Einführung

Mit dem Aufbau des Forschungsgebietes Fleischverarbeitung und basierend auf den bisherigen mikrobiellen Kompetenzen aus dem Käsebereich ist die Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP bestrebt, die bereits bestehende Stammsammlung um wilde Gärungsorganismen aus fermentierten Fleischerzeugnissen zu erweitern. Zu diesem Zweck sollen aus diversen spontan gegärten Schweizer Rohwürsten Bakterien aus den Familien der Milchsäurebakterien (Laktobazillen und Pediokokken) sowie derjenigen der Mikrokokkazeen (lebensmitteltaugliche Staphylokokken und Kocurien) isoliert werden. Dies deshalb, weil vor allem Stämme aus den genannten Familien üblicherweise in Fleisch-Starterkulturen eingesetzt werden [Hummerjohann (2004), Leroy et al. (2005)] und sich solche schon in einer früheren Arbeit an ALP aus in der Schweiz kommerziell erhältlichen Kulturen isolieren liessen (unveröffentlicht).

Mit der Begrenzung auf spontan gegärte Rohwürste sollen ausschliesslich Produkte untersucht werden, bei deren Herstellung keine kommerziell erhältlichen Starterkulturen zugegeben wurden. Daher sind nach der Identifizierung in einer 1. Phase die Genotypen der gewonnenen Isolate mit denjenigen von Stämmen aus in der Schweiz kommerziell erhältlichen Kulturen abzugleichen. In einer 2. Phase werden die Isolate vorerst auf einige für die Fleischfermentation relevante Eigenschaften geprüft. Dabei legte man sich auf die nachfolgenden Kriterien fest, die für die fleischtechnologischen Effekte der jeweiligen Familien von grosser Bedeutung sind:

- Nitrat-Reduktase-Aktivität bei den Mikrokokkazeen
- Wachstum und Säuerung in einem Rohwurst-ähnlichen Medium bei Laktobazillen und Pediokokken

2. Material und Methoden

2.1 Rohwürste

Für die Untersuchung wurden insgesamt 20 unterschiedliche Rohwürste, verteilt über die gesamte Schweiz, gemäss Tabelle 1 verwendet.

Dabei erwies sich in einzelnen Betrieben die gewünschte Abklärung bezüglich des für die vorliegende Untersuchung nicht gewollten Einsatzes von kommerziellen Fleisch-Starterkulturen als relativ schwierig, weil die diesbezüglichen Kenntnisse äusserst unsicher waren. Auch aus diesem Grund wollte man sich an ALP so weit wie möglich absichern, um gewährleisten zu können, dass ausschliesslich Wildstämme Eingang in die ALP-Stammsammlung finden.

Tab. 1: Art und Herkunft der untersuchten Rohwürste

Art der Rohwurst	Herkunft (Kanton und jeweilige Anzahl)
Salami	Tessin (2), Genf (2)
Salamino, Salametti	Tessin (3, wovon eine aus biologischer Produktion)
Bauernsalsiz	Graubünden (1)
Appenzeller Pantli	Appenzell Ausserrhoden (2) bzw. Innerrhoden (1)
Hirschwurst	Wallis (1)
Lauchwurst	Wallis (1)
Saucisse d'Ajoie	Jura (1)
Saucisson vaudois	Waadt (2)
Mortadella cruda	Tessin (2)
Luganighe	Tessin (1)

2.2 Isolierung und Konservierung

Für die Isolierung der einzelnen Bakteriengattungen wurden folgende Bedingungen gewählt:

- Milchsäurebakterien: allgemein auf MRS-Agar (Biolife)
- Fakultativ heterofermentative Laktobazillen: auf FH-Agar [Isolini et al. (1990)] und auf MRS-Agar mit 50 mg/l Vancomycin (Biolife), pH 5.4
- Pediokokken: auf MRS-Agar mit 1 mg/l Ampicillin (Sigma)
- Staphylokokken: auf Mannit-Salz-Agar (Biolife) und auf Baird-Parker-RPF-Agar (Bio Mérieux)

Sämtliche Platten wurden 3 Tage bei 30°C bebrütet (Milchsäurebakterien anaerob, Staphylokokken aerob). Die Reinigung der Kolonien erfolgte über drei Passagen (Milchsäurebakterien auf MRS-Agar und Staphylokokken auf Baird-Parker-RPF-Agar). Für die Konservierung sowie für die verschiedenen Untersuchungen wurden die Milchsäurebakterien in MRS-Bouillon (1%, 30°C, 20 h) und die Staphylokokken in Trypticase-Soy-Bouillon (BBL) mit 5g/l Hefeextrakt (BBL) und 5 g/l Glukose (Merck) bebrütet (1%, 30°C, 20 h). Das Sediment von je 10 ml Kultur wurde in 1.5 ml steriler Magermilch suspendiert und bei -40°C gelagert.

2.3 Identifizierung

Die Identifikation der Stämme erfolgte durch eine partielle Sequenzierung des 16S rRNA-Gens.

2.4 Wachstum und Säuerung der Milchsäurebakterien

Nach der Reaktivierung der Konserven in MRS-Bouillon (1%, 30°C, 22 h) wurde ein Teil der Isolate in eine modifizierte MRS-Bouillon (3) überimpft (1%, 30°C, 18 h). Diese Kulturen dienten als Inokulum für die Prüfung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Säuerungsaktivität. Zur Bestimmung der beiden Merkmale wurde ein Nährmedium eingesetzt, welches bezüglich pH und Gehalt an NaCl, NaNO₂ und Laktat ähnliche Bedingungen, wie sie in Rohwürsten vorherrschen, aufweist [Dossmann et al. (1996)]. Die optische Dichte (OD) des beimpften Mediums (je 6.0 ml) bei 578 nm lag zwischen 0.03 und 0.06. Pro Stamm wurden 6 Röhrchen beimpft (je ein Triplikat für die Messung des Wachstums und des pH-Wertes). Die Bebrütung erfolgte bei 25°C im Brutschrank. Nach 4, 8, 12, 23, 27 und 31 Stunden wurden der OD- und der pH-Wert gemessen.

Die Wachstumskurven wurden in logarithmischer Form aufgezeichnet und für die Berechnung der Generationsdauer (g) die exponentielle Phase der logarithmischen Kurve verwendet. Die beiden OD-Werte (N_t und N₀), die diese Stelle eingrenzten, wurden in die Formel einbezogen.

Berechnungsformel:

$$n = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2}$$
$$g = \frac{t}{n} = \frac{t \times \log 2}{\log N_t - \log N_0}$$

n	Anzahl Teilungen
N _t	Zellzahl (OD-Wert) zum Zeitpunkt t
N ₀	Zellzahl (OD-Wert) zum Zeitpunkt t = 0
t	Zeit zwischen N ₀ und N _t in Stunden
g	Generationsdauer

Als Lag-Phase wurde für die vorliegende Arbeit die Zeitspanne zwischen Beginn der Inkubation und dem Start des exponentiellen Wachstums definiert.

2.5 Bestimmung der Nitrat-Reduktase-Aktivität bei den Staphylokokken

Für das Screening der Koagulase-negativen Staphylokokken-Stämme bezüglich Nitrat-Reduktase (NAR)-Aktivität gelangte ein semi-quantitativer Test zur Anwendung. Nach Mauriello et al. (2004) wurden dazu Suspensionen von Übernachtskulturen einzelner Isolate auf eine einheitliche optische Dichte eingestellt und diese dann in ausgestanzten Kavitäten in einem Nitrat-haltigen Nährboden für 3 h bei 30°C inkubiert. Anschliessend erfolgte die Quantifizierung der NAR-Aktivität, indem der Durchmesser des gebildeten roten Hofes gemessen wurde (Nitrit-Bestimmung mittels Griess-Reagenzien führt zur Rotfärbung).

3. Resultate

2.6 Bestimmung des Genotyps

Die Stämme aus den in der Schweiz kommerziell erhältlichen Kulturen wurden 2004 isoliert und identifiziert; damals untersuchte man 13 Kulturen von 7 verschiedenen Lieferanten (Resultate unveröffentlicht). Aus dieser Arbeit wurden insgesamt 33 Isolate, die den Spezies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* und *Kocuria carniphila* zugeordnet wurden, konserviert.

Die Bestimmung des Genotyps erfolgte mittels rep-PCR. Zu diesem Zweck wurden 2 ml einer Kultur abzentrifugiert, die DNS der Bakterien wurde mit dem EZ1 DNA Tissue Kit von Qiagen extrahiert. Die DNS-Konzentration wurde gemessen und wenn nötig auf 10 ng DNS/µl verdünnt. Für jeden Ansatz waren 5 µl (d.h. 50 ng) DNS notwendig. Nach der PCR Reaktion trennte man die Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese voneinander. Danach wurden die Gele mit einer GelRed Lösung gefärbt und fotografiert.

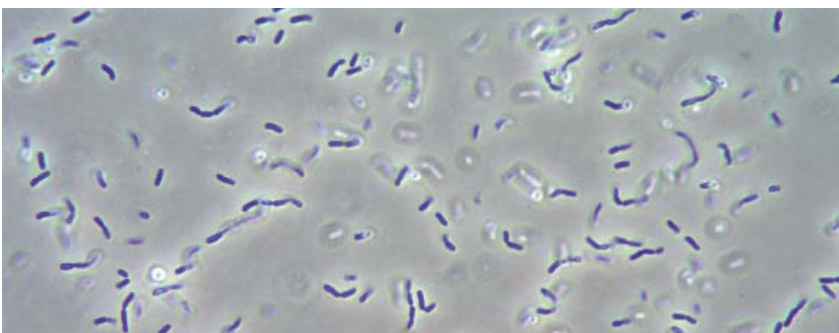
Der erste Schritt der Genotypisierung diente dem Vergleich zwischen den aus zwei Saucissons vaudois isolierten *Lactobacillus*-Stämmen mit denjenigen aus den Handelskulturen. Aus den Isolierungen konnten insgesamt 43 Stämme (12 kommerzielle und 31 Saucisson-Isolate) für die genotypischen Analysen herangezogen werden: 10 Isolate von *Lactobacillus plantarum* (4 kommerzielle und 6 Saucisson-Isolate) und 33 von *Lactobacillus sakei* (8 kommerzielle und 25 Saucisson-Isolate). Neben dem Vergleich mit den Isolaten aus den Handelskulturen interessierte auch das Ausmass der genetischen Variation innerhalb der Isolate aus den spontan gegärten Saucissons.

3.1 Identifizierung

Aus den 20 Rohwürsten konnten insgesamt 380 Isolate von Milchsäurebakterien (Laktobazillen und Pediokokken) sowie 47 Isolate von Mikrokokkazeen (lebensmitteltaugliche Staphylokokken und Kocuria) isoliert werden (Tabelle 2). Dabei war *L. sakei* am weitesten verbreitet; diese Spezies konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Es folgten *L. curvatus* (in 80% der Proben) und *L. plantarum* (in 60% der Proben). *L. paraplantarum* und *P. pentosaceus* traten in nur einem Viertel der Proben auf. In sechs von zwanzig Proben war jedoch keine der als potenzielle Starter geltenden *Staphylococcus*-Spezies vorhanden. In den übrigen Proben kamen *S. xylosus* und / oder *S. carnosus* vor. In zwei Produkten wurde zudem *K. carniphila* gefunden.

Tab. 2: Isolate, die als potenzielle Starter-Organismen gelten

Spezies	Anzahl Isolate	Anzahl Produkte
<i>Staphylococcus carnosus</i>	14	5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	28	8
<i>Kocuria carniphila</i>	5	2
<i>Lactobacillus curvatus</i>	60	16
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	17	5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	46	12
<i>Lactobacillus sakei</i>	237	20
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	20	5



Lactobacillus sakei - ein in Rohwürsten typischer Vertreter von Milchsäurebakterien (Bild: Monica Gross, ALP)

Tabelle 3 listet diejenigen Isolate bzw. Stämme verschiedener Spezies auf, welche üblicherweise nicht den Startern zugerechnet werden. Dabei gilt der in einer der Rohwurstproben nachgewiesene Stamm von *Leuconostoc carnosum* als potenzieller Bacteriocin-Bildner. Dies auch deshalb, weil es bereits Stämme der gerade genannten Spezies gibt, die als mögliche Schutzkulturen beschrieben wurden [Budde et al. (2003)]. Ferner wird in der Literatur auf die mögliche Anwendung von *Carnobacterium divergens* als Schutzkultur hingewiesen [Brillet et al. (2005)]. Bei den übrigen in Tabelle 3 aufgeführten Isolaten handelt es sich um Spezies, welche zum Teil durch das BUWAL [Frey (2003)] der Risikogruppe 2 zugeordnet werden.

Tab. 3: Isolate, die nicht zu den Starterkulturen i.e.S. gehören

Spezies	Anzahl Isolate	Anzahl Produkte	Risikogruppe*
<i>Aerococcus viridans</i>	3	2	2
<i>Carnobacterium divergens</i>	4	4	1
<i>Corynebacterium casei</i>	1	1	Auf der Liste nicht aufgeführt
<i>Corynebacterium variabile</i>	1	1	1
<i>Enterococcus sp.</i>	5	5	1/2
<i>Kocuria kristinae</i>	1	1	1
<i>Kocuria palustris</i>	1	1	1
<i>Kocuria rhizophila</i>	8	5	Noch ohne Einstufung
<i>Lactobacillus brevis</i>	16	5	1
<i>Lactobacillus casei</i>	8	3	1
<i>Lactobacillus coryneformis</i>	4	1	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	2
<i>Lactobacillus zeae</i>	1	1	1
<i>Leuconostoc carnosum</i>	1	1	1
<i>Macrocococcus caseolyticus</i>	3	1	Noch ohne Einstufung
<i>Staphylococcus caseolyticus</i>	1	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	5	2
<i>Staphylococcus equorum</i>	41	11	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	6	2	1
<i>Staphylococcus kloosli</i>	5	2	1
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	7	3	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19	8	2
<i>Staphylococcus succinus</i>	2	1	Noch ohne Einstufung
<i>Staphylococcus warneri</i>	5	4	1
<i>Tetragenococcus koreensis</i>	2	2	Auf der Liste nicht aufgeführt

* Gruppe 1: Organismen die kein oder ein vernachlässigbar kleines Risiko aufweisen;
 Gruppe 2: Organismen, die ein geringes Risiko aufweisen. (Gemäss «Verordnung über den Umgang mit Organismen in geschlossenen Systemen»)

3.2 Charakterisierung

Wachstum und Säuerung der Milchsäurebakterien

Die im Wachstum und in der Säuerung zwischen den untersuchten Milchsäurebakterien-Spezies beobachteten Unterschiede sind als nicht relevant zu beurteilen (Tabelle 3). Davon ausgenommen sind jedoch die *Pediococcus*-Isolate, die sich durch eine durchschnittlich höhere Lag-Phase bzw. Generationsdauer abhoben. Aber auch innerhalb der einzelnen Spezies traten zwischen den einzelnen Isolaten deutliche Unterschiede bezüglich lag-Phase, Generationszeit und Säuerungsaktivität auf, wie dies anhand der Standardabweichungen bzw. Minima und Maxima klar ersichtlich ist.

Tab. 4: Wachstum und Säuerung von verschiedenen Milchsäurebakterien-Spezies in einem Medium mit ähnlichen Bedingungen wie in Rohwürsten [nach Dossmann et al. (1996)] (Isolate aus Rohwürsten)

Spezies	N		Generationsdauer (Stunden)	lag-Phase (Stunden)	pH nach 12 Stunden	pH nach 31 Stunden
<i>L. plantarum</i>	20	Mittelwert	2.6	7.5	5.1	4.0
		Standardabweichung	0.5	2.6	0.3	0.3
		Minimum/Maximum	1.5/3.4	4/12	4.55/5.57	3.87/5.14
<i>L. paraplantarum</i>	12	Mittelwert	3.0	8.0	5.2	4.1
		Standardabweichung	0.5	2.4	0.3	0.1
		Minimum/Maximum	2.5/3.8	4/12	4.73/5.70	4.01/4.31
<i>L. sakei</i>	66	Mittelwert	2.9	7.8	5.4	4.5
		Standardabweichung	0.8	2.4	0.3	0.1
		Minimum/Maximum	1.2/5.8	0/12	4.54/5.80	4.18/4.74
<i>L. curvatus</i>	16	Mittelwert	2.6	6.8	5.1	4.4
		Standardabweichung	0.7	2.4	0.3	0.1
		Minimum/Maximum	1.9/4.3	4/12	4.65/5.56	4.24/4.75
<i>P. pentosaceus</i>	8	Mittelwert	3.9	13.3	5.2	4.4
		Standardabweichung	0.9	6.3	0.3	0.3
		Minimum/Maximum	2.2/5.3	8/23	4.81/5.60	4.23/5.01

Zu Vergleichszwecken wurden auch einige Stämme aus kommerziellen Kulturen charakterisiert (Tabelle 5). Dabei zeigte sich, dass die Werte für die untersuchten Parameter durchaus im Bereich derjenigen der Isolate aus den spontan gegärten Rohwürsten liegen. Der pH-Wert nach 12 Stunden erwies sich bei den kommerziellen Stämmen tendenziell als höher als der mittlere pH-Wert bei den Rohwurst-Isolaten. Dies weist auf einen weniger rasch verlaufenden Säuerungsbeginn beim Einsatz der Handelskulturen hin. Gerade im Zusammenhang mit dem bei Rohwürsten in der Praxis bekannten Qualitätsfehler der Übersäuerung, der sich vor allem negativ auf den Geschmack auswirken kann, muss diesem Aspekt Beachtung geschenkt werden. Umgekehrt zeigen die Maxima in Tabelle 4 aber auch, dass es durchaus Isolate bei den spontan gegärten Rohwürsten gibt, die bezüglich der Geschwindigkeit der pH-Absenkung im

Bereich der Handelskulturen liegen. Nach 31 Stunden bewegte sich der pH-Wert bei den sowohl in den Rohwurst-Isolaten wie auch in den Handelskulturen untersuchten Spezies (*L. sakei*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*) wieder in derselben Größenordnung, wobei auch hier innerhalb der Spezies z.T. grosse Unterschiede zu beobachten waren. Die vergleichbare pH-Absenkung bis 31 Stunden dürfte für die bei Rohwürsten meist mehrere Tage dauernde Säuerung wichtiger sein als der bis 12 Stunden beobachtete, unterschiedliche pH-Abfall.

Basierend auf dem aktuellen Stand der Kenntnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den Isolaten aus den spontan gegärten Rohwürsten auch solche aus kommerziellen Kulturen befinden. Dieser Aspekt wird derzeit über die Genotypisierung sämtlicher Isolate weiter verfolgt.

Tab. 5: Wachstum und Säuerung in einem Medium mit ähnlichen Bedingungen wie in Rohwürsten (Isolate aus kommerziellen Kulturen)

Isolat aus kommerziellen Kulturen	Generationszeit (Stunden)	lag-Phase (Stunden)	pH nach 12 Stunden	pH nach 31 Stunden
<i>L. sakei</i> RM52/3	3.2	8	5.65	4.56
<i>L. sakei</i> OST3	3.6	8	5.54	4.49
<i>L. plantarum</i> TD66/3	2.9	8	5	4.15
<i>L. plantarum</i> GEO1	3.9	12	5.52	4.09
<i>P. pentosaceus</i> GER1	3.1	23	5.37	4.26

Nitrat-Reduktase (NAR)-Aktivität

Die NAR-Aktivität ist technologisch v.a. bei der Pökellung von länger gereiften Fleischerzeugnissen, in deren Verlauf Nitrat über mikrobielle Nitrat-Reduktase in Nitrit umgewandelt wird, von grosser Bedeutung. Daher wurden vierzig der in den Tabellen 2 und 3 aufgeführten Staphylokokken-Isolate bezüglich ihrer NAR-Aktivität gescreent (Tabelle 6). Ein Beispiel, wie die NAR-Aktivität bestimmt wurde, ist zudem in Abbildung 1 dargestellt.

Tab. 6: Staphylokokken-Isolate aus den einzelnen Rohwurstproben, welche auf NAR-Aktivität getestet wurden

Nr.	Wurst-Typ	Isolierte Staphylokokken-Species (Anzahl)
1	«Salami Nostrano»	<i>Staphylococcus xylosum</i> (3)
2	«Salami Superiore»	<i>Staphylococcus xylosum</i> (4)
3	«Bauernsalsiz»	<i>Staphylococcus xylosum</i> (4), <i>Staphylococcus carnosus</i> (2)
4	«Appenzeller Pantli»	<i>Staphylococcus xylosum</i> (3), <i>Staphylococcus equorum</i> (1)
5	«Hirschwurst»	<i>Staphylococcus xylosum</i> (3), <i>Staphylococcus carnosus</i> (3)
6	«Lauchwurst»	<i>Staphylococcus warneri</i> (1), <i>Staphylococcus carnosus</i> (1)
7	«Appenzeller Pantli»	<i>Staphylococcus equorum</i> (1)
8	«Salami»	<i>Staphylococcus carnosus</i> (2)
9	«Saucisse d'Ajoje»	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (1)
10	«Saucisson Vaudois»	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (1)
11	«Saucisson Vaudois»	<i>Staphylococcus equorum</i> (1), <i>Staphylococcus carnosus</i> (6), <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (1)
12	«Mortadella Ticinese»	<i>Staphylococcus equorum</i> (1)
13	«Salametti Ticinesi»	<i>Staphylococcus equorum</i> (1)
14	Kommerz. Starterkulturen	<i>Staphylococcus xylosum</i> (2), <i>Staphylococcus carnosus</i> (2)

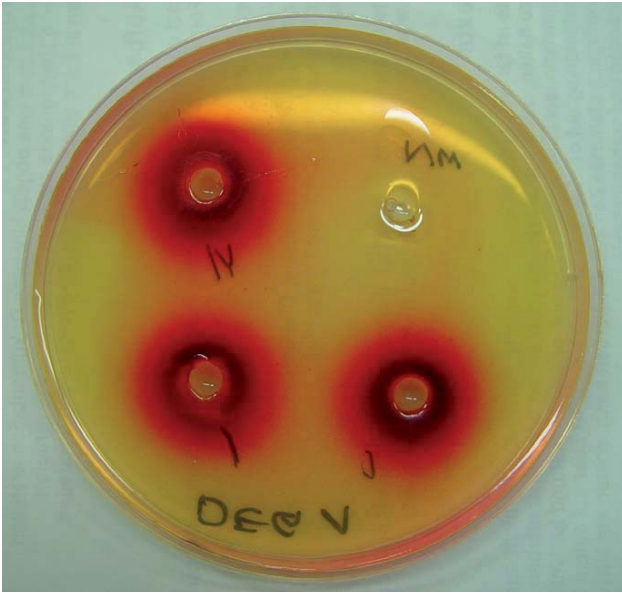
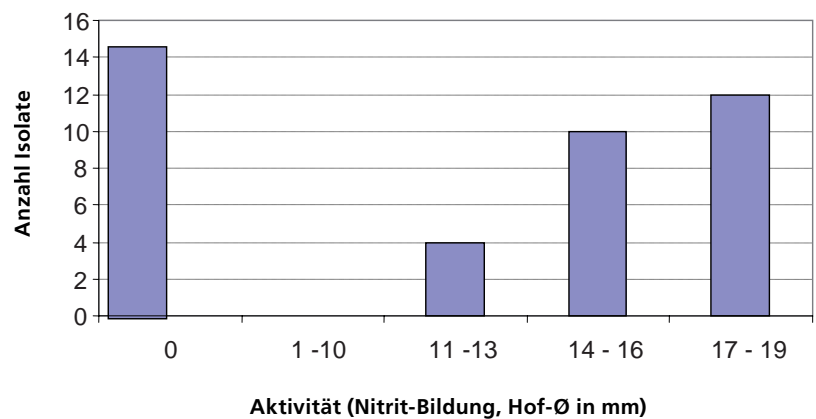


Abb. 1: Nitrat-Reduktase-Aktivität eines Isolates von *Staphylococcus xylosum* (bestimmt als Nitrit-Bildung (roter Hof), 3-fach Ansatz oben rechts: Negativ-Kontrolle mit *Enterococcus faecalis*)

Dabei erwiesen sich 35% der Isolate als NAR-negativ (Abbildung 2). Insgesamt 11 von 14 *Staphylococcus carnosus*, 11 von 17 *Staphylococcus xylosum*, 3 von 5 *Staphylococcus equorum*, 1 von 3 *Staphylococcus saprophyticus* und 0 von 1 *Staphylococcus warneri* waren NAR-positiv. Die meisten dieser Stämme zeigten eine Aktivität zwischen 14-19 mm grosser Hofbildung und waren damit vergleichbar mit Werten, die mit Stämmen aus kommerziellen Starterkulturen erreicht wurden (Daten unveröffentlicht). Kein NAR-positives Isolat bildete einen Hof unter 11 mm, d.h. es konnten keine Isolate ermittelt werden, die einen Hof zwischen 0 und 11 mm entwickelten und somit nur über eine geringe NAR-Aktivität verfügten. Überdies wurde festgestellt, dass einige Isolate derselben Spezies aus derselben Wurst unterschiedliche NAR-Aktivitäten aufwiesen.

Abb. 2: Nitrat-Reduktase-Aktivitäten von Staphylokokken-Isolaten



Bestimmung des Genotyps

In Abbildung 3 ist ein Beispiel für die Genotypisierung von vier Stämmen aus kommerziellen Kulturen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Stämme 1 und 2 identisch sind und sich von den Stämmen 3 und 4, die ihrerseits übereinstimmen, in einzelnen Banden klar unterscheiden.

Abbildung 4 gibt ein Beispiel für die Genotypisierung von einzelnen Wildstämmen wieder. In diesem Falle waren jeweils die Isolate 2 und 3, 4 und 5 bzw. 6 und 7 innerhalb, nicht aber zwischen den Gruppen identisch. Das Isolat 1 hob sich in seinem Profil von den übrigen Isolaten ab.

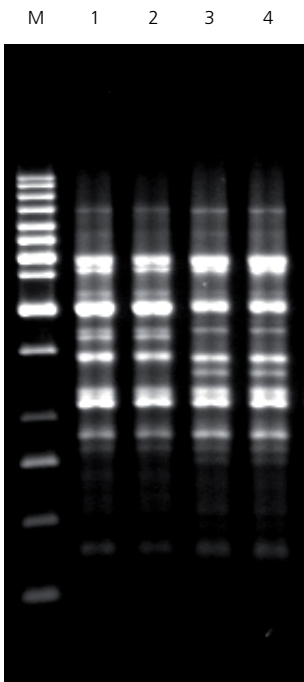


Bild links
M: 1 kb marker
Die Stämme 1 und 2 sind identisch
Die Stämme 3 und 4 sind identisch

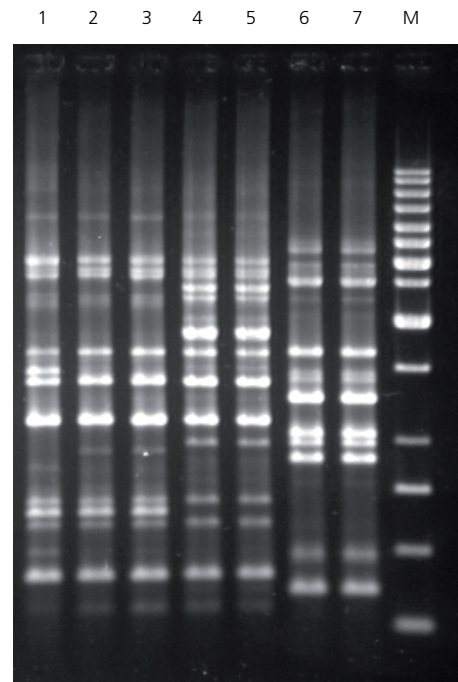


Bild rechts
M: 1 kb marker
Die Stämme 2 und 3 sind identisch
Die Stämme 4 und 5 sind identisch
Die Stämme 6 und 7 sind identisch
Der Stamm 1 hat ein einzigartiges Profil

Abb. 3: Beispiel von Profilen von vier Stämmen aus kommerziellen Kulturen

Abb. 4: Beispiel von Profilen von sieben Wildstämmen

Die ersten Ergebnisse der Genotypisierung der Laktobazillen-Isolate aus den beiden Saucissons zeigen deutlich, dass eine gewisse Heterogenität unter den Isolaten auftreten kann (Tabelle 7). Aus den sechs Saucisson-Isolaten von *L. plantarum* sind drei Stämme identisch und drei zeigen ein einzigartiges Profil. Dazu gibt es keine Übereinstimmung mit den kommerziellen Stämmen von *L. plantarum*. Abhängig von der höheren Anzahl der Isolate erwies sich die Variation in den Profilen bei *L. sakei* als deutlich grösser, indem innerhalb von 25 Saucisson-Isolaten 17 verschiedene Profile ermittelt wurden. Im Gegensatz zu *L. plantarum* sind unter den Isolaten von *L. sakei* jedoch drei mit einem Stamm aus einer kommerziellen Kultur identisch. Diejenigen Isolate, die sich von den Stämmen aus den geprüften kommerziellen Kulturen unterschieden, können somit mit grosser Wahrscheinlichkeit als Wildstämme eingestuft werden.

Tab. 7: Übersicht über die Resultate der Genotypisierung der Laktobazillen-Isolate aus zwei Saucisson vaudois

	<i>L. plantarum</i>	<i>L. sakei</i>
Anzahl der Isolate aus kommerziellen Kulturen	4	8
Anzahl der unterschiedlichen Profile	2	4
Anzahl der Isolate aus den Saucisson	6	25
Anzahl der unterschiedlichen Profile	4	17



«Geschnürte» Salami während der Reifung (Bild: Ruedi Hadorn, ALP)

4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

- Es konnten Mikroorganismen-Spezies isoliert werden, welche sich als potenzielle Gärungsorganismen für die Rohwurstfabrikation klassieren lassen.
- Die Untersuchung eines Teils der isolierten Milchsäurebakterien zeigte, dass bezüglich Wachstum und Säuerung die Variation innerhalb der einzelnen Isolate relativ breit ist. Es wurden Isolate gewonnen, welche mit kommerziellen Starterkulturen vergleichbar sind.
- Der grösste Teil der isolierten Staphylokokken verfügt über Nitrat-Reduktase-Aktivitäten; die Grössenordnungen sind vergleichbar mit denjenigen von Stämmen aus kommerziellen Starterkulturen.
- Die ersten genotypischen Untersuchungen und der entsprechende Vergleich mit Stämmen aus kommerziellen Kulturen zeigen, dass sich erwartungsgemäss Wildstämme isolieren lassen und innerhalb der Isolate eine gewisse Biodiversität auftritt.

Für eine abschliessende Beurteilung der gewonnenen Isolate sind die genetische Typisierung und die Charakterisierung der Stämme (Wachstum, Säuerung, Katalase-Aktivität, Verhalten gegenüber Nitrat und Nitrit, etc.) weiterzuführen. Damit sollen Stämme isoliert werden, welche im Hinblick auf die Entwicklung von spezifischen Starterkulturen, nach Möglichkeit bereits verbunden mit einem allfälligen Zusatznutzen, auch in technologischen Versuchen eingesetzt werden können.

5. Literatur

- Brillet A., Pilet M.F., Prevost H., Leroi F. (2005): *Int. J. Food Microbiol.*, 104 (3), 309-324.
- Budde B.B., Hornbaek T., Jacobsen T., Barkholt V., Koch A.G. (2003): *Int. J. Food Microbiol.* 83 (2), 171-184.
- Dossmann M.U., Vogel R.F., Hammes W.P. (1996): *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 334-339.
- Frey, J. (2003): Richtlinien Einstufung von Organismen: Bakterien. <http://www.bafu.admin.ch/publikationen>
- Hummerjohann, J. (2004): *Fleischfermentation. ALP science Nr. 482. Agroscope-Liebefeld Posieux, Bern.*
- Isolini D., Grand M., Glättli H. (1990): *Schweiz. Milchw. Forschung*, 19 (3), 57-59.
- Leroy F., Verluysen J., De Vuyst L. (2005): *Int. J. Food Microbiol.*, 106, 270-285.
- Mauriello G., Casaburi A., Blaiotta G., Villani F. (2004): *Meat Science*, 67, 149-158.