

Mikrobiologische Beurteilung von Schnittsalat und Sprossgemüse = The microbiological evaluation of prepared salad vegetables and sprouts

Autor(en): **Geiges, O. / Stählin, Bettina / Baumann, Barbara**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **81 (1990)**

Heft 6

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982633>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

O. Geiges, Bettina Stählin und Barbara Baumann, Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

Mikrobiologische Beurteilung von Schnittsalat und Sprossgemüse

The Microbiological Evaluation of Prepared Salad Vegetables and Sprouts

Einleitung

Der heutige Trend zur leichteren, kalorienarmen und gesunden Ernährung lässt die Nachfrage auch nach Blattsalaten ansteigen. Frische, vitaminreiche Produkte nehmen bei grossen Teilen der Bevölkerung einen wichtigen Stellenwert in der Ernährung ein.

In Grossküchen und Restaurationsbetrieben ist die Anwendung von Halbfertigprodukten seit Jahren eingeführt, weil sie eine willkommene Arbeitseinsparung bedeuten. Durch die steigende Zahl von Kleinhaushalten werden diese Produkte vermehrt auch im Detailhandel angeboten. Zu den erfolgreichsten Produkten dieser Art gehören die vorgeschnittenen Salate und die Sprossgemüse, insbesondere die Sojasprossen.

Die zeitliche Trennung von Produktion und Verzehr beim Schnittsalat, wie auch die Tatsache, dass Sojasprossen bei rund 30 °C produziert werden, stellen eine Reihe von mikrobiologischen Problemen. Beide Produktgruppen sind natürlicherweise mikrobiell hoch kontaminiert. Die Beurteilung insbesondere der hygienischen Relevanz dieser Keime wird teilweise kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit:

- der Bedeutung der Koloniezahlen von Schnittsalaten und Sprossgemüsen,
- der Frage nach der Herkunft und Zusammensetzung der Bakterienflora, insbesondere der Enterobacteriaceen,
- dem Einfluss von Lagerzeit und -temperatur auf den Mikroorganismengehalt im allgemeinen und die potentielle Vermehrung der Pathogenen im speziellen.

Material und Methoden

Probenmaterial

Rohsalate

Bezug der Rohsalate durch die Grosshändler Gastrostar, 8108 Dällikon, und Gerber, 8320 Fehraltorf), in einem Fall im Einzelhandel. Nähere Angaben zum Probenmaterial in Tabelle 1.

Tabelle 1. Daten der analysierten Rohsalate

Probe-Nr.	Produkt	Herkunft	Hersteller bzw. Lieferant
1	Cicorino rosso	Italien	Gastrostar
2	Endivien	Italien	Gastrostar
3	Zuckerhut	Italien	Gastrostar
4	Frisée	Italien	Gastrostar
5	Nüssli	Schweiz	Gastrostar
6	Nüssli	Schweiz	Migros City
7	Frischkresse	Schweiz	Gerber

Schnittsalate

Einkauf der Schnittsalate in Detailhandelsgeschäften der Stadt Zürich gemäss Tabelle 2. Wichtigste Hersteller sind Gastrostar, 8108 Dällikon, Eymann, 8185 Winkel, und Gerber, 8320 Fehraltorf.

Sojasprossen

Einkauf der Detail-Handelspackungen von Sojasprossen (Moyashi, 8302 Kloten) in Lebensmittelgeschäften der Grossagglomeration Zürich und Direktbezug beim Hersteller Nguyen Hai, 9000 St. Gallen. Einzelheiten zu den durchwegs 250 g fassenden Mustern in Tabelle 3.

Alfalfasprossen

Direktbezug YDL, 1635 La Tour-de-Trême

Sojasamen

Direktbezug Moyashi, 8302 Kloten

Tabelle 2. Daten der analysierten Schnittsalate

Probe-Nr.	Bezeichnung	Produzent	Anbieter	Kaufdatum	Packdatum	Enddatum	Lagerung im Handel
1	Frisée-Herzen	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	5. 12. 89	4. 12. 89	6. 12. 89	gekühlt
2	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso)	Gerber	Migros Rigiblick	24. 11. 89	22. 11. 89	24. 11. 89	un- gekühlt
3	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso, Frisée, Mais, Kabis)	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	1. 12. 89	29. 11. 89	1. 12. 89	gekühlt
4	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso, Nüsslisalat)	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	5. 12. 89	4. 12. 89	6. 12. 89	gekühlt
5	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso, Frisée, Nüssli)	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	12. 3. 90	10. 3. 90	13. 3. 90	gekühlt
6	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso, Frisée, Nüssli)	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	15. 3. 90	13. 3. 90	15. 3. 90	gekühlt
7	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Rosso, Frisée, Mais, Kabis)	Gastrostar	Coop Bahnhofbrücke	26. 3. 90	24. 3. 90	27. 3. 90	gekühlt
8	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Cicorino, Nüssli)	Eymann	Migros Rigiblick	16. 3. 90	15. 3. 90	17. 3. 90	gekühlt
9	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Cicorino, Nüssli)	Eymann	Migros Rigiblick	4. 4. 90	2. 4. 90	4. 4. 90	gekühlt
10	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Cicorino, Nüssli)	Eymann	Migros Rigiblick	11. 4. 90	9. 4. 90	11. 4. 90	gekühlt
11	Mischsalat (Endivien, Zuckerhut, Cicorino, Nüssli)	Eymann	Migros Rigiblick	2. 5. 90	1. 5. 90	3. 5. 90	gekühlt

Tabelle 3. Daten der analysierten Sojasprossen

Probe-Nr.	Produzent	Anbieter	Kauf-datum	Pack-datum	End-datum	Lagerung im Handel
1	Moyashi	Migros Rigiblick	20. 11. 89	19. 11. 89	21. 11. 89	gekühlt
2	Moyashi	Coop Bahnhofbrücke	1. 12. 89	29. 11. 89	21. 12. 89	gekühlt
3	Moyashi	Migros Stadelhofen	13. 8. 90	12. 8. 90	14. 8. 90	gekühlt
4	Moyashi	Migros Zollikerberg	15. 8. 90	14. 8. 90	16. 8. 90	gekühlt
5	Moyashi	Jelmoli, City	15. 8. 90	undatiert	undatiert	ungekühlt
6	Nguyen Hai	ab Hersteller	22. 8. 90	19. 8. 90		gekühlt
7	Nguyen Hai	ab Hersteller	22. 8. 90	20. 8. 90		gekühlt
8	Moyashi	Globus, City	5. 9. 90	undatiert	undatiert	ungekühlt
9	Moyashi	Migros, City	5. 9. 90	3. 9. 90	5. 9. 90	gekühlt

Nährmedien und Reagenzien

Homogenisat und Verdünnungslösung

Verdünnungslösung: 0,85% NaCl (Merck 6404) und 0,1% Microbiotone (Oxoid L72)

Koloniezahlbestimmung

Gesamtkoloniezahlbestimmung: Standard-Methods-Agar (BBL 11638)

Enterobacteriaceen: VRBG-Agar (Oxoid CM 485); Anaerocult A (Merck 13829); Anaerotest (Merck 15112)

E. coli: ECD-Medium (Oxoid CM 649)

Pseudomonaden: GSP-Agar (Merck 10230); Zusätze Penicillin G-K-Salz 100 000 I. E./g (Serva, 31749) und Pimaricin (Delvocid instant, Gist-brocades) 0,01 g/l

Salmonellen: Salmonella-Shigella(SS)-Agar (Difco 007401)

Listerien: Listeria-Selektiv-Agar (Merck 10986)

Identifizierung und Charakterisierung

Isolierung: BHI-Bouillon (Difco 0410-01-5); Standard-Methods-Agar (BBL11638)

Aufbewahren der Reinkulturen: BHI-Agar (Difco 0418-01-5)

Identifizierung Enterobacteriaceen: Api 20 E (Api # 2010)

Identifizierung Pseudomonaden (aerobe gramnegative Nicht-Enterobacteriaceen): Api 20 NE (Api # 2005)

Grobidentifizierung:

Aminopeptidase-Test: 4% L-Alanin-4-nitroanilid-hydroxichlorid in 50 mM Tris-maleat-Puffer pH 7,0

Katalase: 3% H₂O₂

Oxidations-Fermentations-Test: OF-Medium nach Hugh und Leifson (Merck 10282) und Paraffin, dickflüssig (Merck 7160)

Fluoreszenz: King's-Agar B (Merck 10991) mit Zusatz von 10 g/l Glycerin (Merck 4093)

Glucuronidase-Bildung: MUG-Confirmation Plates (Biolife 171300): MUG (Methyl-umbelliferyl-Glucuronid in Ampullen (Oxoid BR 71)

Indolbildung: 5 g Dimethylaminobenzaldehyd (Merck 3058) ad 100 ml mit 1 n HCl

Bakterienstämme

Salmonella enteritidis

Listeria innocua

Beide: Stammsammlung Labor für Lebensmittelmikrobiologie ETH Zürich

Methoden

Probenaufbereitung

Rohsalat: äussere, verschmutzte Blätter entfernen, Salatköpfe halbieren und über die Schnittfläche verteilt ca. 20 g Probe entnehmen. Vom Nüsslisalat direkt 20 g verarbeiten.

Schnittsalat und Sprossgemüse: ca. 20 g Probe entnehmen, Proben mit Verdünnungslösung auf das zehnfache der Einwaage auffüllen und im Stomacher während 90 Sekunden homogenisieren und dezimale Verdünnungen anlegen.

Sojasamen: 10 g Samen mit 90 ml Verdünnungslösung im Waring Blendor während 1 Minute aufschliessen und dezimale Verdünnungsreihe anlegen.

Koloniezahlbestimmungen

Von den erforderlichen Verdünnungsstufen je zwei Platten im Oberflächenverfahren ansetzen. Enterobacteriaceen im Gussplattenverfahren mit Overlay und anaerober Bebrütung nachweisen, um falsch positive Ergebnisse durch Pseudomonaden zu vermeiden. Bebrütung der Platten nach Tabelle 4. Auszählung der Kolonien nach Vorschrift der Nährbodenhersteller und Bestimmung des gegebenen arithmetischen Mittels.

Lagerversuche

Mischsalat und Rohsalat (Endivien) bei 4 °C und 20 °C, Alfalfa-Sprossen bei 4 °C, 10 °C und 20 °C bis zum deutlich sichtbaren Verderb lagern. Periodisch GKZ sowie KBE von Enterobacteriaceen und Pseudomonaden ermitteln, unter Benützung neuer Produktionseinheiten bzw. Salatköpfen für jede Probenverarbeitung.

Tabelle 4. Nährmedien und Kulturbedingungen

Nährmedium	Verwendungszweck	Milieu	Temperatur °C	Zeit h
Standard-Methods-Agar	Gesamtkoloniezahl	aerob	30	48
	Reinkultur	aerob		24–48
VRBG-Agar	KBE Enterobacteriaceen	anaerob	30	24–36
GSP-Agar	KBE Pseudomonaden	aerob	30	48
ECD-Agar	KBE E. coli	aerob	37	24
BHI-Bouillon	Anreicherung	aerob	30	24
BHI-Agar	Konservierung	aerob	30	24–48
	Aufbewahrung der Stämme		4	
King's Agar	Fluoreszenz	aerob	30	36–48
Listeria-Selektiv-Agar	KBE Listerien	aerob	37	48
SS-Agar	KBE Salmonellen	aerob	37	18–36
Hugh Leifson's Medium	O/F-Test	aerob/ anaerob	30	24–48
MUG Confirmation Plates	β -Glucuronidase-Test	aerob	37	4–24
Api 20 E	Identifizierung Entero- bacteriaceen	aerob/ anaerob	37	18–24/48
Api 20 NE	Identifizierung gramneg. Nicht-Enterobacteriaceen	aerob/ anaerob	30	24–48

Identifizierung der Enterobacteriaceen- und Nicht-Enterobacteriaceen-Flora

12 bis 25 Kolonien von VRBG- bzw. GSP-Agar in BHI-Bouillon überimpfen und durch Dreiösenausstrich auf Standard-Methods-Agar Reinkultur der Stämme herstellen. Zur Aufbewahrung die gereinigten Stämme auf BHI-Schrägröhrchen übertragen.

Die gereinigten Stämme nach den entsprechenden Vorschriften Api ansetzen und identifizieren.

Fluoreszenz

Bei nicht eindeutiger Api 20 NE-Identifizierung zusätzlich die Bildung fluoreszierender Pigmente prüfen. Dazu Stämme auf King's Agar austreichen und nach Tabelle 4 bebrüten. Fluoreszenz im UV-Licht (366 nm) prüfen.

Methylumbelliferyl-Glucuronidase(MUG)-Test

Alle von VRBG-Agar isolierten, indolpositiven Stämme auf Bildung von β -Glucuronidase untersuchen. 1 bis 2 Tropfen einer dichten Suspension des zu testenden Stammes auf den Testagar geben und nach Bebrütung laut Tabelle 4 die Anwesenheit von 4-Methyl-umbelliferon im UV-Licht (366 nm) prüfen.

Grobidentifizierung

Grobidentifizierung nach *Bischofberger* (1) bei einem Mischsalat in frischem Zustand und nach 6 Tagen Lagerung bei 20 °C. Reinkultur von je 80 von Standards-Methods-Agar isolierten Stämmen über Anreicherung in BHI-Bouillon und Dreiösen-Ausstrich auf BHI-Agar herstellen. Bebrütung nach Tabelle 4. Grobidentifizierung mit makroskopischer Kontrolle der Kolonie, mikroskopischer Untersuchung von Zellform, Beweglichkeit und Sporenbildung, Amino-peptidase-Test nach *Genry* (2), O/F-Test nach *Hugh* und *Leifson* (3) und der Katalase-Test nach *Simbert* und *Krieg* (4).

Schnittsalat: Wachstum von *S. enteritidis* und *L. innocua* während der Lagerung von Schnittsalat bei 4 °C und 20 °C

Herstellung der Impfsuspensionen: Vermehrung je eines Stammes von *S. enteritidis* und *L. innocua* in BHI-Bouillon gemäss Tabelle 4. Kulturen nach zweimaligem Zentrifugieren und Waschen in entionisiertem Wasser und nach mikroskopischer Zellzahlbestimmung auf die gewünschte Zelldichte einstellen.

Portionen von je 50 g Schnittsalat in Stomachersäcke einwiegen und mit der errechneten Zellzahl von *S. enteritidis* bzw. *L. innocua* in 15 ml entionisiertem Wasser versetzen. Anschliessend die Säcke verschweissen und den Salat gut mischen.

Proben bei 4 °C und 20 °C lagern und in regelmässigen Abständen KBE von *S. enteritidis* bzw. *L. innocua* nach Tabelle 4 bestimmen.

Sojasprossen: Vermehrung von *S. enteritidis* während der Sprossung von Sojasamen

Herstellung der Impfsuspensionen: Vermehrung von *S. enteritidis* in BHI-Bouillon gemäss Tabelle 4. Kulturen mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung auf eine Dichte von rund 10^5 /ml einstellen. 150 g Sojasamen in sterilem Becherglas mit Impfsuspension übergiessen und während rund 1 h stehen lassen. Anschliessend dekantieren und Sojasamen auf sterilem Fliesspapier kurz antrocknen.

Exsikkator (5 l) mit Exsikkatorplatte reinigen und desinfizieren. Gefäss bis knapp über die Exsikkatorplatte mit sterilem Wasser füllen. Auf die Exsikkatorplatte doppelte Lage steriler Watte legen und gut befeuchten, dann kontaminierte Samen auf der feuchten Watteschicht verteilen. Zum ausreichenden Sauerstoffzutritt Exsikkatordeckel auf drei Abstandhalter von 1 cm Höhe aufsetzen. Auskeimen der Samen bei 30 °C im Umluft-Brutschrank mit Frischluftzufuhr. Regelmässige Kontrolle des Wasserstandes im Exsikkator.

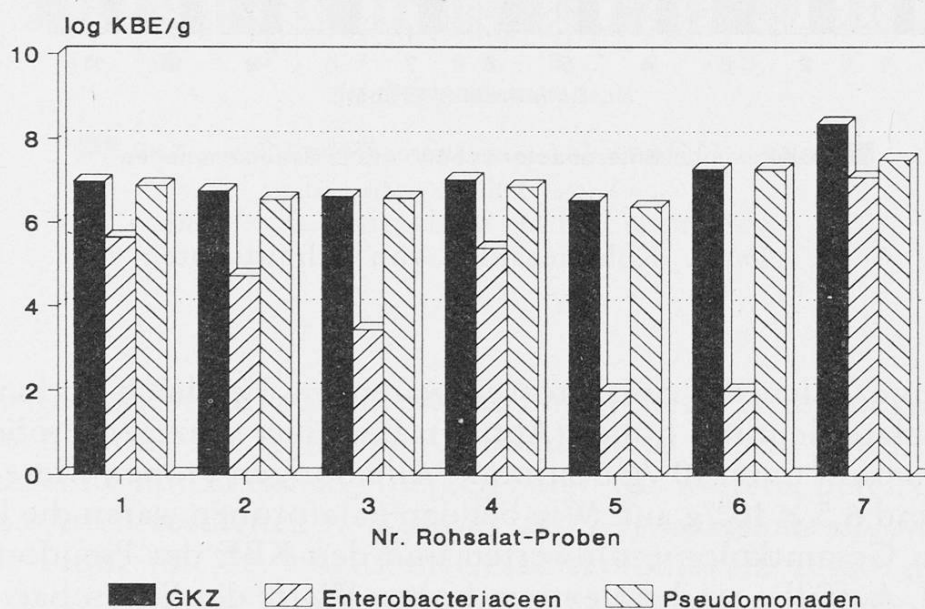
Zur Bestimmung der KBE von *S. enteritidis* 10 g Samen oder gekeimte Samen entnehmen und mit 90 ml Verdünnungslösung im Waring Blendor aufschliessen. Weitere Verarbeitung nach Tabelle 4.

Resultate

Gesamtkoloniezahlbestimmung sowie Bestimmung der KBE von Enterobacteriaceen und Pseudomonaden

Rohsalat

Wie Abbildung 1 zeigt, unterschieden sich die Gesamtkoloniezahlen der verschiedenen Rohsalate nur wenig. Sie lagen meist wenig unter- und oberhalb 10^7 /g. Davon ausgenommen ist die Frischkresse mit über 10^8 KBE/g. Die Koloniezahlen der Pseudomonaden lagen um weniger als eine Zehnerpotenz unterhalb der Gesamtkoloniezahlen. Im Unterschied dazu schwankten die Zahlen der koloniebildenden Einheiten von Enterobacteriaceen sehr stark. Während die beiden Proben Nüsslissalat KBE unter 10^2 /g aufwiesen, lag der entsprechende Wert für die Frischkresse bei rund 10^7 /g.



1 = Rosso 2 = Endivien 3 = Zuckerhut 4 = Frisée 5 und 6 = Nüsslissalat 7 = Frischkresse

Abb. 1. Koloniezahlen von Rohsalaten

Schnittsalat

Die Gesamtkoloniezahlen der Schnittsalate lagen mit einer Ausnahme zwischen $8,1 \times 10^5$ /g und $1,3 \times 10^7$ /g (Abb. 2). Die Schnittsalatprobe Nr. 9 wies mit einer Gesamtkoloniezahl von $2,2 \times 10^8$ /g einen Wert auf, der über eine Zehnerpotenz höher war als der nächst tiefere Wert. Im Gegensatz zu den Rohsalaten streuten die Werte der KBE von Enterobacteriaceen bei den Schnittsalaten weit weniger. Sie waren beim Frisée-Salat mit $1,1 \times 10^4$ /g zwar um eine Zehnerpotenz tiefer als der nächst höhere Wert, bei allen übrigen Proben, bei denen es sich ausschliesslich um Mischsalate handelte, wurden dagegen Koloniezahlwerte zwi-

schen $10^5/g$ und $10^6/g$ bestimmt. (Bei Probe 2 Enterobacteriaceen nicht bestimmt.) Die Koloniezahlenwerte für die Pseudomonaden lagen im allgemeinen nur geringfügig unterhalb der Gesamtkoloniezahlen. Einzig bei der Probe Nr. 9 betrug die Differenz nahezu eine Zehnerpotenz.

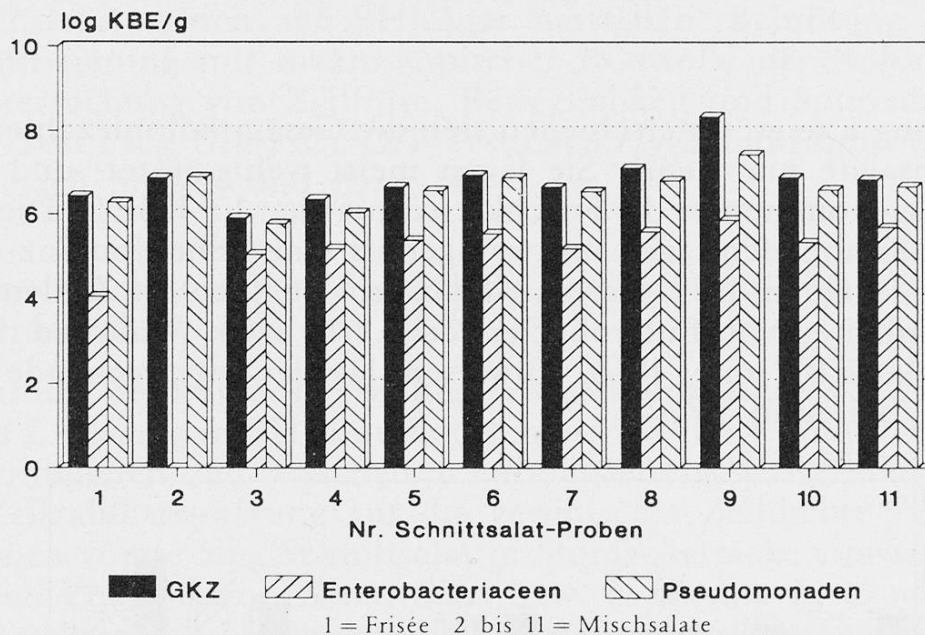


Abb. 2. Koloniezahlen von Schnittsalaten

Sojasprossen

Die Koloniezahlen der Sojasprossen waren im Vergleich zu jenen der Roh- und Schnittsalate deutlich höher (Abb. 3). Bei einer einzigen Probe wurde eine Gesamtkoloniezahl unter $10^7/g$ bestimmt. Alle übrigen Proben wiesen Werte zwischen $10^8/g$ und $6,5 \times 10^9/g$ auf. Wie bei den Salatproben waren die Unterschiede zwischen den Gesamtkoloniezahlenwerten und den KBE der Pseudomonaden nur unbedeutend. Auffällig sind die extrem hohen Werte der Enterobacteriaceen, die mit einer Ausnahme alle über $10^7/g$ lagen und die Koloniezahlenwerte der Pseudomonaden in den 4 Proben Nr. 2, 3, 4 und 5 überschritten. In den übrigen Proben betrug der Anteil der Enterobacteriaceen immer mehr als 10% der entsprechenden Gesamtkoloniezahlen.

Analyse der Enterobacteriaceen-Flora in Rohsalat, Schnittsalat und Sojasprossen

Rohsalat

Tabelle 5 zeigt die Api-20-E-Analysen der von den Rohsalaten isolierten Enterobacteriaceen-Stämme. Es wurden ausschliesslich Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* identifiziert. *E. agglomerans* war als einzige Spezies in allen Proben nachweisbar. In den Proben Nr. 1 bis 4 dominierten Vertreter der Gattung *Enterobacter*. In den gleichen Salaten fanden sich Stämme von *R. aquatilis*. Die Flora der Kresse

bestand vorwiegend aus der Art *K. pneumoniae, ssp. pneumoniae*. *E. americana* trat als einzelner Stamm nur im Rosso auf. Bei den beiden Mustern Nüsslisalat lag die Zahl der Enterobacteriaceen unter 10^2 KBE/g, so dass die Florenanalyse hier entfällt.

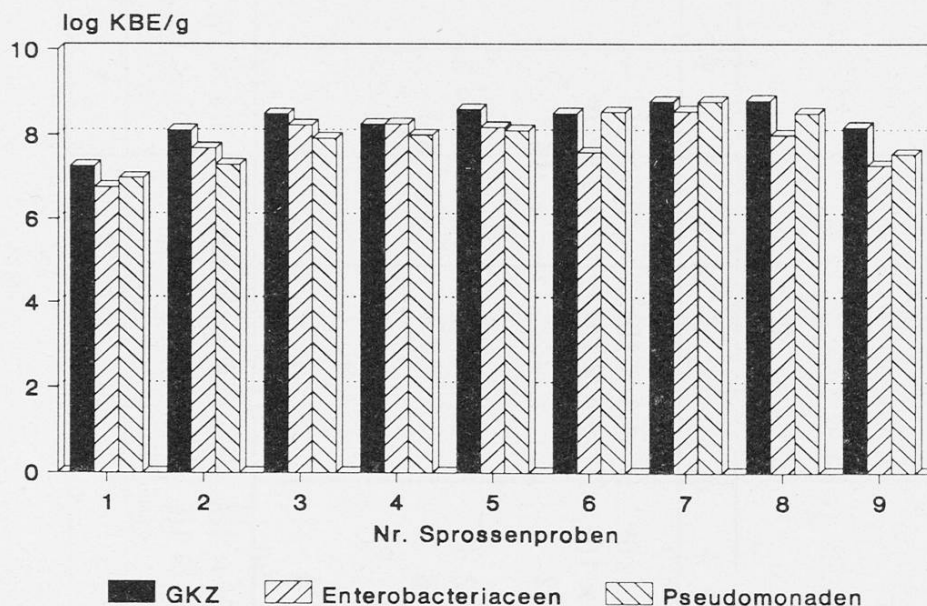


Abb. 3. Koloniezahlen von Sojasprossen

Schnittsalat

Nach Tabelle 6 wiesen die Schnittsalate ein breiteres Artenspektrum von Enterobacteriaceen auf als die Rohsalate. *E. cloacae* fand sich in sämtlichen Proben, *E. agglomerans* fehlte nur in einem einzigen Salat. Als weitere, bereits im Rohsalat nachgewiesene Arten verdienen *R. aquatilis* und *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* Erwähnung. Die Probe mit der höchsten Gesamtkoloniezahl zeigte mit 8 Spezies auch das breiteste Artenspektrum. Neben den üblichen Arten fanden sich auf dieser Probe *A. hydrophila*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* sowie *V. fluvialis*, die in keiner der anderen Proben nachgewiesen worden war. Aufgrund der Tatsache, dass bei den Proben 1, 3 und 4 auch Nicht-Enterobacteriaceen als typische Kolonien isoliert worden waren, und es sich bei diesen Stämmen ausschliesslich um Pseudomonas-Arten handelte, wurde der VRBG-Agar in den weiteren Versuchen unter anaeroben Bedingungen bebrütet. In der Folge wurden ab VRBG-Agar keine Nicht-Enterobacteriaceen mehr isoliert.

Sojasprossen

Das Artenspektrum der Enterobacteriaceen bei den Sojasprossen war im Vergleich zu den Roh- und Schnittsalaten nicht wesentlich verschieden (Tabelle 7), vor allem was die am häufigsten beobachteten Spezies betrifft. In acht von neun Proben nachgewiesen, traten *E. cloacae* und *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* am häufigsten auf, wobei *E. cloacae* zahlenmässig klar dominiert. *E. agglomerans* wurde im

Tabelle 5. Enterobacteriaceen-Flora der Rohsalate

Probe-Nr.		1	2	3	4	7
Gesamtkoloniezahl	KBE/g	$9,5 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$
Enterobacteriaceen	KBE/g	$4,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^4$	$2,9 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$
Anzahl Stämme isoliert		12	12	12	12	24
Enterobacter aerogenes						2
agglomerans		3	2	10	2	2
cloacae		5	6		6	
Ewingella americana		1				
Klebsiella penumoniae ssp. pneumoniae				1		20
Rahnella aquatilis		3	4	1	4	

1 = Rosso

2 = Endivien

3 = Zuckerhut

4 = Frisée

7 = Kresse

Tabelle 6. Enterobacteriaceen-Flora der Schnittsalate

Probe-Nr.	1	3	4	5	6	7	8	9
Gesamtkoloniezahl KBE/g	$2,7 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
Enterobacteriaceen KBE/g	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$
Anzahl Stämme isoliert	24	19	24	20	18	20	18	20
Aeromonas hydrophila								1
Enterobacter aerogenes								3
agglomerans	3	6	4	6	4		3	2
amnigenus	1							
cloacae	3	8	6	4	7	11	8	1
intermedius		1				1		
sakasakii			6					
Klebsiella oxytoca								1
pneumoniae ssp. pneumoniae			1	5	2			
Rahnella aquatilis				5	5	8	6	8
Serratia liquefaciens							1	2
Vibrio fluvialis								2
gramnegative								
Nicht-Enterobacteriaceen	17	3	7					
nicht identifiziert		1						

1 = Frisée 3 bis 9 = Mischsalate unterschiedlicher Zusammensetzung

Sprossgemüse weniger oft nachgewiesen als in den Salaten. Auch *R. aquatilis* wurde nur in einem Drittel der Proben und in geringen Anteilen gefunden. Mit Ausnahme von *S. odorifera* wurde keine Spezies oder Art isoliert, die nicht auch zur Roh- oder Schnittsalatflora gehört hätte.

4-Methylumbelliferyl-glucuronid(MUG)-Test

Beim Nachweis von *E. coli* können falsch positive Ergebnisse resultieren, wenn ausschliesslich auf Wachstum bei 44 °C und Indolbildung aus Tryptophan abgestellt wird. Es hat sich deshalb bewährt, solche Stämme zusätzlich dem MUG-Test zu unterziehen. Von den insgesamt 135 aus Schnittsalat isolierten und identifizierten Enterobacteriaceen-Stämmen wurde bei den indolpositiven Isolaten der MUG-Test durchgeführt. Indolpositive Stämme fanden sich einzig in der Probe Nr. 9, die auch die höchste Gesamtkoloniezahl aufwies. Es handelte sich um je einen Stamm *A. hydrophila* und *K. oxytoca* sowie zwei Isolate von *V. fluvialis*, die alle eine negative MUG-Reaktion zeigten.

Von den aus den Sojasprossen-Proben Nr. 1 und 2 isolierten Enterobacteriaceen waren indolpositiv: 1 *E. agglomerans*, 1 *E. cloacae*, 7 *K. oxytoca* und 1 *S. odorifera*. *E. agglomerans* und 1 Stamm *K. oxytoca* zeigten kein Wachstum bei 44 °C. Sämtliche Stämme waren MUG-negativ. Die Sojasprossen Nr. 3 bis 9 wurden mit Hilfe der ECD-Methode auf *E. coli* untersucht. In keiner der 7 Proben konnte in 0,1 g Wachstum MUG- und indolpositiver Keime beobachtet werden.

Analyse der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen in Rohsalat, Schnittsalat und Sojasprossen

Von den insgesamt über 300 von GSP-Agar isolierten und identifizierten Stämmen, die bei der Keimzählung in einem allgemeinen Sinn als Pseudomonaden erfasst wurden, gehören nicht alle der Familie der *Pseudomonadeceae* an. Bei 3 Stämmen handelte es sich um *A. hydrophila*, die im weiteren Sinne den Enterobacteriaceen zuzuordnen sind. Alle anderen Isolate gehören der Gruppe der gramnegativen, aeroben Stäbchen und Kokken nach Bergey's Manual (5) an. Sie werden im folgenden als gramnegative Nicht-Enterobacteriaceen bezeichnet.

Rohsalat

Pseudomonas-Arten dominierten die gramnegative Nicht-Enterobacteriaceen-Flora (Tabelle 8). *P. fluorescens* war in allen Proben mit allerdings unterschiedlichen Anteilen zu finden. *P. chlororaphis* und *P. putida* wurden in zwei Dritteln der Proben nachgewiesen.

Schnittsalat

Die Zusammensetzung der Nicht-Enterobacteriaceen-Flora des Schnittsalates unterschied sich unwesentlich von jener des Rohsalates. Wie Tabelle 9 belegt,

Tabelle 7. Enterobacteriaceen-Flora der Sojasprossen

Probe-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gesamtkoloniezahl KBE/g	$1,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$8,8 \times 10^8$
Enterobacteriaceen KBE/g	$5,8 \times 10^6$	$4,8 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$	$3,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$
Anzahl Stämme isoliert	25	24	20	20	20	20	19	20	20
Enterobacter aerogenes	3	7	17	9	1	2	2		
agglomerans	5					1	3		
amnigenus		2					1	5	2
cloacae	10	9		4	16	12	13	10	14
sakazakii				2	1				
Klebsiella pneumoniae									
ssp. pneumoniae	3	1	3	4	2	4		2	2
oxytoca	3	4							
Rahnella aquatilis				1				2	2
Serratia odorifera	1								
nicht identifiziert		1				1		1	

Tabelle 8. Flora der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen in Rohsalat

Probe-Nr.	1	2	3	4	5	6
Gesamtkoloniezahl KBE/g	$9,5 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$
Pseudomonaden KBE/g	$7,8 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$7,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
Anzahl Stämme isoliert	12	12	12	12	10	20
Acinetobacter baumannii		1				
Chryseomonas luteola	3		1			
Pseudomonas aureofaciens		5	5			7
chlororaphis			1	1	7	5
fluorescens	4	5	5	11	2	7
mendochina	1					
putida	3	1			1	1
vesicularis	1					

1 = Rosso

2 = Endivien

3 = Zuckerhut

4 = Frisée

5 und 6 = Nüsslisalat

Tabelle 9. Flora der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen in Schnittsalat

Probe-Nr.	5	6	7	8	9
Gesamtkoloniezahl KBE/g	$4,6 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
Pseudomonaden KBE/g	$3,7 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$2,7 \times 10^7$
Anzahl Stämme isoliert	16	20	19	20	19
<i>Aeromonas hydrophila</i>		1			2
<i>Acinetobacter baumannii</i>					1
<i>lwoffii</i>				1	
<i>Chryseomonas luteola</i>		2	5	1	
<i>Flavobacterium oryzihabitans</i>					1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1			
<i>aureofaciens</i>	2	3	3		3
<i>cepacia</i>	1				
<i>chlororaphis</i>	2	3	5	4	1
<i>fluorescens</i>	11	8	6	12	11
<i>mendochina</i>		1		1	
<i>pseudopomallei</i>		1		1	

5 bis 9 = Mischsalate unterschiedlicher Zusammensetzung

wurden *P. fluorescens* und *P. chlororaphis* in allen fünf untersuchten Proben gefunden. Sie waren zusammen mit *P. aureofaciens*, der in vier von fünf Proben nachgewiesen wurde, mit rund vier Fünftel der Isolate die zahlenmässig dominierenden Organismen. *C. luteola* fand sich in drei von fünf Mustern.

Sojasprossen

Die auf Roh- und Schnittsalat nachgewiesenen Gattungen und Arten von Bakterien fanden sich im wesentlichen auch auf Sojasprossen wieder (Tabelle 10). Die Anteile der einzelnen Arten an der gesamten Flora hatten sich aber wesentlich verschoben. Die Vertreter der Gattung *Pseudomonas* dominierten in ihrer Gesamtheit nur in einer einzigen Probe. *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* traten selten und mit geringen Anteilen auf. *P. putida* wurde in vier von sieben Proben nachgewiesen und stellte in Probe Nr. 3 die Hälfte der Isolate. Dominierte Art war *C. luteola*. Sie fand sich in sämtlichen Sojasprossenmustern und hatte in fünf von sieben Proben einen Anteil von 50% und mehr der Flora.

Bakterienvermehrung während der Lagerung von Rohsalat, Schnittsalat und Sprossgemüse

Rohsalat

Die Bakterienvermehrung bei Rohsalaten während der Lagerung bei 4 °C und 20 °C wird am Beispiel des Endiviensalates als der Hauptsorte bei der Schnittsalatproduktion aufgezeigt (Abb. 4). Es gilt zu berücksichtigen, dass für jede Untersuchung ein separater Salatkopf analysiert wurde, das Material also entsprechend inhomogen war und die Koloniezahlen deshalb grössere Schwankungen zeigen. Die Gesamtkoloniezahlen und die KBE der Pseudomonaden wiesen sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C Lagerung eine gewisse Tendenz zu grösseren Werten auf. Die KBE der Enterobacteriaceen nahmen bei 20 °C schnell, bei 4 °C langsam bis auf ein Maximum von rund 10^6 /g zu, anschliessend aber wieder ab.

Schnittsalat

Die Gesamtkoloniezahl des Mischsalates lag am Kauftag bei $1,1 \times 10^7$ /g. Während der Lagerung nahm die Zahl koloniebildender Einheiten kontinuierlich zu. Abbildung 5 zeigt, dass die Koloniezahlen bei der 20 °C-Lagerung viel schneller anstiegen als bei 4 °C. Bei der kühleren Lagertemperatur betrug der Anstieg der Koloniezahl innerhalb von 7 Tagen rund eine Zehnerpotenz, während die gleiche Zunahme bei der 20 °C-Lagerung bereits nach 2 Tagen erreicht war. Nach weiteren 3 Tagen bei 20 °C hatte die Gesamtkoloniezahl 10^9 /g erreicht. Der Salat zeigt zu diesem Zeitpunkt erste Anzeichen von Verderb mit leicht fauligem Geruch und braunen, teilweise schleimigen Schnittstellen. Nach 6 Tagen Lagerung bei 20 °C war der Verderb weit fortgeschritten und die Gesamtkoloniezahl hatte einen Wert von 4×10^9 erreicht. Der bei 4 °C gelagerte Schnittsalat zeigte kaum Verderb. Trotz der vergleichsweise hohen Keimbelastung von 10^8 /g war das Pro-

dukt nach 10 Tagen Lagerung visuell nahezu einwandfrei. Die Koloniezahl der Pseudomonaden betrug zu Beginn der Lagerung $5,9 \times 10^6/g$. Sie erreichte nach 10 Tagen bei 4 °C $10^8/g$ und nach 6 Tagen bei 20 °C $4 \times 10^9/g$. Eine analoge Entwicklung zeigte sich bei den Enterobacteriaceen, die sich im Laufe der Lagerung bei 4 °C um knapp eine Zehnerpotenz, bei 20 °C um eineinhalb Zehnerpotenzen vermehrten.

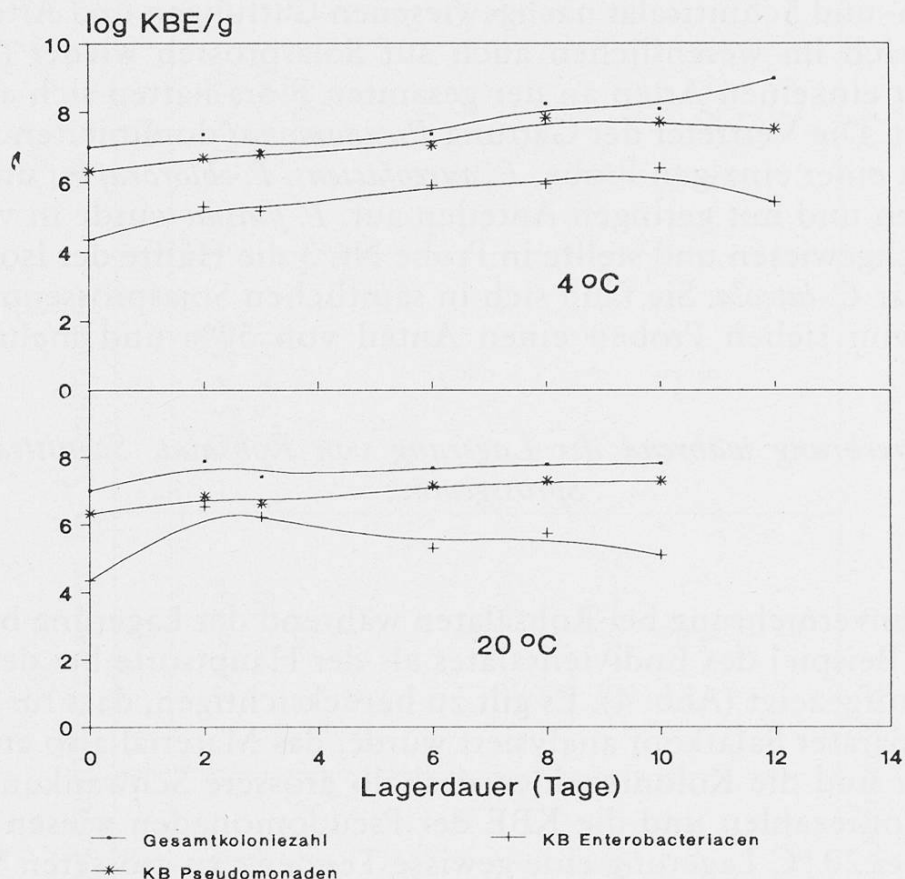


Abb. 4. Veränderung der Koloniezahlen während der Lagerung von ungeschnittenem Salat (Endivie)

Bakterienflora des Mischsalates zu Beginn und am Ende der Lagerung bei 20 °C

Die aeroben mesophilen Keime des bei 20 °C gelagerten Mischsalates wurden zu Beginn und nach 6 Tagen Lagerung einer Grobidentifikation unterzogen, wie sie *Bischofberger* (1) beschreibt. Gramnegative, nicht violett pigmentierte Stämme, umfassend die Familie der *Enterobacteriaceae* und der *Pseudomonadaceae* sowie die Gattungen *Vibrio* und *Aeromonas*, wurden als Gruppe zusammengefasst. Sie waren mit Hilfe der Api-Analysen bereits exakter identifiziert worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Die wichtigsten Verschiebungen in der Zusammensetzung der Bakterienflora ergaben sich bei der Gruppe der gramnegativen, nicht pigmentierten Organismen, deren relativer Anteil an der Flora im Laufe der sechstägigen Lagerung von 85% auf 69% zurückging. Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der grampositiven,

Tabelle 10. Flora der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen auf Sojasprossen

Probe-Nr.	3	4	5	6	7	8	9
Gesamtkoloniezahl KBE/g	$3,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
Pseudomonaden KBE/g	$8,4 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$8,8 \times 10^7$
Anzahl Stämme isoliert	20	20	20	20	20	20	20
Acinetobacter baumannii	1		1				1
junii			1			3	
Agrobacterium radiobacter	1		10				1
Alcaligenes xylosoxydans							
ssp. xylosoxydans				2			
Chryseomonas luteola	7	16	5	17	20	10	16
Pseudomonas aureofaciens						1	
cepacia		1				1	
chlororapis		2					
fluorescens						3	
paucimobilis							1
pickettii						1	
putida	11	1	2			1	
Xanthomonas maltophilia				1			1
nicht identifiziert			1				

oxidativen, nichtsporenbildenden Stäbchen von 0% auf 20% der gesamten Bakterienflora. Die Verschiebungen bei anderen Bakteriengruppen waren geringer und dürften eher zufällig sein.

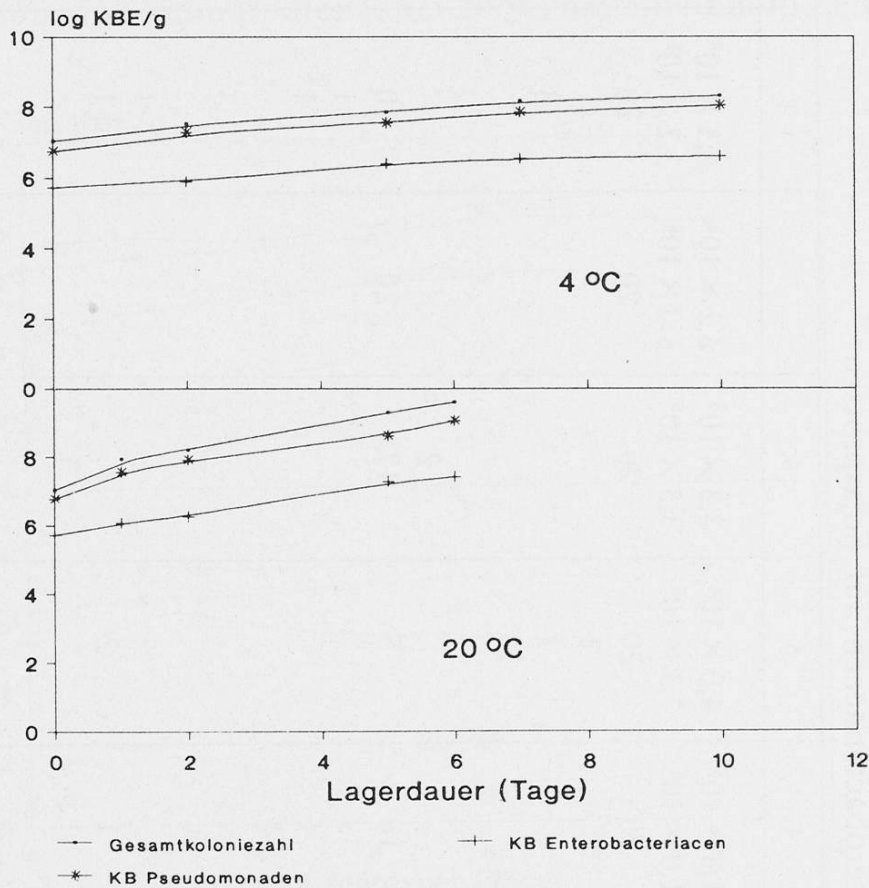


Abb. 5. Veränderung der Koloniezahlen während der Lagerung von Mischsalat

Tabelle 11. Bakterienflora von Mischsalat, frisch und nach 6 Tagen bei 20 °C

Familie/Gattung	Beginn der Lagerung Anteil in %	Ende der Lagerung Anteil in %
Anzahl Isolate	80	80
Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio, Enterobacteriaceae	85	69
Chromobacterium	3	
Micrococcus		4
Lactobacillus	10	2
Bacillus	2	5
Corynebacterium, Microbacterium		
Brevibacterium		20

Sprossgemüse

Die für den Lagerversuch verwendeten Alfalfa-Sprossen wiesen zu Beginn der Lagerung Koloniezahlwerte auf, die mit den Keimzahlwerten der Sojasprossen vergleichbar sind (Abb. 6). Die vorliegenden Ergebnisse lassen keine gesicherte Aussage über eine Zunahme oder Abnahme der Gesamtkoloniezahl und der KBE der Enterobacteriaceen und Pseudomonaden zu. Immerhin darf festgehalten werden, dass sich die bei 4 °C gelagerten Sprossen nach 17 Tagen äusserlich noch einwandfrei präsentierten, wogegen die bei 20 °C aufbewahrten Sprossen vollständig verdorben waren. Weil während der Lagerung keine Florenanalysen durchgeführt wurden, bleibt unklar, ob sich die Bakterien nicht oder nur wenig vermehrt haben oder ob sich durch das Absterben bestimmter Arten und die Vermehrung anderer Arten eine Verschiebung in der Florenzusammensetzung ergeben hat. Sämtliche Proben wurden nach der ECD-Methode auf *E. coli* untersucht. Die Werte lagen in allen Fällen unter der gewählten Nachweisgrenze von 10 KBE/g.

Wachstumsversuche mit *S. enteritidis* und *L. innocua*

Verhalten von *S. enteritidis* in Mischsalat

- Nicht näher aufgeführte Vorversuche hatten die folgenden Ergebnisse:
- Unter vier handelsüblichen Selektivmedien für Salmonellen hatte sich der Salmonella-Shigella (SS)-Agar für den Nachweis von *S. enteritidis* innerhalb einer sehr grossen Zahl anderer Enterobacteriaceen am besten geeignet.
 - Vergleichsversuche hatten gezeigt, dass durch die Zugabe von 15 ml destilliertem Wasser zu 50 g Salat zur besseren Verteilung von *S. enteritidis* kein Unterschied in der Entwicklung der Gesamtkoloniezahl im Vergleich zu Proben ohne Salmonellen- und Wasserzugabe eintritt.

Abbildung 7 zeigt das Verhalten der Salmonellen während der Lagerung bei 4 °C und 20 °C. Bei 4 °C führten die drei Versuche zu einer kontinuierlichen Abnahme der Koloniezahl im Laufe der Lagerung. Bei der hohen Anfangskonzentration von $1,3 \times 10^7$ /g ging die Koloniezahl innerhalb von 12 Tagen um 3 Zehnerpotenzen auf $1,2 \times 10^4$ /g zurück. Niedrigere Beimpfungsmengen führten in 10 Tagen zu einer Abnahme um 1 bis 1,5 Zehnerpotenzen. Die beiden Lagerversuche bei 20 °C zeigen ein uneinheitliches Bild der Salmonellenentwicklung. Während die KBE von Salmonellen in einem Versuch konstant blieben, nahm der Salmonellengehalt im zweiten Versuch zuerst leicht ab und stieg gegen Lagerende wieder an. Wegen der hohen Lagertemperatur, die den Verderb des Schnittsalates beschleunigte, wurde die Lagerdauer auf 6 bzw. 7 Tage beschränkt.

Verhalten von *L. innocua* in Mischsalat

Analog zu den Versuchen mit *S. enteritidis* wurden Lagerversuche bei 4 °C und 20 °C mit *L. innocua* durchgeführt. Aus den drei Versuchen bei der 4 °C-Lage-

rung kann keine Tendenz der Koloniezahlveränderung abgeleitet werden (Abb. 8). Während im Versuch mit der niedrigsten Beimpfungsmenge die Anzahl Listerien innerhalb von 10 Tagen um annähernd 1 Zehnerpotenz zunahm, war bei hoher Ausgangskoloniezahl das Gegenteil zu beobachten. Die Koloniezahl sank zwischen dem dritten und siebten Tag um 2 Zehnerpotenzen und blieb anschließend auf diesem Niveau stehen. Im Salat mit der mittleren Bakteriendichte von rund 10^6 KBE/g im Ausgangssubstrat blieb die Koloniezahl praktisch konstant. Beachtenswert bei diesen drei Versuchen ist sicherlich die Tatsache, dass sich die drei unterschiedlichen Ausgangskoloniezahlen innerhalb der Lagerzeit von 10 Tagen alle auf ein gemeinsames Niveau von rund 10^6 /g eingependelt hatten.

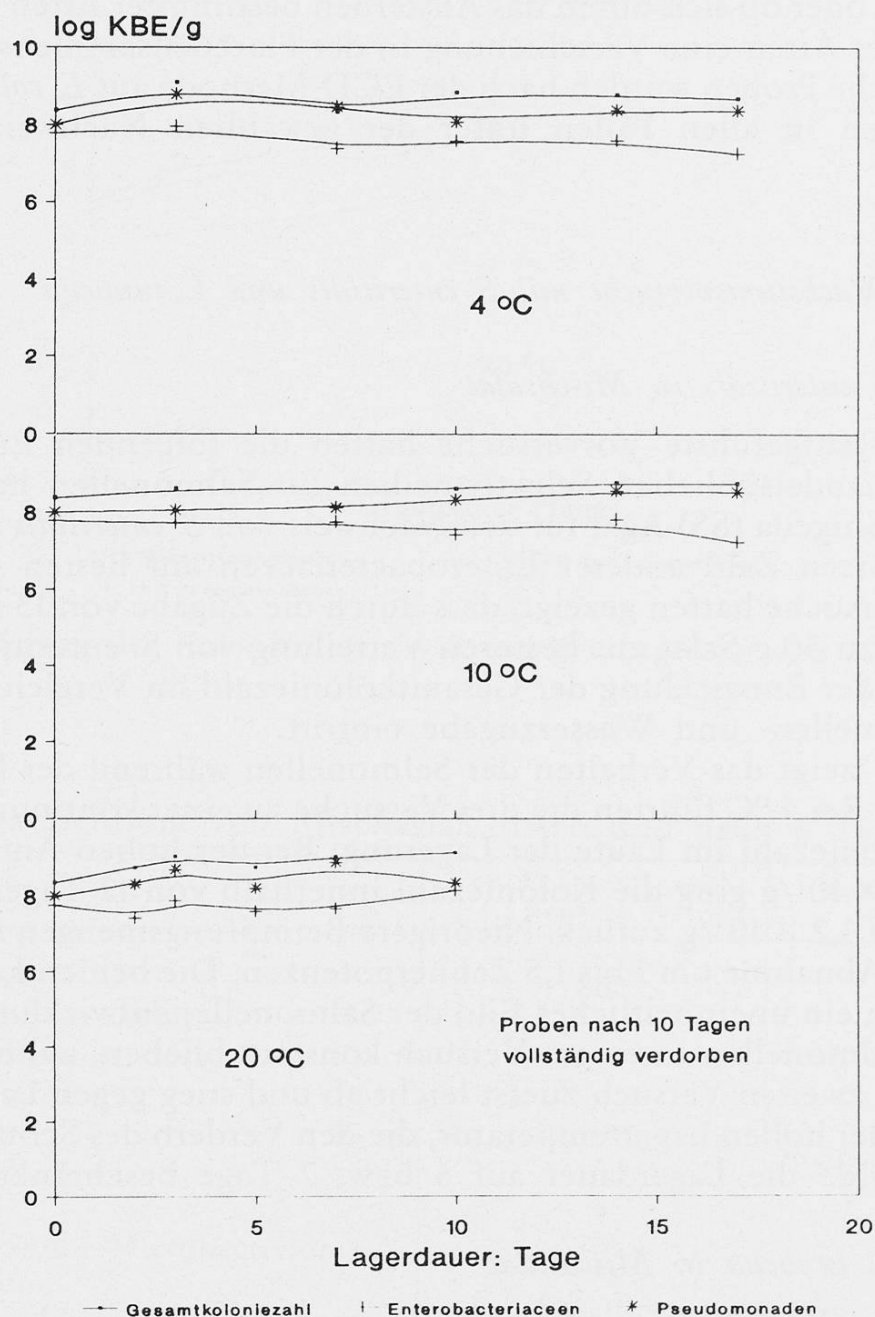


Abb. 6. Veränderung der Koloniezahlen während der Lagerung von Alfalfa-Sprossen

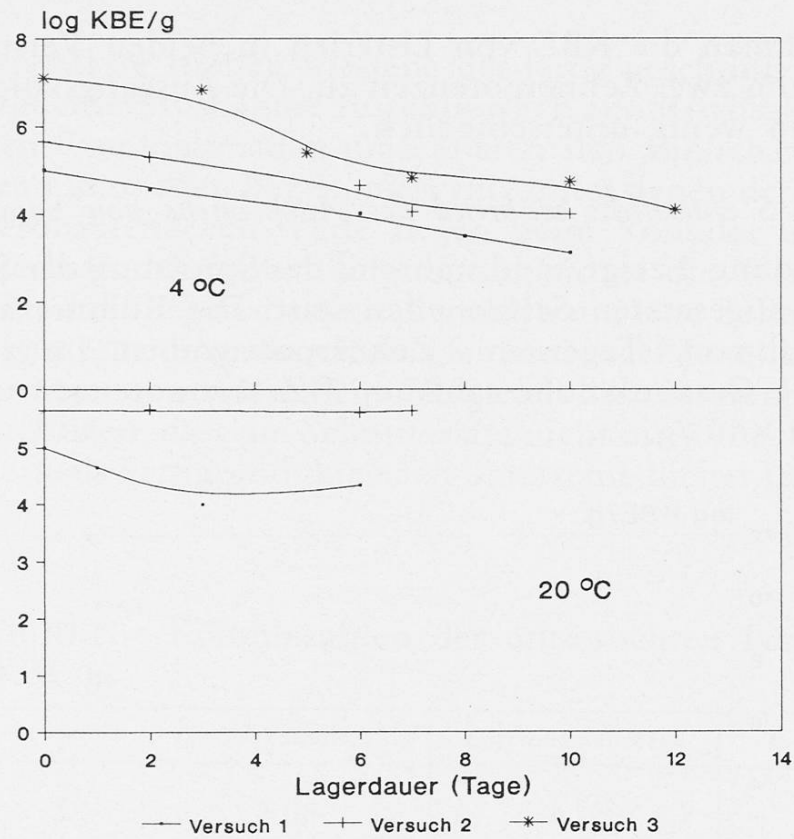


Abb. 7. Veränderung der Koloniezahlen von *S. enteritidis* während der Lagerung von Mischsalat

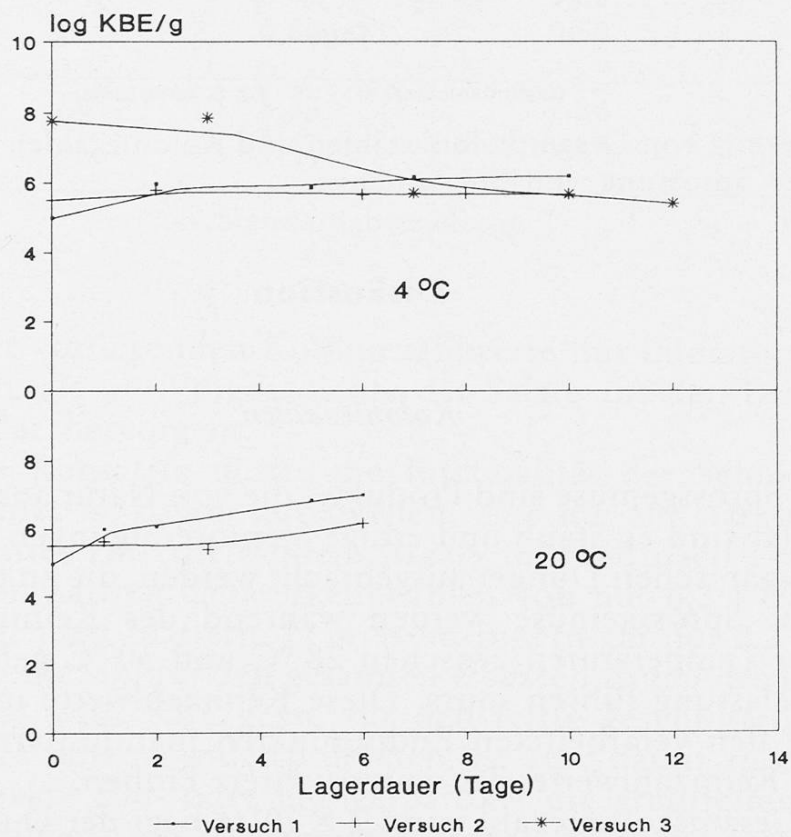


Abb. 8. Veränderung der Koloniezahlen von *L. innocua* während der Lagerung von Mischsalat

Bei 20 °C nahmen die KBE von Listerien in beiden Versuchen im Zeitraum von 6 Tagen um zwei Zehnerpotenzen zu. Die Ausgangskoloniezahl war in beiden Versuchen wenig unterschiedlich.

Verhalten von S. enteritidis während des Auskeimens von Sojasprossen

Wie Abbildung 9 zeigt, fand während der Sprossung der Sojasamen eine Vermehrung der zugesetzten Salmonellen statt. Die Koloniezahl von *S. enteritidis* nahm innerhalb von 4 Tagen um 3 Zehnerpotenzen zu. Im gleichen Zeitraum erhöhte sich die Gesamtkoloniezahl um 5 Zehnerpotenzen und erreichte einen Wert von $6,5 \times 10^9$ /g.

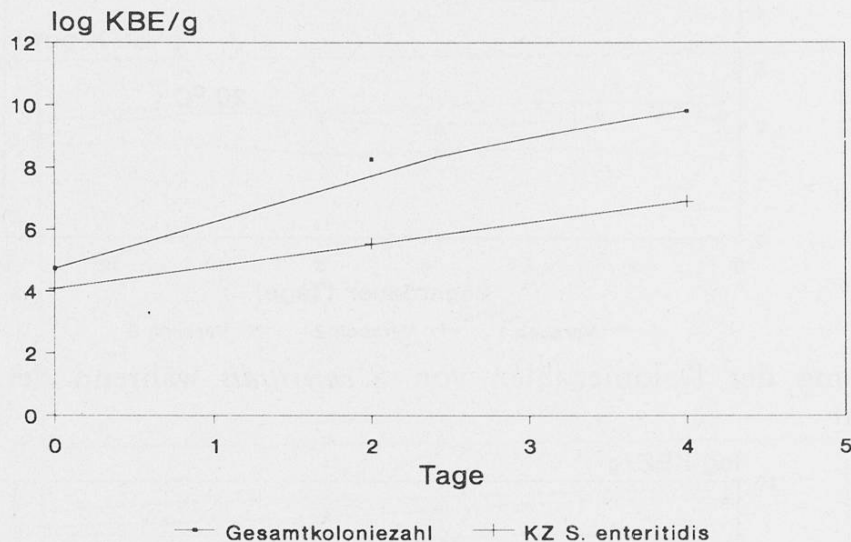


Abb. 9. Veränderung von Gesamtkoloniezahlen und Koloniezahlen von *S. enteritidis* während der Sprossung von Sojasamen

Diskussion

Koloniezahlen

Salate und Sprossgemüse sind Produkte, die von Natur aus hoch kontaminiert sind. Beim Salat sind es Staub und erdige Verunreinigungen sowie Organismen, die mit dem organischen Dünger ausgebracht werden, die zu diesen hohen Keimzahlen führen. Sprossgemüse werden während des Keimungsvorganges sehr feucht und bei Temperaturen zwischen 28 °C und 30 °C gehalten, was zu einer hohen Keimbelastung führen muss. Diese Keimzahlwerte müssen sich zwangsläufig auch in den verarbeiteten Endprodukten manifestieren. Tabelle 12 zeigt die mittleren Keimzahlwerte der untersuchten Proben.

Mit einer Gesamtkoloniezahl von $1,2 \times 10^7$ /g liegt der Durchschnitt der Rohsalate nur unbedeutend über dem entsprechenden Wert für den Schnittsalat. Erstaunlich dabei ist die Tatsache, dass die Werte trotz der unterschiedlichen Roh-

produkte im gleichen Masse streuen wie jene der fertig geschnittenen und verpackten Salate, die mit einer Ausnahme ausschliesslich aus Mischsalat bestanden. Die Resultate bei den Pseudomonaden präsentieren sich ähnlich. Die Koloniezahlenwerte für die Pseudomonaden liegen nur wenig unter denen der Gesamtkoloniezahlen. Die Enterobacteriaceen-Werte liegen beim Rohsalat um nahezu 3 Zehnerpotenzen unterhalb der Gesamtkoloniezahl, wobei die Werte sehr stark streuen. Im fertigen Produkt liegen die Koloniezahlen um eine Zehnerpotenz höher und die Streuung ist – bedingt durch die gleichmässige Verteilung der Organismen – deutlich geringer geworden. Beim Vergleich der entsprechenden Wertpaare gilt zu berücksichtigen, dass die Schnittsalate nicht direkt nach der Produktion analysiert, sondern als Fertigprodukte nach unterschiedlicher Lagerdauer untersucht wurden.

Tabelle 12. Durchschnittliche Koloniezahlen der untersuchten Proben
(als log KBE/g)

		Gesamtkoloniezahl	Enterobacteriaceen	Pseudomonaden
Rohsalat $n = 7$	D_x	7,08	4,32	6,87
	s_x	0,61	1,92	0,40
Schnittsalat $n = 11$	D_x	6,82	5,28	6,59
	s_x	0,60	0,50	0,45
Sojasprossen $n = 9$	D_x	8,33	7,84	7,96
	s_x	0,47	0,57	0,60

D_x = Durchschnitt

s_x = Standardabweichung

n = Anzahl Proben

Der Vergleich der vorliegenden Koloniezahlenwerte mit Literaturwerten ist insofern problematisch, als die Vorgeschichte der Salate aus den Beschreibungen nicht oder nur unklar hervorgeht.

Die Qualität der Rohsalate dürfte die Endqualität der Schnittsalate stark beeinflussen. Allerdings ist davon auszugehen, dass die am stärksten kontaminierten, äusseren Blätter entfernt werden. *Maxcy* (6) fand nach Entfernung der äussersten Blätter von Lattich Gesamtkeimzahlen von nur $6,3 \times 10^4$ KBE/g auf den unmittelbar folgenden Blättern. Er wies im Innern gar nur $3,2 \times 10^1$ KBE/g nach. Als Gesamtkoloniezahl für den gesamten essbaren Anteil des Lattichs führt der gleiche Autor $1,6 \times 10^5$ KBE/g an, für den fertig geschnittenen Salat gar $4,2 \times 10^5$ KBE/g. Dies scheint widersprüchlich, ist aber damit zu erklären, dass bereits kleine, kompakte Erd- oder Düngerpartikel die ermittelten Werte sehr stark beeinflussen können. Aus je weniger Material die Probe für die Untersuchung einer Einzelpflanze besteht, desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit, ein Extremresultat zu erhalten. Die Beobachtung, wonach im fertig geschnittenen

Salat höhere Koloniezahlen gefunden werden, dürfte damit in Zusammenhang stehen. Insgesamt liegen die von *Maxcy* (6) vorgelegten Werte um mindestens 1 Zehnerpotenz unter den vergleichbaren Werten anderer Autoren. *Garcia-Villanova Ruiz et al.* (7) fanden bei der Analyse von 80 Lattich-Proben, die sie auf Gemüsesfarmen und auf dem lokalen Markt erstanden hatten, 50% der Muster mit Gesamtkoloniezahlen über 10^6 /g und über 90% mit Werten zwischen 10^4 und 10^8 /g. *Meyns* (8) hat in ihrer Analyse von Mischsalat vergleichbare Werte für Gesamtkoloniezahl und Pseudomonaden, dagegen deutlich höhere Koloniezahlen von Enterobacteriaceen im Ausgangsprodukt nachgewiesen.

In der Schweiz hatten *Schüpbach et al.* (9) bereits 1981 auf die Problematik der vorpräparierten Salate in der Massenverpflegung hingewiesen. Die Verteilung der in Restaurationsbetrieben gefassten Proben in die 3 Keimklassen von bis 10 Mio., bis 20 Mio. und über 20 Mio./g vorbereiteten Winter-Kopfsalates entsprach ziemlich genau der Verteilung der im Laborversuch bereiteten, ungewaschenen Muster. Im Labor geschnittene und gewaschene Proben lagen zu 100% unter 10^7 KBE/g. *Marcy* (10) fand durchschnittliche Gesamtkoloniezahlwerte von rund 2×10^5 /g in 7 frischen, haushaltmässig zubereiteten Salatproben, 3×10^6 /g in 7 industriell gefertigten Produkten und 10^7 /g in 26 vorwiegend von Selbstbedienungsbuffets in Restaurationsbetrieben eingezogenen Mustern. Nach *Frank* und *Holzapfel* (11) liegt die aerobe Gesamtkeimzahl bei abgepackten Salaten nach dem Verarbeitungsprozess je nach Kombination der Rohware bei 10^5 bis 10^6 /g. Aufgrund umfangreicher Untersuchungen haben die gleichen Autoren festgestellt, dass 1987 die aerobe Gesamtkoloniezahl von Packungen aus dem Einzelhandel in 70% der Fälle ein Maximum von 10^8 /g aufwies. Für 1988 lagen diese Werte zu rund 50% bei 10^7 /g und liegen somit in der Grössenordnung der Werte der vorliegenden Untersuchung. *Hildebrandt et al.* (12) fanden in Rohkostsalaten im Theken- und im Selbstbedienungsverkauf durchschnittliche Gesamtkoloniezahlen, die nur um wenig höher liegen als das Ergebnis der vorliegenden Studie. Die Koloniezahlwerte für Pseudomonaden und Enterobacteriaceen waren dagegen bei *Hildebrandt* etwas grösser.

Die Flora der Schnittsalate ist einerseits durch die Zusammensetzung der Ausgangsflora bestimmt, andererseits aber auch durch die äusseren Bedingungen während der Lagerung, wie Temperatur, Sauerstoffangebot, Nährstoffangebot u. a. Zu den zahlenmässig wichtigsten Gruppen von Mikroorganismen gehören die Pseudomonaden, die Enterobacteriaceen, Milchsäurebakterien, insbesondere Lactobazillen und Pediokokken, sowie Hefen. Diese Annahme bestätigen die Arbeiten von *Brockelhurst et al.* (13), *Bomar* (14), *Denis* und *Picoche* (15), *Frank* und *Holzapfel* (11), *Hildebrandt et al.* (12) und *Meyns* (8). Der Umstand, dass die Anteile der einzelnen Keimgruppen unterschiedlich ausfallen, dürfte im unterschiedlichen Probenmaterial begründet sein. Die Pseudomonaden stellen praktisch ausnahmslos den höchsten Anteil der Flora. Die Enterobacteriaceen, die ihrer hygienischen Bedeutung wegen nachgewiesen werden, sind in unterschiedlichen Anteilen gefunden worden. Ein Vergleich wird dort schwierig, wo mit den Coliformen nur der Lactose abbauende Anteil der Enterobacteriaceen erfasst wurde. *Hildebrandt et al.* (12) fanden im Durchschnitt einen Enterobacteriaceen-Anteil im

Vergleich zur Gesamtkoloniezahl von 0,6% bis 0,8%, *Brockelhurst et al.* (13) von 0,25% bis 2,5%. Höhere Werte wiesen *Denis* und *Picoche* (15) mit 6,7% und *Meyns* (8) mit rund 10% nach. Nach Tabelle 12 betrug der mittlere Enterobacteriaceen-Anteil an der Gesamtflora in der vorliegenden Untersuchung 0,2% beim Rohsalat und 2,9% bei den Schnittsalaten. Zu analogen Resultaten kam auch *Baumgartner* (16), der eine deutliche Diskrepanz zwischen den Enterobacteriaceen-Zahlen von ungeschnittenen und geschnittenen Salaten feststellte.

Sprossgemüse ist im Vergleich zum Schnittsalat weit stärker mit Bakterien kontaminiert. Von den 9 untersuchten Mustern Sojasprossen wies eine einzige Probe eine Gesamtkoloniezahl unter $10^8/g$ auf. Sowohl Gesamtkoloniezahl als auch die Koloniezahl der Pseudomonaden lag um durchschnittlich rund 1,5 Zehnerpotenzen höher als die entsprechenden Werte der Schnittsalate. Die Enterobacteriaceen-Werte der Sojasprossen liegen sogar 2,5 Zehnerpotenzen über jenen der Schnittsalate, was 32% der Gesamtflora entspricht. Dieser hohe Enterobacteriaceen-Anteil dürfte einer der Gründe für die kritische Beurteilung dieser Produkte durch Lebensmittelhygieniker sein. *Marcy* (17) wies Gesamtkoloniezahlen in ungewaschenen Sojasprossen zwischen $2,3 \times 10^7/g$ und $1,5 \times 10^9/g$ nach. Die Zahl coliformer Bakterien lag nach dem gleichen Autor zwischen $5,5 \times 10^6/$ und $6,9 \times 10^7/g$, entsprechend 1% bis 24% der Gesamtflora.

Enterobacteriaceen-Flora

Über das Vorkommen und die Bedeutung der Enterobacteriaceen auf pflanzlichen Lebensmitteln, insbesondere Blattsalaten und Sprossgemüsen, existieren zurzeit keine Angaben. Es ist aus diesem Grund notwendig, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bei unverarbeiteten und verarbeiteten Produkten einige Ansätze zur Beurteilung dieser Produkte zu machen. Aus der Sicht der Lebensmittelhygiene gilt als wichtigste Forderung die weitestgehende Abwesenheit von toxischen oder toxiinfektösen Mikroorganismen. Es stellt sich die Frage, was als natürliche, saprophytäre und was als durch die Verarbeitung zusätzlich aufgebraachte Flora zu betrachten ist. Schliesslich gilt abzuschätzen, inwieweit einzelne Organismenarten als potentiell gesundheitsgefährdend einzustufen sind.

In Tabelle 13 ist der prozentuale Anteil der einzelnen Arten nach Produktgruppen aufgelistet. *A. hydrophila* und *V. fluvialis*, die mit je einem Stamm vertreten waren, wurden der Vollständigkeit halber aufgeführt, obwohl sie nicht zu den Enterobacteriaceen im engeren Sinne gehören. In Roh- und Schnittsalat in grösseren Anteilen vertreten waren die Arten *E. agglomerans*, *E. cloacae* und *R. aquatilis*. Diese drei Arten machten 67% der Isolate beim Rohsalat und 81% der Isolate beim Schnittsalat aus. *R. aquatilis* wurde in den Schnittsalatproben, die während der Winterzeit analysiert worden waren, nie gefunden. Es ist denkbar, dass saisonale Schwankungen in der Zusammensetzung der Enterobacteriaceen-Flora auftreten, so wie sie *Nguyen-The* und *Prunier* (18) anhand der Pseudomonadenflora aufgezeigt haben. *K. pneumoniae* trat nur im Rohsalat in grösserem Anteil auf. Dies ist im wesentlichen auf die extrem hohe Kontamination des Frisée-

Salates mit diesem Organismus zurückzuführen. *K. pneumoniae* war aber auch auf Sojasprossen regelmässig und in vergleichsweise geringen Anteilen zu finden. Die wichtigsten Arten in Sojasprossen waren *E. aerogenes* und *E. cloacae* mit einem Anteil von 70% an der Gesamtheit der Isolate. Die einzige Art, die in allen drei Produktegruppen in grösseren Anteilen auftrat, ist *E. cloacae*.

Table 13. Prozentuale Anteile der von Rohsalat, Schnittsalat und Sprossgemüse isolierten Enterobacteriaceen

	Rohsalate	Schnittsalate	Sojasprossen
Anzahl Isolate	72	135	185
<i>Aeromonas hydrophila</i>		1	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	2	22
<i>agglomerans</i>	26	21	5
<i>amnigenus</i>		1	5
<i>cloacae</i>	24	36	48
<i>intermedius</i>		1	
<i>sakazakii</i>		4	2
<i>Ewingella americana</i>	1		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		1	4
<i>pneumoniae</i> ssp. <i>pneum.</i>	29	6	11
<i>Rhanella aquatilis</i>	17	24	3
<i>Serratia liquefaciens</i>		2	
<i>odorifera</i>			1
<i>Vibrio fluvialis</i>		1	
Anzahl Gattungen	4	7	4
Anzahl Arten	6	12	9

Es darf festgehalten werden, dass kein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Floren von Roh- und Schnittsalat wie auch zwischen den Herstellerfirmen besteht. Immerhin fällt auf, dass sich die Enterobacteriaceen-Flora nach der Verarbeitung vielfältiger präsentiert. Die Gründe dürften in der Wasser- und spezifischen Hausflora zu suchen sein.

Alle isolierten Enterobacteriaceen gelten nach *Brenner* (19) als ubiquitär. Sie besiedeln den Boden und das Wasser und werden der autochthonen Pflanzenflora zugerechnet. Sie gelten teilweise als opportunistische Krankheitserreger, insbesondere für immungeschwächte Personen. Sie sind als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen nicht bekannt.

Die Vibrionaceen mit den Gattungen *Vibrio*, *Aeromonas* und *Plesiomonas* haben ihren natürlichen Standort in Küstengewässern und in Oberflächenwasser. Die aus einem der Schnittsalate isolierte Spezies *V. fluvialis* gilt als ubiquitär und lediglich opportunistisch pathogen (20). *A. hydrophila* wird in letzter Zeit ver-

mehrt als potentiell pathogen diskutiert. Aeromonaden sind ubiquitär und werden häufig auf Gemüse nachgewiesen. Als psychrotrophe Organismen können sie sich auch bei Kühlschranktemperaturen vermehren. Lagerversuche mit Spargeln, Broccoli und Blumenkohl haben nach *Berrang et al.* (21) zu massiven Koloniezahlerhöhungen durch *A. hydrophila* geführt. Innerhalb von sechs Tagen stieg die Zahl koloniebildender Einheiten bei 4 °C um drei Zehnerpotenzen und bei 15 °C um fünf Zehnerpotenzen. Nach *Popoff* (22) bilden zumindest einige Stämme von *A. hydrophila* ein hitzestabiles Enterotoxin. Versuche an Freiwilligen führten bei Einnahme von hohen Zellzahlen von *A. hydrophila* zu Durchfallerkrankungen (23).

Weder aus Roh- und Schnittsalat noch aus den Sojasprossen wurden *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* oder Salmonellen-Spezies isoliert. Es ist allerdings zu beachten, dass mit der gewählten Methode nur Organismen, die in relativ grosser Zahl vorkommen, erfasst werden. Aber auch bei jenen Schnittsalat- und Sojasprossenmustern, die mit Hilfe der ECD-Methode auf *E. coli* untersucht wurden, konnten keine *E. coli* nachgewiesen werden. *Frank* und *Holzappel* (11) fanden bei Anwendung von Selektivmethoden in 30 frischen Mischsalatproben keine Salmonellen-Spezies. *Brockelhurst et al.* (13) isolierten bei Anwendung der Anreicherungstechnik in allen Mischsalatproben *Y. enterocolitica*. *Ercolani* (24) wies in 68,3% der untersuchten Proben von Lattich einen oder mehrere Serotypen von Salmonella nach.

Die Funktion von *E. coli* als Indikator einer fäkalen Kontamination ist bei vielen Lebensmitteln umstritten. Die Resultate der vorliegenden Studie, aber auch zahlreiche Literaturhinweise, lassen es gerechtfertigt erscheinen, *E. coli* bei Schnittsalat und Sprossgemüse als Fäkalindikator zu betrachten. *E. coli* scheint auf keinen Fall zur natürlichen Flora der erwähnten Produkte zu gehören. Der Nachweis von *E. coli* hat allerdings verschiedentlich zu falsch positiven Ergebnissen geführt. Wie *Baumgartner* (16) ausführt, wurden in den von ihm untersuchten Salaten und Sprossen bei 12 von 20 Proben indolpositive Enterobacteriaceen gefunden. Es handelte sich um Stämme von *E. agglomerans*, *K. oxytoca*, *V. fluvialis*, *C. diversus* und *E. adecarboxylata*. Weitere indolpositive Stämme, die in der vorliegenden Arbeit isoliert wurden, sind *A. hydrophila*, *S. odorifera* und *V. fluvialis*. Nach der ECD-Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches (25) würden diese fälschlicherweise als *E. coli* diagnostiziert. Mit dem MUG-Test, der die Bildung von β -Glucuronidase überprüft, ist eine solche Fehldiagnose praktisch ausgeschlossen. Das erwähnte Enzym bzw. die Freisetzung von Methylumbelliferon aus 4-Methylumbelliferyl-glucuronid ist ein sehr spezifisches Merkmal für *E. coli* und ermöglicht eine sichere und eindeutige Bestätigung. In pflanzlichen Lebensmitteln mit einem hohen Anteil von Enterobacteriaceen ist der MUG-Test für die quantitative Bestimmung von *E. coli* somit unerlässlich.

Flora der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen

Wie bei der Zusammensetzung der Enterobacteriaceen-Flora zeigen auch die Ergebnisse bei der Identifizierung der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen,

dass zwischen der Keimflora der Roh- und Mischsalate keine grossen Unterschiede bestanden. Die wenigen, dominierenden Arten wie *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* waren in praktisch allen Proben zu finden. Auch hier dominierte die primäre typische Salatflora im Endprodukt. Bedingt durch die andersartige Haus- und eventuell auch Wasserflora, traten im Endprodukt mehr Gattungen und Arten auf. Völlig verschieden präsentierte sich die Flora bei den Sojasprossen. *C. luteola*, im Roh- und Schnittsalat in kleinen Anteilen vorhanden, stellte zwei Drittel der Isolate von Sojasprossen. *P. putida*, der in geringerer Zahl isoliert wurde, war in der Mehrzahl der Sojasprossen zu finden und dürfte zu den wichtigsten Vertretern der typischen Flora von Sprossgemüse gehören. Die in dieser Arbeit identifizierten Spezies gelten nach *Palleroni* (26) alle als ubiquitär. Sie sind Teil der natürlichen Flora der Pflanzen und sind mit Ausnahme von *A. hydrophila* lediglich opportunistische Krankheitserreger. Der aus einem Schnittsalat isolierte *P. aeruginosa* kann humanmedizinisch bedeutsam sein. Seine Zugehörigkeit zu einer Untergruppe zur Feststellung der epidemiologischen Relevanz wurde nicht bestimmt.

Einige *Pseudomonas*-Arten und die ihnen nahestehenden Vertreter der Gattungen *Acinetobacter* und *Chryseomonas* sind vor allem für den Verderb der Produkte durch Pektinolyse verantwortlich. Sämtliche von *Nguyen-The* und *Prunier* (18) aus Salat isolierte Pektin abbauende Bakterienstämme gehörten der Gattung *Pseudomonas* an. Alle in der vorliegenden Arbeit isolierten und geprüften Stämme von *C. luteola* waren Pektinolyten.

Lagerversuche

Rohsalat

Die Ergebnisse der Lagerversuche mit Endivie als Rohsalat streuten ziemlich stark. Die Streuung manifestiert sich um so deutlicher, als weder bei 4 °C noch bei 20 °C eine sehr ausgeprägte Veränderung der Koloniezahlen zu beobachten war. Dies dürfte im wesentlichen darauf zurückzuführen sein, dass an jedem Analysentag ein neuer, intakter Endivienkopf analysiert wurde. Trotzdem ist ein gewisser Einfluss der Lagertemperatur auf die Koloniezahleentwicklung anzunehmen. 20 °C-Lagerung führte zu einer ausgeprägten Zunahme der Koloniezahlen. Nach 10 Tagen Lagerung bei 20 °C waren die äusseren Blattreihen deutlich angefault. 4 °C-Lagerung über 12 Tage führte zu kaum sichtbaren Veränderungen. Der Pseudomonaden-Anteil betrug zu Lagerbeginn rund 30% der Gesamtkoloniezahl. Er entsprach nach 10 Tagen bei 20 °C rund 35%, nach 12 Tagen bei 4 °C weiterhin 30% der im Vergleich zum Ausgangsprodukt leicht höheren Gesamtkoloniezahl. Die Koloniezahl der Enterobacteriaceen streute stärker, wie sich dies schon bei der Untersuchung unterschiedlicher Rohsalate gezeigt hatte (Abb. 1 und Tabelle 14). Es lässt sich deshalb keine Tendenz der Veränderung des prozentualen Anteils dieser Organismen an der Gesamtkoloniezahl ableiten.

Tabelle 14. Prozentuale Anteile der von Rohsalat, Schnittsalat und Sprossgemüse isolierten gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen

	Rohsalat	Schnittsalat	Sojasprossen
Anzahl Isolate	78	94	139
<i>Aeromonas hydrophila</i>		3	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1	2
<i>junii</i>			3
<i>lwoffii</i>		1	
<i>Agrobacterium radiobacter</i>			9
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> var. <i>xylos.</i>			1
<i>Chryseomonas luteola</i>	5	9	66
<i>Flavobacterium oryzihabitans</i>		1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1	
<i>aureofaciens</i>	22	12	1
<i>cepacia</i>		1	1
<i>chlororaphis</i>	18	16	1
<i>fluorescens</i>	44	51	2
<i>mendochina</i>	1	2	
<i>paucimobilis</i>			1
<i>pickettii</i>			1
<i>pseudopomallei</i>		2	
<i>putida</i>	8		11
<i>vesicularis</i>	1		
<i>Xanthomonas maltophilia</i>			1
Anzahl Gattungen	3	5	6
Anzahl Arten	8	12	13

Schnittsalat

Die Zunahme der Koloniezahlen beim gewählten Mischsalat ist sowohl für 4 °C- als noch ausgeprägter bei 20 °C-Lagerung deutlich sichtbar. Durch das homogenere Versuchsmaterial bedingt, schwankten die Koloniezahlen nur sehr wenig. Bemerkenswert ist die Veränderung der prozentualen Anteile der Pseudomonaden. Lagerung bei 4 °C scheint nur zu einer minimalen Verschiebung des ursprünglichen Anteils zu führen. 20 °C-Lagerung führte im vorliegenden Versuch innerhalb von 6 Tagen zur Halbierung des Pseudomonaden-Anteils. Die Enterobacteriaceen machten anfänglich rund 5% der Flora aus. Für beide Lagertemperaturen blieben die Verhältnisse ungefähr gleich, das heisst die Enterobacteriaceen hatten sich praktisch wie die Gesamtkeime vermehrt. Extremere Veränderungen in der Florenzusammensetzung während der Lagerung beschreibt *Geiges* (27). Lagerung bei 20 °C führte zu einem Anteil der Enterobacteriaceen an der Gesamtflora von über 70%, während nach 4 °C-Lagerung lediglich 8% der gesamten Flora aus Enterobacteriaceen bestand.

Die Florenanalyse durch Grobidentifikation von je 80 Isolaten aus frischem und 6 Tage bei 20 °C gelagertem Mischsalat hat die Ergebnisse der Koloniezählung bestätigt. Der Anteil der gramnegativen Bakterien lag zwar mit 85% über dem Durchschnitt früherer Beobachtungen, doch bestätigte sich die Tendenz, dass sich der Anteil dieser Bakterien während der Lagerung bei Zimmertemperatur vermindert. Der Prozentsatz der grampositiven Bakterien stieg während der sechstägigen Lagerung von 12% auf 31%. Es erstaunte, dass der Anteil der Lactobacillen geringer wurde und die coryneformen Bakterien, die aus dem Frischprodukt nicht isoliert worden waren, 20% der Gesamtflora ausmachten.

Manwell und *Ackland* (29) beobachten in Schnittsalat während der Lagerung bei 30 °C einen starken Anstieg der Milchsäurebakterien, der bei 7 °C ausblieb. Die Floren der Mischsalate, die von *Frank* und *Holzappel* (11) analysiert wurden, wiesen einen Anteil von rund 50% Milchsäurebakterien auf. Das vermehrte Auftreten von Lactobacillen nach Lagerung bei erhöhten Temperaturen wurde bei der Grobidentifizierung der Flora jedoch nicht bestätigt.

Bomar (14) weist darauf hin, dass sich bei erhöhten Temperaturen und bedingt durch die Zellatmung des Salates das Verhältnis pO_2/pCO_2 zugunsten des CO_2 verschiebt. Dies begünstigt im O_2 -undurchlässigen Beutel das Wachstum der fakultativ anaeroben Milchsäurebakterien und Enterobacteriaceen. Diese Erhöhung des Anteils der Enterobacteriaceen wird durch die vorliegenden Lagerversuche nicht bestätigt.

Sprossgemüse

Die Koloniezahlen der Alfalfa-Sprossen entsprachen für Gesamtkoloniezahl, Enterobacteriaceen und Pseudomonaden ziemlich genau den Mittelwerten der untersuchten Sojasprossen (Tabelle 12). Nur die Lagerung bei 20 °C führte innerhalb von 3 Tagen zu einer Zunahme der Gesamtkoloniezahl um knapp eine Zehnerpotenz auf wenig über 10^9 KBE/g. Während der folgenden 7 Tage blieb dieser Wert konstant. Die Verdoppelung der Gesamtkoloniezahl bei der 4 °C- und der 10 °C-Lagerung dürfte im Schwankungsbereich der Methodik und der einzelnen Probenpackungen liegen. Der prozentuale Anteil der Enterobacteriaceen fiel bei allen drei Temperaturen von 25% auf rund einen Zehntel des Ausgangswertes. Die Pseudomonaden vermehrten sich ziemlich gleichförmig wie die Gesamtkeime, so dass der prozentuale Anteil dieser Organismen mehr oder weniger konstant blieb.

Es scheint, dass bei Sprossgemüse mit 10^9 KBE/g die obere Grenze der möglichen Keimbelastung erreicht ist und die Koloniezahlen nicht mehr stärker ansteigen. Der sichtbare Verderb des Produktes, verbunden mit dem vollständigen Zerfall der pflanzlichen Strukturen, manifestiert sich erst einige Zeit später.

Vermehrung von S. enteritidis und L. innocua in Schnittsalat und Sprossgemüse

S. enteritidis in Schnittsalat

Mensch und Tier sind die natürlichen Reservoirs von Salmonellen. Salmonellen können jedoch auf Pflanzen oder auf Futter- und Lebensmitteln über Zeiträu-

me von Monaten und Jahren vermehrungs- und infektionsfähig bleiben. Salat kann bereits auf dem Felde über Kot von wildlebenden Tieren sowie durch Düngung mit Jauche oder Klärschlamm kontaminiert werden. Sekundär besteht die Möglichkeit einer fäkalen Kontamination im Laufe des Verarbeitungsprozesses. Es ist deshalb wichtig, dass bei der Produktion von Schnittsalat die Hüllblätter oder die äusserste Schicht der Rohprodukte konsequent entfernt werden. Das Putzen der Rohware hat räumlich getrennt von der weiteren Verarbeitung zu erfolgen.

Die vorliegenden Versuche zeigen, dass *S. enteritidis* bei konsequenter Kühllhaltung nicht in der Lage ist, sich zu vermehren. Nach *Schmidt-Lorenz* (29) liegt die minimale Vermehrungstemperatur für Salmonellen in Abhängigkeit von Stamm und Milieubedingungen zwischen 6 °C und 10 °C. In drei unabhängigen Versuchen nahm die Koloniezahl von *S. enteritidis* bei einer Lagertemperatur von 4 °C innerhalb von 10 Tagen um rund 2 Zehnerpotenzen ab.

Lagerung bei 20 °C führte einmal zu einem sehr geringen Rückgang der KBE/g von *S. enteritidis*, während die Koloniezahlwerte im zweiten Versuch konstant blieben. Mit Sicherheit trat bei dieser Temperatur innerhalb von 6 Tagen keine Vermehrung ein.

Analoge Versuche von *Marcy* (10, 17) führten zu anderen Ergebnissen. Die Koloniezahlen von *S. typhimurium* stiegen auf geschnittenem Lattich bei 23 °C bis 25 °C um rund eine halbe Zehnerpotenz innerhalb eines Zeitraumes von nur 6 Stunden. Bei späteren Belastungsversuchen mit *S. typhimurium* wurden, ausgehend von 10³ KBE/g, nach 16 Stunden bei 22 °C Werte von 10⁵ bis 10⁶ KBE/g erreicht, nach 48 Stunden lagen die Ergebnisse jeweils eine Zehnerpotenz höher. *Marcy* (10) verneint zudem einen Einfluss einer variierenden, initialen Bakterienflora auf die Vermehrungsgeschwindigkeit pathogener Kontaminanten.

L. innocua in Schnittsalat

Listerien sind in der Natur weit verbreitet. Galten früher tierische Produkte, insbesondere Fleisch, als praktisch ausschliessliche Träger von *L. monocytogenes* als die wichtigsten Vertreter der Gattung, sind in den letzten Jahren vereinzelt Beichte über Listerioseerkrankungen durch Produkte pflanzlichen Ursprungs bekannt geworden, so die Fälle von Listeriose nach dem Verzehr von Kohlsalat (31). *Laine* und *Michard* (31) fanden in 17 von 126 Proben pflanzlicher Produkte, die für den Rohkonsum bestimmt waren, *L. monocytogenes* und *L. seeligeri*. Dabei handelte es sich ausschliesslich um Salate und geschnittenen Kohl. Nur eine Probe enthielt 50 Listerien/g, bei allen anderen Proben lagen die Werte unter 3/g bzw. unter 1/g. Da Listerien ubiquitär sind, darf es nicht weiter verwundern, dass sie auch auf ungeschnittenen oder geschnittenen Salaten zu finden sind. Weit wichtiger ist die Frage, ob sich diese Organismen auf pflanzlichen Produkten, insbesondere Schnittsalat, vermehren können.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Lagerversuche mit Mischsalat, der mit *L. innocua* beimpft war, zeigen scheinbar kontroverse Ergebnisse für die

Lagerung bei 4 °C. Bei massiver Beimpfung mit $5,8 \times 10^7$ Zellen/g ging die Koloniezahl innerhalb von 10 Tagen auf $4,7 \times 10^5$ /g zurück. Bei einem anfänglichen Listeriengehalt von $3,2 \times 10^5$ /g blieb dieser Wert über 10 Tage konstant, während sich *L. innocua* bei geringerer Beimpfung auf einen Wert von $9,5 \times 10^4$ /g im gleichen Zeitraum auf $1,5 \times 10^6$ /g vermehrte. Beide Versuche mit Lagerung des Produktes während 6 Tagen bei 20 °C führte zu einem Anstieg der KBE/g von *L. innocua* um rund 1 bis 2 Zehnerpotenzen.

Steinbruegge et al. (32) prüften die Vermehrung von *L. monocytogenes* auf geschnittenem Lattich während der Lagerung bei 5, 12 und 25 °C. Während sich *L. monocytogenes* bei 5 °C innerhalb von 14 Tagen um 1 Zehnerpotenz vermehrte, stieg die Zahl KBE/g bei 12 °C um 3 Zehnerpotenzen. Allerdings weisen die Autoren darauf hin, dass in einigen Versuchen keine anhaltende oder überhaupt keine Vermehrung von *L. monocytogenes* beobachtet wurde. Bei 25 °C stieg die Zahl KBE/g um rund 1 Zehnerpotenz innerhalb von 8 Stunden. Unregelmässigkeiten im Zuwachs führen die Autoren auf mögliche Antagonismen mit der autochthonen Flora zurück.

Es ist nicht auszuschliessen, dass ähnliche Mechanismen zu den in dieser Arbeit beobachteten Abweichungen geführt haben.

S. enteritidis in Sojasprossen

Salmonellen, die durch Rohmaterial oder unhygienisches Arbeiten in den Schnittsalat gelangen, können durch konsequente Kühlung in der Vermehrung gehemmt werden. Bei Sojasprossen ist das Salmonellenproblem wesentlich kritischer. Da für die Keimung der Sojasamen Temperaturen um 30 °C angewandt werden, ist zu erwarten, dass sich Salmonellen in diesem Milieu vermehren und damit ein grosses hygienisches Risiko darstellen. Die vorliegenden Versuche haben diese Annahme bestätigt. Die Gesamtkoloniezahl der Sprossen hatte innerhalb von 4 Tagen um 5 Zehnerpotenzen zugenommen. In der gleichen Zeit stieg die Zahl der Salmonellen um etwas über 2,5 Zehnerpotenzen.

In Anbetracht des hohen Risikos erstaunt die Tatsache, dass Gemüsesprossen nur selten Ursache von Salmonellosen sind. Sprossenproduzenten werden die mikrobiologische Beschaffenheit des Rohmaterials besonders sorgfältig untersuchen müssen.

Grenz- und Toleranzwerte

Das mikrobiologisch-hygienische Risiko, das Schnittsalate und Sprossgemüse darstellen können, ist frühzeitig erkannt worden. Es hat nicht an Ansätzen gefehlt, Herstellung und Verkauf dieser Produkte im Sinne einer Verminderung des Risikos zu reglementieren.

Nach Schweizerischer Hygieneverordnung (33) gelten als Grenzwert für die aerobe, mesophile Koloniezahl in genussfertigen, nicht fermentierten Lebensmitteln 10^8 KBE/g. Der Toleranzwert liegt um eine Zehnerpotenz tiefer. Dazu gehö-

ren als fixe Grenzwerte: *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, nicht nachweisbar in 20 g; *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, nicht nachweisbar in 10 g.

Aufgrund dieser Werte hätten für die aeroben, mesophilen Keime 2 von 11 Schnittsalatproben den Toleranzwert und 1 Probe den Grenzwert überschritten. Von 9 Proben Sojasprossen hätte nur 1 Probe den Grenzwert nicht überschritten.

Schüpbach et al. (9) haben für gewaschene und gerüstete Salate ohne Sauce aus Restaurationsküchen folgende maximal tolerierbare Keimgehalte (KBE/g) vorgeschlagen:

GKZ: 2×10^7 ; Coliforme: 10^4 ; *E. coli*: <10 ; Schimmelpilze und Hefen: 10^5 .

Frank und *Holzzapfel* (11) geben für Mischsalate folgende Empfehlung:

1. Mindesthaltbarkeit nicht mehr als 6 Tage
2. Kühlung bis maximal 6 °C
3. max. Koloniezahlen: GKZ: 5×10^7 /g; *E. coli*: 10^3 /g; Salmonellen und Shigellen: nicht nachweisbar in 25 g.

Veit (34) erwähnt die folgenden französischen Vorschläge:

1. Verkaufsfrist: maximal 7 Tage
2. Kühlung: 0 °C bis 4 °C
3. max. Koloniezahlen: GKZ: 5×10^7 /g; Fäkal-Coliforme: 10^3 /g; Salmonellen: nicht nachweisbar in 25 g.

In der Schweiz werden zurzeit folgende Vorschriften für Schnittsalate und Sprossgemüse diskutiert (*Baumgartner*, persönliche Mitteilung, 1990):

1. Verbrauchsfrist: höchstens 2 Tage nach dem Tag der Abpackung
2. Kühlung bei maximal 5 °C
3. GKZ (nur Schnittsalat): 10^7 /g; *E. coli*: 10/g.

Alle gesetzlichen Vorschriften bezwecken in erster Linie die Sicherung der hygienischen Unbedenklichkeit der Produkte. Primär wichtig ist die Abwesenheit von Infektions- und Intoxikationserregern. Neben den rein mikrobiologischen Vorschriften bedient sich der Gesetzgeber immer mehr auch begleitender Vorschriften, vor allem über Lagertemperaturen und maximale Verkaufsfristen. Dies ist sehr wichtig, weil nur über solche Vorschriften Gewähr besteht, dass hygienisch kritische Produkte sachgerecht behandelt werden.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen scheint die sehr kurze Verkaufsfrist, wie sie die schweizerische Gesetzgebung vorsieht, gerechtfertigt. Der Umstand, dass geschnittene Salate mikrobiologisch empfindliche Produkte sind, die roh konsumiert werden, lässt es deshalb geraten erscheinen, sie nicht zentral dort herzustellen, wo der Rohsalat produziert wird, sondern dezentral dort, wo der geschnittene Salat konsumiert wird.

Diskutiert wird heute, ob es sinnvoll und berechtigt ist, für diese Produkte verbindliche Gesamtkoloniezahlwerte festzulegen. *Sinell* (35) vertritt die Ansicht, dass Rohprodukte, die eine hohe primäre Keimzahl aufweisen und ohne bakterienabtötenden Technologieschritt genussfertig vorliegen, immer mit hohen Keimzahlen belastet sein werden. Im Gegensatz zu Lebensmitteln, deren Produktion einen keimzahlvermindernden Prozess-Schritt beinhaltet, hat die Gesamtkoloniezahl keine Indikatorfunktion, weil sie nichts über den hygienischen Status des Produktes aussagt. Die saprophytische Flora beinhaltet kaum ein hygienisches Risiko.

Diese Ansicht hat sicherlich Geltung für die Sprossgemüse. Hier liegen die Gesamtkoloniezahlen am Ende der Produktion bereits in der Grössenordnung von 10^8 bis 10^9 /g. Eine Vermehrung der Bakterien findet praktisch nicht mehr statt. Für die Schnittsalate wäre diese Frage zu diskutieren. Aufgrund der vorliegenden Resultate liegt ein Toleranzwert von 10^7 KBE/g eher an der untersten möglichen Grenze. Nach schweizerischer Auffassung soll die Lebensmittelgesetzgebung nicht nur die hygienische Sicherheit, sondern auch die produktspezifische Qualität garantieren. *Hilhorst et al.* (37) fanden eine enge Korrelation zwischen Gesamtkoloniezahl und sensorischen Eigenschaften von geschnittener Endivie. Nach *Meyns* (8) liegt die Grenzkoloniezahl für eine geruchliche Veränderung des Salates bei ungefähr 5×10^7 KBE/g. Mit Gesamtkeimzahlen von 10^8 /g sind solche Produkte bereits deutlich verdorben.

Zusammenfassung

Schnittsalate und Sprossgemüse sind von Natur aus hoch kontaminiert und werden häufig als hygienisch risikoreich bezeichnet. Die mittleren GKZ/g (i) von Schnittsalat betragen $6,6 \times 10^6$, Enterobacteriaceen (ii) $1,9 \times 10^5$ und Pseudomonaden (iii) $3,9 \times 10^6$. Die entsprechenden Werte für ungeschnittene Salate waren für (i) und (iii) ähnlich, für (ii) bei grösseren Schwankungen 1 Zehnerpotenz tiefer. Für Sojasprossen wurden ermittelt: (i) $2,1 \times 10^8$, (ii) $6,9 \times 10^7$ und (iii) $9,1 \times 10^7$. Die Enterobacteriaceen-Flora von Roh- und Schnittsalat war ähnlich und bestand v. a. aus *E. agglomerans*, *E. cloacae* und *R. aquatilis*. Bei Sojasprossen dominierten *E. aerogenes* und *E. cloacae*. *E. coli* wurde in keiner der analysierten Proben gefunden. Die Flora der gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceen von Roh- und Schnittsalat bestand hauptsächlich aus *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* und *P. fluorescens*, jene der Sojasprossen aus *C. luteola* und *P. putida*. Lagerung von Schnittsalat bei 20 °C führte zu höheren KBE/g, nicht aber bei 4 °C. Die sehr hohen Koloniezahlwerte bei Alfalfasprossen blieben praktisch unverändert. *S. enteritidis* hatte sich bei der Lagerung von Schnittsalat nicht vermehrt, die KBE/g waren eher zurückgegangen. Während des Auskeimens der Sojasamen hatte sich *S. enteritidis* vermehrt. *L. innocua* zeigte bei Lagerung von Schnittsalat kein einheitliches Verhalten. Gesetzliche Vorschriften für diese Produkte werden diskutiert.

Résumé

Les salades précoupées et les légumes à graines germées sont fortement contaminés et souvent considérés comme risques sanitaires. Les moyennes des nombres de germes totaux/g (i) des salades coupées étaient de l'ordre de $6,6 \times 10^6$, des Enterobactéries (ii) de $1,9 \times 10^5$ et des Pseudomonades (iii) de $3,9 \times 10^6$. Les nombres correspondants des salades non coupées étaient comparables pour (i) et (iii), mais une puissance moins élevée et plus variable pour (ii). Les valeurs correspondantes des pousses soja étaient: (i) $2,1 \times 10^8$, (ii) $6,9 \times 10^7$ et (iii) $9,1 \times 10^7$. La flore entéro-bactérienne des salades se composait avant tout d'*E. agglomerans*, *E. cloacae* et *R. aquatilis*, celle des germes de soja d'*E. aerogenes* et *E. cloacae*. *E. coli* n'avait été détecté dans aucun des échantillons. La flore non-entérobactérienne Gram négative était dominée par *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* et *P. fluorescens*, celle des ger-

mes de soja par *C. luteola* et *P. putida*. Le nombre de bactéries restait constant pendant le stockage à 4 °C de la salade précoupée tandis qu'à 20 °C celui-ci augmentait. Le nombre élevé de UPC/g des germes de luzerne restait plus ou moins constant pendant le stockage à 4, 10 et 20 °C. Le nombre de *S. enteritidis* des salades précoupées diminuait ou restait constant pendant le stockage à 4 et 20 °C, tandis qu'il augmentait lorsque les graines de soja germent. Les résultats pour *L. innocua* pendant le stockage de la salade précoupée n'indiquent pas de tendance distincte. Les prescriptions légales pour ces produits sont discutées.

Summary

Ready to serve salads and sprouts are naturally highly contaminated and often regarded as risky from the point of view of health. Their average total count/g (i) was 6.6×10^6 , the average CFU/g of enterobacteria (ii) 1.9×10^5 and of pseudomonas (iii) 3.9×10^6 . The corresponding values for raw salads were similar for (i) and (iii), but one log unit lower and of higher variation for (iii). The values for soja sprouts were: (i) 2.1×10^8 , (ii) 6.9×10^7 and (iii) 9.1×10^7 . The enterobacteria of raw and cut salads consisted mainly of *E. agglomerans*, *E. cloacae* and *R. aquatilis*, those of sprouts of *E. aerogenes* and *E. cloacae*. *E. coli* has not been found in either of the products. The flora of the gram-negative non-enterics was dominated by *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis* and *P. fluorescens* in whole and cut salad, while *C. luteola* and *P. putida* dominated in the sprouts. The number of CFU/g increased during storage of ready to serve salad at 20 °C but was stable at 4 °C. No clear CFU/g changes were detected during storage of alfalfa-sprouts at 4, 10 and 20 °C. No growth or slight decrease of CFU/g of *S. enteritidis* was observed during storage of cut salad, while it grew well during germination of soja beans. *L. innocua* did not show any clear trend of growth during storage of ready to serve salad at 4 and 20 °C. Possible suggestions for safe handling of the mentioned products are discussed.

Literatur

1. *Bischofberger, Th.*: Oligotrophe Bakterien im natürlichen Mineralwasser und ihre spezifischen Eigenschaften. Diss. ETH Nr. 7230 (1983).
2. *Genry, G.*: Method for the distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. European J. Appl. Microbiol. **3**, 223–225 (1976).
3. *Hugh, R.* and *Leifson, E.*: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. J. Bact. **66**, 24–26 (1953).
4. *Smibert, R. M.* and *Krieg, N. R.*: General characterization. In: Manual of methods for general bacteriology, p. 413. Amer. Soc. Microbiol. (1981).
5. *Krieg, N. R.* (ed): Bergey's manual of determinative bacteriology. Vol. 1, p. 408. Williams & Wilkins Co., Baltimore 1984.
6. *Maxcy, R. B.*: Lettuce salad as a carrier of microorganisms of public health significance. J. Food Prot. **41**, 435–438 (1978).
7. *Garcia-Villanova Ruiz, B.*, *Galvez Vargas, R.* and *Garcia-Villanova, R.*: Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. Int. J. Food Microbiol. **4**, 285–291 (1987).

8. *Meyns, S.*: Bakteriologische Untersuchungen von Mischsalat. Unpublizierte Daten. ILW, ETH-Zürich (1986).
9. *Schüpbach, M. R., Niederberger, S. und Bieri, H.*: Die bakteriologische Charakterisierung von gewaschenem Winter-Kopfsalat. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **72**, 396–401 (1981).
10. *Marcy, G.*: Potentielle bakteriologische Gefahren durch Frischkostsalate. Deut. Lebensm. Rundschau, **81**, 78–79 (1985).
11. *Frank, H. K. und Holzapfel, W. H.*: Mischsalate, Entwurf: Anlage 11 aus der 27. Sitzung der Arbeitsgruppe «Lebensmittelerhaltung und Mikrobiologie» (1989).
12. *Hildebrandt, G., Beneke, B. und Müller, A.*: Hygienischer Status von Rohkostsalaten verschiedener Angebotsformen. Arch. Lebensmittelhyg. **40**, 49–72 (1989).
13. *Brocklehurst, T. F., Zaman-Wong, C. M. and Lund, B. M.*: A note on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. J. Appl. Bact. **63**, 409–415 (1987).
14. *Bomar, M. T.*: Mikrobiologische Bestandesaufnahme von Fertigsalaten in den Jahren 1985 und 1987. Ernährungs-Umschau **35**, 392–395 (1988).
15. *Denis, C. et Picoche, B.*: Microbiologie des légumes frais prédecoupés. Ind. Alim. Agri. **103**, 547–553 (1986).
16. *Baumgartner, A.*: Kommentar zur Methode 7.07 des Kapitels 56 LMB. Internes Papier BAG, Bern 1990.
17. *Marcy, G.*: Sojasprossensalat als hygienisches Risiko. Arch. Lebensmittelhygiene **28**, 197–198 (1977).
18. *Nguyen-The, C. and Prunier, J. P.*: Involvement of pseudomonads in deterioration of “ready-to-use” salads. Int. J. Food Sci. Technol. **24**, 47–58 (1989).
19. *Brenner, D. J.*: Family I *Enterobacteriaceae*. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G., Bergey’s manual of systematic bacteriology, Vol. 1, 408–420. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
20. *Baumann, P., Furniss, A. P. and John, V. L.*: Genus I *Vibrio*. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G., Bergey’s manual of systematic bacteriology, Vol. 1, 518–538. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
21. *Berrang, M. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R.*: Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 2167–2171 (1989).
22. *Popoff, M.*: Genus III *Aeromonas*. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G., Bergey’s manual of systematic bacteriology, Vol. 1, 545–550. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
23. *Archer, D. L. and Young, F. E.*: Contemporary issues: Diseases with a food vector. Clin. Microbiol. Rev. **1**, 377–398 (1988).
24. *Ercolani, G. L.*: Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. Appl. Environ. Microbiol. **31**, 847–852 (1976).
25. Schweizerisches Lebensmittelbuch, Kapitel 56, Mikrobiologie. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1988.
26. *Palleroni, N. J.*: Family I *Pseudomonadaceae*. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G., Bergey’s manual of systematic bacteriology, Vol. 1, 141–219. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1984.
27. *Geiges, O.*: Impact des développements technologiques sur la qualité sanitaire des aliments d’origine végétale. In: Association A. Tessier: Comptes-rendues des Journées d’études sur l’évolution des technologies agro-alimentaires et nouveaux risques Sanitaires, 4–5 (1989).

28. *Manwell, P. M. and Ackland, M. R.*: Rapid detection of microbial growth in vegetable salads at chill and abuse temperatures. *Food Microbiology* **3**, 59–65 (1986).
29. *Schmidt-Lorenz, W.*: Ist die Kühlschranks-Lagerung von Lebensmitteln noch ausreichend sicher? *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **81**, 233–286 (1990).
30. *Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V.*: Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**, 203–206 (1983).
31. *Laine, K. et Michard, J.*: Fréquence et abondance des *Listéria* dans des légumes frais découpés prêts à l'emploi. *Microbiologie – Aliments – Nutrition* **6**, 329–335 (1988).
32. *Steinbruegge, E. G., Maxcy, R. B. and Liewen, M. B.*: Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *J. Food Prot.* **51**, 596–599 (1988).
33. Verordnung über die hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände (Hygieneverordnung). Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1987.
34. *Veit, P.*: Réglementation et contrôle de l'hygiène des végétaux dits de la «IV^e gamme»: L'expérience d'une approche spécifique. *RGE*, 105–107 (1989).
35. *Sinell, H.-J.*: Mikrobiologische Standards – Instrumente des Verbraucherschutzes? *Ernährung/Nutrition* **12**, 261–264 (1988).
36. *Hilhorst, R. A., Van der Meer, M. A. and Van der Vuurst de Vries, R. G.*: Quality description of shredded endive. I. Preliminary research and statistical approach. *Acta Alimentaria* **12**, 347–355 (1983).

Dr. O. Geiges
 Laboratorium für Lebensmittelmikrobiologie
 Institut für Lebensmittelwissenschaft
 ETH-Zentrum
 CH-8092 Zürich