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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 76 (1985)

Heft: 2

Artikel: Ethanolvorbehandlung zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei Gewürzen = Ethanolic pretreatment for the selective colony counting of bacillus spores in spices

Autor: Schmidt-Lorenz, W. / Hotz, Franziska

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982361

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 10.07.2025

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

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **76**, 127–155 (1985)
Eingegangen 22. Februar 1985. Angenommen 28. März 1985

Ethanolvorbehandlung zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei Gewürzen

Ethanolic Pretreatment for the Selective Colony Counting of Bacillus Spores in Spices

W. Schmidt-Lorenz und *Franziska Hotz*
Laboratorium für Lebensmittelmikrobiologie im Institut
für Lebensmittelwissenschaft, ETH, Zürich

Einleitung

Bei zahlreichen schwach sauren bis neutralen, durch Hitzepasteurisation kurz- bis mittelfristig haltbar gemachten Lebensmitteln wird die mikrobiologische Stabilität in erster Linie durch die noch vorhandenen Bakteriensporen bestimmt. Die Kenntnis der Höhe der Sporenbelastung ist daher eine wesentliche Voraussetzung für die Einschätzung der voraussichtlichen Haltbarkeit dieser Lebensmittel. Besonders problematisch bei der Herstellung solcher Produkte ist die Verwendung von Gewürzen, Trockengemüse- und Kräuterpulvern, die oft hoch mit Bacillussporen kontaminiert sein können.

Zur Bestimmung der Sporenbelastung von Rohstoffen, Gewürzen und Zusatzstoffen werden die Produkte oder ihre Homogenisate üblicherweise vor der Koloniezählung zur Inaktivierung der vegetativen Mikroorganismen kurzzeitig hitzepasteurisiert: zur Ermittlung der Bacillussporenzahl häufig für 5 bis 30 Minuten bei 80 bis 100 °C, zur Bestimmung der Clostridiensporenzahl meist bei 70 bis 80 °C. Die Pasteurisationsbedingungen sind dabei in der Regel nicht standardisiert und können sehr unterschiedlich sein. Die Ergebnisse sind daher nicht eindeutig reproduzierbar und exakt vergleichbar. Ausserdem werden damit nicht alle tatsächlich vorhandenen, insbesondere nicht die weniger hitzeresistenten Sporen erfasst.

Wesentlich einfacher durchzuführen und besser reproduzierbar ist offenbar die Ethanolvorbehandlung, durch die alle vegetativen Mikroorganismen inaktiviert, die Bakteriensporen aber nicht geschädigt werden. In der medizinischen Mikrobiologie wird gelegentlich die Ethanolvorbehandlung zur selektiven Erfassung von Clostridiumsporen in Stuhlproben angewandt (1). Nach *Johnston* et al. (2) eignet sich die Ethanolvorbehandlung sehr gut zur selektiven Erfassung der weniger resistenten Sporen von *Clostridium botulinum* des Typs E in Fischhomogenisat. *Koransky* et al. (3) haben gezeigt, dass nach einstündiger Vorbehand-

lung mit 50%igem Ethanol sowohl bei Reinkulturen als auch in Stuhlproben selektiv die Sporen zahlreicher Clostridiumarten erfasst und durch Koloniezählung quantitativ bestimmt werden können.

In vorliegenden Untersuchungen wurde die Eignung der Ethanolvorbehandlung zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen im Vergleich zur üblichen Hitzepasteurisation bei Reinkulturen von drei Bacillusarten unterschiedlicher Sporenhitzeresistenz und bei 27 verschiedenen Gewürzen, Trockengemüse- und Kräuterpulvern überprüft.

Material und Methoden

Mikroorganismen

Es wurden ausschliesslich definierte Stämme aus bekannten Stammsammlungen untersucht. Die geprüften vegetativen Mikroorganismen sind in Tabelle 1, die drei Bacillusarten in Tabelle 2 aufgeführt. (ATCC = American Type Culture Collection, DSM = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, ZT = Sammlung Mikrobiologisches Institut der ETH-Zürich).

Vorkultur der Teststämme

Vegetative Bakterien

Nach zweimaliger Vorkultur 24stündige Hauptkultur bei 35 °C in Hirn-Herz-Infusion (Oxoid CM 131).

Hefe

Nach zweimaliger Vorkultur 48stündige Hauptkultur bei 25 °C in Malzextraktlösung (Merck 5391).

Schimmelpilze

Nach Vorkultur Hauptkultur auf Malzextrakt-Agar (3% Malzextrakt und 2% Agar) in Roux-Flaschen bei 25 °C bis nach 3 bis 7 Tagen weitgehende Konidienbildung erreicht war. Abschwemmung und Suspension der Konidien mit Verdünnungslösung (0,1% Pepton und 0,85% NaCl) mit Zusatz von 0,05% Tween 80 und kurze Homogenisation (0,5 min) mit Ultra-Turrax.

Bacillusarten

Nach zweimaliger 24stündiger Vorkultur in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (Merck 5459) bei 35 °C Oberflächenausstrich auf FP-Agar (Nutrient agar – Difco 0069-01 – mit Zusatz von 0,0005% $MnSO_4$) und Bebrütung bei

Tabelle 1. Inaktivierung von vegetativen Bakterien- und Hefezellen sowie von Schimmelpilzkonidien durch 37,5 und 50%ige Ethanollösungen bei Expositionszeiten von 5 bis 60 Minuten

Geprüfte Mikroorganismen		Kontrolle KBE ml^{-1}	Einwirkungszeiten in Minuten von											
			37,5 Vol.-% Ethanol						50 Vol.-% Ethanol					
			5	10	15	30	45	60	5	10	15	30	45	60
Bakterien														
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 15442	$3{,}2 \times 10^6$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Escherichia coli	ATCC 25922	$9{,}0 \times 10^7$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	$6{,}4 \times 10^7$	+	±	±	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Streptococcus faecalis	ATCC 6057	$6{,}5 \times 10^6$	++	++	++	++	+	–	–	–	–	–	–	–
Schimmelpilze und Hefen														
Aspergillus flavus	ZT 8373	$3{,}8 \times 10^5$	+	+	+	+	–	–	±	–	–	–	–	–
		$2{,}4 \times 10^6$	+	+	+	+	+	±	±	–	–	–	–	–
Aspergillus niger	ZT 8359	$8{,}0 \times 10^5$	++	++	++	++	++	+	++	+	+	±	±	±
		$7{,}2 \times 10^7$	++	++	++	++	++	+	++	+	+	+	±	–
Penicillium expansum	ZT 8345	$6{,}2 \times 10^7$	++	++	+	+	+	+	+	±	–	–	–	–
Eurotium herbariorum	ZT 8381	$3{,}4 \times 10^6$	+	+	+	±	–	–	±	±	±	–	–	–
Neosartorya fischeri var. spinosa	ZT 4590	$2{,}5 \times 10^5$	+	+	±	±	±	±	±	±	±	–	±	±
Mucor racemosus	ZT 8617	$2{,}0 \times 10^6$	++	++	+	±	–	–	–	–	–	–	–	–
Saccharomyces cerevisiae	ATCC 9763	$1{,}2 \times 10^6$	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Zeichenerklärung:

		KBE ml^{-1}	Wachstum in Anreicherungskulturen
–	=	< 10	negativ
±	=	< 10	positiv
+	=	10 bis 1000	positiv
++	=	> 1000	positiv

Tabelle 2. Vergleich der Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren: A) Ethanolexposition und B) Erhitzung, zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen
log $\bar{x}_G$ (geom. Mittelwert) KBE ml^{-1} A) nach 15, 30 und 60 min Exposition mit 37,5 und 50 Vol.-% Ethanol und B) nach 10 min Erhitzung bei 60 bis 80 °C, 60 bis 75 oder 60 bis 70 °C sowie prozentualer Sporengehalt nach diesen Vorbehandlungen im Vergleich zum KBE-Gehalt der unbehandelten Ausgangssuspensionen

Bacillus-arten	Unbehandelte Ausgangssuspensionen				A) Nach Ethanolexpositionen		B) nach 10 min Erhitzung	
	Kulturdauer bei 35 °C in h	Suspension Standzeit bei 4 °C in d	Versporung (mikroskop.)	log ($\bar{x}_G$) KBE ml^{-1}	log ($\bar{x}_G$) KBE ml^{-1}	% Sporen	log ($\bar{x}_G$) KBE ml^{-1}	% Sporen
							bei 60 bis 80 °C	
Bacillus subtilis var. niger (DSM 675)	8	–	sehr gering	7,85	4,07	0,02	4,10	0,02
	19	1	mittel	7,81	7,30	31	7,13	21
	19	6	mittel	7,68	7,57	77	7,51	67
	140	–	stark	8,25	8,04	62	8,19	87
							bei 60 bis 75 °C	
Bacillus cereus (DSM 351)	11	1	mittel	7,53	7,00	30	6,93	25
	11	6	mittel	7,46	7,25	62	7,11	45
	140	–	stark	8,11	7,90	62	8,01	79
							bei 60 bis 70 °C	
Bacillus megaterium (DSM 90)	15	1	mittel	7,41	7,17	57	6,95	35
	15	6	mittel	7,21	7,15	87	7,01	63
	140	–	stark	8,12	8,02	80	7,68	36
	15	1	mittel	7,11	nur Erhitzung		6,62	32
					Erhitzung und Ethanol		6,68	36
					Ethanol und Erhitzung		6,63	32

35 °C. Abschwemmung der Zellen und Sporen mit Verdünnungslösung, kurze Homogenisation der Suspension mit Ultra-Turrax und Einstellung auf eine Gesamtzellzahl in der Grössenordnung von 10^7 bis 10^8 ml^{-1}. Während der Bebrütung wurde der Versporungsgrad mikroskopisch in der Zählkammer geprüft und folgende, unterschiedlich versporte Suspensionen gewonnen:

- mit sehr geringer Versporung bei *B. subtilis* nach 8 Stunden Bebrütung
- mit nahezu vollständiger Versporung bei allen drei Arten nach 140 Stunden Bebrütung
- mit annähernd 50%iger Versporung bei *B. cereus* nach 11 Stunden, bei *B. megaterium* nach 15 Stunden und bei *B. subtilis* nach 19 Stunden Bebrütung. Diese Suspensionen werden zur Hemmung weiterer Versporung bzw. Alterung jeweils ein und sechs Tage bei 4 °C gelagert.

Hitzepasteurisation

Jeweils 5 ml der Sporensuspensionen bzw. der Gewürz- und Pulverhomogenisate wurden in dünnwandigen Reagenzgläsern (0,7 x 16 x 160 mm) im Ultrathermostaten einschliesslich Aufheizzeit exakt 10 Minuten bei Temperaturen von 60 bis 100 °C erhitzt und danach sofort im Eisbad auf Raumtemperatur gekühlt. Die unter diesen Bedingungen im Zentrum der Suspensionen mit Thermoelementen gemessene Aufheizzeit betrug 2,2 bis 2,5 Minuten, die Abkühlzeit mit Eisbad annähernd 1,5 bis 2 Minuten.

Ethanolvorbehandlung

Von den ein bzw. zwei Tage alten Hauptkulturen der vegetativen Mikroorganismen sowie den Konidiensuspensionen wurden im Doppel jeweils 1 ml in 9 ml von exakt nach Gewicht und Dichte auf Endkonzentrationen von 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 37,5 und 50 Vol.-% Ethanol eingestellten Lösungen überführt, auf einem Reagenzglasvibrator eine halbe Minute durchmischt, die Durchmischung bei Raumtemperatur alle 5 Minuten wiederholt und nach Expositionszeiten von 15, 30, 45 und 60, teilweise auch von 90 Minuten, Proben zur Koloniezählung und Anreicherung entnommen.

Bei den Zell- und Sporensuspensionen der drei Bacillusstämme sowie den Homogenisaten der Gewürze, Trockengemüse- und Kräuterpulver wurden dagegen jeweils 4,0 ml mit 4,0 ml absolutem Ethanol bzw. einer 75%igen Ethanollösung vermischt, auf dem Reagenzglasvibrator genau für eine halbe Minute gut durchmischt, die Durchmischung alle 5 Minuten wiederholt und nach entsprechenden Expositionszeiten Proben zur Koloniezählung entnommen. Diese 1:1 Mischung von Homogenisat und Ethanol entspricht den vereinfachten Laboratoriumsbedingungen der Praxis. Bei Anwendung von absolutem Ethanol (99,46 Vol.-%) und einer exakt auf 75 Vol.-% eingestellten Ethanollösung beträgt die tatsächliche Ethanolkonzentration in dem als 50%ig bezeichneten Ansatz in Folge der Volumenkontraktion exakt 51,56 Vol.-%, in der als 37,5%ig bezeichneten Mischung exakt 38,13 Vol.-% Ethanol.

Kombinierte Behandlungen

Bei einer zu 50% versporten und 1 Tag alten Suspension von *B. megaterium* wurden die Ethanolvorbehandlung und Hitzepasteurisation zweifach kombiniert. Zur Kontrolle wurde jeweils 10 Minuten bei 60, 65, 70, 75 und 80 °C erhitzt. In der ersten Kombination folgte nach der Erhitzung und Abkühlung eine jeweils 30 Minuten lange Exposition mit 50%igem Ethanol. Bei der zweiten Kombination erfolgte zuerst die Ethanolbehandlung und anschliessend die Hitzepasteurisation mit entsprechender Volumenkorrektur vor Ansatz der Koloniezählungen.

Koloniezählungen

Von allen unbehandelten sowie allen hitzepasteurisierten oder/und ethanolvorbehandelten Suspensionen und Homogenisaten wurden nach dezimaler Verdünnung mit Verdünnungslösung (0,1% Pepton und 0,85% NaCl) Koloniezählungen im Oberflächen-Ausstrich-Verfahren (0,1 ml pro Platte) mit jeweils 3 Parallelplatten pro Verdünnungsstufe angelegt. Bei sehr niedrigen Koloniezahlen und den stärker verdünnten Kräuterhomogenisaten wurden von den ersten Verdünnungsstufen jeweils 1 ml auf stärker gegossene und getrocknete Agarplatten aufgebracht. Zur sicheren Verhütung von Lauf- und Schleimkolonien wurden alle Platten vor der Bebrütung offen bei 35 °C für 3 bis 4 Stunden oberflächlich angetrocknet.

Die Bestimmung der Schimmelpilz- und Hefekoloniezahlen bei den Gewürzen und Kräutern erfolgte auf Malzextrakt-Agar mit Zusatz von jeweils 50 ppm Chloramphenicol und Chlortetracyclin nach 4 und 7 Tage langer Bebrütung bei 25 °C.

Die Bestimmung der Gesamt- und Sporenkoloniezahlen erfolgte auf Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar nach 48 Stunden Bebrütung bei 35 °C mit zusätzlicher Kontrolle nach weiteren ein und drei Tagen.

Die angegebenen Koloniezahlen wurden als gewogene Mittelwerte ($\bar{x}_{gew}$) von jeweils bis zu 6 Einzelzählungen berechnet.

Zur Prüfung der Ethanolinaktivierung der vegetativen Mikroorganismen wurden aus den jeweiligen Ethanol-Mikroorganismen-Ansätzen nach den entsprechenden Expositionszeiten im Doppel jeweils 0,1 ml entnommen, auf festen Kulturmedien (Bakterien = Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar, Pilze und Hefen = Malzextraktagar) ausgestrichen und nach 1, 2 und 5 Tagen Bebrütung bei 35 °C bzw. 25 °C die Koloniezahlen bestimmt. Zusätzlich wurde ebenfalls im Doppel jeweils 0,1 ml in 10 ml Anreicherungslösung (Bakterien = Hirn-Herz-Infusion, Pilze und Hefen = Malzextraktlösung) überführt, ebenfalls 2 bis 5 Tage bei 35 °C bzw. 25 °C bebrütet und danach Kontrollausstriche angelegt, bebrütet und geprüft.

Ergebnisse

Ethanolinaktivierung von Bakterien, Hefen und Pilzkonidien

Bei allen 11 geprüften Mikroorganismen-Arten wurden die vegetativen Zellen oder Pilzkonidien nach über einstündiger Einwirkung von Ethanol in niedrigen Konzentrationen (2,5; 5; 7,5; 10 und 15 Vol.-%) nicht inaktiviert. Auch durch 20 Vol.-% Ethanol erfolgte bei den meisten Prüfstämmen keine Inaktivierung. Nur bei *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* war damit eine relativ geringe Inaktivierung und Reduktion der Zahl vermehrungsfähiger Zellen in der Grössenordnung von etwa ein bis zwei Zehnerpotenzen nachweisbar.

Eine starke bis vollständige Inaktivierung erfolgte dagegen nach kurzzeitiger bis einstündiger Einwirkung der höheren Ethanolkonzentrationen von 37,5 und 50 Vol.-% (Tabelle 1). Dabei zeigten sich ausgeprägte Unterschiede in der Ethanolresistenz zwischen Bakterien- und Hefezellen einerseits und Schimmelpilzkonidien andererseits. Alle geprüften Bakterien und Hefen wurden nach einstündiger Einwirkung bereits durch 37,5 Vol.-% Ethanol vollständig inaktiviert, die meisten Pilzkonidien dagegen erst durch 50vol.-%iges Ethanol.

Die gramnegativen Bakterien waren am empfindlichsten und wurden durch 37,5% Ethanol bereits innerhalb von 5 Minuten abgetötet. Die grampositiven Bakterien und auch *Saccharomyces cerevisiae* waren etwas resistenter und wurden durch 37,5% Ethanol erst nach 15 bis 60 Minuten inaktiviert. Ein entsprechendes Verhalten zeigten auch die deutlich empfindlicheren Sporen von *Mucor racemosus* und Konidien von *Eurotium herbariorum.*

Die Konidien der *Aspergillus-, Penicillium-* und *Neosartoria-Arten* wurden in 37,5 Vol.-% Ethanol auch nach 90 Minuten langer Einwirkung nur teilweise und erst in 50%igem Ethanol nach 30 bis 60 Minuten vollständig inaktiviert. Besonders auffällig war die relativ hohe Ethanolresistenz der Konidien des hier geprüften Stammes von *Aspergillus niger.*

Ethanolvorbehandlung und Hitzepasteurisation von Bacillussporen

Bei drei Bacillusarten unterschiedlicher Sporenhitzeresistenz wurde die Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren zur selektiven Sporenkoloniezählung: (A) Ethanolexposition und (B) Hitzepasteurisation verglichen. Dazu wurden aliquote Anteile einer Ausgangssuspension jeweils 15, 30, 60 und teilweise auch 45 und 90 Minuten mit 37,5- und 50%igem Ethanol (exakt 38,13 und 51,66 Vol.-%) vorbehandelt, parallel dazu jeweils 10 Minuten bei Temperaturen von 60, 65, 70, 75, 80 und 100 °C erhitzt und danach Koloniezählungen durchgeführt. Bei allen drei Arten wurden Suspensionen mit mittlerer (etwa 50%iger) und starker (etwa 80- bis 100%iger) Versporung geprüft, bei *B. subtilis* auch noch mit sehr geringer (< 0,02%iger) Versporung. Zur Prüfung eines möglichen Einflusses des Sporenalters wurden die mittel versporten Suspensionen nach jeweils 1

und 6 Tage langer Lagerung bei + 4 °C untersucht. Die Ergebnisse der vergleichenden Koloniezählungen sind in den Abbildungen 1 bis 3 und der Tabelle 2 zusammengefasst.

Nach den Ethanolvorbehandlungen waren bei allen untersuchten Suspensionen sowohl bei beiden Ethanolkonzentrationen als auch bei allen 4 bis 5 angewandten Expositionszeiten sehr konstante Werte der Koloniezahlen zu verzeichnen. Die mittleren Abweichungen lagen innerhalb der methodisch bedingten Fehlergrenzen des Koloniezählverfahrens.

Nach der Hitzepasteurisation nahmen dagegen die Koloniezahlen je nach spezifischer Sporenhitzeresistenz der drei Arten mit zunehmender Pasteurisationstemperatur mehr oder weniger stark ab.

Bei *B. subtilis,* der Art mit der grösseren Sporenresistenz, blieben die Werte bis zur Pasteurisationstemperatur von 80 °C annähernd konstant, zeigten aber insgesamt grössere Schwankungen als nach Ethanolvorbehandlung. Erst nach 10 Minuten langer Erhitzung bei 100 °C erfolgte eine Reduktion der Koloniezahlen um etwa 4 Zehnerpotenzen.

Bei *B. cereus,* der Art mit mittlerer Sporenresistenz, nahmen die Koloniezahlen mit zunehmender Pasteurisationstemperatur nur relativ wenig, aber doch deutlich ab. Dabei war diese Abnahme bei der mittel versporten Suspension wesentlich stärker ausgeprägt als bei der stark versporten Suspension.

Bei *B. megaterium,* der Art mit der geringsten Sporenresistenz, nahmen die Koloniezahlen gleichermassen in den mittel und stark versporten Suspensionen bereits nach 10 Minuten langer Erhitzung bei 75 °C stark ab.

Sowohl bei *B. cereus* als auch bei *B. megaterium* hatte eine 10 Minuten lange Erhitzung bei 100 °C eine Koloniezahlreduktion um über 6 Zehnerpotenzen zur Folge.

Besonders auffällig waren bei den beiden Arten mit höherer Sporenresistenz, *B. subtilis* und *B. cereus,* die deutlich höheren Koloniezahlen nach beiden Vorbehandlungsverfahren in den 6 Tage alten gegenüber den nur einen Tag alten Suspensionen. Nach den ermittelten Koloniezahlen ergab sich dabei eine Erhöhung der prozentualen Versporung von etwa 30% in der einen Tag alten Suspension um das Doppelte auf über 60% in derselben, aber 6 Tage gelagerten Suspension (Tabelle 2). Bei *B. megaterium* war dies weit weniger deutlich der Fall.

Bei den einen Tag alten Suspensionen von *B. megaterium* mit mittlerer Versporung ergaben beide Kombinationen von Ethanolvorbehandlung (50%, 30 min) mit Hitzepasteurisation (60 bis 80 °C, 10 min) keine signifikanten Unterschiede in den Koloniezahlen im Vergleich zur Hitzepasteurisation allein, unabhängig davon, ob zuerst erhitzt oder mit Ethanol vorbehandelt wurde.

Ethanolvorbehandlung und Hitzepasteurisation von Gewürzen

Bei 27 unterschiedlich stark versporten Gewürzen, Trockengemüse- und Kräuterpulvern des Handels wurde die Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren zur selektiven Koloniezählung der vorhandenen Bacillussporen vergleichend bestimmt.

In einer ersten Serie wurden 8 Gewürze, hauptsächlich verschiedene Pfeffersorten, mit gleicher Methodik, wie sie bei den *Bacillus*-Reinkulturen angewandt worden war, untersucht (Tabelle 3). Alle Produkte waren mit Sporenkoloniezahlen in der Grössenordnung zwischen 5×10^7 und 10^4 KBE g^{-1} und einem durchschnittlichen prozentualen Versporungsgrad von 83% stark versport. Dabei zeigten die Werte der Sporenkoloniezahlen nach Ethanolvorbehandlung und Hitzepasteurisation bis einschliesslich bei 80 °C keine signifikanten Unterschiede. Lediglich bei der Paprikaprobe (Nr. 7) waren die Koloniezahlen nach 10 min Erhitzung bei 80 °C um etwa die Hälfte reduziert.

Bei weiteren 19 Gewürzen sowie Trockengemüse- und Kräuterpulvern wurden bei der Ethanolvorbehandlung nur die beiden Expositionszeiten von 15 und 60 Minuten und bei der Hitzepasteurisation neben 60 und 80 °C auch noch die höheren Erhitzungstemperaturen von 90, 95 und 100 °C geprüft (Tabelle 4). Die Gesamtkeim- und auch Sporenbelastung variierte in einem weiten Bereich zwischen 10^7 bis 10^4 bzw. 10^2 KBE g^{-1} ebenso wie der prozentuale Sporengehalt zwischen 100 und 0,2%. Von wenigen Ausnahmen abgesehen waren auch hier die Sporenkoloniezahlen nach Ethanolvorbehandlung und Hitzepasteurisation bei 80 °C innerhalb der methodischen Fehlergrenzen weitgehend identisch. Erst nach Erhitzung bei höheren Temperaturen von 90, 95 und 100 °C nahmen die Sporenkoloniezahlen zunehmend stärker ab (Abb. 5, 6 und 7). Eine der Ausnahmen war das Paprikapulver (Nr. 14), bei dem die Sporenzahlen nach Erhitzung auf 80 °C über eine halbe Zehnerpotenz niedriger als nach Ethanolvorbehandlung lagen (Abb. 4).

In Tabelle 5 sind die Gesamtergebnisse der Koloniezählungen bei allen 27 verschiedenen Gewürzen zusammengestellt. Die absoluten Sporenkoloniezahlen lagen zwischen 10^7 und unter 10^2 KBE g^{-1} mit einer deutlichen Dominanz der Sporenzahlen von 10^6 bis 10^7 g^{-1}. Der auf die Gesamt-KBE bezogene prozentuale Sporengehalt lag bei über der Hälfte der Proben zwischen 54 und 100%, bei 7 Proben unter 35% und bei 4 Proben unter 1%. Es wurden keine Hefen, sondern nur Schimmelpilze überwiegend in der Grössenordnung von 10^3 bis 10^4, bei 4 Proben von 10^5 und bei einer Probe sogar von 10^6 KBE g^{-1} nachgewiesen.

Diskussion

Ethanolinaktivierung von Bakterien, Hefen und Pilzkonidien

Die rasche mikrobizide, aber nicht sporizide Wirkung höherer Ethanolkonzentrationen zwischen 60 und 80 Vol.-% ist seit langem gut bekannt (4). Über die unteren Grenzkonzentrationen der antimikrobiellen Wirksamkeit des Ethanols gibt es dagegen weit weniger und teilweise kontroverse Befunde.

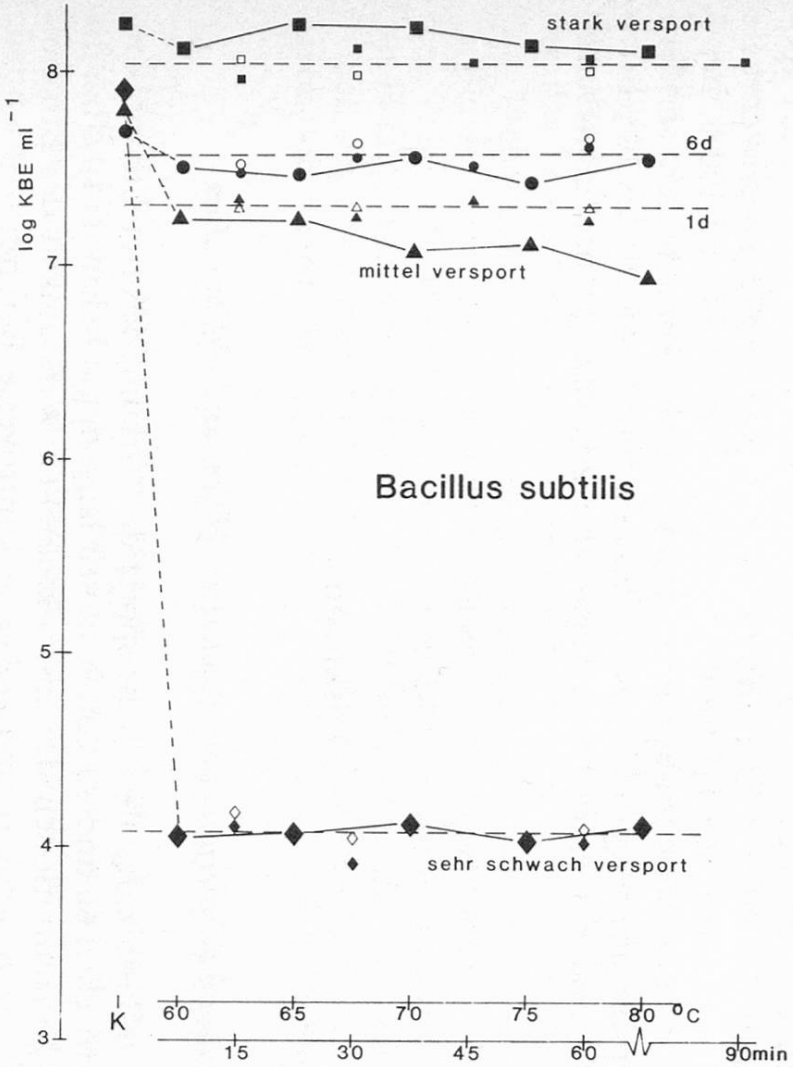

Abb. 1. *Bacillus subtilis var. niger* (DSM 675)

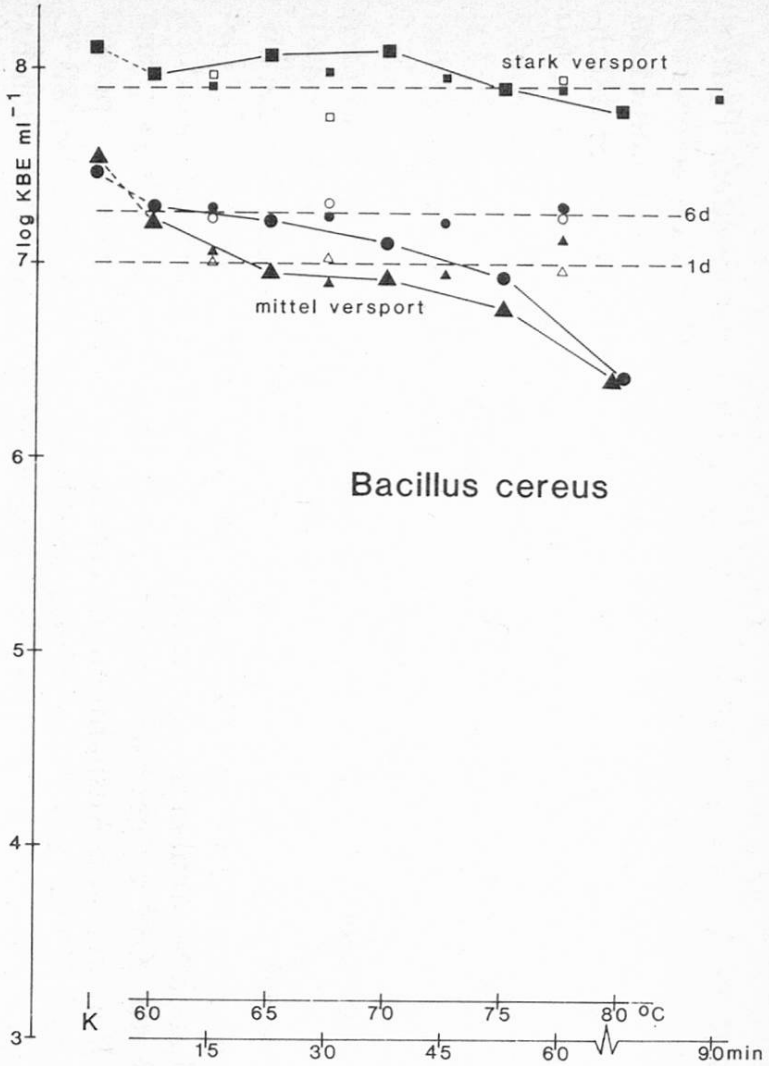

Abb. 2. *Bacillus cereus* (DSM 351)

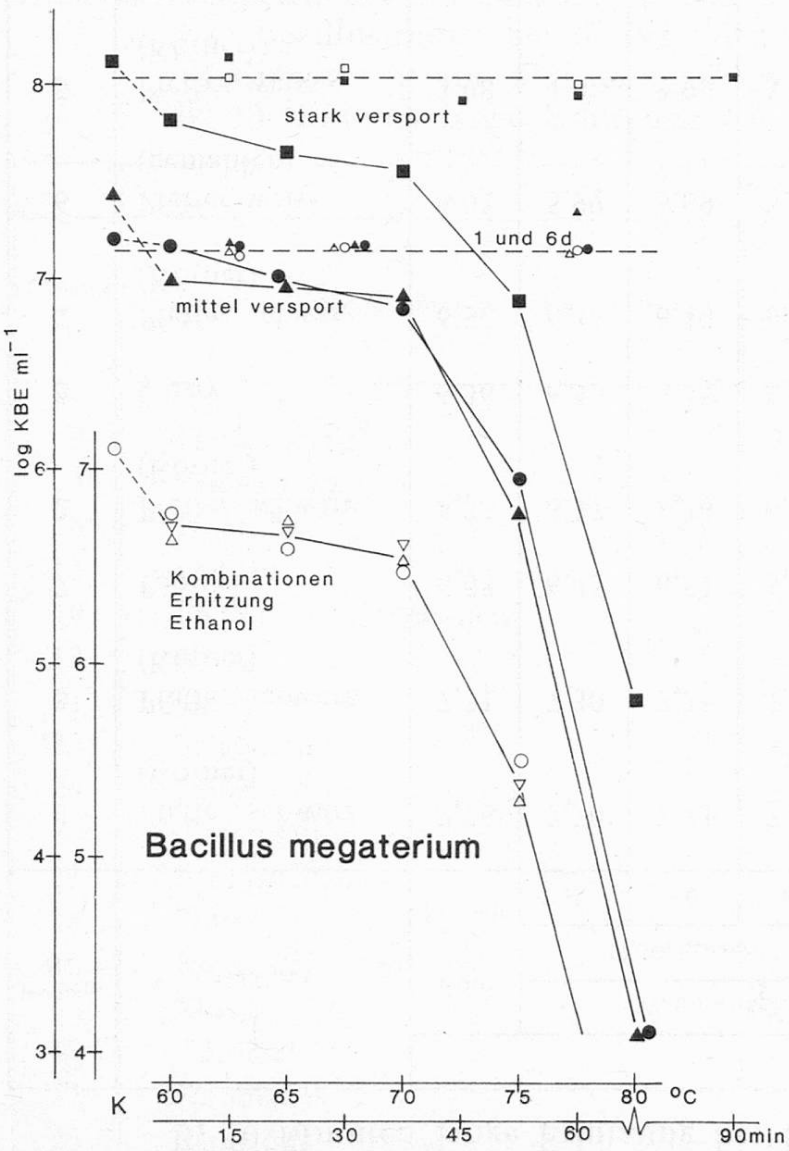

Abb. 3. *Bacillus megaterium* (DSM 90) mit zusätzlichen Kombinationen von Erhitzung und Ethanolexposition

Abb. 1 bis 3. Vergleich der Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren:
Ethanolexposition (37,5 und 50 Vol.-%, 15 bis 90 min) und Erhitzung (10 min bei 60 bis 80 °C) zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei unterschiedlich stark versporten Suspensionen

Zeichenerklärung:

	Erhitzung (10 min)	Ethanol 37,5	Ethanol 50 Vol.-%
stark versport	■ —	□ — — — —	■
mittel versport 1 d	▲ —	△ — — — —	▲
mittel versport 6 d	● —	○ — — — —	●
mittel versport 1 d Erhitzung	○ —		
Erhitzung und Ethanol	▽ —		
Ethanol und Erhitzung	△ —		
sehr schwach versport	◇ —		
unbehandelte Ausgangssuspension	K		

Tabelle 3. Vergleich der Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei 8 verschiedenen Gewürzen:
A) Einwirkung von 37,5 und 50%igem Ethanol für 15, 30 und 60 Minuten
B) 10 Minuten lange Erhitzung bei 60, 65, 70, 75, 80 und 100 °C

Proben-Nr.	Gewürze	log KBE g^{-1} nach Koloniezählung im Oberflächenverfahren												
		Kontrolle unbehandelt	A) Einwirkungszeiten in Minuten von						B) nach 10 Minuten langer Erhitzung bei °C					
			37,5% Ethanol			50% Ethanol								
			15	30	60	15	30	60	60	65	70	75	80	100
4	Pfeffer, schwarz (Körner)	7,76	7,70	7,73	7,66	7,63	7,75	7,62	7,75	7,73	7,76	7,75	7,74	5,88
3	Pfeffer, schwarz (Körner)	7,51	7,30	7,35	7,41	7,47	7,46	7,36	7,48	7,39	7,49	7,45	7,44	5,37
7	Paprika	6,58	6,45	6,53	6,38	6,61	6,51	6,61	6,56	6,54	6,47	6,31	5,97	2,60
2	Pfeffer, schwarz (Körner)	6,36	6,37	6,26	6,20	6,38	6,44	6,28	6,31	6,45	6,49	6,32	6,39	4,35
8	Curry	6,36	6,35	6,35	6,40	6,32	6,34	6,32	6,48	6,48	6,41	6,43	6,35	3,54
1	Pfeffer, schwarz (Körner)	6,36	6,34	6,40	6,20	6,28	6,27	6,34	6,30	6,40	6,30	6,26	6,10	3,16
6	Pfeffer, weiss (gemahlen)	6,01	5,99	5,89	5,88	5,86	5,96	5,77	6,00	5,89	5,90	5,81	5,72	2,19
5	Pfeffer, weiss (Körner)	3,98	4,02	3,99	3,91	3,90	4,00	3,96	4,06	3,97	4,00	3,91	3,88	n. b.

Tabelle 4. Vergleich der Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei 19 verschiedenen Gewürzen und Trockengemüse- und Kräuterpulvern:
A) Einwirkung von 37,5 und 50%igem Ethanol für 15 und 60 Minuten
B) 10 Minuten lange Erhitzung bei 60, 80, 90, 95 und 100 °C

		log KBE g^{-1} nach Koloniezählung im Oberflächenverfahren									
			A) Einwirkungszeiten in Minuten von				B) nach 10 Minuten langer Erhitzung bei °C				
Proben-Nr.	Gewürze, Trockengemüse- und Kräuterpulver	Kontrolle unbehandelt	37,5% Ethanol		50% Ethanol						
			15	60	15	60	60	80	90	95	100
9	Pfeffer weiss	7,89	7,81	7,68	7,60	7,65	7,75	7,79	7,56	7,18	5,87
23	Salatgewürz	7,39	7,00	7,04	6,36	6,93	7,14	6,82	6,72	5,23	5,32
18	Petersilie	7,38	4,47	4,51	4,49	4,62	4,85	4,66	4,74	4,60	3,43
14	Paprika	7,00	7,02	7,03	7,13	7,07	7,00	6,50	4,88	2,97	<2,0
10	Pfeffer, weiss, gemahlen	6,85	6,00	5,98	6,34	6,14	6,06	6,05	5,38	4,62	3,60
12	Curry	6,84	7,18	6,87	7,04	6,93	6,85	6,95	6,49	5,64	<2,0
11	Curry	6,71	6,58	6,58	6,60	6,55	6,71	6,46	5,45	4,74	2,92
22	Salatgewürz	6,41	5,30	5,30	5,34	5,43	5,51	5,33	4,72	3,95	3,07
24	Salbei	5,79	3,73	3,61	3,81	3,64	4,16	3,82	2,95	2,72	2,68
20	Gewürzmischung	5,76	5,68	5,69	5,70	5,77	5,76	5,58	5,26	4,83	4,23
21	Schnittlauch	5,40	2,72	2,77	2,38	2,57	3,88	2,89	<2,0	<2,0	<2,0
13	Curry, alt	5,38	4,95	4,94	4,76	4,77	5,34	4,81	<3,0	<2,0	<2,0
15	Koriander	4,91	3,81	3,84	3,58	3,71	4,43	3,57	2,88	2,82	2,96
17	Muskat	4,87	2,67	3,04	2,88	2,56	3,29	3,09	2,42	<2,0	<2,0
19	Kümmel	4,81	4,09	4,16	4,06	4,25	4,74	4,29	3,16	2,85	<2,0
27	Knoblauch	4,70	4,69	4,69	4,57	4,66	4,72	4,51	4,33	3,69	<2,0
25	Estragon	4,66	3,90	4,08	4,08	4,07	4,46	4,11	3,75	3,63	3,55
26	Sellerie	4,58	4,21	4,27	4,33	4,29	4,48	4,32	3,94	3,93	3,56
16	Senfkörner	3,84	3,64	3,63	3,50	3,57	3,76	3,55	3,19	2,70	<2,0

Abb. 4 bis 7. Vergleich der Wirksamkeit der beiden Vorbehandlungsverfahren: Ethanolexposition (37,5 und 50 Vol.-%, 15 bis 60 min) und Erhitzung (10 min bei 60 bis 100 °C) zur selektiven Koloniezählung von Bacillussporen bei 4 unterschiedlich stark verkeimten und versporten Gewürzen

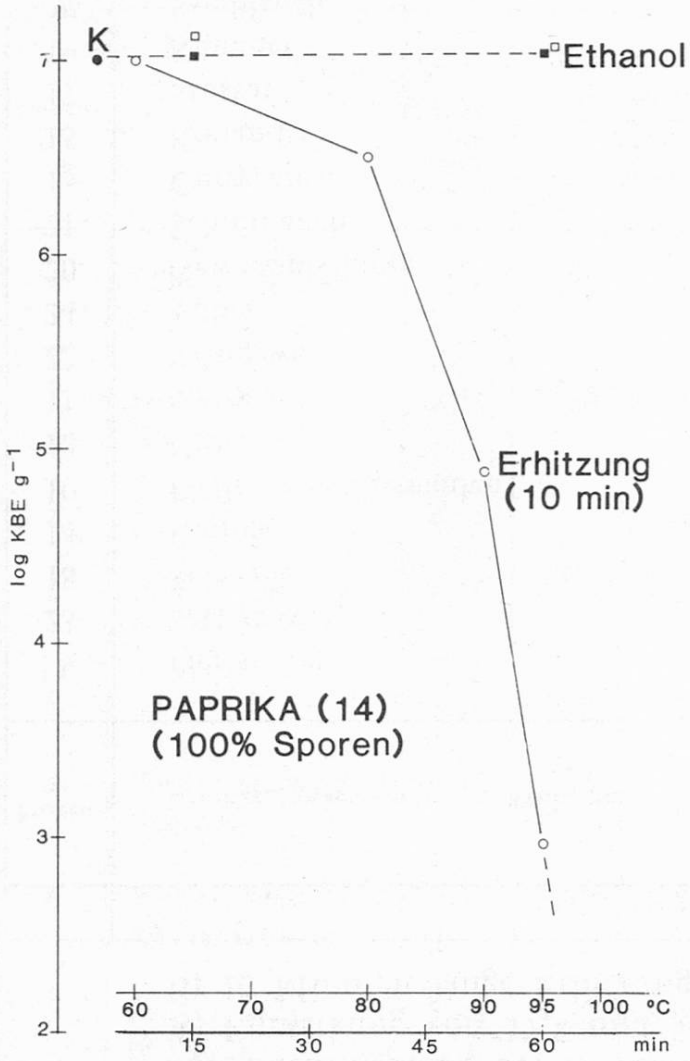

Abb. 4. Paprika Nr. 14 (100% Sporen)

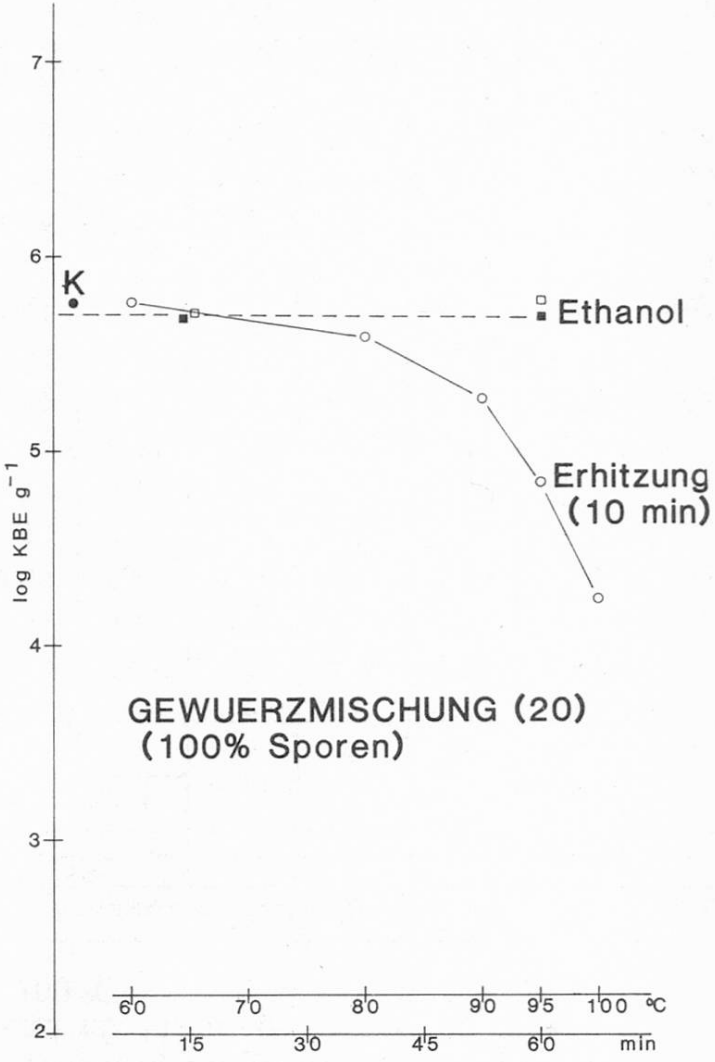

Abb. 5. Gewürzmischung (Nr. 20) (100% Sporen)

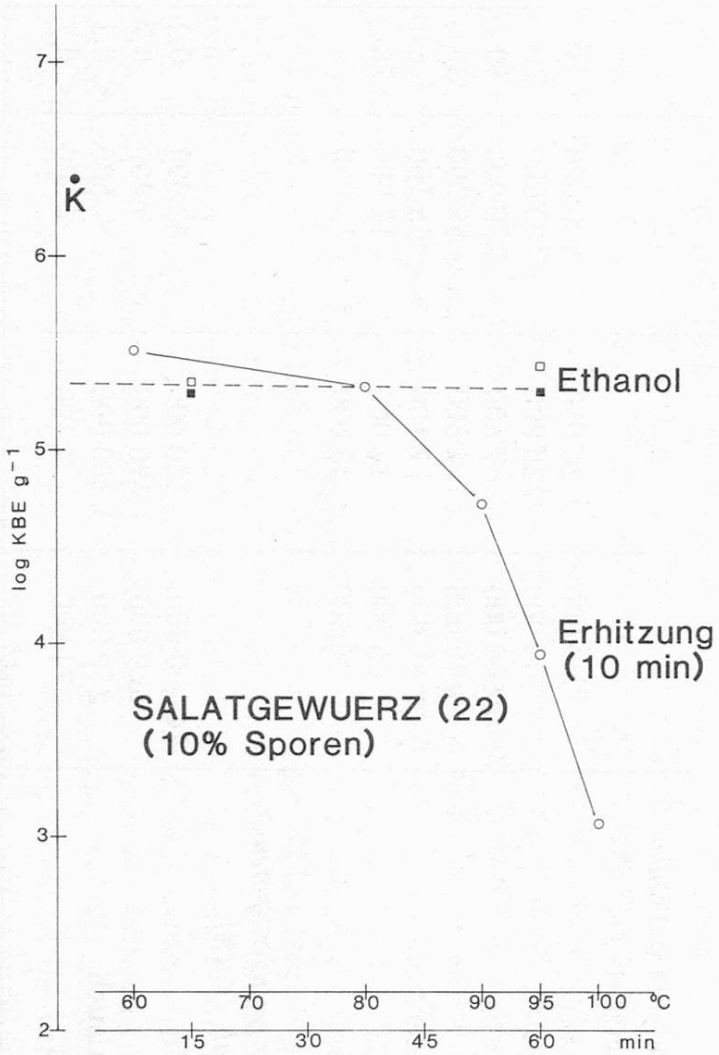

Abb. 6. Curry (Nr. 11) (70% Sporen)

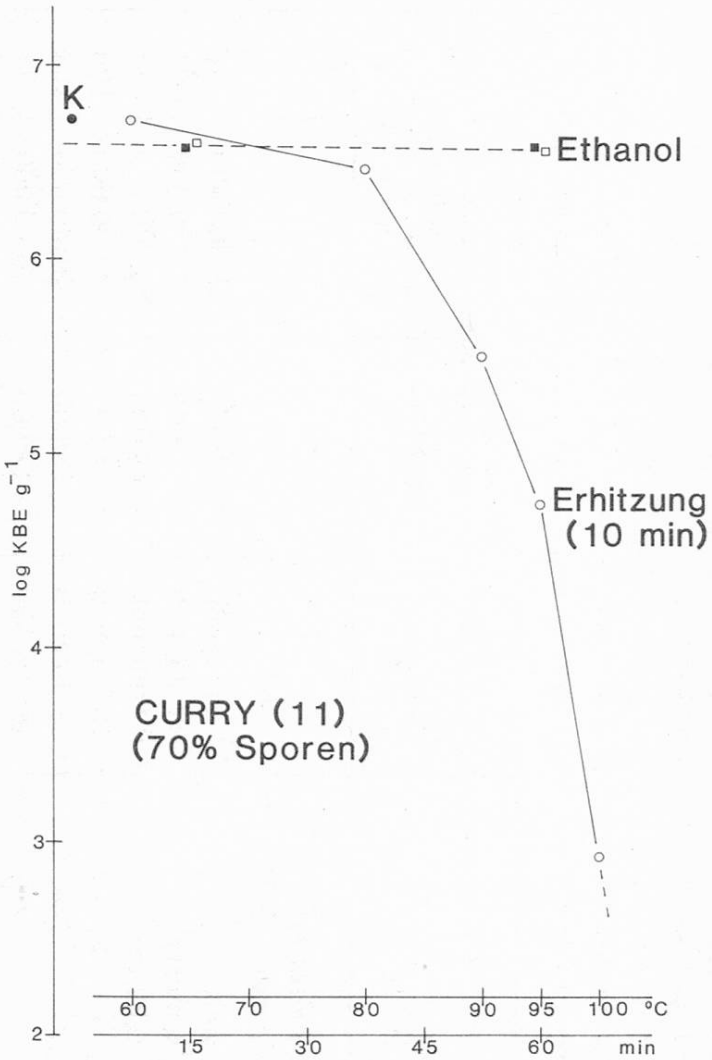

Abb. 7. Salatgewürz (Nr. 22) (10% Sporen)

Zeichenerklärung:

Erhitzung (10 min)	Ethanol 37,5	Ethanol 50 Vol.-%
○	□	■

K = unbehandeltes Ausgangshomogenisat

Tabelle 5. Gesamtergebnisse der Koloniezählungen bei 27 verschiedenen Gewürzen und Gemüsetrockenpulvern
– Gesamt-KBE g^{-1}; – Schimmelpilz-KBE g^{-1}
– Bacillussporen KBE-g^{-1} nach 60 min Einwirkung von 50%igem Ethanol
– prozentualer Bacillussporengehalt (bezogen auf Gesamt-KBE)

Produkt-Nr.	Produkte	KBE g^{-1}			
		Gesamt-KBE	Schimmelpilz-KBE	Bacillussporen	
				KBE	%
	I. Hoher prozentualer Sporengehalt (⩾ 50%)				
9	Pfeffer, weiss	78 000 000	11 000	45 000 000	58
4	Pfeffer, schwarz	58 000 000	10 000	42 000 000	72
3	Pfeffer, schwarz	32 000 000	13 000	23 000 000	72
14	Paprika	10 000 000	14 000	12 000 000	100
12	Curry	6 900 000	23 000	8 500 000	100
11	Curry	5 100 000	17 000	3 600 000	71
7	Paprika	3 800 000	< 500	4 100 000	100
1	Pfeffer, schwarz	2 300 000	< 500	2 200 000	96
8	Curry	2 300 000	1 100	2 100 000	91
2	Pfeffer, schwarz	2 300 000	1 200	1 900 000	83
6	Pfeffer, weiss	1 000 000	140 000	590 000	59
20	Gewürzmischung	580 000	< 500	590 000	100
27	Knoblauch	50 000	< 500	46 000	92
26	Sellerie	38 000	< 500	20 000	53
5	Pfeffer, weiss	9 600	1 800	9 100	95
16	Senfkörner	6 900	3 000	3 700	54
	II. Geringer prozentualer Sporengehalt (⩽ 35%)				
23	Salatgewürz	25 000 000	26 000	8 500 000	34
10	Pfeffer, weiss	7 100 000	220 000	1 400 000	20
22	Salatgewürz	2 600 000	7 600	270 000	10
13	Curry	240 000	< 500	59 000	25
15	Koriander	81 000	7 100	5 100	6
19	Kümmel	65 000	14 000	18 000	28
25	Estragon	46 000	17 000	12 000	26
	III. Sehr geringer Sporengehalt (< 1%)				
18	Petersilie	24 000 000	120 000	42 000	0,2
24	Salbei	620 000	190 000	4 400	0,7
21	Schnittlauch	250 000	1 300 000	< 500	< 0,2
17	Muskat	74 000	1 100	< 500	< 0,7

Die *bakteriostatischen* Ethanolkonzentrationen können je nach Milieubedingungen sehr niedrig sein. *Fried* und *Novick* (5) konnten zeigen, dass nach Ethanolzugabe zu einer Kultur von E.coli K-12 in exponentieller Wachstumsphase eine mit der Ethanolkonzentration zunehmende Reduktion der Wachstumsrate, ab 1,1 M Ethanol Hemmung der Zellteilung und ab 1,6 M (= ca. 7,4%) Inaktivierung erfolgt. Nach *Dagley* et al. (6) wird bereits durch 0,4 M (= ca. 1,2%) Ethanol die lag-Phase von *Aerobacter aerogenes* stark verlängert. *Heinmets* et al. (7) beobachteten, dass durch sehr kurze, nur 10 Minuten lange Einwirkung von 20%igem Ethanol die Vermehrung von *E.coli* reversibel gehemmt wird. Die Hemmung war durch Zugabe von Metaboliten wieder aufhebbar.

In Untersuchungen zur Steigerung der Toleranz von Bakterien gegenüber bakteriziden Stoffen konnten *Wigert* et al. (8) bei *Staphylococcus aureus* durch 75 Passagen bei subletalen Konzentrationen die Toleranz, d. h. Vermehrungsfähigkeit, von 6% auf 12% Ethanol steigern. *Feuerpfeil* et al. (9) erreichten bei *Pseudomonas aeruginosa* und vier Enterobacteriaceen-Arten nach 50 Passagen Toleranzsteigerungsfaktoren von 2 bis 4. *Hermann* et al. (10) bestimmten in 24stündigen Schüttelkulturen als bakteriostatische Konzentrationen für *Staphylococcus saprophyticus* 10 bis 15% und für *Lactobacillus spec.* 14 bis 16% Ethanol.

Die niedrigsten *bakteriziden* Ethanolkonzentrationen liegen je nach Dauer der Einwirkungszeiten zwischen etwa 8 bis 25 Vol.-%. Alkoholische Getränke sind bei Ethanolgehalten von über 17 bis 20 Vol.-% erfahrungsgemäss mikrobiologisch stabil. In Eierlikör mit einem Gehalt von 17,2 Vol.-% Ethanol wurden nach massiver Beimpfung fünf Salmonella-Serotypen und drei Phagentypen von *Staphylococcus aureus* innerhalb von 24 Stunden vollständig inaktiviert (11). Eierlikör mit einem Gehalt von 20 Vol.-% Ethanol war nach Beimpfung mit *Escherichia coli* und verschiedenen Salmonella-Arten innerhalb von 4 bis 12 Stunden keimfrei (12, 13, 14). In Whisky eingeimpfte Zellen von 11 Stämmen von *Vibrio cholera* wurden ebenfalls innerhalb von 24 Stunden inaktiviert (15).

Zur raschen Inaktivierung von Bakterien innerhalb von 5 bis 60 Minuten sind höhere Ethanolkonzentrationen von 30 bis 50 Vol.-% notwendig (3, 16). Dabei sind grampositive Bakterien, insbesondere Streptokokken, meist deutlich resistenter als gramnegative Arten (3, 16, 17), wie dies auch in vorliegenden Untersuchungen der Fall war. *Koransky* et al. (3) konnten nach 60 Minuten langer Einwirkung von 25%igem Ethanol nur eine relativ geringe Keimzahlreduktion um ein bis drei Zehnerpotenzen nachweisen, während 10%ige Ethanollösungen unwirksam waren.

Die *fungistatische* und *fungizide* Ethanolwirkung wurde vor allem von *Geiges* und *Kuchen* (18) im Hinblick auf die langfristige Konservierung von Brot mit Ethanol eingehender untersucht (19). Danach werden Schimmelpilzkonidien bereits bei Konzentrationen von über 6 bis 7 Vol.-% Ethanol am Auskeimen gehemmt. Die Konidien von *Penicillium expansum, P. implicatum* und *P. lanoso-coeruleum,* von *Aspergillus oryzae* und *Trichoderma harzianum* wurden im Suspensionsversuch nach tage- und wochenlanger Exposition bei Ethanolkonzentrationen zwischen 8 und 13 Vol.-% inaktiviert. Nur *Neurospora sitophila* war sehr empfindlich und wurde bereits durch 2 bis 4 Vol.-% Ethanol innerhalb weniger Wo-

chen abgetötet. Vier geprüfte Hefen: *Saccharomyces cerevisiae, Hansenula anomala, Pichia burtonii* und *Endomycopsis spec.* zeigten eine höhere Ethanoltoleranz. Sie konnten auf Brot noch mit einem Ethanolgehalt, bezogen auf die wässerige Phase bis 9 bis 10 Vol.-% wachsen, wurden aber bei Ethanolkonzentrationen von über 13 Vol.-% mehr oder weniger rasch inaktiviert. Ähnlich fanden *Hermann* et al. (10) bei *Saccharomyces cerevisiae* bei 10 Vol.-% Ethanol innerhalb von 4 bis 24 Stunden eine Koloniezahlreduktion um eine, bei 15 Vol.-% um zwei Zehnerpotenzen und erst bei 20 Vol.-% rasche Inaktivierung innerhalb von 4 Stunden.

Bei kurzzeitiger Exposition waren umgekehrt Pilzkonidien erheblich resistenter als Hefen (18). *Pichia burtonii* wurde im Suspensionsversuch innerhalb einer Stunde bereits durch 26,1 Vol.-%, *Hansenula anomala* durch 32,7 Vol.-% Ethanol inaktiviert. Demgegenüber wurden Konidien der drei Penicilliumarten *P. roquefortii, P. expansum* und *P. verruconi* innerhalb einer Stunde erst durch 50 Vol.-% Ethanol abgetötet. Bei 42 Vol.-% waren nach einstündiger Einwirkung noch keim- und wachstumsfähige Konidien nachweisbar. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte nur der geprüfte *Aspergillus niger*-Stamm eine ähnlich hohe Resistenz. Bei allen anderen untersuchten Pilzen wurden die Konidien bzw. Sporen durch 50 Vol.-% Ethanol bereits innerhalb von 15 bis 30 Minuten inaktiviert. Das gelegentliche Pilzwachstum in den Anreicherungskulturen nach 15 bis 60 Minuten langer Einwirkung von 50 Vol.-%igem Ethanol bei *Neosartorya fischeri* dürfte auf die Anwesenheit von Ascosporen zurückzuführen sein. Diese ausgeprägt hitzeresistenten Fruktifikationsorgane sind offenbar gleichzeitig auch stärker ethanolresistent. Auch bei Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* werden die Ascosporen durch 33 bzw. 30 Vol.-% Ethanol nicht inaktiviert (20, 21). Die Ascosporen von *Byssochlamys fulva* überdauern sogar eine 20 Minuten lange Einwirkung von 85%igem Ethanol (22).

Die Mechanismen der Ethanoltoleranz sowie der mikrobistatischen und mikrobiziden Wirkung des Ethanols sind bisher noch nicht ausreichend abgeklärt. Ein primärer Effekt des Ethanols ist neben der Verminderung der Wasseraktivität (a_w-Wert) (10) offenbar eine Änderung von Struktur und Funktion der Zellmembranen (5, 10, 23, 24, 27). *Ingram* (23) beobachtete bei *E.coli* bei Wachstum in Gegenwart von 4 Vol.-% Ethanol signifikante Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Zellmembranen. Die ungewöhnlich hohe Toleranz von *Saccharomyces sake* bei der Sakeherstellung gegenüber 20 bis 21% Ethanol ist nach *Hayashida* et al. (26) auf die Inkorporation von aus den Kojipilzmycelen stammenden ungesättigten Fettsäurekomplexen in die Hefezellmembranen zurückzuführen. Auch bei *Saccharomyces cerevisiae* war durch Zugabe von poly-ungesättigten Fettsäuren oder Steroiden eine deutlich höhere Ethanoltoleranz erreichbar (24, 25). Wahrscheinlich sind die Zellmembranen der luftexponierten Pilzkonidien austrocknungsresistenter und werden aus diesem Grunde bei kurzzeitiger Exposition nur durch relativ hohe Ethanolkonzentrationen inaktiviert. Nach Durchtritt des Ethanols durch die Barriere der Plasmamembranen wird dann die mehr oder weniger rasche Inaktivierung höchstwahrscheinlich durch Denaturierung der membrangebundenen und intrazellulären Enzyme verursacht (4, 5, 24, 25, 27).

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass vegetative Bakterien und Hefen durch 35 bis 40 Vol.-% Ethanol innerhalb einer Stunde und durch 50 Vol.-% bereits innerhalb von 5 bis 15 Minuten sicher inaktiviert werden. Längere Einwirkungszeiten von 50 Vol.-% Ethanol bis zu einer Stunde sind nur zur Inaktivierung der resistenteren Konidien einiger Schimmelpilzarten notwendig. Überdauern können diese Bedingungen lediglich die relativ selten vorkommenden hitzeresistenten Ascosporen einiger Pilzarten.

Ethanolwirkungen auf Sporen und Sporenbildner

Reife Sporen von Bacillus- und Clostridiumarten sind gegenüber Ethanol resistent und werden auch bei hohen Konzentrationen und langer Exposition nicht geschädigt (2, 3, 4, 28, 29). *Molin* (30) konnte zeigen, dass Bacillussporen nach über dreijähriger Lagerung in 95%igem Ethanol noch weitgehend keim- und vermehrungsfähig waren. Dagegen kann Ethanol bereits in niedrigeren Konzentrationen unterschiedliche Wirkungen auf Sporenkeimung und Wachstum der vegetativen Zellen haben: Aktivierung der Sporen einerseits, Hemmung der Sporenkeimung, Reduktion der Wachstumsrate der ausgewachsenen Zellen und Hemmung der Sporulation andererseits.

Sporenaktivierung durch Ethanol

Bei vielen Sporenbildnern ist vor der Keimung der Sporen zunächst eine Aktivierung notwendig, entweder durch kurze Erhitzung der Sporensuspensionen bei erhöhten, aber noch subletalen Temperaturen, wie z. B. 10 Minuten bei 60 °C, oder durch Einstellung niedrigerer oder höherer pH-Werte, Zusatz von reduzierenden oder anderen Stoffen wie Dimethylformamid- oder Dimethylsulfoxid u.a. (29). Die Aktivierung ist ebenso auch durch kurze, d. h. 5 Minuten lange Exposition bei höheren Ethanolkonzentrationen von über 20%, optimal von über 50 bis 60% möglich. Mit heissem absolutem Ethanol können die Sporen dagegen deaktiviert werden und sind danach sowohl durch Erhitzung als auch durch niedrigere Ethanolkonzentrationen wieder reaktivierbar. Als Ursache der Aktivierung wird insgesamt eine verbesserte und raschere Wasseraufnahme und Hydratation der Sporen angenommen (31, 32).

In den vorliegenden Untersuchungen lagen die Koloniezahlen nach den Ethanolvorbehandlungen und der 10 Minuten langen Hitzeaktivierung bei 60 °C sowohl bei den Bacillusreinkulturen (Abb. 1 bis 3) als auch bei den Gewürzen (Tabellen 3 und 4) ohne signifikante Abweichungen weitgehend in gleicher Grössenordnung. Nur bei einigen weniger mit Sporen belasteten Gewürzen mit Gesamtkoloniezahlen zwischen 10^4 und 10^5 KBE g^{-1} (Tabelle 4) lagen die Koloniezahlen nach Erhitzung bei 60 °C etwas höher als nach den Ethanolvorbehandlungen. Hier waren aber wie z. B. beim Schnittlauch- und Muskatpulver nach der Erhitzung neben Bacillusarten noch thermoresistentere vegetative Bakterien wie insbesondere Enterokokken nachweisbar und weitgehend für diese Unterschiede verantwortlich.

Milde Hitze- und Ethanolvorbehandlungen haben also insgesamt die gleiche aktivierende Wirkung auf die Sporen. Wie die Ergebnisse der Untersuchungen mit Kombination beider Vorbehandlungsverfahren gezeigt haben, wurde die Aktivierung dadurch weder synergistisch verstärkt noch abgeschwächt, gleich ob zuerst erhitzt und dann Ethanol angewandt wurde oder umgekehrt. Auch resultierte aus dieser relativ drastischen, doppelten Vorbehandlung keine Schädigung der Sporen. Bei *B. megaterium* waren die Sporenkoloniezahlen nach kombinierter Ethanolbehandlung und 10 Minuten Erhitzung bei 60 bis 80 °C innerhalb der Fehlergrenze des Koloniezählverfahrens weitgehend gleich (Abb. 3 unten). Dasselbe war bei *B. subtilis* nach Erhitzung bei 60 und 80 °C der Fall. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass die Ethanolvorbehandlung die Hitzeaktivierung voll ersetzt und damit eine zusätzliche Hitzebehandlung zur Sporenaktivierung unnötig macht.

Ethanolhemmung von Sporenkeimung, Vermehrung und Sporulation

Wenn die aktivierten Sporen dann auskeimen, kann die Keimung bereits durch 0,5 Vol.-% Ethanol verzögert und durch 1,4 Vol.-% und höhere Ethanolkonzentrationen vollständig gehemmt werden. Dabei ist die Hemmung reversibel. Die Keimung geht weiter, wenn das Ethanol noch im Keimstadium wieder entfernt wird (33–35). Es ist also bei Koloniezählungen wichtig, dass die Sporensuspensionen bzw. Lebensmittelhomogenisate nach der Ethanolexposition so weit verdünnt werden, dass der Restethanolgehalt im Kulturmedium weniger als 0,5 Vol.-% beträgt. Dies ist bei üblichen Koloniezählungen im Oberflächenverfahren mit Ausstrich von 0,1 ml pro Platte in der Regel der Fall. Nur bei sehr geringer Sporenbelastung von unter 10^2 bis 10^3 Sporen-KBE g^{-1} sind dann Membranfiltrationsverfahren, bei denen das Ethanol durch Nachspülung entfernt werden kann, anzuwenden.

Nach den Befunden von *Bohin* et al. (36) wird bei *B. subtilis* die Wachstumsrate der vegetativen Zellen ab etwa 1 Vol.-% Ethanol mit steigenden Konzentrationen zunehmend stärker reduziert und gleichzeitig die Sporulation weitgehend gehemmt. Dabei erfolgt die Sporulationshemmung bereits in einem sehr frühen Stadium noch vor der Septumbildung offenbar ebenfalls durch Einwirkungen auf die Zellmembranen. Die Hitzeresistenz der Sporen wird dagegen erst in späteren Stadien nach Zunahme des Calcium- und Dipicolinsäuregehaltes ausgebildet (29, 37). Es ist anzunehmen, bisher aber noch nicht genauer untersucht, dass ähnlich auch die Resistenz gegenüber höheren Ethanolkonzentrationen erst in diesen späteren Sporulationsstadien ausgebildet wird.

Ethanol- und Hitzeresistenz der Sporen

Beim Vergleich von Ethanol- und Hitzeeinwirkungen auf Sporen ist deren spezifische Hitzeresistenz zu berücksichtigen. Von *Briggs* (38) wurden bei Sporensuspensionen in Wasser für *B. subtilis* $D_{100\,°C}$-Werte von 11,3 min, für *B. cereus* von 5,5 min und für *B. megaterium* von 1,0 min bestimmt. *Murrel* und *Wardt* (39) ermittelten bei in P-Puffer suspendierten Sporen für *B. subtilis var. niger* und

B. megaterium ähnliche $D_{100\,°C}$-Werte von 1,7 bis 6,7 bzw. 2,3 min, während der Wert für *B. cereus* mit 14,2 min erheblich höher lag. Die Hitzeresistenz der Sporen kann bekanntlich von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich und auch von den Anzuchtbedingungen abhängig sein (29).

Von den hier untersuchten Stämmen waren ähnlich wie bei *Briggs* (38) die Sporen von *B. subtilis var. niger* am hitzeresistentesten, von *B. cereus* etwas weniger resistent und von *B. megaterium* deutlich hitzeempfindlicher. Dementsprechend lagen bei *B. subtilis* die Sporenzahlen nach Ethanol- und Hitzebehandlung weitgehend in gleicher Grössenordnung (Abb. 1). Bei *B. cereus* (Abb. 2) waren die Sporenzahlen nach 10 min Erhitzung bei 80 °C um etwa eine Zehnerpotenz, bei *B. megaterium* (Abb. 2) dagegen um fast drei Zehnerpotenzen niedriger als nach der Ethanolexposition. Dies war gleichermassen bei den stark versporten Suspensionen mit älteren, ausgereiften Sporen wie auch bei den geringer versporten Suspensionen mit jüngeren, teilweise auch etwas weniger hitzeresistenten Sporen der Fall. Der deutliche Anstieg des prozentualen Sporengehaltes in den mittel versporten Suspensionen von *B. subtilis* und *B. cereus* nach 6 Tagen Lagerung bei 4 °C im Vergleich zur Ausgangssuspension (Tabelle 2) ist wahrscheinlich auf eine «endotrophe» Sporulation im nährstoffarmen Medium zurückzuführen. Auch hierbei waren – unter Berücksichtigung der etwas geringen Hitzeresistenz der Sporen von *B. cereus* – insgesamt keine gravierenden Unterschiede zwischen den Sporenzahlen nach Ethanol- und Hitzebehandlung nachweisbar. Die Befunde von *Koransky* et al. (3) von deutlich höheren Sporenzahlen nach Ethanolvorbehandlung (50%, 1 h) im Vergleich zur Hitzebehandlung (80 °C, 15 min) waren also nicht zu bestätigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mit Sporen von Bacillusreinkulturen in unterschiedlichen Reife- und Altersstadien zeigen also insgesamt, dass beide Vorbehandlungsverfahren zur selektiven Sporenkoloniezahlbestimmung durchaus als gleichwertig zu bewerten sind, wenn man die spezifische Hitzeresistenz der betreffenden Sporen entsprechend berücksichtigt. Der erhebliche Vorteil der Ethanolvorbehandlung besteht darin, dass damit unabhängig von der spezifischen Hitzeresistenz alle vorhandenen keimfähigen Sporen erfasst werden können.

Bei den teilweise sehr unterschiedlich stark versporten Gewürzen und Kräuterpulvern waren, von wenigen Ausnahmen abgesehen, die Sporenzahlen nach Ethanolexposition und Hitzepasteurisation bis einschliesslich bei 80 °C weitgehend identisch und zeigten nur geringe Abweichungen. Das lässt darauf schliessen, dass in der natürlichen Flora stärker hitzeresistente Sporen wie bei *B. subtilis* dominieren. Nur bei den beiden Paprikaproben (Nr. 7 in Tabelle 3, Nr. 14 in Tabelle 4 und Abb. 4) lagen die Sporenzahlen nach 10 min Erhitzung bei 80 °C um etwa eine halbe Zehnerpotenz niedriger als nach der Ethanolvorbehandlung. Es war also ein höherer Anteil weniger hitzeresistenter Sporen vorhanden.

Bei weiterer Erhöhung der Pasteurisationstemperatur bis auf 100 °C, wie sie in der Praxis oft angewandt wird, nahmen die Koloniezahlen im Vergleich zur Ethanolvorbehandlung ganz erheblich, d. h. um 2 bis über 4 Zehnerpotenzen, ab. Damit werden also nur noch die wesentlich stärker hitzeresistenten Sporen erfasst.

Schliesslich ist noch darauf hinzuweisen, dass das Ethanolvorbehandlungsverfahren auch bei ungewöhnlich hoher Belastung der Produkte mit Schimmelpilzkonidien ohne Schwierigkeit durchführbar war. Bei der Schnittlauchprobe Nr. 21 mit über 10^6 Schimmelpilz-KBE ml^{-1} waren die wenigen vorhandenen Bacillussporen (Tabelle 5) nach Ethanolexposition eindeutig ohne jede Pilzkontamination erfassbar.

Sporenzahlbestimmung

Die sogenannte «Sporenzahl» wird bei Lebensmitteln und Gewürzen bisher ausschliesslich nach entsprechender Hitzepasteurisation der Produkte oder ihrer Homogenisate durch Koloniezählungen bestimmt. Zur Ermittlung der «aeroben bzw. anaeroben mesophilen Sporenzahl» werden Pasteurisationstemperaturen zwischen 70 und 80 °C oder von 100 °C angewandt. Zur Erfassung der weniger hitzeresistenten Clostridiumsporen, wie z. B. des Typs E von *Clostridium botulinum,* wird oft überhaupt nicht erhitzt oder nur sehr kurz bei 60 °C aktiviert. In der Regel werden die Pasteurisationsbedingungen wie Erhitzungsbehälter und Volumina, Aufheiz- und Abkühlungsbedingungen nicht genauer vorgeschrieben oder angegeben. Sie sind weitgehend der Entscheidung des Untersuchers überlassen. Das gilt ähnlich auch für die Erhitzungstemperaturen und -zeiten. Allein für Gewürze wurden in der Literatur zur Bestimmung der «aeroben mesophilen Sporenzahl» die in Tabelle 6 aufgeführten, 10 verschiedenen Pasteurisationsbedingungen angegeben. Dabei ist insbesondere die Angabe «bei 100 °C» oft nicht ausreichend eindeutig, wenn es z. B. heisst: «bis zum Kochen bringen», «Kochen», «im kochenden Wasser» oder ähnlich. Selten existieren exaktere Vorschriften, wie z. B. bei der Methode zur Bestimmung des «rope spore count» bei Cerealien, in der angegeben wird, dass nach Einbringen des Probegefässes in kochendes Wasser innerhalb von 5 Minuten eine Temperatur des Mediums von mindestens 94 ± 2 °C erreicht werden muss (55).

Bei Gewürzen, Kräuterpulvern, Trockengemüse und anderen Zusatzstoffen zu Lebensmitteln kann die Belastung mit höher hitzeresistenten Sporen einerseits und hitzeempfindlicheren Sporen andererseits je nach Provenienz, Verarbeitungs- und Mischungsbedingungen von Charge zu Charge ausserordentlich variieren.

Bei vielen Produkten können stärker hitzeresistente Sporen, wie z. B. von *Bacillus licheniformis, B. subtilis* und anderen Arten, dominieren (41, 42, 51, 56– 59, 61). In solchen Fällen sind bei Anwendung unterschiedlicher Pasteurisationstemperaturen und -zeiten im Bereich zwischen 70 und 80 °C keine gravierenden Unterschiede in den Sporenzahlen zu erwarten. Im Vergleich dazu werden aber Erhitzungen auf 100 °C stets um einige Zehnerpotenzen niedrigere Werte ergeben, wie auch die Beispiele in Tabelle 3 und 4 zeigen. Für alle Gewürze und anderen Zusatzstoffe, die Lebensmitteln und Speisen vor intensivem Durchkochen oder Hitzesterilisation zugesetzt werden, ist zweifellos nur die Zahl der hitzeresistenteren Sporen, die bei 95 bis 100 °C nicht inaktiviert werden, von hygienischem und technologischem Interesse. Voraussetzung zur Bestimmung gut reproduzier-

Tabelle 6. In der Literatur angegebene Pasteurisationstemperaturen und -zeiten zur Bestimmung der «aeroben Sporenzahl» bei Gewürzen

«aerobe Sporenzahl» Pasteurisations-			
temperatur °C	zeit min	Autoren	
70	10	*Julseth* und *Deibel* (1974)	(40)
70	10	*Baxter* und *Holzapfel* (1980)	(41)
75	5	*Sheneman* (1973)	(42)
80	5	*Ruschke* (1976)	(43)
80	5	*Michels* und *Visser* (1976)	(44)
80	10	*Schweiz. Lebensmittelbuch* (1969)	(45)
80	15	*Koransky* et al. (1978)	(3)
80	20	*Fanelli* et al. (1965)	(46)
80	20	*Tjaberg* et al. (1972)	(47)
80	30	*Guarino* und *Peppler* (1976)	(48)
80	30	*Thompsen* (1976)	(49)
80	30	*Weber* (1983)	(50)
100	3	*Coretti* (1955)	(51)
100	5	*Zehnder* (1979)	(52)
100	5	*Yesair* und *Williams* (1942)	(53)
100	5	*OICC/AIFC* (1977)	(54)
100	20	*AACC* (1969)	(55)

barer und vergleichbarer Sporenzahlen ist aber die konsequente Anwendung exakt formulierter und standardisierter Pasteurisationsverfahren.

Andererseits können bei Gewürzen und Gewürzmischungen aber ebenso häufig erheblich weniger hitzeresistente Sporen, wie z. B. von *Bacillus megaterium* und zahlreichen anderen Bacillus- und auch Clostridiumarten, vorherrschen (41, 56, 57, 59–62). Die genaue Kenntnis der gesamten Sporenbelastung, unabhängig von ihrer spezifischen Hitzeresistenz, also einschliesslich auch der hitzeempfindlichen Sporen, ist heute aber für alle Gewürze und Zusatzstoffe, die bei der Fertiggerichtherstellung und in der Grossverpflegung angewandt werden, aussserordentlich wichtig. Küchen- oder tischfertige Speisen werden häufig, wie z. B. bei Tiefgefrierprodukten, nur unvollständig gegart oder erst nach Erwärmung gewürzt bzw. «nachgewürzt». Bei pasteurisierten Fertiggerichten wird für Pasteurisation und Wiedererwärmung nach Kühllagerung zwar eine 10 Minuten lange Erhitzung auf eine Kerntemperatur von 80 °C gefordert (63), aber in der Praxis wahrscheinlich nicht immer konsequent durchgeführt. Auch bei der Zubereitung von Instantprodukten werden insgesamt nur sehr kurze Zeit höhere Temperaturen erreicht. Bei jedem längeren Stehenlassen aller solcher und ähnlicher Speisen können die vorhandenen und hitzeaktivierten Sporen rasch auskeimen, die ge-

keimten Zellen sich vermehren und dann die mikrobiologische Qualität und Haltbarkeit beeinträchtigen (64, 65). Zudem besteht auch die Gefahr der Vermehrung potentiell lebensmitteltoxigener Arten. *Frank* und *Beyer* (65) empfehlen daher, überall dort, wo in Grossküchen, Restaurants und Haushalt Speisen und Reste für den nächsten Tag aufgehoben werden, keine naturbelassenen, sondern nur noch entkeimte Gewürze zu verwenden.

Entkeimte Gewürze werden heute immer häufiger auch bei der industriellen Herstellung von kurz- bis mittelfristig haltbaren Lebensmitteln angewandt. Sie sind in der Regel nicht völlig frei von Bacillussporen. Der Sporengehalt ist aber stark reduziert. Dabei sollte die Sporenzahl 10^4 g^{-1} nicht überschreiten. Zur Beurteilung der Wirksamkeit der angewandten Entkeimungsverfahren (47, 50, 52, 61, 66) sind ebenfalls standardisierte Pasteurisations- und Kulturverfahren zur Sporenzahlbestimmung zu fordern. Wenn z. B. zur Wirksamkeitsprüfung der Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen zur Gewürzentkeimung einerseits 20 oder 30 Minuten bei 80 °C (47, 50), andererseits 5 Minuten bei 100 °C (52) pasteurisiert wird, so sind die danach bestimmten Sporenzahlen sicherlich nicht oder nur sehr bedingt vergleichbar.

Schlussfolgerungen

Der grosse Vorteil der Ethanolvorbehandlung zur selektiven Koloniezählung von Sporen im Vergleich zur bisher üblichen Hitzepasteurisation ist die Erfassung aller vorhandenen Sporen unabhängig von ihrer spezifischen Hitzeresistenz. Das Verfahren ist sehr einfach durchführbar und stellt keine besonderen Anforderungen an die exakte Einhaltung bestimmter Bedingungen. Es müssen lediglich aliquote Anteile von Produkthomogenisaten und 95 bis 99 Vol.-% Ethanol im Verhältnis 1:1 vermischt werden. Nach einer Stunde Standzeit kann dann nach dezimaler Verdünnung die übliche Koloniezählung durchgeführt werden. Ethanolendkonzentrationen zwischen 35 bis über 50 Vol.-% und Expositionszeiten zwischen 30 und 60 Minuten haben die gleiche Wirkung. Es kann vergälltes oder denaturiertes Ethanol verwendet werden. Die verschiedenen Denaturierungsmittel stören nicht. Das zu verwendende Ethanol kann vorsichtshalber durch Membranfiltration auf Anwesenheit von keim- und vermehrungsfähigen Sporen vorgeprüft werden. In der Regel ist das aber unnötig. *Gershenfeld* (67) fand bei über 100 Chargen von 95 Vol.-% und absolutem Ethanol keine Sporen. In eigenen Untersuchungen waren bei über 20 verschiedenen Ethanolproben in jeweils 500 ml ebenfalls keine Sporen nachweisbar. Nach weiteren eigenen Erfahrungen ist die Ethanolvorbehandlung ebenso gut auch zur selektiven Erfassung von Clostridiumsporen in Lebensmitteln geeignet. Der einzige Nachteil ist, dass bei sehr geringer Sporenbelastung von unter 10^2 bis 10^3 g^{-1} wegen der zu hohen Restethanolgehalte im Kulturmedium keine direkten Koloniezählungen im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren mehr möglich und dann Membranfiltrationsverfahren anzuwenden sind.

Zusammenfassung

Bei der Ethanolvorbehandlung für die selektive Koloniezählung von Bacillussporen werden aliquote Anteile von Produkthomogenisaten und 95 bis 99 Vol.-% Ethanol im Verhältnis 1:1 vermischt und 30 bis 60 Minuten stehen gelassen. Dadurch werden alle vegetativen Mikroorganismen einschliesslich Pilzkonidien inaktiviert, die Bakteriensporen dagegen aktiviert, aber nicht geschädigt.

Bei Anwendung steigender Ethanolkonzentrationen wurden Bakterien (4 Arten), Hefen (1 Art), Pilzsporen und -konidien (6 Arten) durch 20 Vol.-% Ethanol innerhalb einer Stunde nicht oder nur wenig geschädigt, durch 37,5 und 50 Vol.-% Ethanol jedoch innerhalb von 5 bis 60 Minuten vollständig inaktiviert.

Bei Suspensionen von *Bacillus subtilis, B. cereus* und *B. megaterium* mit unterschiedlichem Versporungsgrad und Alter der Sporen wurden nach 15 bis 60 Minuten Exposition mit 37,5 und 50 Vol.-% Ethanol sehr konstante Koloniezahlen erhalten. Im Vergleich dazu nahmen die Koloniezahlen nach jeweils 10 Minuten langer Erhitzung mit zunehmender Temperatur (60 bis 100 °C) je nach spezifischer Hitzeresistenz der Sporen mehr oder weniger stark ab. Dasselbe war bei 27 unterschiedlich stark versporten Gewürzen, Kräuter- und Trockengemüsepulvern der Fall.

Die Ethanolvorbehandlung ist sehr einfach und gut reproduzierbar durchzuführen. Sie hat gegenüber der bisher üblichen, nicht standardisierten Hitzepasteurisation zur Sporenzahlbestimmung den Vorteil, dass damit alle vorhandenen Sporen unabhängig von ihrer Hitzeresistenz erfassbar sind. Die bisherigen Befunde über die mikrobistatische und mikrobizide Wirkung von Ethanol werden kritisch besprochen.

Résumé

Dans un prétraitement à l'éthanol en vue du dénombrement selectif des colonies de spores Bacillus, on mélange en proportion 1:1 des parties aliquotes de produit homogénéisé et d'éthanol à 95–99 Vol.-%, puis laisse reposer le mélange 30 à 60 minutes. Ainsi, tous les microorganismes végétatifs y compris les conidies des moisissures sont inactivés, les spores bactériennes étant par contre activées, mais pas endommagées.

L'emploi d'éthanol à des concentrations croissantes a montré qu'à 20 Vol.-% d'éthanol des bactéries (4 sortes), levures (1 sorte), des spores et conidies de moisissures (6 sortes) ne sont pas inactivées, ou seulement partiellement, en l'espace d'une heure; par contre, à 37,5 et 50 Vol.-% d'éthanol elles sont complètement inactivées entre 5 et 60 minutes.

Pour les suspensions de *Bacillus subtilis, B. cereus* et *B. megaterium* à des degrés de sporulation et des âges différents des spores, le nombre de colonies est très constant après 15 à 60 minutes d'exposition à l'éthanol aux concentrations de 37,5 et 50 Vol.-%. En comparaison, le nombre de colonies, selon la résistance spécifique à la chaleur des spores, décroissait plus ou moins fortement après 10 minutes de pasteurisation à des températures croissant de 60 à 100 °C. Cette constatation fut la même pour 27 poudres d'épices, d'herbes et de légumes secs, contenant des nombres différents de spores.

Le prétraitement à l'éthanol est un procédé très simple et bien reproductible. Il a le grand avantage, par rapport à la pasteurisation non standardisée, de permettre de déceler toutes les spores présentes indépendamment de leur résistance à la chaleur. Les constatations faites jusqu'ici sur l'effet microbiostatique et microbicide de l'éthanol est l'objet d'une étude critique.

Summary

The ethanol pretreatment method is used for the selective counting of colonies from *Bacillus spores.* Aliquotes of the homogenised product are mixed with 95 to 99% (v/v) ethanol in equal amounts and allowed to stand für 30 to 60 minutes. Hereby all vegetative forms of microorganisms including fungal conidia are inactivated while bacterial spores are activated but not damaged.

Ethanol (20% v/v) caused no or only slight damage to 4 species of bacteria, 1 species of yeasts and 6 species of fungal spores and conidia within one hour. The same species, however, were completely inactivated within 5 to 60 minutes on treatment with 37.5 and 50% (v/v) ethanol.

Very constant colony counts were obtained from suspensions of *Bacillus subtilis, B. cereus* and *B. megaterium* with differing age of spores and degrees of sporulation, after 15 to 60 minutes contact with 37.5 and 50% (v/v) ethanol. In contrast, a varying decrease in the colony counts occurred after pasteurization for 10 minutes at temperatures between 60 and 100 °C depending on the specific heat-resistance of the spores. The same result was obtained with 27 spices, herbal and dried vegetable powders with different spore loads.

The ethanol pretreatment is a simple method with a good reproducibility. In comparison with the usual unstandardized heat pasteurisation for the determination of spore counts this method has the advantage that all the presently spores are detected independently of their heat resistance. The microstatic and microbicidal effects of ethanol are discussed critically.

Literatur

1. *Dowell, Jr., V. R.* and *Allen, St. D.:* Anaerobic bacterial infections. In: Balows, A. and Hausler, W. J. (eds.), Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections, 6th ed. Amer. Publ. Ass. Inc., New York 1981.
2. *Johnston, R., Harmon, S.* and *Kautter, D.:* Method to facilitate the isolation of *Clostridium botulinum* type E. J. Bacteriol. **88**, 1521–1522 (1964).
3. *Koransky, J. R., Allen, St. D.* and *Dowell Jr., V. R.:* Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **35**, 762–765 (1978).
4. *Morton, H. E.:* Alcohols. In: Block, S. S. (ed.), Disinfection, sterilization and preservation, 3rd ed. Lea and Febinger, Philadelphia 1983.
5. *Fried, V. A.* and *Novick, A.:* organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: Effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of Escherichia coli (K-12). J. Bacteriol. **114**, 239–249 (1973).
6. *Dagley, S., Dawes, E. A.* and *Morrison, G. A.:* Inhibition of growth of *Aerobacter aerogenes:* The mode of action of phenols, alcohols, acetons and ethylacetate. J. Bacteriol. **60**, 369–379 (1950).
7. *Heinmets, F., Taylor, W. W.* and *Lehmann, J. J.:* The use of metabolites in the restoration of the viability of heat and chemically inactivated *Escherichia coli.* J. Bacteriol. **67**, 5–12 (1954).
8. *Wigert, H., Schwotzer, H.* und *Feuerpfeil, I.:* Zur Resistenzentwicklung von Staphylokokken gegen Desinfektionsmittel. Z. ges. Hyg. **25**, 401–406 (1979).
9. *Feuerpfeil, I., Dobberkau, H.-J., Schwotzer, H.* und *Wigert, H.:* Zum Resistenzverhalten gram-negativer Bakterienstämme gegen Desinfektionsmittel. Z. ges. Hyg. **28**, 781–784 (1982).

10. *Herman, E. B., Haas, G. J., Crosby, U. H.* and *Conte, C. J.:* Antimicrobial action of short chain alcohols and glycols. J. Food Safety **2**, 131–139 (1980).
11. *Beckers, H. J.* and *van Erne, E. H. W.:* Survival of *Salmonella ssp., Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in «Advocaat». J. Food Prot. **46**, 98–99 (1983).
12. *Ihlow, F.* und *Neumann, K. H.:* Überleben Salmonellen und Colibakterien in Eierlikör? Alkohol-Industrie 100–101 (1962).
13. *Bulling, E.:* Überlebenszeit von Salmonella = Bakterien in Eierlikör. Arch. Lebensmittelhyg. **16**, 177–179 (1965).
14. *Kuschfeldt, D.* und *Thiel, D.:* Zur Frage der ausreichenden Vorbehandlung von Eiprodukten, insbesondere von Eigelb. Arch. Lebensmittelhyg. **27**, 134–135 (1976).
15. *Felsenfeld, O.:* Notes on food beverages and fomites contaminated with *Vibrio cholerae.* Bull. WHO **33**, 725–734 (1965).
16. *Morton, H. E.:* Relationship of concentration and germicidal efficiency of ethyl alcohol. Ann. N. Y. Acad. Sci. **53**, 191–196 (1950).
17. *Price, P. B.:* Reevaluation of ethyl alcohol as a germicide. Arch. Surg. **60**, 392–502 (1950).
18. *Geiges, O.* und *Kuchen, W.:* Konservieren von Brot mit Aethylalkohol. 2. Mitt.: Grundlagen zur Brotkonservierung mit Aethylalkohol. Getreide, Mehl und Brot **35**, 263–265 (1978).
19. *Geiges, O., Gundlach, J.* und *Kuchen, W.:* Konservierung von Brot mit Aethylalkohol. 3. Mitt.: Zur Technik der Brotkonservierung mit Alkohol. Getreide, Mehl und Brot **35**, 306–308 (1981).
20. *Zakharov, I. A.* and *Inge-Vechtomov, S. G.:* Ascospore isolation of yeast for genetic analysis without a micromanipulator. Issledovaniya po Genetike (English translation) **2**, 134–139 (1964).
21. *Leupold, U.:* Physiologisch-genetische Studien an adenin-abhängigen Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe.* Ein Beitrag zum Problem der Pseudoallelie. Schweiz. Z. Pathol. Bakter (Now Pathologia microbiologia) **20**, 535–544 (1957).
22. *Splittstösser, D. F., Kues, F. R.* and *Harrison, W.:* Enumeration of *Byssochlamys* and other heat-resistant molds. Appl. Microbiol. **20**, 393–397 (1970).
23. *Ingram, L. O.:* Adaptation of membrane lipids to alcohol. J. Bacteriol. **125**, 670–678 (1976).
24. *Thomas, D. S., Hossack, J. A.* and *Rose, A. H.:* Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae.* Arch. Microbiol. **117**, 239–245 (1978).
25. *Thomas, S. D.* and *Rose, A. H.:* Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch. Microbiol. **122**, 49–55 (1979).
26. *Hayashida, S., Da Feng, D.* and *Motoyoshi, M.:* Function of the high concentration of alcohol-producing factor. Agr. Biol. Chem. **38**, 2001–2006 (1974).
27. *Ingram, L. O.* and *Buttke, Th. M.:* Effects of alcohols on micro-organisms. In: Rose, A. H. and Tempest, D. W. (eds). Advances in microbial physiology, p. 253–300. Academic Press, New York 1984.
28. *Heuzenröder, M.* and *Johnson, K. P.:* Sterilization by chemical agents. Aust. J. Pharm. **40**, 944–948 (1958).
29. *Russel, A. D.:* The destruction of bacterial spores. Academic Press, London 1982.
30. *Molin, G.:* Dry heat sterilization by infrared radiation. A study on the resistance of bacterial spores. Dissertation University Stockholm, 1976.

31. *Holmes, P. K.* and *Levinson, H. S.:* Activation of *Bacillus megaterium* spores with aqueous ethyl alcohol; their deactivation and reactivation. Current Mod. Biol. **1**, 256–258 (1967).
32. *Hyatt, M. T.* and *Levinson, H. S.:* Water vapor, aqueous ethyl alcohol, and heat activation of *Bacillus megaterium* spore germination. J. Bacteriol. **95**, 2090–2101 (1968).
33. *Curran, H. R.* and *Knaysi, G.:* Survey of fourteen metabolic inhibitors for their effect on endospore germination in *Bacillus subtilis.* J. Bacteriol. **82**, 793–797 (1961).
34. *Trujillo, R.* and *Laible, N.:* Reversible inhibition of spore germination by alcohols. Appl. Microbiol. **20**, 620–623 (1970).
35. *Yasuda-Yasaki, Y., Namiki-Kanie, S.* and *Hachisuka, Y.:* Inhibition of germination of *Bacillus subtilis* spores by alcohols. In: Chamblis, G. and Vary, J. C. (eds), Spores VII. Am. Soc. Microbiol., Washington 1978.
36. *Bohin, J. P., Rigomier, D.* and *Schäffer, P.:* Ethanol sensitivity of sporulation in *Bacillus subtilis:* a new tool for the analysis of the sporulation process. J. Bacteriol. **127**, 932–940 (1976).
37. *Balassa, G., Milhaud, P., Raulet, E., Silva, M. T.* and *Sousa, J. C. F.:* A *Bacillus subtilis* mutant requiring dipicolinic acid for the development of heat resistent spores. J. Gen. Microbiol. **110**, 365–379 (1979).
38. *Briggs, A.:* The resistance of spores of the *genus Bacillus* to phenol, heat and radiation. J. appl. Bacteriol. **29**, 490–504 (1966).
39. *Murrel, W. G.* and *Warth, A. D.:* Composition and heat resistance of bacterial spores. In: Campbell, L. E. and Halvorson, H. O. (eds), Spores III. Am. Soc. Microbiol., Michigan 1965.
40. *Julseth, R. M.* and *Deibel, R. H.:* Microbial profile of selected spices and herbs at import. J. Milk Food Technol. **37**, 414–419 (1974).
41. *Baxter, R.* and *Holzapfel, W. H.:* A microbial investigation of selected spices, herbs and additives in South Africa. J. Food Sci. **47**, 570–578 (1980).
42. *Sheneman, J. N.:* Microbiology of dehydrated onion products. 1. Survey of aerobic mesophilic bacteria. J. Food Sci. **38**, 206–209 (1973).
43. *Ruschke, R.:* Probleme der produktionshygienischen Qualitätssicherung von Lebensmitteln – insbesondere pflanzlicher Herkunft. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, **162**, 409–448 (1976).
44. *Michels, M. J. M.* and *Visser, F. M. W.:* Occurrence and thermoresistance of spores of psychrophilic and psychrotrophic aerobic sporeformers in soil and foods. J. appl. Bacteriol. **41**, 1–11 (1976).
45. Schweizerisches Lebensmittelbuch, 2. Band, Kapitel 56, Mikrobiologie und Hygiene. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1969.
46. *Fanelli, M. J., Peterson, A. C.* and *Gunderson, M. F.:* Microbiology of dehydrated soups. I. A survey. Food Technol. **19**, 83–86 (1965).
47. *Tjaberg, T. B., Underdal, B.* and *Lunde, G.:* The effect of ionizing radiation on the microbiological content and volatile constituents of spices. J. appl. Bacteriol. **35**, 473–478 (1972).
48. *Guarino, P. A.* and *Peppler, H. J.:* Spices and condiments. In: Speck, M. L. (ed.), Compendium of methods of the microbiological examination of foods p. 568–573, Am. Publ. Health Assoc. Washington, D. C. 1976.
49. *Thompson, P. J.:* Mesophilic sporeforming aerobes. In: Speck, M. L. (ed.), Compendium of methods of the microbiological examination of foods, p. 235–247, Am. Public Health Assoc. Washington, D. C. 1976.
50. *Weber, H.:* Gewürzentkeimung. Einflüsse von Elektronen- und Gammastrahlen auf die Qualität verschiedener Gewürze. Fleischwirtschaft **63**, 1065–1071 (1983).

51. *Coretti, K.:* Der Keimgehalt von Gewürzen. Fleischwirtschaft **7**, 386–389 (1955).
52. *Zehnder, H. J.:* Zur Keimverminderung bei Gewürzen mit Hilfe ionisierender Strahlen. 1. Mitt. Qualitative Parameter bei schwarzem Pfeffer. Alimenta **18**, 43–48 (1979).
53. *Yesair, J.* and *Williams, O. B.:* Spice contamination and its control. Food Res. **7**, 118–126 (1942).
54. OICC/AIFC – Office International du Cacao et du Chocolat – Association International de Fabricant de Confiserie. 142, Avenue de Cortenbergh, B – 1040 Bruxelles. Analysen-Methoden-Blatt 101/B/D-1977.
55. AACC – Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 1821 University Avenue, St. Paul, Minnesota 55104. USA. Revised and reprinted October, 1969.
56. *Pruthi, J. S.:* Spices and condiments. Chemistry, microbiology, technology. Academic Press, New York 1980.
57. *Pivnik, H.:* Spices in microbial ecology of foods. Vol. II. Food commodities. Academic Press., New York 1980.
58. *Palumbo, S. A., Rivenburgh, A. I., Smith, J. L.* and *Kissinger, J. C.:* Identification of *Bacillus subtilis* from sausage products and spices. J. appl. Bact. **38**, 99–105 (1975).
59. *Rheinbaben, K. E. von* und *Hadlok, R. M.:* Produktgebundene Mikroflora verschiedener Fleischerzeugnisse. Fleischwirtschaft **64**, 1483–1486 (1984).
60. *Hadlok, R.* und *Toure, B.:* Mykologische und bakteriologische Untersuchung entkeimter Gewürze. Arch. Lebensmittelhyg. **24**, 20–24, (1973).
61. *Goto, A., Yamazaki, K.* and *Oka, M.:* Bacteriology of radiation sterilization of spices. Food Irradiation **6**, 35–42 (1971).
62. *Pohja, M. S.:* Vergleichende Untersuchungen über den Mikrobengehalt fester und flüssiger Gewürze. Fleischwirtschaft **9**, 547–548 (1957).
63. *Schmidt-Lorenz, W.:* Fertig-Gerichte – Mikrobiologische Aspekte. Dtsch. Lebensm. Rdsch. **71**, 13–19 (1975).
64. *Fanelli, M. J., Peterson, A. C.* and *Gunderson, M. F.:* Microbiology of dehydrated soups. III. Bacteriological examination of rehydrated dry soup mixes. Food Technol. **19**, 90–94 (1965).
65. *Frank, H. K.* und *Beyer, I.:* Einfluss von naturbelassenem und entkeimtem Pfeffer auf die Verderbsgeschwindigkeit verzehrsfertiger Suppen. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. **80**, 369– 374 (1984).
66. *Vajdi, M.* and *Pereira, R. R.:* Comparative effects of ethylene oxide, gamma irradiation and microwave treatments on selected spices. J. Food. Sci. **38**, 893–895 (1973).
67. *Gershenfeld, L.:* The sterility of alcohol. Am. J. Med. Sci. **195**, 358–361 (1938).

Prof. Dr. W. Schmidt-Lorenz
Franziska Hotz
Laboratorium für Lebensmittelmikrobiologie
Institut für Lebensmittelwissenschaft
ETH-Zentrum
CH-8052 Zürich