

3 Wachstum der Mikroorganismen

Mikroorganismen können nur unter bestimmten Umweltbedingungen leben. Sie haben jedoch nur geringe Nährstoffansprüche. Die Mikroben zeichnen sich durch ihre Anpassungsfähigkeit ihres Stoffwechsels an Veränderungen der Umweltbedingungen aus. Die Nährstoffansprüche richten sich je nach der Mikroorganismengruppe und dem Entwicklungsstadium der Mikroben.

Aufgrund der verschiedenartigen Energiegewinnung und der Nutzung unterschiedlicher Kohlenstoffquellen lassen sich 2 Gruppen unterscheiden:

Autotrophe Mikroorganismen:

Sie sind im allgemeinen nicht in der Lage organische Substanzen zu verwerten. Einfache anorganische Stoffe dienen zum Aufbau ihrer Zellwandbestandteile und als C-Quelle nutzen sie Kohlendioxid.

- **Photoautotrophe M.** nutzen die Lichtenergie mit Hilfe von Assimilationsfarbstoffen
- **Chemoautotrophe M.** nutzen die Energie durch Oxidation anorganischer Substanzen

Heterotrophe Mikroorganismen:

Sie verwerten als C-Quelle nicht nur CO₂ sondern benötigen auch noch eine andere C-Quelle. Zur Entwicklung brauchen sie zusätzlich mineralische Stoffe und andere komplexe organische Verbindungen (Proteine...). Die lebensnotwendige Energie gewinnen die heterotrophen Mikroorganismen ausschließlich aus organischen Substanzen, insbesondere durch Oxidation von Kohlenhydraten oder anderen energiereichen organischen Verbindungen. Für die Lebensmittelindustrie haben besonders die heterotrophen Mikroorganismen erhebliche Bedeutung.

- Saprophyten, Nahrung von toten Substanzen
- Parasiten, Nährstoffe von lebenden Geweben

3.1 Nährstoffbedarf

Die Nährstoffe werden für die Synthese von Zellsubstanzen und zur Energiegewinnung für synthetische Prozesse sowie zur Struktur- und Funktionserhaltung benötigt. Der Umsatz der Substanzen erfolgt über den Stoffwechsel. Die im wesentlichen benötigten Nährstoffe sind Wasser, Kohlenstoff, Stickstoff, Mineralien, Spurenelemente und Wachstumsfaktoren (Supplimente).

Wasser:

Der **Wassergehalt** eines Mikroorganismus beträgt 70-98 %. Er ist damit der Hauptbestandteil der lebenden Zelle. Wasser ist an fast allen Prozessen der Stoffaufnahme beteiligt. Bei einigen Mikroorganismen wird Wasser direkt über die Photosynthese zur Energiegewinnung benötigt. Die lebenserhaltende Funktion des Wassers nutzt man in umgekehrter Richtung zur Konservierung von Lebensmitteln. Durch den Wasserentzug wird Wachstum und der Stoffwechsel der Mikroorganismen verhindert.

Kohlenstoff:

Der Bedarf an **Kohlenstoff** richtet sich danach, ob es sich um heterotrophe oder autotrophe Mikroorganismen handelt und nach der Art des Mikroorganismus selbst. Während Hefen z.B.

Glucose als Kohlenstoffquelle genügt, benötigen andere Mikroorganismen, wie z.B. *Propionibacterium spp.* komplizierte organische Verbindungen.

Vor der Nutzung eines Mikroorganismus muß daher dessen Kohlenstoffbedarf geklärt werden, um optimale Wachstumsbedingungen schaffen zu können. Bezüglich des Substratangebotes unterscheidet man einfache Substrate, komplexe Substrate und Mischsubstrate.

Im allgemeinen wachsen Bakterien bevorzugt auf eiweißreichen Medien und Fungi bevorzugt auf zuckerhaltigen Medien.

Stickstoff:

Die Nutzungsmöglichkeiten von **Stickstoff** sind bei den Mikroorganismen recht unterschiedlich. Während die Mehrzahl der Mikroorganismen organische oder anorganische Stickstoffverbindungen benötigen, gibt es auch Bakterien, die in der Lage sind, Luftstickstoff zu verwerten. Das sind Bodenbakterien der Gattung **Rhizobium** in Symbiose mit Leguminosen und Bodenbakterien der Gattung **Acetobacter**.

Bei den Mikroorganismen, die den Luftstickstoff nicht zu nutzen im Stande sind, muß die Stickstoffquelle über das Nährmedium zugeführt werden. Im allgemeinen dient als Stickstoffquelle NH_4^+ , das durch Aminierung der Ketosäuren in Asparagin- und Glutaminsäure überführt wird. Aber auch andere Substanzen, wie Ammoniak, Harnstoff, Fette, Phenole können von manchen Mikroorganismen verwertet werden. Die Fähigkeit, Harnstoff zu verwerten, wird teilweise als Differenzierungskriterium von Mikroorganismen mit herangezogen.

Einige Aminosäuren können nicht von allen Mikroorganismen synthetisiert werden. Sie müssen über das Nährmedium zugeführt werden.

Im allgemeinen stellen gramnegative Bakterien geringere Ansprüche an die Stickstoffquelle als grampositive. Alle autotrophen Bakterien sind gramnegativ.

Mineralstoffe:

Jede Zelle benötigt zum Wachstum **Mineralstoffe**. Der Bedarf ist jedoch bei den einzelnen Mikroorganismen unterschiedlich. Eine zentrale Bedeutung hat bei allen Mikroorganismen der **Phosphor**. Er ist Bestandteil der Nucleinsäuren, wirkt bei der Energieübertragung z.B. in Form von Adenosintriphosphat (ATP) mit, ist am Aufbau der Zellmembran in Form von Phospholipiden beteiligt und ist Bestandteil bei einigen Enzymen.

Schwefel wird für die Proteinsynthese benötigt. Des weiteren ist Schwefel Bestandteil der prosthetischen Gruppen einiger Enzyme und des Coenzym A. Bei den meisten Mikroorganismen wird der Phosphor und der Schwefel aus organischen Verbindungen gewonnen.

Die meisten Mikroorganismen benötigen weiterhin **Kalium, Calcium, Magnesium** und **Natrium** essentiell. Calcium wird z.B. zur Sporenbildung benötigt. **Kalium** ist bei nahezu allen Zellen an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt. Darüber hinaus hat Kalium stoffwechselregulatorische Aufgaben. **Magnesium** ist für die Aktivierung von Enzymen und für die Stabilisierung von Nucleinsäuren und Ribosomen erforderlich.

Neben den in vergleichsweise großen Mengen vorkommenden Elementen, sind auch zahlreiche Elemente für die Zelle von essentieller Bedeutung, die aber nur in sehr kleinen Mengen als Spurenelemente vorkommen. Als wichtigste sind zu nennen: **Cobalt, Mangan,**

Kupfer, Zink, Molybdän, Chrom, Nickel, Vanadium, Bor, Selen, Silicium, Wolfram, Chlor, Jod. Sie sind Bestandteil im Enzymsystem der Zelle.

Wachstumsfaktoren:

Wachstumsfaktoren werden auch als **Supplie** bezeichnet. Es sind spezielle organische Verbindungen, die für die Entwicklung der Zelle essentiell sind, da sie nicht synthetisiert werden können.

Man unterscheidet drei Stoffgruppen: Vitamine, Aminosäuren und Pyrimidine bzw. Purine:

Viele **Vitamine** sind unerläßliche Wachstumsfaktoren für die Mikroorganismenzelle. Jedoch gibt es vitaminheterotrophe und vitaminautotrophe Mikroorganismen, so daß im einzelnen zu prüfen ist, ob und in welcher Art Vitamine zugeführt werden müssen. Häufig ist festzustellen, daß bei Anwesenheit von bestimmten Vitaminen im Medium ein deutlich verbessertes Wachstum zu verzeichnen ist. Die mikrobiologisch wichtigsten Vitamine sind Thiamin (Vitamin B₁), Riboflavin (Vitamin B₂), Pyridoxin (Vitamin B₆), Biotin (Vitamin H), Pantothensäure, Folsäure und Cobalamin (Vitamin B₁₂). In der Tabelle sind einige Vitamine und ihre Funktionen im Mikroorganismus zusammengestellt.

Ausgewählte Vitamine und ihre Funktionen in der Zelle

Vitamin	Funktion in der Zelle
Thiamin (Vitamin B ₁)	als Coenzym Bestandteil von Decarboxylasen, Transferasen u.a. Enzyme;
Riboflavin (Vitamin B ₂)	Bestandteil der Flavincoenzyme, die für die Wasserstoffübertragung benötigt werden; essentiell für fast alle Lactobacillus spp.
Pyridoxin (Vitamin B ₆)	Vorstufe des Pyridoxalphosphats, das als Coenzym für Transaminasen u.a. wichtig ist
Biotin (Vitamin H)	beteiligt an zahlreichen Stoffwechselprozessen; z.B. bei Desaminisierung, Carboxylierung, Decarboxylierung, Glucoseoxidation
Nicotinsäureamid	Bestandteil des Coenzym NAD und NADP, die zur Wasserstoffübertragung benötigt werden

Aminosäuren als Bestandteile der Proteine, können nur teilweise von der Zelle synthetisiert werden. Einige essentielle Aminosäuren müssen deshalb über das Nährmedium zugeführt werden.

Pyrimidine (Uracil, Thymin und Cytosin) und **Purine** (Adenin und Guanin) werden in der Zelle zur Synthese der Nucleinsäuren benötigt.

3.2 Vermehrung der Bakterien

Die Bakterien vermehren sich ungeschlechtlich durch Querteilung. Die bei der geschlechtlichen Vermehrung ablaufenden Vorgänge (Mitose, Meiose) fehlen.

Ablauf der Querteilung:

Die Bakterienzelle teilt sich durch Einbau einer Querwand (Septum). Die Zellmembran und später die Zellwand wachsen nach innen. Zuerst beginnt die Zelle ihr Streckenwachstum und dabei erfolgt auch die Teilung des Zellkernes. Das ringförmig geschlossene Bakterienchromosom verdoppelt sich, so daß jede Tochterzelle ihr eigenes Chromosom erhält. Nach dieser Verdopplung der DNA (Replikation) erfolgt die eigentliche Teilung der Bakterienzelle.

Stets teilt sich eine ausgewachsene Zelle in zwei junge Tochterzellen. Zahlenmäßig betrachtet ergibt sich folgende geometrische Reihe: Aus einer Bakterienzelle werden zwei, aus zwei werden vier, aus vier acht usw.. Schreibt man dies als Hochzahl/Exponent von Zwei (es findet ja jedesmal eine Zweiteilung der Zelle, oder Verdoppelung der Zellzahl statt), so ergibt sich folgende Vermehrungsrate.

Vermehrung durch Zweiteilung

Schritt	Bakterienzahl	Exponent von 2
Beginn	1	2^0
1. Teilung	2	2^1
2. Teilung	4	2^2 (2 x 2)
3. Teilung	8	2^3 (2 x 2 x 2)
4. Teilung	16	2^4
n-te-Teilung	-	2^n

Diese Art der Vermehrung bezeichnet man als exponentiell, oder logarithmisch. Das hervorstechendste Merkmal der exponentiellen Vermehrung ist, daß sich die Bakterienzahl pro Teilungsschritt verdoppelt, sie wächst "explosionsartig" an.

3.3 Physiologie des mikrobiellen Wachstums

Beimpft man eine Kultur in einen Kulturenzuchtbehälter und bebrütet, so stellt man fest, dass die Mikroorganismen sich nicht sofort exponentiell vermehren. Sie gehen erst nach einer Anlaufphase (lag-Phase) dazu über, sich mit maximaler Geschwindigkeit zu vermehren. Diese Phase wird exponentielle, Wachstums- oder log-Phase genannt. Rechnerisch müßte die Mikroorganismen-Zahl unendlich groß werden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Nach gewisser Zeit gehen die Mikroorganismen in eine stationäre, oder Ruhephase über. Wird die Bebrütung fortgesetzt, so sinkt die Zahl der Mikroorganismen ab. Die Kultur befindet sich in der Absterbe-Phase. Die Dauer der "Phasen" hängt von der Art der Mikroorganismen und der Qualität der Umweltbedingungen ab.

Folgende Abbildung zeigt die Wachstumskurve, die bei Übertragung der Keimzahlen in ein Koordinatensystem entsteht.

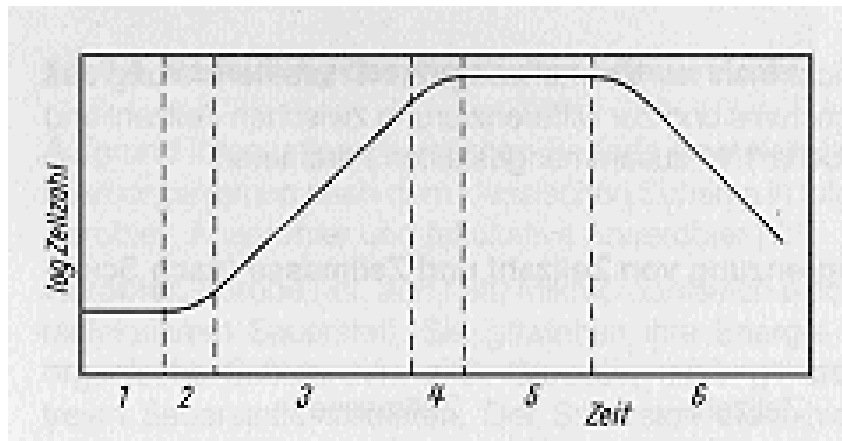


Abb.: Wachstumskurve einer diskontinuierlichen Bakterienkultur

- (1) Latenzphase (2) Beschleunigungsphase (3) exponentielle Phase
(4) Verzögerungsphase (5) stationäre Phase (6) Absterbephase

Latenzphase (Anlaufphase):

In der Anlaufphase bleibt die Mikroorganismenzahl gleich. Augenscheinlich vermehren sich die Mikroorganismen nicht. In dieser Zeit "stellen" sich die Mikroorganismen auf das „neue“ Medium und die Umweltbedingungen "ein". So bilden sie zunächst Enzyme, um die Nährstoffe aufzuspalten und verarbeiten zu können. Kommen die Mikroorganismen aus einer Umgebung, die sich sehr stark von der vorgefundenen unterscheidet, wird die Anlaufphase länger dauern. Gleiches gilt für (nicht tödlich) geschädigte Mikroorganismen (= subletal geschädigte Mikroorganismen) oder Mikroorganismen, die aus der stationären oder Absterbephase stammen. Nicht optimale Wachstumsbedingungen verlängern die Anlaufphase ebenfalls. Bei Kultur-Keimen ist eine kurze Anlaufphase gewünscht. Durch rasches Anwachsen wird die Kultur schädliche Mikroorganismen unterdrücken.

Exponentielle Phase:

Die Kultur vermehrt sich explosionsartig. Die Mikroorganismen-Dichte wird immer höher. Verbunden mit dem rasanten Anstieg der Mikroorganismen-Zahl ist eine zunehmend raschere Abnahme der Nährstoffe, sowie eine exponentiell steigende Konzentration an Stoffwechsel-Schlacken. Übertragen auf die Joghurtproduktion hieße dies: In der späten exponentiellen Phase wird am meisten Laktose verbraucht und am meisten Milchsäure ausgeschieden. Für die Produktion ist dies die nützlichste Phase mit der raschesten pH-Senkung. Wie angedeutet geht die exponentielle Phase in die stationäre Phase über. Bleiben wir bei Joghurt als Beispiel: Schließlich ist es die von den Joghurtbakterien selbst ausgeschiedene Milchsäure, die deren Wachstumsgeschwindigkeit immer mehr verlangsamt. Auch die immer geringere Konzentration an Nährstoffen verringert die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen. Ein weiterer bremsender Faktor kann die gegenseitige Beeinflussung der Mikroorganismen, bedingt durch die extreme Zelldichte, sein. Trägt man die Mikroorganismen-Zahl wie in der Abbildung logarithmisch über der Zeit auf, so ist die exponentielle Phase eine Gerade. Die Steilheit der Geraden (Wachstumsrate) ist ein charakteristisches Merkmal der jeweiligen Mikroorganismen-Art. Sie wird vom Erbmateriale und den Umweltfaktoren bestimmt. In dieser Phase ist die Beeinflussung von außen am größten.

Verzögerungsphase:

Durch z. B. Substratverarmung oder Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte, ist die exponentielle Phase zeitlich begrenzt. Die Vermehrungsgeschwindigkeit der Mikroorganismen nimmt ab.

Stationäre Phase:

In dieser Phase bleibt die Keimzahl gleich groß. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist null. Der Zuwachs an Mikroorganismen hält sich mit der Zahl der absterbenden Mikroorganismen die Waage. Die Mikroorganismen betreiben jedoch noch Stoffwechsel, zum Beispiel nutzen sie Speicherstoffe.

Absterbephase:

Die Mikroorganismen ertragen keine hohe Konzentrationen der eigenen Stoffwechselprodukte. Bei langdauerndem Kontakt sterben sie ab. Danach können sich die Zellen durch eigene Enzyme auflösen (Autolyse).

Die **Generationszeit** ist ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Zucht von Bakterien. Sie ist die Zeit, die für einen Teilungsschritt benötigt wird. Bei optimalen Bedingungen können viele Bakterienarten sich innerhalb von weniger als 20 Minuten verdoppeln. Diese Art der Vermehrung bezeichnet man als exponentiell oder logarithmisch. Kennt man die Generationszeit, kann man leicht errechnen, wieviel Bakterien nach einer bestimmten Zeit gebildet wurden.

Die Generationszeit (g) läßt sich mit der Formel $g = t / n$ errechnen.

t = Vermehrungszeit

n = Anzahl der Generationen

N = Gesamtkeimzahl

N_0 = Ausgangskeimzahl

Man kann die Anzahl der Generationen (n) errechnen, wenn man N und N_0 kennt

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

z. B.: Wie groß wird die Bakterienzahl, wenn ausgehend von einer Zelle zwanzig Teilungsschritte ablaufen?

$n=20$ (Teilungen) $\rightarrow 2^n = 2^{20}$ oder 1048576 Bakterien.

Wird nicht von einer Zelle ausgegangen so muß folgende Formel benutzt werden:

N (Gesamtzahl) = N_0 (Ausgangszahl) $\times 2^n$

Generell kann man die Kultivierung von Mikroorganismen in 3 verschiedene Fermentationsverfahren gliedern:

- Batch-Fermentation
- Fedbatch-Fermentation
- Kontinuierliche Fermentation

Bei **Batch-Fermentationen** werden alle benötigten Nährstoffe zu Beginn zugesetzt, und man erhält das Produkt nach Beendigung der Wachstumsphase. Diese Verfahren sind einfach, bieten aber kaum Möglichkeiten in das Wachstum der Kultur einzugreifen und hohe Zelldichten zu erreichen. Batch-Systeme dienen häufig nur zur Ermittlung von kinetischen Parameter, welche als Grundlage für nachfolgende Fedbatch-Verfahren notwendig sind.

Fedbatch-Verfahren bieten im Vergleich zu batch- und kontinuierlichen Verfahren viele Vorteile und werden deshalb häufig verwendet.

Diese Verfahren sind für das Erreichen von hohen Zelldichten das am besten geeignete Fermentationsverfahren, jedoch abhängig von den physiologischen Eigenschaften des verwendeten Mikroorganismus und der Reaktorgeometrie. Da das Wachstum von manchen Mikroorganismen durch zu hohe Konzentrationen einiger Medienbestandteile inhibiert werden, können diese nicht gleich zu Anfang der Fermentation in den notwendigen, hohen Konzentrationen, die für das Erreichen einer hohen Biomassekonzentration notwendig sind, vorgelegt werden. Diese Substrate werden zu Beginn nur in geringer Menge zugegeben und dann erst „zugefüttert“.

Wachstum in kontinuierlicher Kultur:

Mikroorganismen sind in der Regel in der exponentiellen Phase am leistungsfähigsten. In einer kontinuierlichen Kultur züchtet und nutzt man die Mikroorganismen in der produktivsten Phase.

Das Prinzip der kontinuierlichen Kultur beruht darauf, daß fortlaufend (kontinuierlich) frische Nährlösung zugeführt wird, so daß ein Mangel an Nährstoffen vermieden wird. Gleichfalls werden dauernd Stoffwechselschlacken und Mikroorganismen entfernt, so daß hierdurch nicht die Wachstumsgeschwindigkeit beeinträchtigt wird. In einer kontinuierlichen Kultivierung können durch Mikroorganismen rasch große Mengen Arzneimittel, Alkohole, Säuren u.a. erzeugt werden. Anlagen zur kontinuierlichen Zucht von Mikroorganismen bezeichnet man als Fermenter. Auch das biologische Becken von Kläranlagen stellt eine kontinuierliche Kultur dar.

3.4 Kulturbedingungen der Mikroorganismen

Das Wachstum und die Entwicklung der Mikroorganismen sind nicht nur von einer ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen abhängig, sondern auch von den Umweltfaktoren:

3.4.1 a_w -Wert

Mikroorganismen benötigen für alle Stoffwechselaktivitäten Wasser. Der Entzug von Wasser führt deshalb zu einem langsameren Wachstum. Bei Abwesenheit von Wasser ruht der Stoffwechsel. Empfindliche Mikroorganismen werden unter diesen Bedingungen abgetötet. Wasser wird von zahlreichen Inhaltsstoffen der Lebensmittel wie Salz, Zucker und Proteine gebunden. Dieses gebundene Wasser steht den Mikroorganismen für ihre Vermehrung nicht mehr zur Verfügung. Proportional zum Anstieg der Konzentration an wasserbindenden Substanzen sinkt der Wasserdampfdruck über dem Lebensmittel. Der Wasserdampfdruck steht damit in direkter Beziehung zur Wassermenge, die den Mikroorganismen tatsächlich zur Verfügung steht. Als Maß für dieses verfügbare Wasser ist der Begriff **Wasseraktivität** oder a_w -Wert ("activity of water") eingeführt worden. Der a_w -Wert wird definiert als das Verhältnis des Wasserdampfdrucks über dem Lebensmittel (p) zum Wasserdampfdruck des reinen Wassers (p_0) bei gleicher Temperatur:

$$a_w = p / p_0$$

Reines Wasser ($p = p_0$) hat damit einen a_w -Wert von 1,0. Jeder Zusatz einer wasserbindenden Substanz bewirkt, daß $p < p_0$ und damit der a_w -Wert < 1 wird. Die Absenkung des a_w -Wertes in einem Lebensmittel ist durch Wasserentzug (Trocknen, Räuchern), Tiefgefrieren oder durch den Zusatz wasserbindender Substanzen möglich. Bezogen auf einen Zusatz von 1 % wird z.B. in Fleischwaren der a_w -Wert durch Fett um 0,00062, durch Milcheiweiß um 0,0013, durch Lactose um 0,0022 und durch NaCl um 0,0062 erniedrigt.

Der optimale a_w -Wert der meisten Mikroorganismen liegt bei $a_w > 0,98$. Bei Absenkung des a_w -Wertes werden die Mikroorganismen immer stärker in ihrem Wachstum gehemmt. Besonders empfindliche Bakterien wie die *Pseudomonaden* und *Acinetobacter* finden sich deshalb vorwiegend auf wasserreichen Lebensmitteln wie Fleisch, Fisch oder Eiern. Die Widerstandsfähigkeit gegen a_w -Wert-Absenkungen ist in der Regel bei Schimmelpilzen am größten, geringer bei Hefen und grampositiven Bakterien und am geringsten bei gramnegativen Bakterien. Besonders adaptierte Mikroorganismen, die noch sehr niedrige a_w -Werte tolerieren können, werden als **xerotolerant** (griech. *xeros* = trocken), **osmotolerant** oder als Hinweis auf die gleichzeitige Salztoleranz als **halotolerant** (griech. *hal* = Salz) bezeichnet.

Bestimmte Mikroorganismen wie die Halobakterien oder zahlreiche Hefen, haben sich an niedrige a_w -Werte so adaptiert, daß sie ein obligates Bedürfnis an eine hohe Salz- bzw. Zuckerkonzentration besitzen. Die Aeroben zu den Archaeobakterien zählenden Vertreter der Gattung *Halococcus* und *Halobacterium* brauchen z.B. mindestens 12 % Natriumchlorid zum Wachstum. Diese Organismen, die auf Nährböden mit üblicher Salz- oder Zuckerkonzentration nicht mehr zu wachsen vermögen, werden als **halophil**, **osmophil** oder **xerophil** bezeichnet. Die Fähigkeit, noch bei hohen Salz- oder Zuckerkonzentrationen zu überleben und zu wachsen, beruht bei vielen osmophilen Hefen und Pilzen offenbar auf der intrazellulären Akkumulierung von osmotisch aktiven Substanzen (Polyole, bestimmte Aminosäuren, K^+ -Ionen), die Wasser in der Zelle binden und die Enzyme schützen.

Der minimale zum Wachstum bzw. zur Toxinbildung notwendige a_w -Wert wird wesentlich von Milieufaktoren wie dem pH-Wert beeinflusst. Während z.B. der minimale a_w -Wert für *Clostridium botulinum* Typ B im Neutralbereich bei $a_w = 0,95$ liegt, steigt er bei pH 5,5 auf 0,98 und bei pH 5,0 auf 0,997 an. Ein anderes Beispiel ist der Einfluß der Temperatur und des Sauerstoffpartialdrucks. *Staphylococcus aureus* bildet z.B. Enterotoxin A unter aeroben Bedingungen bei 37° C bis zu einem minimalen a_w -Wert von 0,84. Unter anaeroben Bedingungen beträgt der entsprechende a_w -Wert bei 37° C 0,90. Wird die Temperatur auf 20° C abgesenkt, steigt der minimale a_w -Wert unter aeroben Bedingungen auf 0,88, unter anaeroben Bedingungen auf 0,91.

Wegen der zum mikrobiellen Wachstum erforderlichen minimalen a_w -Werte müssen Lebensmittel mit einem a_w -Wert $> 0,95$ als **leicht verderblich** gelten. Dazu gehört neben den flüssigen Lebensmitteln z.B. frisches Fleisch, Eier und Fisch (a_w 0,99), gegarte Pökelfleisch (0,98 bis 0,96) und viele Koch- und Brühwürste (0,98 bis 0,93). **Mittelgradig verderblich** sind Lebensmittel mit einem a_w -Wert $< 0,95$ aber $> 0,91$, auf denen sich die meisten bakteriellen Verderbniserreger und Lebensmittelvergifter nicht mehr vermehren können. Wachsen können aber noch resistenter Mikroorganismen wie die Mikrokokken, Staphylokokken, Hefen und Schimmelpilze. Zu diesen Lebensmitteln gehören z.B. bestimmte Rohwürste (Cervelatwurst 0,93) und gepökelte Rohware wie Lachsschinken (0,93). **Kaum verderblich** sind Lebensmittel mit einem a_w -Wert unter 0,90. Dazu gehören z.B. getrocknete Rohwürste wie Salami (a_w 0,84 bis 0,85), gereifter Hartkäse (0,92 bis 0,80), hartgesalzene Fische (0,80 bis 0,70), Fruchtsaftkonzentrate (0,94 bis 0,73), Konfitüren und Marmeladen, Mehl, Reis, Hülsenfrüchte, Marzipan, Trockenfleisch, Trockenobst und andere getrocknete Produkte wie Trockenmilch, Eipulver und Kartoffelchips. Als grobe Richtlinie gilt, daß Produkte mit einem a_w -Wert $> 0,95$ nur wenige Tage, mit einem a_w -Wert unter 0,85 ein bis zwei Wochen, unter 0,75 ein bis zwei Monate, unter 0,65 ein bis zwei Jahre und unter 0,60 unbegrenzt mikrobiologisch lagerfähig sind.

Minimale a_w -Werte für das Wachstum von Mikroorganismen

Minimaler a_w -Wert	Organismengruppe	Beispiele	
		Organismen (Gattung bzw. Spezies)	minimaler a_w -Wert
0,97-0,96	Gramnegative Stäbchenbakterien	<i>Pseudomonas</i>	0,97
		<i>Acinetobacter, E.coli,</i> <i>Klebsiella, Shigella,</i> <i>C.botulinum</i> Typ E	0,96
0,95-0,91	Die meisten Bakterien	<i>Salmonella</i> u.a. Entero- bacteriaceae	0,95
		<i>Bacillus, Clostridium,</i> <i>Microbacterium</i> <i>Lactobacillus, Streptococcus,</i> <i>Pediococcus</i>	0,94
0,94-0,87	Hefen	<i>Candida utilis</i>	0,94
		Die meisten Verderbniserreger <i>Debaryomyces</i>	0,88 0,87
0,90-0,86	Grampositive Kokken	<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,90 0,86
0,93-0,80	Schimmelpilze	<i>Rhizopus nigricans</i>	0,93
		<i>Penicillium expansum</i>	0,83
		<i>P. patulum</i> Die meisten Verderbniserreger	0,80 0,80
0,80-0,75 (0,60)	Halophile Bakterien	<i>Halobacterium halobium</i>	0,75
0,65-0,60	Osmotolerante (-phile) Hefen	<i>Saccharomyces rouxii</i>	0,62
0,78-0,60	Xerotolerante (-phile) Schimmelpilze	<i>Aspergillus flavus</i>	0,78
		<i>A. ochraceus</i>	0,77
		<i>A. glaucus</i>	0,70
		<i>Chrysosporium fastidium</i>	0,69
		<i>Xeromyces bisporus</i>	0,60

3.4.2 Temperatur

Jede Mikroorganismen-Art betreibt Stoffwechsel (wächst) in einem ihr typischen Temperaturbereich. Viele Stoffwechselforgänge der Mikroorganismen sind chemische Reaktionen. Ihr Ablauf hängt vom Überschreiten einer Mindestreaktionstemperatur ab. Allgemein nimmt die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen mit ansteigender Temperatur zu. Man kann in Zellen pro 10°C Temperaturerhöhung von einer Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit ausgehen. Wird die Temperatur jedoch zu hoch, dann werden zum Beispiel Enzyme oder die Zellmembran funktionsunfähig.

Unterhalb des Temperaturminimums vermehrt sich die Mikroorganismen-Zelle nicht (sie stirbt aber im Regelfall auch nicht ab). Überschreitet man die untere Temperaturgrenze, nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit bis zum Temperaturoptimum zu. Im Optimum vermehrt sich die Zelle so schnell, wie es aufgrund ihres Erbmaterials möglich ist. Steigt die Temperatur über das Optimum, so nimmt die Wachstumsgeschwindigkeit ab. Im Temperatur-Maximum hört die Vermehrung auf. Bei Überschreiten der Abtötungstemperatur wird die Zelle so stark geschädigt, daß sie selbst bei Rückkehr in den Optimalbereich nicht mehr vermehrungsfähig ist.

Einteilung der Mikroorganismen nach dem Temperatur-Optimum

Ausgehend von dem Temperaturbereich in dem das Optimum liegt, ordnet man die Mikroorganismen den nachstehenden Gruppen zu:

Temperaturbereich in °C			
	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Psychrophile</i>	-10-0	15-20	20-30
<i>Mesophile</i>	10-25	20-37 (42)	35-50
<i>Thermophile</i>	30-50	50-65	60-95

psychro = kalt, philos = Freund, meso = mittel, thermo = warm

Wichtig: In der Milchwirtschaft ist es üblich, den Begriff thermophil ab dem Temperaturoptimum von 37° C zu benutzen (mesophil: 20 bis 37° C).

Es ist nützlich, sich noch folgenden Sachverhalt zu merken: Psychrophile Mikroorganismen haben ein sehr niedriges Temperatur-Minimum (0 - 10° C) und ein niedriges Temperatur-Maximum (selten über 30° C). Thermophile Mikroorganismen wachsen selten unter 25° C, ihr Maximum und oft auch ihre Abtötungstemperatur sind sehr hoch. Der Wachstumsbereich der Mesophilen liegt zwischen 10 - 50° C.

Psychrotrophe Mikroorganismen (tropho = sich ernähren):

Um Mikroorganismen genauer definieren zu können, wird seit 1962 die Bezeichnung psychrotroph gebraucht. Ihr Optimum liegt zwar im mesophilen oder sogar thermophilen Bereich, das besondere Merkmal der Psychrotrophen aber ist, daß sie sich noch unter $6,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ relativ schnell vermehren und Stoffwechsel betreiben können. Psychrotrophe Mikroorganismen gefährden daher die Haltbarkeit kühlgelagerter Lebensmittel.

Hitzeresistente Mikroorganismen - Thermodure oder Thermoresistente:

Als "Hitzeresistente" bezeichnet man Mikroorganismenarten, die Pasteurisierungstemperaturen überleben. Es handelt sich in der Milchwirtschaft nur um grampositive Bakterien-Arten. Gramnegative Bakterien sind dagegen grundsätzlich empfindlich gegen Pasteurisierungstemperaturen ("thermolabil"). Sie werden also durch Pasteurisierung mit Sicherheit abgetötet.

Beispiele zu den genannten Begriffen

Bakterienart	Temp. Min.	Temp. Opt.	Temp. Max.	Bezeichnung	Vorkommen
<i>Lb. bulgaricus</i>	20° C	45° C	52° C	thermophil	Joghurt
<i>E. coli</i>	10° C	37° C	45° C	mesophil	Darm
<i>Lb. casei</i>	10° C	30° C	43° C	mesophil	Käse (reif)
<i>Ps. fluorescens</i>	0° C	25° C	40° C	mesophil psychrotroph	Wasser
<i>B. stearothermophilus</i>	30° C	60° C	75° C	thermophil, thermodur	Heißhalter, Hemmstofftest

3.4.3 Sauerstoff-Bedarf

Alle Mikroorganismen benötigen Sauerstoff, um ihre Zellsubstanz aufbauen zu können. Jedoch unterscheiden sich die Mikroorganismen bezüglich des Sauerstoffbedarfs bei der Produktion von Energie erheblich.

Es gibt vier Typen von Mikroorganismen:

Aerobe, mikroaerophile, anaerobe, fakultativ anaerobe Mikroorganismen.

Sauerstoffbedarf	Energiegewinnung
obligat aerob	Atmung
mikroaerophil	Atmung
obligat anaerob	Gärung
fakultativ aerob	Atmung oder Gärung

obligat aerob: Wachstum in der Zone, in der Luftsauerstoff in den Nährboden eindiffundiert, sie wachsen nicht im Bereich ohne Sauerstoff (obligat = streng, aer = Luft). Obligat aerobe Mikroorganismen gewinnen Energie durch Atmung.

mikroaerophil: Sonderfall aerober Mikroorganismen. Wachstum besser mit verringertem Sauerstoff-Gehalt möglich. Energiegewinnung durch Atmung.

obligat anaerob: kein Wachstum im Bereich mit Luftsauerstoff im Nährboden. Sauerstoff wirkt hemmend, daher Wachstum im Bereich ohne Sauerstoff. (an = ohne) Obligat anaerobe Mikroorganismen gewinnen Energie durch Gärung.

fakultativ anaerob: Wachstum ohne und mit Luftsauerstoff möglich. Indifferente = Luftsauerstoff hemmt nicht, Opportunisten = Luftsauerstoff wird mitverwendet (fakultativ, Abkürzung fakt. = wahlweise). Fakultativ anaerobe Mikroorganismen atmen oder gären.

Aus der Kenntnis des Sauerstoffanspruchs bestimmter Mikroorganismen kann man ableiten, ob ein bestimmtes Lebensmittel durch sie verderben werden kann.

Beispiele:

Hartkäse im Teig haben keinen Luftsauerstoffgehalt, also setzen sich anaerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen durch. Oberflächen (Käserinde ...) - Aerobe und fakultativ anaerobe Mikroorganismen wachsen.

- Zum Schutz vor Verderb durch aerobe Keime verpackt man sauerstoffdicht, oder man ersetzt Sauerstoff durch N₂ bzw. CO₂ ("Begasen")
- Auch bei gewünschter Keimvermehrung (Kulturenzucht) ist es wichtig, die Sauerstoffansprüche zu kennen. Aerobe Mikroorganismen werden am besten in Oberflächenkultur oder flacher Nährbodenschicht angezogen. Tiefenkulturen müssen mit Luft durchströmt (belüftet) werden. Anaerobe Mikroorganismen zieht man in Tiefenkultur und/oder verhindert den Zutritt von Luftsauerstoff, bindet oder entfernt ihn. Hinweis: Milch enthält genügend Sauerstoff, so daß auch aerobe Mikroorganismen in ihr wachsen können.

Sauerstoffansprüche wichtiger Mikroorganismen

- aerob sind; Schimmel, Pseudomonaden, Rotschmierebakterien
- anaerob sind: Clostridien
- fakultativ anaerob sind: Enterobakterien
- Milchsäurebakterien stellen einen Sonderfall dar. Sie gewinnen Energie durch Gärung (anaerob), erdulden aber geringe Mengen Luftsauerstoff (sind aerotolerant).

3.4.4 pH-Wert

Die meisten unbehandelten Lebensmittel wie Fleisch und Fisch sind schwach sauer. Beim Verderb dominieren deshalb Mikroorganismen, die ihr Wachstumsoptimum nahe pH 7,0 haben und in einem Bereich von pH 6 bis 8 gut wachsen können.

Das **pH-Minimum** liegt für die meisten verderbniserregenden Bakterien bei pH 4,4 bis 4,5 (viele Enterobacteriaceae, Bacillus-Arten u.a.). Auch *Clostridium botulinum* Typ A und B hat sein pH-Minimum bei pH 4,5. Lebensmittel-Vergifter wie *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* Typ E, *Pseudomonas aeruginosa* sind säureempfindlicher. Im Gegensatz zu diesen Bakterien haben Essigsäurebakterien ihr pH-Optimum zwischen pH 5,4 und 6,3 und *Lactobacillus*-Arten zwischen pH 5,5 und 6,0. Entsprechend tiefer liegen die minimalen pH-Werte. Wesentlich säuretolanter als die Bakterien sind die Hefen und Schimmelpilze, die auch in stark saurem Milieu (pH 4,0) noch wachsen können. Die Säuretoleranz der Mikroorganismen ist in Lebensmitteln durch die Einwirkung der Inhaltsstoffe, des reduzierten a_w-Wertes, der ungünstigen Sauerstoffversorgung, des Einflusses der Herstellungs- und Lagerbedingungen sowie anderer Parameter in der Regel deutlich geringer als die unter optimalen Wachstumsbedingungen ermittelten Werte.

pH-Bereiche verschiedener Lebensmittelgruppen

pH-Bereich	Lebensmittel	pH-Wert
Alkalisch pH > 7,0	Eiklar	bis 9,6
Neutral pH 7,0 - 6,5	Frischfleisch, schlachtwarm	7,2
	Milch	7,0 - 6,8
	Garnelen	7,0 - 6,8
	Austern	6,7 - 6,3
	Geflügel	6,7 - 6,3
Schwach sauer pH 6,5 - 5,3	Fisch	6,6 - 5,7
	Kochschinken, Brühwurst, Leberwurst	6,4 - 6,0
	Schweinefleisch gereift	6,0 - 5,6
	Rindfleisch gereift	5,8 - 5,4
	Rohschinken	5,8 - 5,3
	Rohwurst, streichfähig	5,8 - 5,0
	Weißbrot Viele Gemüsesorten	6,0 - 5,0 6,5 - 5,0
Mittelsauer pH 5,3 - 4,5	Viele Dosenkonserven	
	Rohwurst, schnittfest	5,2 - 4,9
Sauer pH 4,5 - 3,7	Sauergemüse	4,5 - 3,5
	Tomaten	4,4 - 4,0
	Joghurt	4,2 - 3,8
	Mayonnaise	4,1 - 3,0
	viele Obstsorten	4,5 - 3,0
Stark sauer pH < 3,7	Sauerkraut	3,7 - 3,1
	Äpfel, Apfelsaft	3,5 - 3,3
	Pflaumen	3,0 - 2,8
	Zitronen	2,4 - 2,2

Das **pH-Maximum** liegt bei Bakterien, Pilzen und Hefen durchschnittlich bei pH-Werten von 8 bis 9, die nur in wenigen Lebensmitteln (Eiklar) überschritten werden. Die maximal tolerierten pH-Werte für *Lactobacillus*- und *Acetobacter*-Arten (z.B. *A. acidophilus*) liegen mit pH 7,2 bzw. pH 4,3 wesentlich niedriger.

Die Mikroorganismen werden nicht nur durch die freien H^{\oplus} -Ionen (pH-Wert = $-\log_{10} [H^{\oplus}]$), sondern auch durch die **undissoziierte Säure** gehemmt. Undissoziierte organische Säuren können die lipidhaltige Membran durchdringen und ins Zellinnere der Mikroorganismen gelangen. Besonders leicht können deshalb schwach dissoziierte lipophile organische Säuren (z.B. Essigsäure, Milchsäure) in die Zelle eindringen. Ihre Hemmwirkung beruht auf der Ansäuerung des Zellinneren und/oder der Hemmung von Stoffwechselfvorgängen wie dem

Transport von Nährstoffen. Der Grad der Ansäuerung ist u.a. davon abhängig, ob das Anion der Säure metabolisiert werden kann (und damit H⁺-Ionen freigesetzt werden) und in welchem Umfang der unkontrollierte Protonentransport in die Zelle verstärkt wird. Bei gleichem pH-Wert bewirken aufgrund dieser Zusammenhänge schwache organische Säuren eine stärkere Wachstumshemmung als stark dissoziierte Säuren wie die Salzsäure. Allerdings ist im Vergleich zu einer starken Säure zur Einstellung des gleichen pH-Wertes eine größere Menge an schwacher Säure notwendig.

 Minimale und maximale pH-Werte für das Wachstum von Mikroorganismen

Mikroorganismen (Beispiele)	Minimum pH	Maximum pH	Säuretoleranz
<i>Micrococcus sp.</i>	5,6	8,1	Geringe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	8,0	Säuretoleranz
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5,2	9,2	pH _{min} >5,0
<i>Clostridium botulinum</i> Typ E	5,0-5,2		Mittlere
<i>Clostridium sporogenes</i>	5,0	9,0	Säuretoleranz
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,0	9,0	pH _{min} 5,0-4,0
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0	8,3	
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9	8,0	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,5	9,0	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8	11,0	
<i>Clostridium botulinum</i> Typ A,B	4,5	8,5	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	9,8	
Salmonellen	4,0-4,5	8 - 9,6	
<i>Escherichia coli</i>	4,4	9,0	
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4	9,2	
<i>Streptococcus lactis</i>	4,3-4,8	9,2	
<i>Bacillus cereus</i>	4,3-4,9	9,3	
Milchsäurebakterien			Hohe
<i>Lactobacillus spp.</i>	3,8-4,4	7,2	Säuretoleranz
Essigsäurebakterien			pH _{min} < 4,0
<i>Acetobacter acidophilus</i>	2,6	4,3	
Hefen			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,3	8,6	
Pilze			
<i>Penicillium italicum</i>	1,9	9,3	
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6	9,3	

3.4.5 Redoxpotential

Oxidations-Reduktionsreaktionen sind das Ergebnis einer Elektronenübertragung zwischen reagierenden Stoffen. Grundsätzlich versteht man unter Oxidation, wenn eine Verbindung Elektronen oder Wasserstoff abgibt, unter Reduktion, wenn Elektronen oder Wasserstoff aufgenommen werden. Immer wenn eine Oxidation stattfindet, tritt auch eine Reduktion ein, da die freigesetzten Elektronen oder der Wasserstoff durch vorhandene Stoffe gebunden werden. Beide Reaktionen laufen also gleichzeitig ab. Sie erreichen ein Gleichgewicht, wenn die Reaktionsbedingungen konstant gehalten werden.

Ein derartiges System stellt ein elektromotorisches Potential von meßbarer Größe dar, gemessen in Millivolt oder rh. Eine nur quantitative Messung kann durch Zusatz bestimmter Farbstoffe erfolgen, die bei Oxidation oder Reduktion Farbveränderungen zeigen (Resazurin, Methylenblau, TTC, Brillantschwarz ...): Temperatur und pH-Verhältnisse beeinflussen das Redoxpotential.

In jeder tätigen Zelle sind zahlreiche enzymatisch regulierte Oxidations-Reduktionsreaktionen mit dem Transport von Wasserstoff und Elektronen verknüpft. Sie geben der Zelle und auch ihrer Umgebung ein bestimmtes Redoxpotential. Dieses wird zum Beispiel in einer Mikroorganismen-Kultur erniedrigt, wenn die Vermehrung einsetzt. Dabei drücken Anaerobier das Potential stärker als Aerobier.

Umgekehrt läßt sich von außen das Potential in der Zelle beeinflussen, wenn man reduzierende Substanzen (z.B. Ascorbinsäure, Cystein, Glutathion, Natriumthioglycolat, Natriumhydrosulfit, oder "Innereien", z.B. Leberstückchen, Leberpulver o.ä. dem Nährboden zusetzt. Damit wird das Wachstum der Anaerobier durch ein niedrig gehaltenes Redoxpotential begünstigt.

Sättigt man die Nährlösung mit Sauerstoff, steigt das Redoxpotential. Anaerobier werden am Wachstum gehindert.

Der **E_h -Wert-Bereich** bei dem ein Wachstum der Mikroorganismen stattfindet, kann art- und stammspezifisch stark variieren. Aerobe Bakterien benötigen hohe E_h -Werte. Z.B. wächst *Pseudomonas fluorescens* in einem Bereich von +100 bis +500 mV. Fakultativ anaerobe Bakterien tolerieren dagegen für ihr Wachstum sowohl positive als auch negative E_h -Werte. *Staphylococcus aureus* vermehrt sich z.B. in einem E_h -Bereich von -200 bis über +200 mV mit einem Wachstums- und Enterotoxin-Bildungsoptimum bei +200 mV. Die meisten anaeroben Bakterien (Clostridien) benötigen für ihr Wachstum einen sehr niedrigen E_h -Wert von etwa -300 mV. *Clostridium perfringens* und *C. botulinum* sind toleranter gegenüber höheren E_h -Werten. Die Angaben für den wachstumsbegrenzenden E_h -Wert von *C. perfringens* variieren in Abhängigkeit von der Species, der Anfangskeimkonzentration und den Lebensmittelinhaltsstoffen zwischen -125 und +350 mV. Auch die obere Grenze des E_h -Wertes, der noch einen Wachstumsbeginn von proteolytischen und nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Sporen zuläßt, liegt bei etwa +200 mV. Nach Wachstumsbeginn sinkt der E_h -Wert schnell auf Werte unter -200 mV ab.

E_h -Werte in Lebensmitteln.

Der E_h -Wert im **Fleisch** fällt nach der Schlachtung von etwa +250 mV während der Lagerung bis auf ca. -200 mV ab und ermöglicht damit nur anaeroben oder fakultativ anaeroben Mikroorganismen das Wachstum. Ähnliche Verhältnisse finden sich im **Käse** (etwa -20 bis -200 mV) oder in Dosenkonserven (-20 bis -150 mV). Im Gegensatz dazu haben **pflanzliche Lebensmittel**, z.B. Obst- und Gemüsesäfte wesentlich höhere E_h -Werte (+300 bis +400 mV) und werden deshalb bevorzugt von aeroben Bakterien und Pilzen verdorben.

4 Faktoren für den mikrobiellen Verderb von Lebensmittel

4.1 Innere Faktoren (intrinsic factors)

Die inneren Faktoren beschreiben die physikalischen, chemischen und biochemischen Eigenschaften der Lebensmittel.

Inhaltsstoffe: Nähr- und Wachstoffsstoffe

Textur (Struktur)

a_w -Wert

pH-Wert und Pufferungsvermögen (=Wachstumsregulator):

z.B. ein eiweißreiches Lebensmittel hat auch ein hohes Puffervermögen

rH-Wert: Das Redoxpotential wird in mV gemessen und ist ein Maß für die Oxidation im Lebensmittel. Damit wird das Sauerstoffverhältnis im Lebensmittel angegeben (aerobe bzw. anaerobe Verhältnisse). z.B. kann Bakterienwachstum durch Ascorbinsäurezusatz unterdrückt werden;

4.2 Äußere Faktoren (extrinsic factors)

Die Äußeren Faktoren geben die Lagerbedingungen wieder.

Temperatur

Relative Luftfeuchtigkeit

Gaspartialdrücke

Licht (Oxidationsvorgänge)

4.3 Prozess-Faktoren

→ Lebensmittletechnologische Verfahren, Haltbarmachung

Physikalisch: thermisch Kälte / Hitze

Wasserentzug

Bestrahlung

Chemisch:

Salzen

Pökeln

Säuern

Räuchern

Konservierungsmittel

Oft auch Kombinationen.

4.4 Biologische Faktoren (implicit parameter)

Die Florazusammensetzung in Lebensmittel ist bedingt durch spezifische Wachstumseigentümlichkeiten der jeweiligen Lebensmittelflora:

Generationszeit

Nährstoffansprüche (Enzysystem)

Nährstoffkonzentration

Antagonistische Wirkung (gegenseitige Beeinflussung, sowohl negativ als auch positiv)

Hemmung durch Säuren, Kohlendioxid, Antibiotika

Förderung durch Eiweißspaltprodukte, pH-Wert-Änderung