

Abschlussbericht

**Im Rahmen der Forschungsprojekte zur Unterstützung der Umsetzung der SDGs in der
österreichischen Landwirtschaft**

Kältetolerante Clostridien in österreichischen Rinderbeständen: Prävalenz, Pathogenität und Rolle als Verderbserreger

Gefördert durch

BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften

Samart Dorn-In

Veterinärmedizinische Universität Wien

**Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen
Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen**

Wien, 20.08.2025

Zusammenfassung

In Zeiten des Klimawandels, der sich unter anderem auf die Getreideernte und in weiterer Folge auf die Nahrungsmittelproduktion auswirkt, gewinnt die Reduktion von Nahrungsmittelverlusten zunehmend an Bedeutung. Die Produktion von Fleisch, insbesondere jene von Rindfleisch, ist ressourcenintensiv. Daher tragen Fleischverluste – verursacht etwa durch mikrobiellen Verderb – direkt sowohl zu wirtschaftlichen Verlusten als auch zu negativen Auswirkungen auf die Umwelt bei. Aus diesem Grund sollten das Ausmaß sowie potenzielle Eintragsquellen von Verderbserregern in Rindfleisch ermittelt werden. Rindfleisch wird in der Regel vakuumverpackt und durchläuft während der Lagerung bei Kühltemperatur eine lange Reifungsphase. Unter diesen Bedingungen können jedoch viele kältetolerante Spezies des Genus *Clostridium* gedeihen und in weiterer Folge das betroffene Fleisch verderben. Das natürliche Habitat dieser Bakterien ist der Boden in gemäßigten und subtropischen Klimazonen. In Österreich wird Rinderhaltung, wie z. B. in den alpinen Regionen, oft als Weide- oder Freilandhaltung praktiziert. Das bedeutet, dass die Tiere mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den Lebensräumen kältetoleranter Clostridien in Kontakt kommen. Ziel dieser Studie war es daher, die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich zu bestimmen (Arbeitspaket, AP1). Die isolierten *Clostridium*-Spezies des AP1 wurden anschließend für das AP2 (über den Verderb von Sous-vide-Fleisch durch kältetolerante Clostridien) und für das AP3 (über die Prüfung der Toxinbildung) verwendet. Im AP4 wurden die Fleischproben von AP2 mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) auf von *C. estertheticum* gebildete Substanzen analysiert.

Zentrale Aussagen dieser Studie sind:

- Kältetolerante Clostridien sind in österreichischen Rinderbetrieben weit verbreitet.
- Rinderkot und mit Kot verschmierte Haut stellen wichtige Kontaminationsquellen für Schlachtkörper und Fleisch dar.
- Mit kältetoleranten Clostridien kontaminiertes Fleisch weist eine kürzere Haltbarkeitsdauer auf als Clostridien-negative Proben.
- Sporen von *C. estertheticum*, der bekanntesten kältetoleranten Clostridien-Spezies, überleben die Hitzebehandlung wie Sous-vide-Garen (SV). SV-Fleisch verdirbt dadurch sogar schneller als frisches Fleisch, da SV-Fleisch nach der Hitzebehandlung weniger konkurrierende Mikroorganismen enthält.

- Um Fleischverluste durch Verderb infolge kältetoleranter Clostridien zu verhindern, sind gezielte Hygienemaßnahmen, Reinigungs- und Desinfektionsmethoden sowie ein Überwachungsplan erforderlich - insbesondere in Schlachthöfen und Fleischverarbeitungsbetrieben.

Die Ergebnisse von AP1 und AP2 wurden bereits im Journal Food Microbiology (2025) und im International Journal of Food Microbiology (2025) veröffentlicht. Darüber hinaus wurden Teile der Ergebnisse der beiden Arbeitspakete als Beiträge (wie Poster, Vorträge, Kurzfassungen bei Konferenzen, Proceedings oder in agrarischen Fachzeitschriften), die sowohl an Wissenschaftler als auch an die Öffentlichkeit adressiert sind, präsentiert und veröffentlicht (siehe Anlagen 1 bis 6). AP3 und AP4 liefern ebenfalls interessante neue Erkenntnisse, allerdings sind für eine statistische Auswertung weitere detaillierte Studien mit höheren Probenmengen erforderlich, um die Ergebnisse der beiden Arbeitspakete bestätigen zu können.

Zusammengefasst: Diese Studie untersucht das Vorkommen kältetoleranter Clostridien in österreichischen Tierbeständen, etabliert und validiert verbesserte Nachweismethoden, bewertet deren Pathogenitätspotential und analysiert deren Rolle als Verderbserreger von vakuumverpacktem, frischem und Sous-vide-Rindfleisch. Eine Zusammenarbeit von Wissenschaft und relevanten Behörden würde die Etablierung eines Überwachungsprogramms sowie die Entwicklung von Maßnahmenplänen zur Reduzierung der Kontaminationsgefahr ermöglichen. Das Projekt unterstützt somit eine nachhaltigere Fleischproduktion und die Umsetzung des SDG 2: den Hunger beenden, Ernährungssicherheit und eine bessere Ernährung erreichen und eine nachhaltige Landwirtschaft fördern.

Abstract

Cold-tolerant clostridia in Austrian cattle herds: prevalence, pathogenicity and role as spoilage microorganisms

In times of climate change, which has an impact on the grain harvest and subsequently on food production, the reduction of food losses is becoming increasingly important. The production of meat, especially beef, is resource-intensive. Therefore, meat losses - caused by microbial spoilage, for example - contribute directly to both economic losses and negative impacts on the environment. For this reason, the extent and potential sources of spoilage organisms in beef should be determined. Beef is usually vacuum-packed and undergoes a long maturation phase during storage at refrigeration temperature. Under these conditions, however, many cold-tolerant species of the genus *Clostridium* can thrive and subsequently spoil the affected meat. The natural habitat of these bacteria is the soil in temperate and subtropical climate zones. In Austria, cattle farming, such as in the alpine regions, is often practiced as pasture or free-range farming. This means that the animals are highly likely to come into contact with the habitats of cold-tolerant Clostridia. The aim of this study was therefore to determine the prevalence of cold-tolerant Clostridia in cattle herds in Austria (work package, WP1). The isolated *Clostridium* species of WP1 were subsequently used for WP2 (on the spoilage of sous-vide meat by cold-tolerant Clostridia) and for WP3 (on the testing of toxin formation). In WP4, the meat samples from WP2 were analysed for substances formed by *C. estertheticum* using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

The key findings of this study are:

- Cold-tolerant clostridia are widespread in Austrian cattle farms.
- Cattle faeces and faeces-smeared skin play an important role as sources of contamination for cattle carcasses and their meat.
- Meat contaminated with cold-tolerant clostridia has a shorter shelf life than clostridia-negative meat samples.
- Spores of *C. estertheticum*, the best-known cold-tolerant clostridial species, survive heat treatment such as sous-vide cooking (SV) and spoil SV meat even faster than fresh meat, as after heating, there are few competing meat microorganisms in SV meat.

- To prevent meat losses due to cold-resistant *Clostridium* induced spoilage, targeted hygiene measures, cleaning and disinfection methods, and a monitoring plan are necessary, especially in slaughterhouses and meat processing plants.

The results of WP1 and WP2 have already been published in the Journal Food Microbiology (2025) and the International Journal of Food Microbiology (2025). In addition, parts of the results of the two work packages have been presented and published as contributions (such as posters, lectures, abstracts at conferences, proceedings or in agricultural journals) addressed to both scientists and the public (see [Appendices 1 to 6](#)). WP3 and WP4 also provide interesting new findings, but further detailed studies with larger sample quantities are required for a statistical evaluation in order to confirm the results of the two work packages.

Summarized: This study investigates the occurrence of cold-tolerant *Clostridia* in Austrian livestock, establishes and validates improved detection methods, evaluates their pathogenicity potential and analyses their role as spoilage microorganisms of vacuum-packed, fresh and sous-vide beef. Collaboration between science and relevant authorities would enable the establishment of a monitoring programme and the development of action plans to reduce the risk of contamination. The project thus supports more sustainable meat production and the implementation of SDG 2: end hunger, achieve food security and improved nutrition and promote sustainable agriculture.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit	1
1.2 Kältetolerante <i>Clostridium</i> spp.	3
1.2.1 Allgemeiner Überblick	3
1.2.2 Verderb vom Fleisch durch kältetolerante Clostridien	5
1.2.3 Pathogenität	6
1.2.4 Vorkommen und Kontaminationsquelle	7
2. Arbeitspaket 1: Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbetrieb	8
2.1. Zusammenfassung	8
2.2. Veröffentlichung	9
3. Arbeitspaket 2: Verderb von Sous-vide Fleisch durch kältetolerante Clostridien	10
3.1 Zusammenfassung	10
3.2 Veröffentlichung	11
4. Arbeitspaket 3: Prüfung der Pathogenität isolierter kältetoleranter Clostridien	12
4.1 Zusammenfassung	12
4.2 Proben	13
4.3 Methode	13

4.4	Ergebnisse	15
4.5	Diskussion	18
5.	Arbeitspaket 4: Nachweis von <i>C. estertheticum</i> mittels GC-MS Analyse	20
5.1	Zusammenfassung	20
5.2	Proben	21
5.3	Methode	22
5.4	Ergebnis	23
5.5	Diskussion	25
6.	Schlussfolgerung und Ausblick	28
7.	Literaturverzeichnis	30
	Danksagung	35
	Anlage 1: Publikation im Journal „Food Microbiology“, 2025	36
	Anlage 2: Beitrag und Posterpräsentation bei DVG Tagung, 2023	43
	Anlage 3: Beitrag und Posterpräsentation and für Kongressband bei ALVA-Tagung, 2025	46
	Anlage 4: Beitrag in Fachzeitschrift Klauentierpraxis	52
	Anlage 5: Publikation im „International Journal of Food Microbiology“	64
	Anlage 6: Beitrag für Kongressband und Powerpoint-Präsentation bei DVG-Tagung, 2025	73

1. Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Mit einem Fleischkonsum von 60,5 kg pro Person und Jahr gehört Österreich in Europa und weltweit zu den Ländern mit dem höchsten Pro-Kopf-Verbrauch von Fleisch ([Statista, 2022](#); [WWF, 2022](#)). Die Fleischherstellung verbraucht enorme Ressourcen. Daher bedeutet jeder Fleischverlust gleichzeitig einen hohen wirtschaftlichen Verlust mit negativen Auswirkungen auf die Umwelt. Fleischverderb wird meist durch mikrobielle Kontamination verursacht. Diesem Risiko ist Fleisch auf allen Stufen der Lebensmittelkette ausgesetzt, beginnend bei der Schlachtung über die Zerlegung, Verarbeitung, Verpackung und Lagerung bis hin zu Transport und Verkauf bis zum Verbraucher. Der Verderbsprozess durch mesophile aerobe Keime kann durch Maßnahmen wie Vakuumverpackung und Kühlagerung verlangsamt werden. Unter diesen Bedingungen können sich jedoch bislang wenig bekannte, kältetolerante (psychrotolerante) obligate Anaerobier, wie z. B. bestimmte *Clostridium* spp., etablieren. Aufgrund des hierdurch gewonnenen Selektionsvorteils spielen diese Nischenkeime mittlerweile eine bedeutende Rolle als Verderbserreger.

Kältetolerante *Clostridium* spp. (z. B. *C. estertheticum*, *C. frigorophilum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes*) sind erst seit relativ kurzer Zeit als Verderbserreger von vakuumverpacktem frischem Fleisch bekannt ([Broda et al., 2000](#); [Dorn-In et al., 2012](#); [EFSA, 2016](#); [Mang et al., 2021](#)). Ihre natürlichen Habitate sind Permafrost- sowie Böden des gemäßigten und subtropischen Klimas ([Pecheritsyna et al., 2007](#); [Spring et al., 2003](#); [Suetin et al., 2009](#)). Als Kontaminationsquellen für Fleisch gelten Kot und Felle von geschlachteten Tieren. Ähnlich wie Sporen von mesophilen Sporenbildnern (z. B. *C. perfringens*, *C. botulinum* und *Bacillus cereus*) sind Sporen kältetoleranter Clostridien auch resistent gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmitteln. Der Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien ist teilweise an der Aufblähung der Verpackung erkennbar, der sogenannte „Blown Pack Spoilage“ (BPS). Diese wird durch die Bildung von CO₂ und H₂ verursacht ([Boerema et al., 2007](#)). Der Druckanstieg in der Verpackung führt zu einem erheblichen Fleischtropfsaftverlust. Die beschriebene Problematik wurde in vielen Ländern beschrieben, insbesondere jenen mit hoher Fleischproduktion und/oder hohem Fleischkonsum, darunter Brasilien, Irland, Neuseeland, das Vereinigte Königreich und die Vereinigten Staaten. In Deutschland sind laut eigenen Studien 34 – 53 % des vakuumverpackten Fleisches mit kältetoleranten Clostridien belastet ([Bonke et al., 2016](#); [Mang et al., 2021](#)). In Österreich gibt es bisher keine Daten zum

Vorkommen von kältetoleranten Clostridien in Tierbeständen, Schlacht- und Fleischverarbeitungsbetrieben und in vakuumverpacktem Fleisch und Fleischprodukten im Handel. Abgesehen von der Rolle als Verderbserreger von vakuumverpacktem, frischem Fleisch wurden die Pathogenität der kältetoleranten Clostridien und ihr Potential als Verderbserreger von erhitztem Fleisch bis dato nicht untersucht.

Ziele des Projekts waren daher:

1. Die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich festzustellen
2. Den Verderb von Sous-vide Fleisch durch kältetolerante Clostridien zu charakterisieren
3. Das Pathogenitätspotential kältetoleranter Clostridien-Isolate mittels Zellkulturmodell zu untersuchen
4. Schnelle Nachweismethoden für kältetolerante Clostridien in Lebensmitteln zu etablieren

Dazu wurden in **Arbeitspaket 1 (Ziel 1)** Kot- und Fellwischproben von Rindern von verschiedenen Tierbeständen in Österreich molekularbiologisch und kulturell auf das Vorkommen kältetoleranter Clostridien untersucht. In **Arbeitspaket 2 (Ziel 2)** wurde der Verderb eines erhitzten Fleischproduktes, nämlich Sous-vide-Rindfleisch, durch *C. estertheticum* - die bekannteste Spezies der kältetoleranten Clostridien - untersucht. Sous-vide (SV) ist eine Form des Niedrigtemperaturgarens. Temperatur und Dauer richten sich dabei nach der Art des Lebensmittels, der Tierart und dem Gewicht beziehungsweise der Dicke des Fleisches ([Grillfuerst, 2024](#)). Bereits in den 1960er Jahren wurde dieses Verfahren zur Produktion von Convenience Food und später auch in Gastronomiebetrieben eingesetzt. Mittlerweile sind auf dem Markt fertige SV-Bäder und SV-Sticks erhältlich. Diese kostengünstige Alternative und die einfache Anwendungsart sorgen für eine immer häufigere Verwendung in privaten Haushalten. SV-Garen kann die vegetativen Zellen der Fleischmikrobiota reduzieren, wodurch sich das Verbrauchsdatum des vakuumverpackten Fleisches verlängern lässt. Dennoch können Pathogene wie Salmonellen, Listerien und *E. coli* SV-Garen zum Teil überleben und Erkrankungen bei Verbrauchern auslösen ([Ismail et al., 2022](#); [Onyeaka et al., 2022](#)). Dazu können nach eigenem Vorversuch Sporen von Verderbserregern wie jene kältetoleranter Clostridien SV-Garen überleben, bei Kühlschranktemperaturen anschließend weiterwachsen und so Fleischverderb verursachen ([Beindorf et al., 2021](#)).

In **Arbeitspaket 3 (Ziel 3)** wurden die gewonnenen Clostridien-Isolate des Weiteren auf Toxinbildung untersucht, indem die Toxizität bzw. Zellviabilität der Caco-2-Zellen mittels Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätstest geprüft wurde. Da die kulturelle Anzucht von kältetoleranten Clostridien aufgrund deren extrem langsamen Wachstums sehr zeitintensiv ist (bis zu 8 Wochen), wurde weiterhin überprüft, ob sensitive Methoden wie Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) zum Nachweis von lebenden kältetoleranten Clostridien in Fleischproben verwendet werden konnten (**Arbeitspaket 4, Ziel 4**). Diese State-of-the-art Techniken werden dazu beitragen, Fleischverderb durch kältetolerante Clostridien schnell, frühzeitig und effektiv zu erkennen, damit entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden können.

Gemäß der europäischen Verordnung (EG) Nr. 178/2002 darf verdorbenes Fleisch nicht für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel verarbeitet werden ([Regulation \(EC\) No 178/2002](#)). Um das Bewusstsein der Lebensmittelunternehmer sowie der Verbraucher für die Möglichkeiten, Verderb zu erkennen und zu vermeiden, zu schärfen, wurden die Ergebnisse des Projekts zusätzlich zu ihrer Veröffentlichung in wissenschaftlichen Publikationen in peer-reviewed Journals zielgruppengerecht aufbereitet und im Rahmen der Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) sowie der Tagung der österreichischen Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel-, Veterinär- und Agrarwesen (ALVA) vorgestellt.

Das Projekt ermöglicht somit eine nachhaltigere Fleischproduktion und unterstützt daher die Umsetzung des SDG 2 (den Hunger beenden, Ernährungssicherheit und eine bessere Ernährung erreichen und eine nachhaltige Landwirtschaft fördern). Zudem unterstützen die erzielten Projektergebnisse auch die Umsetzung von SDG 3 (ein gesundes Leben für alle Menschen jeden Alters gewährleisten und ihr Wohlergehen fördern) sowie SDG 12 (nachhaltigen Konsum- und Produktionsmuster sicherstellen).

1.2 Kältetolerante *Clostridium* spp.

1.2.1 Allgemeiner Überblick

Bei *Clostridium* spp. handelt es sich um eine große, heterogene Gattung von Bakterien, die dem Phylum *Firmicutes* angehört und rund 231 beschriebene Spezies umfasst ([Brasca et al., 2022](#)). Clostridien sind stäbchenförmig und zeigen sich in der Gram-Färbung positiv. Die meisten Spezies wachsen nur unter strikt anaerober Atmosphäre, können Sulfat nicht reduzieren und

sind in der Lage, Endosporen zu bilden ([Brasca et al., 2022](#); [Neumeister et al., 2009](#)). Endosporen von Clostridien sind resistent gegen extreme Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Hitze, die Gegenwart vieler Desinfektionsmittel und Trockenheit ([Brasca et al., 2022](#)). Clostridien sind ubiquitär und kommen häufig in Umgebungen mit wenig oder ohne Sauerstoff vor, wie z. B. im Boden, in Sedimenten, im Kot von Tieren wie Rindern, kleinen Wiederkäuern und Wildschweinen, sowie in pflanzlichen und tierischen Produkten ([Blaschek, 2014](#); [Dorn-In et al., 2018](#)).

Im Lebensmittelbereich gehören unter anderem *C. perfringens* und *C. botulinum* zu den humanmedizinisch bedeutsamsten Spezies ([Neumeister et al., 2009](#)). Sie kommen im Fleisch und in Lebensmitteln vor, insbesondere bei unsachgemäßer Verarbeitung oder Konservierung ([WHO, 2023b](#)). *C. perfringens* ist eine der am weitesten verbreiteten pathogenen Spezies der Gattung *Clostridium*. Es ist in der Lage, Wundinfektionen (z. B. Gasbrand), Enteritis und Enterokolitis auszulösen. Ursächlich hierfür ist die Produktion verschiedener Toxine, die sich je nach *C. perfringens*-Stamm unterscheiden ([Mehdizadeh et al., 2021](#)). Die von *C. botulinum* produzierten Botulinum-Neurotoxine zählen zu den potentesten natürlichen Toxinen. Sie rufen Botulismus hervor, der meist mit den klinischen Symptomen einer akuten, afebrilen, symmetrisch absteigenden schlaffen Lähmung einhergeht ([Lonati et al., 2020](#)). Es wird zwischen Lebensmittelbotulismus, Wundbotulismus, Säuglingsbotulismus und Inhalationsbotulismus unterschieden, wobei Lebensmittelbotulismus die am häufigsten vorkommende Form in Europa darstellt ([RKI, 2022](#)). Lebensmittelbotulismus wird in vielen Fällen durch hausgemachte Konserven hervorgerufen. Betroffene Patienten zeigen gastrointestinale Symptome wie Erbrechen, Übelkeit und Diarrhoe ([Anniballi et al., 2017](#)).

Kältetolerante Clostridien sind im Vergleich zu mesophilen und pathogenen Clostridien wie *C. perfringens* und *C. botulinum* deutlich weniger bekannt. Während die beiden genannten Clostridien-Spezies wegen ihrer Toxine hinsichtlich Lebensmittelsicherheit von Bedeutung sind, spielen die kältetoleranten Clostridien eine Rolle als Verderbserreger, insbesondere bei vakuumverpacktem Fleisch. Aufgrund noch fehlender Einteilung einiger Spezies umfasst der Begriff „kältetolerant“ in dieser Arbeit sowohl psychrophile als auch psychrotrophe Stämme, die jeweils bei einer Temperaturspanne von -5 °C bis 20 °C (optimal bei 12 °C bis 15 °C) und von -5 °C bis 35 °C (optimal bei 25 °C bis 30 °C) wachsen ([Broda et al., 1997](#)).

Die bekanntesten Spezies der verderbserregenden kältetoleranten Clostridien sind *C. estertheticum* und *C. gasigenes*. Andere kältetolerante Clostridien-Spezies, die aus Fleisch

isoliert wurden, sind zum Beispiel *C. algidicarnis*, *C. frigorophilum*, *C. bowmanii* und *C. frigidicarnis* sowie *C. tagluense*-like (Dorn-In et al., 2018; Mang et al., 2021). Da kältetolerante Clostridien strikt anaerob sind, bei niedrigen Temperaturen nur sehr langsam wachsen können und oft von fakultativ anaeroben, psychrotoleranten Mikroorganismen, wie Milchsäurebakterien, überwachsen werden, können sie in klassischen mikrobiologischen Untersuchungen oft nicht nachgewiesen werden. Der kulturelle Nachweis dieser Bakterien erfordert eine strikt anaerobe Umgebung, nährstoffreiche Nährmedien, einen speziellen Anreicherungsprozess und lange Inkubationszeiten bei niedrigen Temperaturen. Daher ist die kulturelle Untersuchung auf kältetolerante Clostridien in Fleisch oder Umweltproben generell sehr aufwendig und zeitintensiv (Dorn-In et al., 2018; Mang et al., 2021).

1.2.2 Verderb vom Fleisch durch kältetolerante Clostridien

Temperatur und Sauerstoffverfügbarkeit sind entscheidende Faktoren für das Wachstum von Mikroorganismen (Húngaro et al., 2016). Während die niedrige Temperatur das Wachstum von Enterobacteriaceae hemmt, gilt dies im Allgemeinen nicht für aerobe Bakterien wie Pseudomonaden, wohl aber für das Vakuumieren. Daher ist die Kombination aus Vakuumierung und Kühllagerung von Fleisch eine gängige Methode zur Verlängerung dessen Haltbarkeit (Bahlinger et al., 2021; Dorn-In et al., 2023). Unter dieser Bedingung können jedoch sowohl kältetolerante Milchsäurebakterien als auch kältetolerante/psychrophile Clostridien gedeihen (Dorn-In et al., 2023).

Wie in Abschnitt 1.2.1 erläutert, können kältetolerante Clostridien, insbesondere *C. estertheticum* und *C. gasigenes*, für den Verderb von kühlgelagertem, vakuumverpacktem Fleisch verantwortlich sein. Eines der wichtigsten Anzeichen für den Verderb ist die „Blown Pack Spoilage“ (BPS), die durch eine hohe Gasproduktion, bestehend aus Kohlendioxid (CO₂) und Wasserstoff (H₂), gekennzeichnet ist (Broda et al., 1996; Dorn-In et al., 2018). Wasserstoff kann sich mit Schwefel verbinden, der in einigen Aminosäuren enthalten ist. Dabei entsteht Schwefelwasserstoff, der sich durch seinen äußerst unangenehmen charakteristischen (schwefeligen oder fauligen) Geruch auszeichnet (Broda et al., 2000).

Einzelne Stämme der Spezies *C. estertheticum* sind in der Lage, beträchtliche Mengen an Gas zu bilden, während andere diesbezüglich kaum Aktivität zeigen. Entsprechend variiert auch das Erscheinungsbild des durch *C. estertheticum* verursachten Fleischverderbs: Es reicht von vereinzelt Gasblasen im Fleischsaft, die Vakuumverlusten ähneln, bis hin zu deutlich sichtbaren Aufblähungen der Verpackung. (Dorn-In et al., 2018; Boerema et al., 2007). Es gibt

weitere kältetolerante Clostridien-Spezies, die häufig in vakuumverpacktem Fleisch nachgewiesen wurden, wie *C. frigoriphilum* und *C. algidicarnis* (Dorn-In et al., 2018; Mang et al., 2021). Obwohl die beiden Arten weniger Gas produzieren können als *C. estertheticum* und *C. gasigenes*, können sie geruchsaktive Substanzen produzieren, insbesondere Butanol, Buttersäure sowie Essigsäure, Ameisensäure und Butylester (Broda et al., 1996; Lawson et al., 1994; Spring et al., 2003). Diese Substanzen verleihen betroffenem Fleisch einen typisch käsigen Verderbsgeruch.

Betroffen sind in der Regel Rind-, Lamm- und Wildfleisch, da diese eine lange Reifungsphase unter anaeroben Bedingungen (vakuumverpackt) und bei niedrigen Temperaturen (< 4 °C) durchlaufen. Der Verderb von Fleisch durch kältetolerante Clostridien tritt meist während der Lagerung zur Reifung bei der richtigen Temperatur, ohne Verpackungsfehler und innerhalb des Verbrauchsdatums auf.

1.2.3 Pathogenität

Zum Toxinbildungsvermögen von kältetoleranten Clostridien gibt es derzeit keine Kenntnisse. Der Verzehr von Lebensmitteln, die kältetolerante Clostridien wie *C. estertheticum* enthalten, wird als nicht gesundheitsschädlich bewertet (BfR, 2010). Eine Studie hat gezeigt, dass kältetolerante *Clostridium botulinum* ähnliche Stämme (n = 259), die aus vakuumverpacktem Fleisch und Schlachthöfen isoliert wurden, 16S rRNA Gene haben, die dem Referenzstamm von *C. botulinum* Typ B ähneln. Allerdings war kein Isolat davon PCR-positiv für das Botulinumtoxin-Gen (Broda et al., 1998). Diese Ergebnisse ähneln denen von Moorhead und Bell (1999), die bei sechs psychrophilen Clostridien, die aus vakuumverpacktem Fleisch isoliert wurden, kein Botulinumtoxin produzieren konnten.

Mehrere Studien konnten belegen, dass einige in Fleisch vorkommende psychrotolerante *Clostridium* spp. (z. B. *C. estertheticum*, *C. frigidicarnis* und *C. tagluense*-like) Hämolysin und/oder Lecithinase produzieren (Broda et al., 1999, Dorn-In et al., 2018; Dorn-In et al., 2022b). Hämolysine gehören zu bakteriellen Exotoxinen. Das Enzym Lecithinase ist eine Phospholipase, die von vielen Bakterien produziert werden kann. Sie wird oft mit dem Potential zur Toxinproduktion oder gesundheitsschädlichen Aktivitäten in Verbindung gebracht. So ist beispielsweise Phospholipase C, eine von *C. perfringens* produzierte Lecithinase-Art, als α -Toxin bekannt, das bei Menschen und Tieren Symptome wie Myonekrose und Hämolyse verursachen kann. Außerdem ähnelt das von *C. perfringens* produzierte α -Toxin in seiner Struktur toxischen Phospholipasen, die von *Bacillus cereus*, *C. bifermentans* und

Listeria monocytogenes produziert werden (Sakurai et al., 2004; Tittball, 1993). Nicht alle Arten von Lecithinase oder Phospholipase C sind für tierische und menschliche Zellen toxisch. Andere Kofaktoren oder Enzyme können jedoch ihre Toxizität auslösen oder verstärken (Hatheway, 1990; Tittball, 1993). Dies wurde bei *Staphylococcus aureus* beobachtet, bei dem Lecithinase produzierende Stämme gesichert auch Koagulase-Aktivität aufweisen (Baird und Lee, 1995; Davis et al., 2016). Eine Untersuchung kältetoleranter Clostridien bezüglich deren Fähigkeit zur Toxinbildung ist deshalb unter dem Aspekt der Lebensmittelsicherheit geboten. Dies trifft insbesondere auf Stämme zu, die sowohl Hämolysin als auch Lecithinase produzieren können (Dorn-In et al., 2022b).

1.2.4 Vorkommen und Kontaminationsquelle

Kältetolerante und psychrophile Clostridien finden sich in Permafrost- und in allen Böden der gemäßigten und subtropischen Klimazonen. So wurde beispielsweise *C. frigoriophilum* erstmals aus Salzwasser von sibirischem Permafrost isoliert (Pecheritsyna et al. 2007). *C. bowmanii* und *C. frigoris* wurden im Permafrost um einen Süßwassersee in der Antarktis (Spring et al., 2023) und *C. tagluense* in der kanadischen Hocharktis erstmals entdeckt (Suetin et al., 2009). Daher könnte das Schmelzen des Permafrosts aufgrund des Klimawandels dazu beitragen, die Verbreitung dieser Keime zu beschleunigen.

Da kältetolerante Clostridien in der Regel im Erdboden vorkommen, können Tiere wie Rinder, kleine Wiederkäuer und Wildtiere die Bakterien beim Grasen aufnehmen. Dies bedeutet, dass Kot von geschlachteten Tieren und deren Häute, wenn sie mit Erde und Fäkalien verunreinigt sind, eine potenzielle Kontaminationsquelle für Fleisch darstellen. Die für den Verderb von vakuumverpacktem Fleisch wichtigsten Spezies wurden zwar zuerst aus Fleisch isoliert, z. B. *C. estertheticum* aus vakuumverpacktem Rindfleisch im Vereinigten Königreich (Dainty et al., 1989), *C. algidicarnis* aus vakuumverpacktem gekühltem Schweinefleisch (Lawson et al., 1994) und *C. gasigenes* aus vakuumverpacktem Lammfleisch in Neuseeland (Broda et al., 2000). Im Laufe der Jahre wurden sie aber ebenfalls in Kot und Haut von Wiederkäuern nachgewiesen, z. B. in Irland (Esteves et al., 2020; Moschonas et al., 2009), der Schweiz (Wambui et al., 2021) und Neuseeland (Esteves et al., 2021).

Daher sind Hygiene und Sauberkeit der geschlachteten Tiere von großer Bedeutung, um die Ausbreitung von kältetoleranten Clostridien im Schlachthof und die anschließende Kontamination des Fleisches zu vermeiden und so den Verderb des Fleisches durch die genannten Bakterien zu verhindern.

2. Arbeitspaket 1: Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbetrieb

2.1. Zusammenfassung

Viele kältetolerante *Clostridium*-Spezies sind für den Verderb von vakuumverpacktem Fleisch verantwortlich. Das Habitat dieser Bakterien ist vor allem der Boden in gemäßigten und subtropischen Klimazonen. Tiere wie Rinder können die Bakterien über den Boden und die Umwelt beim Weidegang oder über das Futter aufnehmen. Da die Rinderhaltung in Österreich oft als Weide- oder Freilandhaltung betrieben wird, war es das Ziel dieses Arbeitspakets, die Prävalenz von kältetoleranten Clostridien bei diesen Rindern zu untersuchen. Die Clostridien-Isolate wurden auf Spezies-Ebene identifiziert und ihr Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (4, 10, 22, 30 und 37 °C) überprüft. Insgesamt wurden 260 Kot- und 260 Fellwischproben von 260 gesunden erwachsenen Rindern aus 26 Betrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol entnommen. Die Proben wurden zuerst in einer Peptone-Yeast-Glucose-Starch (PYGS) Bouillon anaerob bei 4 °C für 4 bis 5 Wochen angereichert. Die PYGS-Anreicherungen wurden mit molekularbiologischen (qPCR und Sequenzierung) und kulturellen Methoden untersucht. Während fast alle Kotproben stark und mäßig positiv für *Clostridium* spp. waren (Ct-Werte < 30 und 30 bis 36), lag der Anteil bei den Fellwischproben nur bei 15 %. Eine Untersuchung mit Spezies-spezifischen qPCR-Sonden ergab, dass 88,5 % der Rinderbetriebe bzw. 22,3 % der Tiere positiv für *C. estertheticum*, 80,8 % bzw. 33,8 % für *C. tagluense*-like, 65,4 % bzw. 32,7 % für *C. bowmanii*, 38,5 % bzw. 11,2 % für *C. frigoriphilum* und 19,2 % bzw. 14,2 % für *C. gasigenes* waren. Die Erfolgsquoten der Isolierung der Spezies aus den PCR-detektierten Proben reichten von 4,7 % (*C. bowmanii*) bis 59,5 % (*C. gasigenes*).

Darüber hinaus wurden neun *Clostridium* spp. isoliert, am häufigsten *C. subterminale* (10,3 % der Tiere), *C. algidixylanolytica* (7,7 %), *C. tagluense* (7,3 %) und *C. botulinum* (4,2 %). Die mittels qPCR bestimmte Prävalenz kältetoleranter Clostridien in den Kotproben von Rindern in Österreich ist relativ hoch, während die Prävalenz in den Fellwischproben sehr niedrig ist. Letzteres könnte mit der geringeren Kontamination der Haut mit Schmutz und Fäkalien zusammenhängen. Die Ergebnisse dieser Studie liefern nützliche Informationen für Rinderbetriebe und Schlachthöfe. Da das Enthäuten der Tiere zu den hygienisch kritischen Schritten im Schlachtprozess zählt, ist die Sauberkeit der Tiere bei Anlieferung hinsichtlich der Verschmutzung mit Fäkalien neben der hygienischen Durchführung von Enthäutungs- und

Ausweideprozessen entscheidend, um eine Kontamination des Rindfleisches mit kältetoleranten Clostridien zu vermeiden.

2.2. Veröffentlichung

Die Ergebnisse des Arbeitspaketes 1 wurden bereits im peer-reviewed Journal „Food Microbiology“, veröffentlicht:

Dorn-In, S., Zand, V., Angerer, J., Özbek, K., Eibl, C., Schwaiger, K., 2025. **Cold-tolerant *Clostridium* spp. related to meat spoilage in cattle farms in Austria.** Food Microbiology. 430. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111069> ([siehe Anlage 1](#)).

Darüber hinaus wurden Teile der Ergebnisse als Posterpräsentation und/oder Beitrag auf Konferenzen vorgestellt oder in agrarischen Fachzeitschriften veröffentlicht:

Dorn-In, S., Angerer, J., Zand, V., Eibl, C., Khol, J.C., Schwaiger, K., 2023. **Vorkommen kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich.** 63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; SEP 26-29, 2023; Garmisch-Partenkirchen, Deutschland. ([siehe Anlage 2](#))

Dorn-In, S., Zand, V., Angerer, J., Özbek, K., Eibl, C., Schwaiger, K., 2025. **Vorkommen kältetoleranter Clostridien, Verderbserreger von Fleisch, in Rinderbetrieben in Österreich.** 79. Arbeitsgemeinschaft für Lebensmittel- Veterinär- und Agrarwesen (ALVA)-Tagung; MAI 26-27, 2025; HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Raumberg, Österreich. https://www.alva.at/images/Publikationen/Tagungsband/Tagungsband_2025.pdf ([siehe Anlage 3](#))

Dorn-In, S., Angerer, J., Zand, V., Casarin, S., Eibl, C., Schwaiger, K., 2025. **Kältetolerante Clostridien in vakuumverpacktem Rindfleisch aus Österreich: Vorkommen und Kontaminationswege.** Klauentierpraxis: Die Zeitschrift der Österreichischen Buiatrischen Gesellschaft (wird im Dezember 2025 erscheinen). ([siehe Anlage 4](#))

3. Arbeitspaket 2: Verderb von Sous-vide Fleisch durch kältetolerante Clostridien

3.1 Zusammenfassung

Die zunehmende Beliebtheit der Sous-vide (SV) Garmethode erfordert die Erforschung der mikrobiologischen Qualität, der sensorischen Veränderungen und der Haltbarkeit der SV-Produkte. Zahlreiche Studien zeigen, dass SV-Garen die Anzahl der (pathogenen) Mikroorganismen deutlich verringert, was sich positiv auf die Haltbarkeit und Sicherheit von SV-Produkten auswirkt. Allerdings können Sporenbildner, insbesondere kältetolerante Clostridien wie die Spezies *Clostridium estertheticum*, das SV-Garen überleben und sich anschließend weiter vermehren. Diese Bakterien können eine große Menge an Gasen und flüchtigen Verbindungen wie Butanol, Butylester und Buttersäure produzieren, die die Aufblähung der Verpackung, die so genannte „Blown Pack Spoilage“ (BPS) und die typischen Verderbsgerüche des vakuumverpackten Fleisches verursachen. Ziel der Studie war es, den Verderb von SV-Fleisch durch *C. estertheticum* zu charakterisieren, nämlich Gasbildung, Verderbsgeruch, Verlust von Fleischtropfsaft und Veränderung des pH-Wertes. Zusätzlich wurden die SV- und Nicht-SV-Fleischproben mikrobiologisch und molekularbiologisch analysiert, um die Anzahl der Bakterien im Allgemeinen und *C. estertheticum* im Speziellen zu bestimmen. Darüber hinaus wurden die Kolonien aus verschiedenen Nährböden mittels MALDI-TOF-MS auf Spezies-Ebene identifiziert. Insgesamt wurden 90 Fleischteilproben untersucht, darunter 54 Fleischproben, die mit drei Stämmen von *C. estertheticum* artifiziell kontaminiert und vakuumverpackt wurden, um die Veränderung des Mikrobioms unter Einfluss dieser Spezies zu analysieren. Davon wurden 27 Fleischproben SV gegart (55 °C, 70 Minuten). Nach 28 Tagen Lagerung bei 4 °C zeigten die SV-Fleischproben eine statistisch signifikant höhere Menge an Gas und deutlichen Verderbsgeruch im Vergleich zu Nicht-SV-Fleischproben ($p < 0,05$). Der Fleischtropfsaftverlust und der pH-Wert von SV-Fleisch waren ebenfalls höher, wurden aber nicht als Verderbsmerkmale von SV-Fleisch durch *C. estertheticum* betrachtet. Die mikrobiologische Untersuchung zeigt, dass SV-Fleischproben niedrige anaerobe/aerobe mesophile Keimzahlen und eine sehr niedrige bis nicht nachweisbare Anzahl an Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae und Hefen aufwiesen. Allerdings gab es deutliche Verderbsanzeichen, wenn sie mit *C. estertheticum* kontaminiert waren. In den Nicht-SV-Proben konnte eine Wachstumshemmung bei zwei der drei *C. estertheticum*-Stämme durch die konkurrierende Fleischmikrobiota beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kontaminiertes SV-Rindfleisch schneller deutliche Verderbsanzeichen aufweist und im Vergleich zu nicht SV-gegartem Rindfleisch kürzer haltbar ist. Die Ergebnisse dieser Studie konnten zu einem besseren Verständnis der Rolle von *C. estertheticum* beim Verderb von SV-Fleisch beigetragen.

3.2 Veröffentlichung

Die Ergebnisse des Arbeitspaketes 2 wurden bereits im peer-reviewed Journal „International Journal of Food Microbiology“, veröffentlicht:

Dorn-In, S., El-Seniti, R., Schwaiger, K., 2025. **Spoilage characteristics of sous-vide beef caused by *Clostridium estertheticum***. International Journal of Food Microbiology 430. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111069> (siehe Anlage 5).

Darüber hinaus wurden Teile der Ergebnisse als Vortrag und Beitrag auf Konferenzen vorgestellt:

Dorn-In, S., El-Seniti, R., Schwaiger, K., 2025. **Verderbscharakteristiken von Sous-Vide-Rindfleisch, verursacht durch *Clostridium estertheticum***. 65. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; SEP 23-26, 2025; Garmisch-Partenkirchen, Deutschland (siehe Anlage 6).

4. Arbeitspaket 3: Prüfung der Pathogenität isolierter kältetoleranter Clostridien

4.1 Zusammenfassung

Hinsichtlich der Toxinbildung durch kältetolerante Clostridien gibt es nur wenige Daten. Bislang wurde in keiner Studie eine potenzielle Zelltoxizität dieser Bakterien mittels Zellkulturmodellen überprüft. Ziel des Arbeitspakets 3 war es daher, einen Überblick über den Einfluss kältetoleranter Clostridien auf lebende Zellen zu geben. Insgesamt wurden 20 Isolate von 8 Spezies kältetoleranter Clostridien auf ihre Toxinbildung getestet: *C. botulinum*, *C. bowmanii*, *C. estertheticum*, *C. frigidicarnis*, *C. gasigenes*, *C. subterminale*, *C. tagluense* und *Lacrimispora algidixylanolytica*. Von den 20 Isolaten stammten 16 aus Kot und Haut von Rindern aus dem Arbeitspaket 1; 4 Isolate stammten aus Stammsammlungen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Alle Isolate wurden anaerob in einer PYGS-Bouillon bei 10 °C und 37 °C für 4, 5 und 6 Wochen (biologische Replikate) angereichert. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei 10 °C inkubierte *C. frigidicarnis* Caco-2-Zellen schädigten. Die verbleibenden Stämme produzierten bei dieser Temperatur keine zelltoxischen Substanzen. Die Testisolate, die bei 37 °C wuchsen (zwei von drei Stämmen von *C. frigidicarnis* und einer von zwei Stämmen von *C. botulinum*) waren in der Lage, zelltoxische Substanzen zu produzieren. Die Dauer des Kontakts spielt dabei offensichtlich eine wichtige Rolle, da Caco-2-Zellen bei einer 24-stündigen Bebrütung mit den Überständen der Testisolate nicht so stark geschädigt wurden wie bei einer 48-stündigen Inkubation. Die Ergebnisse des Arbeitspakets 3 deuten darauf hin, dass einige kältetolerante Clostridien-Spezies toxische Substanzen produzieren. Insbesondere für die Lebensmittelsicherheit von Bedeutung ist die Spezies *C. frigidicarnis*, da sie sowohl bei 10 °C als auch bei 37 °C toxische Substanzen produziert. Daher können diese auch in vakuumverpacktem, gekühltem Fleisch entstehen. Eine detaillierte und umfassende Studie mit weiteren Stämmen der beiden Spezies (*C. frigidicarnis* und *C. botulinum*) und weiteren Isolaten aus der Gruppe der kältetoleranten Clostridien ist jedoch erforderlich, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und eine zuverlässige Risikoeinschätzung vornehmen zu können.

4.2 Proben

Insgesamt wurden 20 Clostridien-Isolate (siehe [Tabelle 1](#)) auf ihre Toxinbildung getestet. Isolate Nr. 1 bis Nr. 16 wurden aus Kot oder Haut von Rindern in Arbeitspaket 1 isoliert. Isolate Nr. 17 bis Nr. 20 sind aus der Stammsammlung der DSMZ. *Lacrimispora algidixylanolytica* weist genetische Ähnlichkeit mit Clostridien auf, somit wurde sie zuvor von [Broda et al. \(2000a\)](#) als *C. algidixylanolyticum* bezeichnet und später von [Haas und Blanchard \(2020\)](#) neu klassifiziert.

Caco-2-Zellen (DSMZ-Nr. ACC 169) wurden von Prof. Dr. med. vet. Franziska Dengler (ehemals Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) zur Verfügung gestellt.

4.3 Methode

Vorbereitung des Clostridien-Inokulums

Die Testisolate wurden initial auf Blutagar (CBA, Columbia Blut Agar + 5 % Scharfblut, BioMérieux™) subkultiviert und anaerob bei 10 °C für 3 Wochen bebrütet. Die resultierenden Kolonien wurden jeweils in 10 ml Peptone-Yeast-Glucose-Starch (PYGS) Bouillon ([Lund et al., 1990](#)) subkultiviert. Ein Ansatz wurde bei 10 °C, der andere bei 37 °C für 4, 5 und 6 Wochen bebrütet. Die jeweilige Bebrütungsdauer repräsentiert die jeweilige biologische Replikation (Durchgänge).

Die Inkubationstemperatur von 10 °C wurde gewählt, um die für die Fleischlagerung typischen niedrigen Temperaturen (< 4 °C) möglichst realitätsnah nachzuahmen, gleichzeitig aber ein beschleunigtes Wachstum der Testisolate zu ermöglichen. Zusätzlich wurde eine Bebrütung bei 37 °C durchgeführt, um zu prüfen, ob die Isolate auch bei Körpertemperatur von Mensch und Tier wachsen und potenziell Toxine bilden können. Nach vierwöchiger Anreicherung in PYGS-Bouillon wurden jeweils 20 µl auf Blutagar aufgebracht und anaerob für 2–3 Wochen bei 10 °C bzw. 37 °C weiter inkubiert. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Isolate unter den gewählten Bedingungen in PYGS kultivierbar sind. Da Clostridien beim Wachstum toxische oder schädliche Substanzen freisetzen können, dienten die PYGS-Anreicherungen im Anschluss als Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Toxinbildung sowie der zellulären Toxizität gegenüber Caco-2-Zellen.

Nach 4, 5 und 6 Wochen (entsprach 1., 2. und 3. Durchgang) Bebrütung wurden 0,5 ml der PYGS-Anreicherungen der jeweiligen Clostridien-Isolate in 1,5 ml-Röhrchen transferiert und

bei $16.000 \times g$ für 1 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 1,5-ml-Röhrchen übertragen und als Ausgangsmaterial für den Test auf die Toxinproduktion verwendet.

Vorbereitung Caco-2-Zellkultur

Für die drei Passagen (drei biologische Wiederholungen) in dieser Studie befanden sich die Caco-2 in den Passagen 51, 52 und 53. Das Zellkulturmedium wurde zuvor aus Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM), Fetalem Kälberserum, Penicillin-Streptomycin und L-Glutaminlösung (Merck/Sigma Aldrich) hergestellt. In diesem Zellkulturmedium wurden die Caco-2-Zellen in einer Zellkulturflasche (175 cm² Flasche) bei 37 °C im Zellkulturbrutschrank mit 5 % CO₂ kultiviert.

Nach 3 bis 4 Tagen Bebrütung wurde das alte Medium verworfen und neues Medium hinzugefügt. Drei Tage später, wenn die Caco-2-Zellen zu 90 % konfluent sind (90 % des Bodens sind von Caco-2-Zellen angewachsen), werden sie gesplittet. Die Caco-2-Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt. Danach wurden insgesamt 1×10^6 Zellen in eine 175 cm² Flasche mit 35 ml Zellkulturmedium gegeben. Diese Subkultur wurde bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ als neue Passage (neues biologisches Replikat), wie oben beschrieben, inkubiert.

Durchführung des Tests auf die Toxinbildung

Pro Durchgang wurden zwei Mikrodilutionsplatten (96 Wells, Flachboden) vorbereitet. Caco-2-Zellen, die 7 Tage alt und zu 90 % konfluent waren, wurden nach der Teilung (Splitten) gezählt. Danach wurden 90 µl der Caco-2-Suspension, die zwischen 1×10^4 und 1×10^5 Caco-2-Zellen enthält, in jedes Well (37,4 mm²) der Mikrodilutionsplatte pipettiert. Die beiden Mikrodilutionsplatten wurden im Zellkulturbrutschrank mit 5 % CO₂ für 24 h bzw. 48 h bebrütet, wenn sie nach 24 h Inkubationszeit noch nicht konfluent waren.

Danach wurden 10 µl des Überstands jeweiliges Clostridien-Isolat in 3 Wells transferiert (= 3 technische Replikate, siehe [Abbildung 1](#)). Die erste Mikrodilutionsplatte wurde für 24 h, die zweite Platte für 48 h inkubiert. Anschließend wurde der LDH-Assay durchgeführt.

Das beschriebene Verfahren wurde in drei Durchläufen (drei biologische Replikate) durchgeführt, wobei jeder Durchlauf drei technische Replikate enthielt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK	NK	NK	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3
B	C4	C4	C4	C5	C5	C5	C6	C6	C6	C7	C7	C7
C	C8	C8	C8	C9	C9	C9	C10	C10	C10	C11	C11	C11
D	C12	C12	C12	C13	C13	C13	C14	C14	C14	C15	C15	C15
E	C16	C16	C16	C17	C17	C17	C18	C18	C18	C19	C19	C19
F	C20	C20	C20									
G	NADH: 0	NADH: 0	NADH: 2	NADH: 2	NADH: 4	NADH: 4	NADH: 6	NADH: 6	NADH: 8	NADH: 8	NADH: 10	NADH: 10
H	PK	PK										

Abbildung 1: Plattenbelegung für Test auf die Toxinbildung der Clostridien-Isolate (C1 – C20); NK = Negativkontrolle (Caco-2-Zellen-Suspension mit PYGS-Bouillon ohne Clostridien); PK = Positivkontrolle für den LDH-Assay; NADH: Konzentrationen 0 bis 10 = Standard für den LDH-Assay

Durchführung der Laktatdehydrogenase-Aktivität (LDH)-Assay

Laktatdehydrogenase (Lactate Dehydrogenase, LDH) ist ein Oxidoreduktase-Enzym, das die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Zellen setzen LDH nach einer Schädigung frei. Da LDH ein relativ stabiles Enzym ist, wird es häufig zur Bewertung von Gewebeschäden und Zelltoxizität verwendet.

Nach 24- und 48-stündiger Inkubation wurde die Platte 15 Minuten lang bei 4 °C mit 10.000 × g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine Mikrodilutionsplatte (Flachboden) mit der Lösung für den LDH-Assay vorbereitet. Das Verfahren zur Herstellung der Positivkontrolle und des Master-Reaktionsmixes entsprach den Anweisungen des Herstellers des LDH-Assay-Kits (Produkt Nr.: MAK066, Sigma-Aldrich®). Zunächst wurden 50 µl der Mischung von Clostridien-Überstand und Caco-2-Zellen ins entsprechende Well der Mikrodilutionsplatte gegeben. Dann wurden jedem Well 50 µl des Master-Reaktionsmixes hinzugefügt. Das Gesamtvolumen betrug somit 100 µl. Unmittelbar nach der Vorbereitung wurde die Platte mit Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet (1. Messung, circa 5 Minuten nach der Fertigung der Vorbereitung) und gleich danach bei 37 °C inkubiert. Die 2., 3. und 4. Messungen wurden jeweils 10, 15 und 30 Minuten nach der Inkubation durchgeführt.

4.4 Ergebnisse

Nach einer Inkubationszeit von 4 Wochen bei 10 °C oder 37 °C wurde das Wachstum der Clostridien-Isolate in den PYGS-Anreicherungen überprüft, indem sie auf CBA subkultiviert

und bebrütet wurden. Wie aus [Tabelle 1](#) hervorgeht, waren alle Testisolate in der Lage, bei 10 °C zu wachsen, aber nur 10 Isolate wuchsen bei 37 °C.

Tabelle 1: Clostridien-Isolate unterschiedlicher Herkunft und Wachstum bei 10 °C und 37 °C

Nr.	Spezies	Isolat Nr.	Herkunft	Wachstumsgrad bei*	
				10 °C	37 °C
1	<i>C. gasigenes</i>	3K3-3	Rinderkot	+++	-
2	<i>C. gasigenes</i>	6K2-1	Rinderkot	+++	-
3	<i>C. tagluense</i>	24K1-1	Rinderkot	+++	-
4	<i>C. tagluense</i>	25K10-1	Rinderkot	+++	+++
5	<i>C. frigidicarnis</i>	22K7-1	Rinderkot	+++	+
6	<i>C. frigidicarnis</i>	1T8-1	Rinderkot	+++	+++
7	<i>C. estertheticum</i>	10K1	Rinderkot	+++	-
8	<i>C. estertheticum</i>	15K6	Rinderkot	+++	-
9	<i>C. botulinum</i>	1K8-2	Rinderkot	+	+
10	<i>C. botulinum</i>	22K8-3	Rinderkot	++	++
11	<i>C. bowmanii</i>	2T9-2	Rinderhaut	++	-
12	<i>C. bowmanii</i>	3K1-2	Rinderkot	++	-
13	<i>C. subterminale</i>	14K9-2	Rinderkot	+	++
14	<i>C. subterminale</i>	22K5-1	Rinderkot	+	++
15	<i>La. algidixylanolytica</i>	2T2-1	Rinderhaut	+++	+++
16	<i>La. algidixylanolytica</i>	31T1-2	Rinderhaut	+++	+++
17	<i>C. estertheticum</i>	-	DSM 8809	+++	-
18	<i>C. tagluense</i>	-	DSM 17763	+++	-
19	<i>C. gasigenes</i>	-	DSM 12272	+++	-
20	<i>C. frigidicarnis</i>	-	DSM 12271	+++	+++

* Wachstumsgrad; +++ = sehr gut (Rasenwachstum), ++ = gut (Einzelkolonien nicht zählbar), + = schwach (Einzelkolonien zählbar) und - = kein Wachstum

Alle Isolate, die bei einer Inkubationstemperatur von 10 °C wuchsen (n = 20) und jene, die bei 37 °C wuchsen (n = 10), wurden auf ihre Toxizität mittels Caco-2-Zellen getestet. [Abbildung 2](#) zeigt die LDH-Werte von 4 verschiedenen Bebrütungskonditionen der drei biologischen und drei technischen Replikate. Es handelt sich um Überstände von PYGS-Kulturen aus der Inkubation bei 10 °C bzw. 37 °C, die eine Kontaktzeit von 24 h und 48 h mit Caco2-Zellen hatten. Lediglich die LDH-Werte aus der ersten Messung (5 Minuten nach der Fertigung der Vorbereitung) wurden für die Auswertung verwendet. Die LDH-Werte der Messungen nach einer Inkubation von 10, 15 und 30 Minuten waren bereits gesättigt und somit nicht auswertbar.

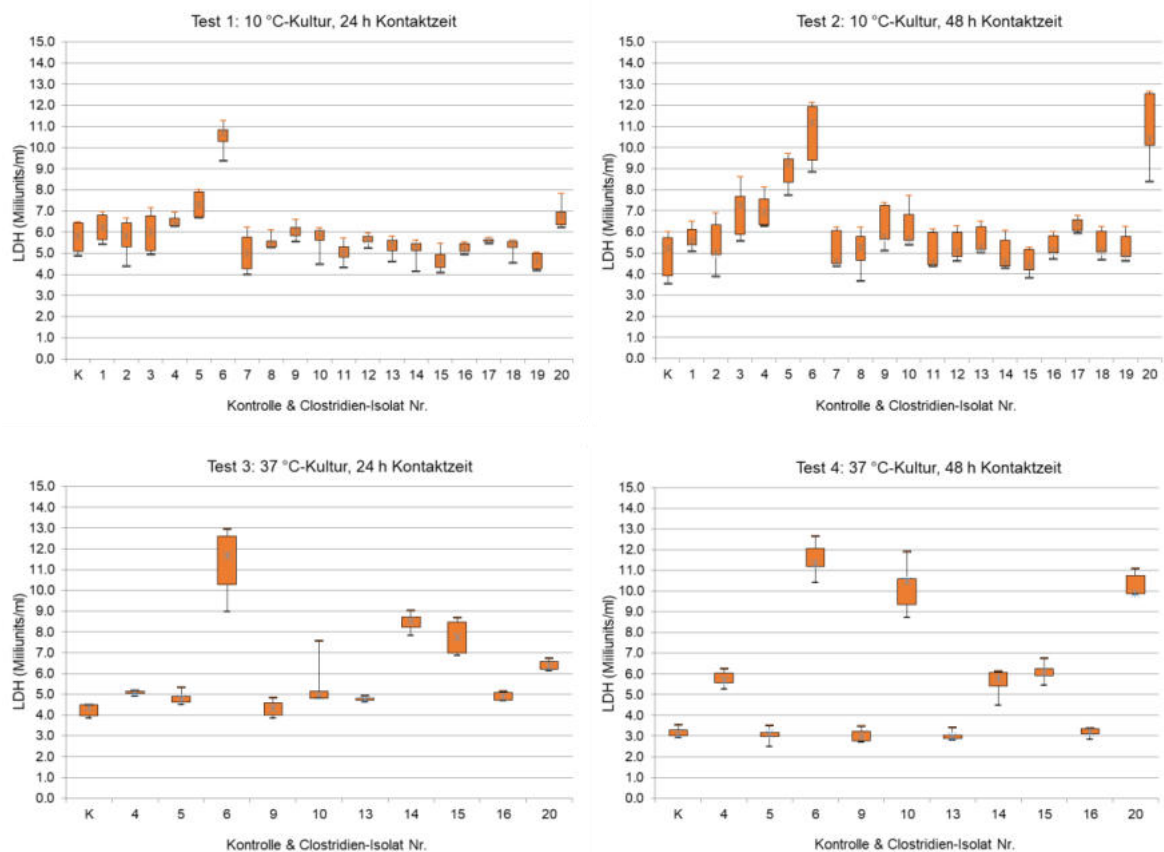


Abbildung 2: Ergebnis LDH-Assay von Testisolaten. K = Negativkontrolle; Isolate Nr. 1-20 entspricht der [Tabelle 1](#). Hohe LDH-Werte deuten einen hohen Schädigungsgrad der Caco-2-Zellen an. Die Messung der LDH-Aktivitäten wurde innerhalb von 5 Minuten nach der Vorbereitung des LDH-Assays durchgeführt.

Die Ergebnisse der Clostridien-Isolate, die bei 10 °C in PYGS angereichert wurden, zeigen, dass das Testisolat Nr. 6 (*C. frigidicarnis*) und Nr. 20 (*C. frigidicarnis*, DSM 12271) zelltoxisch sind. Die entsprechenden LDH-Werte sind signifikant höher als die der Negativkontrolle und der anderen Isolate. Der toxische Effekt steigerte sich bei einer Bebrütung der Platte für 48 Stunden (siehe [Abbildung 2](#)).

Die Isolate, die bei 37 °C inkubiert wurden, zeigten ein ähnliches Bild: Caco-2-Zellen, die mit dem Isolat Nr. 6 (*C. frigidicarnis*) 24 Stunden inkubiert wurden, wiesen ein höheres Maß an Schädigung auf (hohe LDH-Werte). Nach 48-stündiger Inkubation verursachten neben Isolat Nr. 6 ebenfalls die Isolate Nr. 10 (*C. botulinum*) und Nr. 20 (*C. frigidicarnis*) eine hohe Schädigung der Caco-2-Zellen (siehe [Abbildung 2](#)). Die Isolate Nr. 5 (*C. frigidicarnis*) und Nr. 9 (*C. botulinum*) zeigten bei 37 °C ein geringes Wachstum (siehe [Tabelle 1](#)), so dass sie nur sehr

geringe Mengen an Toxin produzieren konnten und daher die Caco-2-Zellen nicht schädigten (niedrige LDH-Werte).

4.5 Diskussion

Wie in den Arbeitspaketen 1, 2 und 4 erwähnt, werden kältetolerante Clostridien oft mit dem Verderb von vakuumverpacktem Fleisch in Verbindung gebracht. Diese Punkte sind wichtig im Hinblick auf Lebensmittelverschwendung, Lebensmittelverluste und nachhaltige Landwirtschaft. Obwohl die Aspekte Lebensmittelsicherheit und Toxinproduktion durch kältetolerante Clostridien gelegentlich diskutiert wurden, gibt es bisher nur wenige relevante Studien (siehe [Einleitung, Abschnitt 1.2.3](#)). In keiner dieser Studien wurde die potenzielle Toxinproduktion von kältetoleranten Clostridien anhand von Zellkulturen untersucht.

Die in diesem Arbeitspaket untersuchten Clostridien-Isolate wurden aus Kot und Haut von Rindern aus dem Arbeitspaket 1 isoliert. Unter den Isolierten Spezies befinden sich *C. estertheticum* und *C. gasigenes*, die als Ursache der BPS, einer Aufgasung von vakuumverpacktem Fleisch, bekannt sind. Die anderen Test-Spezies, nämlich *C. botulinum*, *C. frigidicarnis*, *C. tagluense*, *C. bowmanii* und *Lacrimispora algidixylanolytica*, wurden nur selten in vakuumverpacktem Fleisch detektiert. Über ihre Rolle als Verderbserreger von vakuumverpacktem Fleisch ist wenig bekannt bzw. wurde diese bislang wenig untersucht. Da sie im Arbeitspaket 1 aber relativ häufig in Kot und Haut von Rindern nachgewiesen wurden, wurden sie in den Toxizitätstest mit aufgenommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubationstemperatur ein wichtiger Einflussfaktor für die Toxinbildung zu sein scheint. Abgesehen von *C. frigidicarnis* (Isolate Nr. 6 und Nr. 20) konnte kein weiteres Testisolat bei 10 °C Caco-2-Zellen-schädigende Toxine produzieren. Die bei 37 °C wachsenden Testisolate, insbesondere *C. frigidicarnis* (Isolate Nr. 6 und Nr. 20) und *C. botulinum* (Nr. 10), waren zelltoxisch. Das Isolat Nr. 5 von *C. frigidicarnis* konnte bei 37 °C nur geringgradig wachsen, wodurch sich erklären könnte, warum es wenig oder keine Toxine produzierte. Diese Phänomene wurden auch bei *C. botulinum*, Isolat Nr. 9, beobachtet. Auch die Kontaktzeit spielt eine wichtige Rolle. Caco-2-Zellen, die 24 Stunden lang mit dem Überstand der PYGS-Anreicherung der Testisolate bebrütet wurden, nahmen weniger Schaden (niedrige LDH-Werte) als jene, die einer 48-stündigen Inkubation unterzogen wurden.

Die Ergebnisse dieses Arbeitspakets deuten darauf hin, dass einige kältetolerante *Clostridium*-Spezies in der Lage sind, Toxine zu produzieren, insbesondere *C. frigidicarnis* und *C. botulinum*.

Alle Isolate, die nur bei 10 °C wuchsen, produzierten kein oder nur sehr wenig Toxin. Die Faktoren Temperatur und Wachstumsgrad beeinflussten die Toxinproduktion direkt. Eine verlängerte Kontaktzeit zwischen Caco-2-Zellen und Clostridien-Überstand erhöhte den Grad der Schädigung der Caco-2-Zellen. Da zwei von drei Isolaten der Art *C. frigidicarnis* selbst bei 10 °C Toxine produzierten, ist die Spezies für die Lebensmittelsicherheit von Bedeutung. Über *C. frigidicarnis* ist bis dato nur wenig bekannt. Die Testisolate von *C. botulinum* konnten bei 10 °C überleben oder langsam wachsen. Sie spielen eine Rolle für die Lebensmittelsicherheit, wenn sie den Herstellungsprozess von Konserven überleben und bei der angewandten Lagertemperatur (normalerweise bei Raumtemperatur) wachsen. Zur Überprüfung der Frage, ob die beiden toxinbildenden Spezies in gekühltem, vakuumverpacktem Fleisch wachsen können oder ob sie den Prozess der Lebensmittelherstellung überleben und während der Lagerung weiterwachsen können, sind weiterführende Studien erforderlich. Darüber hinaus sollte eine größere Anzahl der Stämme der beiden Spezies untersucht werden, um einen guten Überblick zu erhalten und die Daten statistisch auswerten zu können.

5. Arbeitspaket 4: Nachweis von *C. estertheticum* mittels GC-MS Analyse

5.1 Zusammenfassung

Kältetolerante Clostridien können zahlreiche Substanzen produzieren, die potenziell Geruchsabweichungen in Lebensmitteln verursachen. Ihr Wachstum hängt von den Bedingungen in den vakuumverpackten Fleischproben ab, insbesondere von der Anwesenheit konkurrierender fakultativ anaerober psychrotropher Bakterien, wie z. B. Milchsäurebakterien, die auch bei niedrigen Lagertemperaturen wachsen. Ziel dieses Arbeitspakets war es daher, mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)-Analyse die Substanzen, die typischerweise von kältetoleranten Clostridien produziert werden, zu identifizieren. Für diesen Zweck wurden Fleischproben (n = 90) aus dem AP2 verwendet. Dabei handelte es sich um frisches Fleisch, Sous-vide-(SV)- und Nicht-SV-behandeltes Fleisch, beide mit und ohne artifizielle Kontamination mit *C. estertheticum*. Die Analyse wurde mit der manuellen Headspace-Festphasen-Mikroextraktions-GC-MS-Methode (HS-SPME-GC-MS) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Ergebnis von AP2 verglichen, d. h. mit dem Grad der Gasbildung (Blown Pack Spoilage (BPS)-Score) und dem Fehlgeruch (Geruch-Score) sowie mit der Anzahl der mittels qPCR quantifizierten *C. estertheticum* in den untersuchten Fleischproben. Das Ergebnis der GC-MS-Analyse zeigte: Zwei Substanzen, Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol, sind ausschließlich in den mit *C. estertheticum* kontaminierten Proben vorhanden. Ihr Auftreten korreliert mit dem Auftreten von Gasbildung und Fehlgeruch der entsprechenden Fleischproben. Allerdings konnten die beiden Substanzen nicht in allen mit *C. estertheticum* kontaminierten Fleischproben nachgewiesen werden. Dies betraf insbesondere jene Proben, die nur eine geringe Keimzahl von *C. estertheticum* aufwiesen, nämlich $< 3,5 \log_{10}$ KbE/g bei SV-Fleisch oder $< 4,5 \log_{10}$ KbE/g bei Nicht-SV-Fleisch. Es bleibt offen, ob *C. estertheticum* in diesen Proben keine ausreichenden Mengen an beiden Stoffe gebildet hat oder ob die mittels qPCR nachgewiesene DNA aus inaktiven oder toten Zellen stammte, die keine relevanten Stoffe bilden können. Da die GC-MS-Analyse als sensitive Nachweismethode gilt, sollten offene Fragen zur Bildung von Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol durch *C. estertheticum* und andere kältetolerante *Clostridium*-Spezies in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Dabei sollten insbesondere potenzielle Einflussfaktoren wie die Wachstumsbedingungen und das Vorhandensein konkurrierender Fleischmikrobiota berücksichtigt werden.

5.2 Proben

Sämtliche Fleischproben (n = 90) stammten aus dem Arbeitspaket 2 und teilten sich in 10 Gruppen. In drei Durchläufen (= 3 biologische Replikate), wurden je 30 Proben und 3 Proben pro Gruppe (= 3 technische Replikate) getestet. Daraus ergab sich für alle 3 Durchläufe eine Gesamtzahl von 9 Proben pro Gruppe (siehe [Tabelle 1](#)). Gruppe 1 war frisches Fleisch, Gruppe 2 war frisches Fleisch, das vakuumverpackt und einer SV-Behandlung unterzogen wurde. Diese beiden Gruppen wurden am selben Tag analysiert. Die Fleischgruppen 3 bis 5 wurden jeweils mit den *C. estertheticum*-Stämmen C1 (DSM 8809), C2 (isoliert aus vakuumverpacktem Rindfleisch) und C3 (isoliert aus Rinderkot) kontaminiert, während es sich bei Gruppe 6 um natives Fleisch handelt. Die Fleischproben der Gruppen 3 bis 6 wurden vakuumverpackt, einer SV-Behandlung (55 °C, 70 Minuten) unterzogen und anschließend 28 Tage lang bei 4 °C gelagert, bevor sie analysiert wurden. Fleischproben der Gruppen 7 bis 10 wurden jeweils wie Gruppen 3 bis 6 vorbereitet, aber nicht der SV-Behandlung unterzogen. Weitere relevante Informationen über Fleisch und über die Vorbereitung des *C. estertheticum*-Inokulums sind in der Veröffentlichung des Arbeitspakets 2 zu finden.

Tabelle 1: Rindfleischprobengruppen 1 bis 10 (insgesamt n = 90) für alle drei biologischen Replikate (Durchläufe)

Gruppe	Probe*	n	Sous-vide Behandlung	Lagerungs- temperature	Tag der Untersuchung
1	Frisches Fleisch	9	-	-	1
2	Fleisch	9	√	-	1
3	Fleisch & C1	9	√	4 °C	28
4	Fleisch & C2	9	√	4 °C	28
5	Fleisch & C3	9	√	4 °C	28
6	Fleisch	9	√	4 °C	28
7	Fleisch & C1	9	-	4 °C	28
8	Fleisch & C2	9	-	4 °C	28
9	Fleisch & C3	9	-	4 °C	28
10	Fleisch	9	-	4 °C	28

* Gruppe 1 war nicht vakuumiert. Rindfleischproben, die mit jeweiligem *C. estertheticum*-Stamm kontaminiert waren: C1 = DSM 8809; C2 = isoliert aus vakuumverpacktem Rindfleisch; C3 = isoliert aus Rinderkot

5.3 Methode

Die GC-MS-Analyse wurde mittels manueller Headspace-Solid-Phase Microextraction-GC-MS Methode (HS-SPME-GC-MS) gemäß [Argyri et al. \(2015\)](#) durchgeführt. Bei der verwendeten Faserbeschichtung handelte es sich um eine Divinylbenzol-Carboxen-Polydimethylsiloxan Beschichtung (DVB-CAR-PDMS) mit einer Schichtdicke von 50/30 µm. Rindfleischproben wurden zerkleinert, jeweils 1 g in ein Vial gefüllt und bei -20 °C bis zur Analyse gelagert. Für die Analyse wurde das Vial mit der Probe direkt aus dem Gefrierschrank entnommen und mit 5 ml 25 % NaCl und einem kleinen Magnetührstäbchen versetzt. Die Proben wurden unter Rühren bei 40°C für 15 min erhitzt. Danach wurde die Hohlnadel des Faserhalters, in der die SPME-Faser verborgen ist, durch die Membran im Deckel des Vials gestochen, die SPME-Faser wurde für 30 min bei 40 °C unter Rühren dem Kopfraum des Vials ausgesetzt und dabei mit den sich darin befindlichen volatilen organischen Verbindungen aus der Probe inkubiert. Während der Inkubation adsorbieren die volatilen organischen Verbindungen an der SPME-Faser und reichern sich in weiterer Folge auf ihr an.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die SPME-Faser in die Injektionsvorrichtung des GC-MS-Geräts gesteckt und der GC-Lauf gestartet. Durch die hohe Temperatur in der Injektionsvorrichtung wurden die volatilen organischen Verbindungen, die sich auf der SPME-Faser befanden, desorbiert. Nach 5 min wurde die SPME-Faser entnommen und für weitere Messungen verwendet.

Zur Durchführung der GC-MS-Analysen wurde ein GC-MS-System von Agilent (GC 8890, MSD 5977B) verwendet, das mit einer HP-5MS-Säule (Länge 30 m; 0,25 mm Innendurchmesser; 0,25 µm Innenschichtdicke) ausgestattet war. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,0 ml/min verwendet. Beim Einspritzen der Probe wurde der Split-Modus mit einer Split-Rate von 1:10 verwendet. Das Gerät wurde im SCAN-Modus betrieben, wobei ein Bereich zwischen 29 und 350 m/z bei einer Frequenz von 4,4 Scans/s abgedeckt wurde. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: Die initiale Temperatur von 40 °C wurde für 5 Minuten gehalten, anschließend mit einer Rate von 4 °C/min auf 150 °C, dann mit einer Rate von 30 °C/min auf 250 °C erhöht und für 5 min auf 250 °C gehalten. Die Laufzeit betrug insgesamt 40 min. Die Daten wurden mit dem Programm MassHunter Unknowns Analysis von Agilent ausgewertet. Die Peaks in den Chromatogrammen wurden mit einer Bibliothek bzw. Datenbank (NIST20) verglichen und anhand ihrer charakteristischen Massenspektren identifiziert.

5.4 Ergebnis

Insgesamt konnten in der vorliegenden Studie mehr als 98 Substanzen mittels GC-MS-Analyse nachgewiesen werden. [Argyri et al. \(2015\)](#) brachten 15 Substanzen (siehe [Abbildung 1](#)) mit dem Verderb von Fleisch in Verbindung. Diese Substanzen sind zusammen mit ihrer durchschnittlichen Fläche unter den Peaks in der [Abbildung 1](#) dargestellt. Von den 15 ausgewählten Substanzen kamen drei in den mit *C. estertheticum* kontaminierten Fleischproben vor, jedoch konnten sie in den anderen Fleischproben kaum nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Buttersäure-n-Butylester, Buttersäureethylester und 1-Butanol.

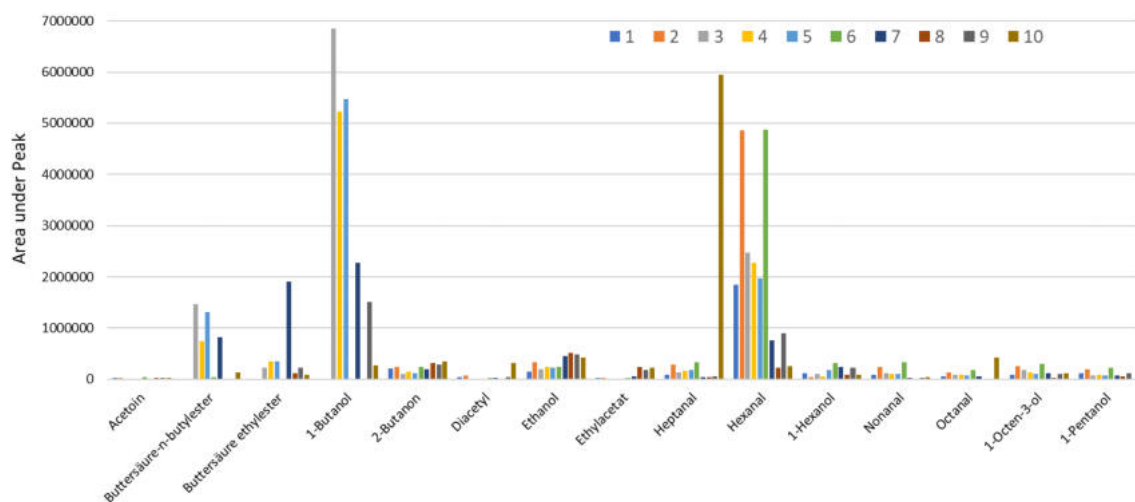


Abbildung 1: Ausgewählte Substanzen, die in den Fleischproben (Gruppen 1-10, Definition siehe [Tabelle 1](#)) detektiert wurden, und die durchschnittliche Fläche unter den Peaks

[Abbildung 2](#) zeigt die Fläche unter den Peaks der drei Substanzen (Buttersäure-n-Butylester, Buttersäureethylester und 1-Butanol) in Form eines Boxplots. Die Fläche unter den Peaks stellt keine absolute Menge der Substanzen in den Proben dar, sondern eine Hilfsgröße, die der Intensität des gemessenen Signals entspricht. Sie ist näherungsweise proportional zur tatsächlichen Stoffmenge und kann daher zur semiquantitativen Bestimmung der Substanzen, die mittels GC-MS-Analyse nach dem beschriebenen Verfahren gemessen wurden, verwendet werden. Zusätzlich werden die mittels qPCR bestimmten KbE/g-Äquivalente von *C. estertheticum*, die Gasbildung (BPS-Score) und der Geruch-Score der untersuchten Proben in [Abbildung 2](#) dargestellt ([Dorn-In et al., 2025](#)). In den Proben der Gruppen 1 (Frischfleisch) und 2 (frisches SV-Fleisch) wurde kein *C. estertheticum* nachgewiesen und es gab keine

Anzeichen von Verderb. In diesen Proben wurden die drei Substanzen ebenfalls nicht in relevanter Menge nachgewiesen. Die SV-Proben (Gruppen 3 bis 5), die zuvor mit *C. estertheticum* artifiziell kontaminiert worden waren, wiesen ein hohes Wachstum von *C. estertheticum* und deutlich höhere Werte (Scores) im Bezug auf Gasbildung und Verderbsgeruch auf. Übereinstimmend hiermit waren auch die Werte (Fläche unter den Peaks) von Buttersäure-n-Butylester, Buttersäureethylester und 1-Butanol sehr hoch. Es stellte sich heraus, dass die als Negativkontrolle dienende Probengruppe 6 ebenfalls Clostridien enthielt, jedoch war der Kontaminationsgrad so gering, dass er weder zu einem erhöhten BPS-Score noch zu einem Verderbsgeruch führten. In einer Probe der Gruppe 6 wurde *C. estertheticum* mit $3,5 \log_{10}$ KbE/g nachgewiesen. Sie war die einzige Probe dieser Gruppe, in der Buttersäure-n-Butylester, nicht jedoch Buttersäureethylester oder 1-Butanol nachgewiesen wurde.

Wie beschrieben in der Veröffentlichung des Arbeitspakets 2 konnte die konkurrierende Fleischmikrobiota (wie etwa Milchsäurebakterien) in den Gruppen 7 bis 9 das Wachstum von *C. estertheticum*, insbesondere von den Stämmen C2 und C3, negativ beeinflussen. In einer Probe der Gruppe 9 betrug die Anzahl von *C. estertheticum* $5,0 \log_{10}$ KbE/g. Es handelte sich um die einzige Probe der Gruppen 8 und 9, in der Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol in hohen Mengen nachgewiesen wurden. Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol wurden in keiner Probe der Gruppe 10 (ohne Kontamination mit *C. estertheticum*) in relevanter Menge nachgewiesen, wohl aber Buttersäureethylester. Dies bedeutet, dass Buttersäureethylester abgesehen von *C. estertheticum* auch noch von weiteren Mikroorganismen gebildet werden können.

Im Rahmen dieser Studie erwiesen sich Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol als Indikatorsubstanzen für das Wachstum von *C. estertheticum* in vakuumverpacktem Fleisch. Eine erhöhte Konzentration dieser Verbindungen wurde insbesondere dann gemeinsam mit sensorischen Verderbsmerkmalen (BPS-Score ≥ 2 ; Geruchs-Score ≥ 2) festgestellt, wenn die Keimzahlen von *C. estertheticum* in hitzebehandeltem Fleisch (Sous-vide) $\geq 3,5 \log_{10}$ KbE/g bzw. in nicht hitzebehandeltem Fleisch $\geq 4,5 \log_{10}$ KbE/g lagen.

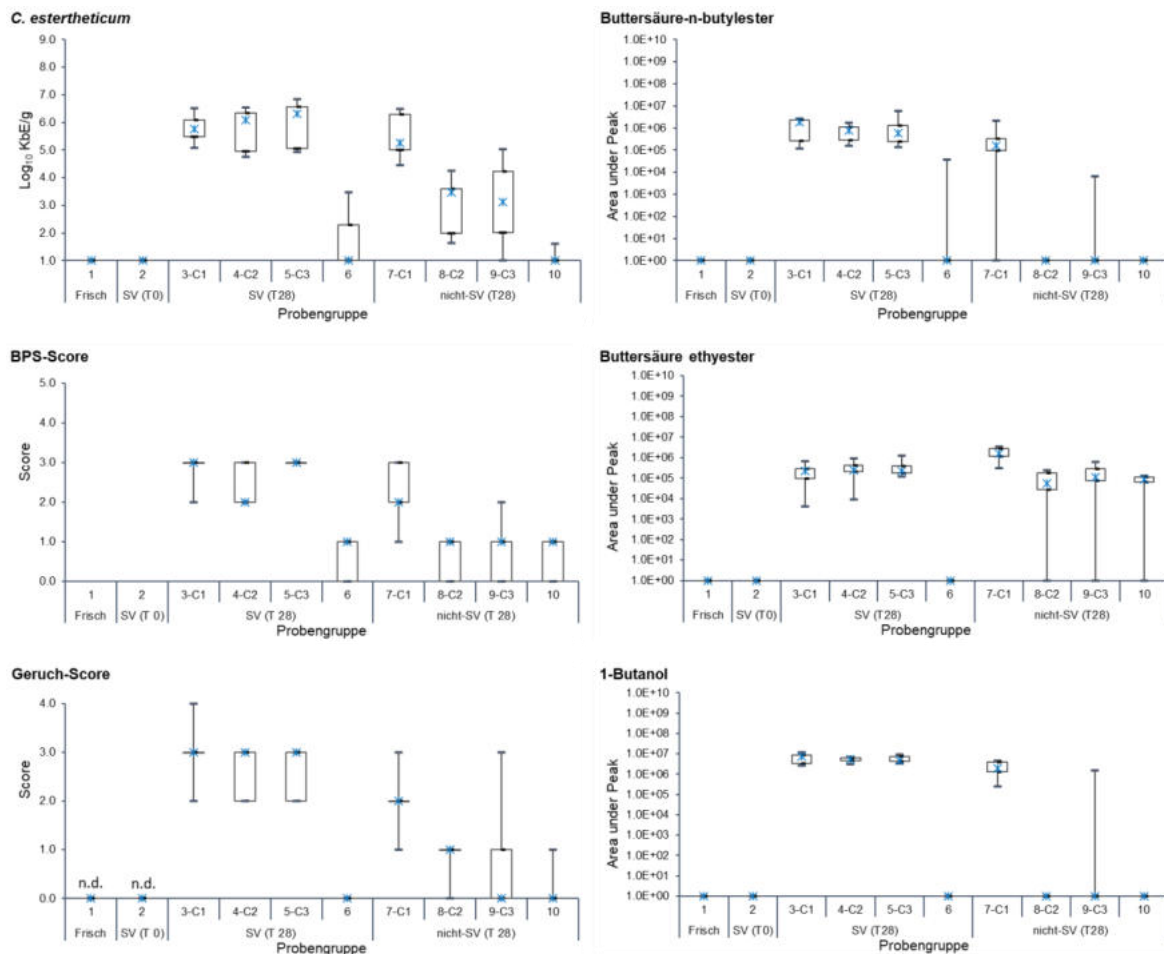


Abbildung 2: Vergleich der Fleischproben (Gruppen 1–10, Definition siehe [Tabelle 1](#)) hinsichtlich des Gehalts an *C. estertheticum*, der Gasbildung (BPS-Score), des Geruch-Scores und der Fläche unter den Peaks von Buttersäure-n-Butylester, Buttersäureethylester und 1-Butanol. **Beurteilung BPS-Score:** **0:** Keine Gasbildung, **1:** Wenige, kleine Gasblasen im Fleischsaft sichtbar, **2:** Aussehen wie bei Vakuumverlust, **3:** Offensichtlich aufgebläht, puffig, **4:** Auf volle Größe aufgebläht, Folie noch nicht straff gespannt, **5:** Auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt; **Beurteilung Geruch-Score;** **0:** Völlig einwandfrei, **1:** Akzeptabel, leichte Abweichung, **2:** Gerade noch akzeptabel, Abweichung vorhanden, **3:** Nicht mehr akzeptabel, deutlicher Verderbsgeruch, **4:** Extremer Verderbsgeruch

5.5 Diskussion

Da die Isolierung von kältetoleranten Clostridien aufgrund ihres extrem langsamen Wachstums sehr zeitintensiv ist (bis zu 8 Wochen), sollte überprüft werden, inwieweit schnellere und dennoch sensitive Methoden wie GC-MS zum Nachweis lebender und aktiver kältetoleranter Clostridien in Fleisch eingesetzt werden können. In dieser Studie wurden

Fleischproben mit und ohne Kontamination mit *C. estertheticum* mittels GC-MS analysiert. In insgesamt 90 Fleischproben konnten mindestens 98 Substanzen nachgewiesen werden. Als spezifisch mit dem Wachstum von *C. estertheticum* assoziiert erwiesen sich jedoch lediglich zwei Substanzen, in Zusammenhang standen, nämlich Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol.

Es ist zwar bereits bekannt, dass *C. estertheticum* und einige kältetolerante Clostridien-Spezies wie *C. gasigenes* und *C. algidicarnis* Buttersäure und 1-Butanol produzieren und dem Fleisch einen käseähnlichen Geruch verleihen ([Broda et al., 2000b](#), [Lawson et al., 1994](#)), jedoch gibt es bislang nur wenige Studien, die untersuchen, unter welchen Umständen sie die genannten Stoffe produzieren. Im Zuge dieser Studie wurde beobachtet, dass bei geringer *C. estertheticum*-Zahl ($< 3,5 \log_{10}$ KbE/g in SV-Fleisch und $< 4,5 \log_{10}$ KbE/g in nicht SV-Fleisch; siehe Gruppen 6, 8, 9) nur geringe, mit GC-MS-Methoden nicht nachweisbare Mengen an Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol gebildet wurden. Dementsprechend wiesen diese Fleischproben auch keinen Verderbsgeruch auf (Geruch-Score < 2) und produzierten nur wenig Gas (BPS-Score < 2). In dieser Studie sollte darüber hinaus geklärt werden, welche Faktoren das Wachstum von *C. estertheticum* derart beeinflussen, dass sie sich in den Nicht-SV-Fleischproben nach 28 Tagen nicht vermehren können. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Diversität der *C. estertheticum*-Stämme eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Fehlgerüchen spielt. Zum anderen scheint das Vorhandensein der Fleischmikrobiota, insbesondere der Milchsäurebakterien, ebenfalls bedeutend, da diese in der Regel in großer Zahl in vakuumverpacktem Fleisch vorhanden sind. Letztere senken durch Milchsäureproduktion den pH-Wert von vakuumverpacktem Fleisch, was das Wachstum von *C. estertheticum* hemmen kann. Diese wurden bei den Proben, die mit den Stämmen C2 (isoliert aus vakuumverpacktem Fleisch) und C3 (isoliert aus Rinderkot) in den Probengruppen 8 und 9 beobachtet werden, nicht jedoch der Stamm C1 (DSM 8809) in der Probengruppe 7. Nicht-SV-Proben mit niedrigen *C. estertheticum*-Zahlen wiesen meist pH-Werte von $5,0 \pm 0,4$ auf, während SV-Proben mit hoher Belastung pH-Werte von $5,7 \pm 0,4$ zeigten (vgl. AP2). Da das Wachstum von *C. estertheticum* im Bereich von pH 5,5–7,5 (optimal 5,8–6,8) liegt ([Wambui & Stephan, 2019](#)), sind die Bedingungen in Nicht-SV-Fleisch tendenziell ungünstiger.

Die Fragestellung, ob sich *C. estertheticum* in bestimmten Proben nicht vermehren kann, jedoch lebensfähig ist oder, weil er tot ist, ist hinsichtlich der Entwicklung einer Strategie zur Verhinderung des Wachstums dieser Bakterien in Fleischproben relevant. Die Kulturmethode kann zwar zu diesem Zweck angewendet werden, ist aber zeitaufwändig.

Darüber hinaus ist *C. estertheticum* generell schwer zu kultivieren, vor allem unter suboptimalen Bedingungen (z. B. niedriger pH-Wert, vielfältige Konkurrenzmikrobiota; s.o.). Die verwendete qPCR quantifiziert sowohl DNA von toten als auch von lebenden *C. estertheticum*. Daher könnte eine alternative Methode eingesetzt werden, beispielsweise die Propidiummonoazid (PMA)-qPCR. In eigenen Studien wurde diese Methode bereits zum Nachweis und zur Quantifizierung von lebenden Mykobakterien des Tuberkulose-Komplexes in Fleisch (Wildbret) oder *Campylobacter jejuni*/*Campylobacter coli* in Eierschalen ([Dorn-In et al., 2019](#); [Dorn-In et al., 2024](#)) entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Die Entwicklung einer PMA-qPCR-Methode für kältetolerante Clostridien fiel nicht in den Rahmen dieser Studie, bietet jedoch Potenzial für zukünftige Untersuchungen. Ein Abgleich mit den vorliegenden GC-MS-Daten erscheint dabei besonders vielversprechend.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Das Vorkommen kältetoleranter Clostridien in Tierbeständen in Österreich (AP1), die Verderbsmerkmale sowohl von rohem als auch von SV-Fleisch (AP2) sowie die potenzielle Toxizität einiger Spezies in der Gruppe der kältetoleranten Clostridien (AP3) wurden in dieser Studie erstmalig beschrieben. Anhand der GC-MS-Analyse (AP4) und mit Unterstützung weiterer Methoden wie qPCR kann mit vermehrungsfähigen Clostridien kontaminiertes Fleisch bereits vor dem Auftreten sensorischer Abweichungen frühzeitig erkannt werden.

Angesichts der hohen Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderkotproben aus österreichischen Rinderbeständen (AP1) sind gezielte Hygienemaßnahmen zu ergreifen, um eine Kontamination der Rinderhaut mit Kot zu vermeiden. Andernfalls könnten diese Bakterien während des Schlachtens und Enthäutens in den Schlachthof eingetragen und in weiterer Folge auf Schlachtkörper und Fleisch übertragen werden. Wenn Rindfleisch mit kältetoleranten Clostridien wie *C. estertheticum* kontaminiert ist und Sous-vide gegart wird, ist es kürzer haltbar als vakuumverpacktes frisches Fleisch, das ebenfalls mit *C. estertheticum* kontaminiert wurde (AP2). Beim SV-Garen wird der größte Teil der Fleischmikrobiota abgetötet, nicht aber die Sporen der Spezies *C. estertheticum*. Dank fehlender Konkurrenzmikrobiota können diese ungehemmt wachsen und somit den Verderb von SV-Fleisch bei eigentlich korrekten Lagerungstemperaturen unter 4 °C beschleunigen. Diese Informationen sind für Lebensmittelunternehmer wichtig, um ggfs. geeignete Maßnahmen ergreifen zu können. Verbraucher sollten ebenfalls über den Verderb von vakuumverpacktem Frischfleisch und SV-Fleisch durch diese kältetoleranten Clostridien informiert sein.

Zwei von 8 aus AP1 isolierte Spezies, erwiesen sich als toxisch für Caco-2-Zellen nämlich *C. frigidicarnis* und *C. botulinum* (AP3). Unter den mittels GC-MS nachgewiesenen Substanzen konnten Buttersäure-n-Butylester und 1-Butanol eindeutig als Indikator für das Wachstum von *C. estertheticum* in vakuumverpacktem Fleisch identifiziert werden (AP4). Zur Absicherung der Ergebnisse und statistischen Auswertungen in AP3 und AP4 ist eine größere Anzahl von Clostridien-Stämmen sowie von vakuumverpackten Clostridien-positiven und -negativen Fleischproben erforderlich.

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen die Relevanz gezielter Hygienemaßnahmen zur Vermeidung von durch kältetolerante Clostridien bedingtem Fleischverderb – insbesondere im Hinblick auf potenzielle Kontaminationsquellen wie fäkal verunreinigte Tierhäute bei der

Anlieferung zur Schlachtung. Darüber hinaus erscheinen ein systematisches Monitoring kältetoleranter Clostridien in Fleischerzeugnissen sowie die Bereitstellung der entwickelten Schnelldiagnostikmethoden für Kontrollbehörden im Sinne eines vorbeugenden Qualitäts- und Risikomanagements sinnvoll. Im Weiteren ist eine enge Zusammenarbeit zwischen Wissenschaft und zuständigen Behörden erforderlich, um die Entwicklung geeigneter Überwachungsprogramme und Aktionspläne zur Reduktion des Kontaminationsrisikos zu unterstützen. Eine Verringerung des durch Clostridien verursachten Verderbs trägt nicht nur zur Ressourcenschonung und damit zum Umweltschutz bei, sondern reduziert auch wirtschaftliche Verluste entlang der Produktions- und Vermarktungskette.

7. Literaturverzeichnis

- Anniballi, F., Auricchio, B., Fiore, A., Lonati, D., Locatelli, C.A., Lista, F., Fillo, F., Mandarino, G., De Medici, D., 2017. Botulism in Italy, 1986 to 2015. *Eurosurveillance*, 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2017.22.24.30550>
- Argyri, A.A., Mallouchos, A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2015. The dynamics of the HS/SPME-GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under different packaging and temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.020>.
- Bahlinger, E., Dorn-In, S., Beindorf, P.-M., Mang, S., Kaltner, F., Gottschalk, C., Gareis, M., Schwaiger, K., 2021: Development of two specific multiplex qPCRs to determine amounts of *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* in meat and heat-treated meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108932>
- Baird, R.M., Lee, W.H., 1995. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 15 – 24. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)E0028-P](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)E0028-P).
- Beindorf, P.-M., Tobisch, M., Mang, S., Dorn-In, S., 2021. Sicherheit von Sous-vide gegarten Rumpsteaks. 61. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft. Online-Satellitenworkshop "Poster Pitch: Vorstellung und Diskussion der Posterauswahl"; SEP 20, 2021; Garmisch-Partenkirchen, Germany.
- BfR: Bundesinstitut fuer Risikobewertung (Federal Institute for Risk Assessment), 2010. http://www.bfr.bund.de/cm/349/clostridium_estertheticum_in_vacuum_packed_bee_f_health_risk_through_consumption_is_unlikely.pdf (last access 01.03.2025)
- Blaschek H P., 2014. *Clostridium* / Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology* 1, 444-448. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00067-7>
- Boerema, J.A., Broda, D.M., Penney, N., Brightwell, G., 2007. Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of "blown pack" spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. *J. Food Prot.* 70, 1434–1439.
- Bonke, R., Drees, N., Gareis, M., 2016. Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *Fems. Microbiol. Lett.* 363, 1-7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv218>.
- Brasca, M., Morandi, S., Silveti, T., 2022. *Clostridium* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Third edition), 431-438. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22989-2>
- Broda, D.M., Boerema, J.A., Bell, R.G., 1998. A PCR survey of psychrotrophic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BoNT genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 219-223.

- Broda, D.M., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1539-1550.
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L., 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 335-352. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00070-4)
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Cook, R.L., Bell, R.G., 1997. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. *N. Z. J. Agric. Res.* 40, 93-98. <https://doi.org/10.1080/00288233.1997.9513236>
- Broda, D.M., Saul, D.J., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 2000a. *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 623-631. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-623>.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 2000b. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophila causing spoilage of vacuum-packed meat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 107-118.
- Davis, M.F., Hu, B., Carroll, K.C., Bilker, W.B., Tolomeo, P., Cluzet, V.C., Baron, P., Ferguson, J.M., Morris, D.O., Rankin, S.C., Lautenbach, E., Nachamkin, I., 2016. Comparison of culture-based methods for identification of colonization with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in the context of cocolonization. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1907-1911. <https://doi.org/10.1128/JCM.00132-16>.
- Dorn-In, S., Daldrop, E., Mang, M., Esteban-Cuesta, I., Gareis, M., Schwaiger, K., 2024. Viable *Campylobacter jejuni* on eggshells and its potential to cross-contaminate egg white and yolk when using a manual separation technique, determined by culture and propidium monoazide (PMA) qPCR. *J. Food Prot.* 87, 100246. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100246>.
- Dorn-In, S., Gareis, M., Schwaiger, K., 2019. Differentiation of live and dead *Mycobacterium tuberculosis* complex in meat samples using PMA qPCR. *Food Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103275>
- Dorn-In, S., Führer, L., Gareis, M., Schwaiger, K., 2023. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. *Food Microbiol.* 109, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104147>
- Dorn-In, S., Mang, S., Schwaiger, K., 2022a. A simple method for the isolation of cold-tolerant *Clostridium* spp. from meat samples. *Int. J. Food Microbiol.* 378, 109836. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109836>
- Dorn-In, S., Mang, S., Schwaiger, K., 2022b. Unknown cold-tolerant *Clostridium* spp.: Characteristics and potential to cause meat spoilage. *Food Microbiol.* 102, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103916>

- Dorn-In, S., Schwaiger, K., Springer, C., Barta, L., Ulrich, S., Gareis, M., 2018. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.020>
- EFSA: European Food Safety Authority, 2016. Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA J.* 14, e04523.
- Esteves, E., Whyte, P., Gupta, T.B., Bolton, D.J., 2020. An investigation into the ecological niches and seasonal nature of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* in the Irish beef farm environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 71, 660–666. <https://doi.org/10.1111/lam.13344>.
- Esteves, E., Gupta, T.B., Whyte, P., Brightwell, G., Bolton, D., 2021. An investigation of the environmental niches of blown pack spoilage causing *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on New Zealand beef and sheep farms. *Food Microbiol.* 98, 103769. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103769>.
- Grillfuerst, 2024. Sous Vide Garen — das Geheimnis hinter Vakuumgaren und 2 tolle Rezepte. <https://www.grillfuerst.de/magazin/bbq-guides/grillmethoden/sous-vid-e-garen/>. Zugriffsdatum 29 Januar 2024.
- Haas, K.N., Blanchard, J.L., 2020. Reclassification of the *Clostridium clostridioforme* and *Clostridium sphenoides* clades as *Enterocloster* gen. nov. and *Lacrimispora* gen. nov., including reclassification of 15 taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 23–34. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003698>.
- Hatheway, C.L., 1990. Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 66–98.
- Húngaro, H.M., Caturla, M.Y., Horita, C.N., Furtado, M.M., Sant’Ana, A.S., 2016. Blown pack spoilage in vacuum-packaged meat: A review on clostridia as causative agents, sources, detection methods, contributing factors and mitigation strategies. *Trends Food Sci Technol.* 52, 123–138. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.010>
- Ismail, I., Hwang, Y.H., Bakhsh, A., Lee, S.J., Lee, E.Y., Kim, C.J., Joo, S.T., 2022. Control of sous-vide physicochemical, sensory, and microbial properties through the manipulation of cooking temperatures and times. *Meat Sci.* 188, 108787. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108787>.
- Lawson, P., Dainty, R.H., Kristiansen, N., Berg, J., Collins, M.D., 1994. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 153–157. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1994.tb00930.x>
- Lonati, D., Schicchi, A., Crevani, M., Buscaglia, E., Scaravaggi, G., Maida, F., Cirronis, M., Petrolini, V.M., Locatelli, C.A., 2020. Foodborne Botulism: Clinical diagnosis and medical treatment. *Toxins* 12, 509. <https://doi.org/10.3390/toxins12080509>

- Lund, B.M., Graham, A.F., George, S.M., Brown, G.D., 1990. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. J. Appl. Microbiol., 69, 481-492.
- Mang, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., Dorn-In, S., 2021. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigoriphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. Int. J. Food Microbiol. 340. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>.
- Gohari I.M., Navarro, M.A., Li, J., Shrestha, A., Uzal, F., McClane, B.A., 2021. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. Virulence 12, 723–753. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>
- Moorhead, S.M., Bell, R.G., 1999. Psychrotrophic clostridia mediated gas and botulinal toxin production in vacuum-packed chilled meat. Lett. Appl. Microbiol. 28, 108–112.
- Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., 2009. Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. J. Appl. Microbiol. 7, 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>
- Onyeaka, H., Nwabor, O., Jang, S., Obileke, K., Hart, A., Anumudu, C., Miri, T., 2022. Sous vide processing: a viable approach for the assurance of microbial food safety. J. Sci. Food Agric. 102, 3503–3512. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11836>
- Pecheritsyna, S., Shcherbakova, V., Rivkina, E., 2007. *Clostridium frigoriphilum* sp. nov., a strictly psychrophilic bacterium from cryopegs of Kolyma Lowland (East Siberia, Russia). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/147743344>
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002R0178&from=EN>
- RKI: Robert Koch Institut, 2022. Botulismus. RKI-Ratgeber. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Botulismus.html (Zugriff 15.09.2024).
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., 2004. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. J. Biochem. 136, 569–574. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh161>.
- Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppenstedt, R.M., Hippe, H., Stackebrandt, E., 2003. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigoris* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. Int. J. Syst. Evol. Micr. 53, 1019-1029.
- Statista, 2022, Konsum von Fleisch in Österreich. <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/287345/umfrage/pro-kopf-konsum-von-fleisch-in-oesterreich/>. Zugriffsdatum 29 Januar 2024.

- Suetin, S.V., Shcherbakova, V.A., Chuvilskaya, N.A., Rivkina, E.M., Suzina, N.E., Lysenko, A.M., Gilichinsky, D.A., 2009. *Clostridium tagluense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost. Int. J. Syst. Evol. Micr. 59, 1421-1426.
- Titball, R.W., 1993. Bacterial Phospholipases C. Microbiol. Rev. 57, 347-366. <https://doi.org/10.1128/mr.57.2.347-366.1993>
- Wambui, J., Ghielmetti, G., Morach, M., Hochreutener, M., Stephan, R., 2021. Detection of psychrophilic *Clostridium* spp. in fecal samples from cattle of different ages sampled at the slaughterhouse level. J. Food Prot. 84, 58-62. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-259>.
- Wambui, J., Stephan, R., 2019. Relevant aspects of *Clostridium estertheticum* as a specific spoilage organism of vacuum-packed meat. Microorganisms, 7, 142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050142>
- WHO: World Health Organization, 2023. Botulism. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>. Zugriffsdatum 29 Januar 2024.
- WWF: Weltweiter Fonds für die Natur, 2022. Fleischkonsum - Unser großer Hunger. <https://www.wwf.at/nachhaltig-leben/fleisch/>. Zugriffsdatum 29 Januar 2024.

Danksagung

Der Autor möchte sich bei den Laborant*innen, Student*innen und Kolleg*innen bedanken, die zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, darunter Andrea Pauker, Dmitrij Sofka, Michaela Mach, Susanne Bauer, Morten Sörig, Joachim Angerer, Julian Bleicher, Vanessa Zand und Sara Casarin von der Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Universität Wien, Riem El-Seniti von der Fachhochschule Wiener Neustadt und Kahraman Özbek von der Firat Universität (Türkei) für ihre Unterstützung und hervorragende Laborarbeit. Dank an Dr. med. vet. Cassandra Eibl und Prof. Dr. med. vet. Johannes Lorenz Khol von der Universitätsklinik für Wiederkäuer für die Entnahme von Kot- und Hautwischproben in den Rinderbetrieben und Prof. Franziska Dengler von der ehemaligen Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die Bereitstellung des Referenzzellkulturstammes. Herzlicher Dank geht an Prof. Dr. med. vet. Karin Schwaiger für die Ermöglichung der Arbeit an der Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Dank auch an BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften für die finanzielle Unterstützung, die diese Studie ermöglicht hat.

Anlage 1: Publikation im Journal „Food Microbiology“, 2025

Food Microbiology 132 (2025) 104838



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



Cold-tolerant *Clostridium* spp. related to meat spoilage in cattle farms in Austria

Samart Dorn-In^{a,*}, Vanessa Zand^a, Joachim Angerer^a, Kahraman Özbek^b, Cassandra Eibl^c, Karin Schwaiger^a

^a Unit of Food Hygiene and Technology, Centre for Food Science and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210, Vienna, Austria

^b Veterinary Medicine Faculty, Firat University, Elazığ, Turkey

^c Clinical Centre for Ruminant and Camelid Medicine, Clinical Department for Farm Animals and Food System Science, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

C. estertheticum
Beef
Cow faeces
Hides
PCR

ABSTRACT

Many cold-tolerant *Clostridium* spp. are responsible for the spoilage of vacuum-packed meat. Cattle can ingest the bacteria via the soil and the environment when grazing or via the feed. Since cattle farming in Austria's Alpine regions is often practiced as pasture-based farming, the aim of this study was to investigate the prevalence of cold-tolerant clostridia in cattle in these regions, to identify the species detected, and to determine the growth temperature of the isolated clostridia. For this purpose, 260 faecal and 260 hide wipe samples were taken from 260 healthy adult cattle from 26 farms in the provinces of Salzburg and Tyrol. The samples were analysed using qPCR, sequencing, and cultural methods. Using qPCR, 22.3 % of the faecal samples were positive for *C. estertheticum*, 33.8 % for *C. tagluense*-like, 32.7 % for *C. bowmanii*, 11.2 % for *C. frigoriphilum*, and 14.2 % for *C. gasigenes*. The isolation rates of the species from the PCR-detected samples ranged from 4.7 % to 59.5 %. In addition, nine different *Clostridium* species were isolated by culture, with *C. subterminale*, *Lacrimispora algidixylanolytica* (syn. *C. algidixylanolytica*), *C. tagluense*, and *C. botulinum* being found most frequently. The prevalence of cold-tolerant clostridia in the investigated faeces was relatively high, while in the hide swab samples it was very low. The latter could be related to the lower contamination of the hide with dirt and faeces. The results of this study provide useful information for slaughterhouses, which should pay attention to cleanliness and hygiene during dehiding and evisceration to avoid further contamination of the meat.

1. Introduction

Meat spoilage caused by cold-tolerant clostridia, in particular the species *C. estertheticum*, can be partially recognised by the swelling of the packaging, known as blown pack spoilage (BPS, Fig. 1), which is caused by CO₂ and H₂ formation. These bacteria can produce enormous amounts of butanol, butyric acid, acetic acid, and butyl esters, which leads to the typical cheesy odour of the affected meat (Broda et al., 1996). *C. estertheticum* was first isolated in the United Kingdom in 1989 (Dainty et al., 1989), and since then the occurrence of cold-tolerant clostridia associated with this kind of spoilage has been reported worldwide, especially in countries with high meat production and/or consumption such as Brazil, Germany, Ireland, New Zealand, the United Kingdom, and the United States (Mang et al., 2021). Other cold-tolerant

Clostridium spp. that have also been isolated from meat include *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii*, and *C. tagluense*-like (Dorn-In et al., 2018), *C. algidicarnis* (Lawson et al., 1994; Mang et al., 2021), *C. gasigenes* (Broda et al., 2000b), and *C. frigidicarnis* (Broda et al., 1999).

As cold-tolerant clostridia are usually found in soils of temperate and subtropical climate zones, cattle can ingest the bacteria while grazing. This means that faeces and hides of slaughtered animals contaminated with soil and faeces are a potential source of contamination for beef. Nevertheless, there are only few studies on the presence of *C. estertheticum* and other cold-tolerant clostridia in these sample materials, e.g., in Ireland (Esteves et al., 2020; Moschonas et al., 2009), Switzerland (Wambui et al., 2021), and New Zealand (Esteves et al., 2021). The other studies focus on the detection of cold-tolerant clostridia in vacuum-packed meat. Cattle farming is of great importance in

* Corresponding author.

E-mail address: samart.dorn-in@vetmeduni.ac.at (S. Dorn-In).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104838>

Received 2 March 2025; Received in revised form 21 May 2025; Accepted 6 June 2025

Available online 6 June 2025

0740-0020/© 2025 Published by Elsevier Ltd.



Fig. 1. A: Cattle (dairy) farm in the Alpine region in Austria and B: blown pack spoilage (BPS) of vacuum-packed beef caused by *C. estertheticum* (BPS).

Austria, and Alpine pasture and grazing are widespread in this context. The aim of this study is therefore to provide an initial overview of the prevalence of *C. estertheticum* and other cold-tolerant clostridia in cattle faeces and hides in Austria. The results of this study should help to assess the risk of contamination of meat with *C. estertheticum* and other cold-tolerant clostridia. Strategies for the delivery of cattle for slaughter and hygiene measures during slaughter can be evaluated in order to minimise the risk of contamination.

2. Material and methods

2.1. Samples and preparations

2.1.1. Clostridial reference strains

The following reference *Clostridium* species were used: *C. estertheticum* subsp. *estertheticum* (DSM 8809), *C. frigidophilum* (DSM 17811), *C. algidicarnis* (DSM 15099), *C. gasigenes* (DSM 12272), *C. bowmanii*, and *C. tagluense*-like (all previously isolated from meat, confirmed by 16S rRNA gene sequencing). These clostridial strains were subcultured in peptone-yeast-glucose-starch (PYGS) broth (Lund et al., 1990) and incubated at 10 °C for four weeks. The pure cultures of *C. estertheticum*, *C. frigidophilum*, *C. bowmanii*, *C. algidicarnis*, *C. gasigenes*, and *C. tagluense*-like were subjected to DNA extraction, and the DNA extracts were used as PCR positive controls. The species *C. estertheticum*, *C. algidicarnis*, and *C. gasigenes* were artificially contaminated in faecal suspensions and then subjected to the test the efficiency of the DNA extraction methods.

2.1.2. Animal samples and preparation

A total of 520 animal samples, including 260 faecal and 260 hide wipe samples, were taken from 260 healthy cows from 26 dairy farms in the Federal States Salzburg and Tyrol, Austria. The number of cattle per sampled farm varied between 12 and 140. To avoid stress from catching and restraining of the animals, sampling was carried out during feeding, whereby the animals were restrained in their usual feeding fences. Ten adult animals were sampled per farm. A faecal sample and a hide wipe sample were taken from the same animal. The faecal samples were taken directly from the rectum or from the floor if the cows had shed fresh faeces and the animal could be clearly identified. The veterinary gloves containing the faecal samples were knotted to prevent faecal leakage and then placed in a polystyrene box with cool packs for transport.

To obtain the hide wipe samples, one square metre of an area on the hindquarters of the cow was wiped several times vertically and

horizontally with a moistened sterile sponge (S/Budget sponge cloth, 18 × 10 × 0.3 cm, autoclaved at 125 °C for 15 min). The sponge cloth was then packed in a stomacher bag and placed in the polystyrene box with cool packs for transport. During transport, the temperature in the polystyrene box was approximately 10 (±2) °C. The samples were stored at 4 °C and prepared for enrichment within 24 h after sampling.

To prepare PYGS enrichment, 50 ml of PYGS broth was added to each of the hide wipe samples in the stomacher bags, while 10 g of faeces were weighed into a stomacher bag and filled with 90 ml of PYGS broth. The samples were then homogenised in a laboratory stomacher (Bag-Mixer, Interscience) for 30 s. The sample suspension (14 ml) was transferred to a sterile glass tube and incubated anaerobically (with AnaeroGen™, Thermo Scientific™/Oxoid™) at 4 °C for 4–5 weeks.

2.2. Molecular biological examinations

2.2.1. DNA extraction

Faecal samples usually contain various PCR inhibitors such as phytic acid that prevent PCR amplification (Thornton and Passen, 2004). Therefore, the efficiency of the DNA extraction method for faecal samples plays an important role in the success of qPCR. To test the efficiency of the DNA extraction method, 0.9 ml of bovine faecal sample in the PYGS broth (concentration: 1 g per 10 ml) was artificially contaminated with 100 µl of different clostridial species, namely *C. estertheticum*, *C. algidicarnis*, and *C. gasigenes*. The contaminated and native faecal suspensions were subjected to the three DNA extraction methods, each in duplicate.

DNA extraction with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) and the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) was performed according to the manufacturer's instructions. The method using the combination of InhibitEX Buffer (Qiagen) and High Pure Template Preparation Kit (Roche) was performed as follows: 200 µl of the sample suspension or PYGS enrichment was transferred to a 1.5 ml tube. Then, 1 ml of InhibitEX buffer was added and vortexed for 15 s. The suspension was then heated to 95 °C for 5 min in a thermomixer (Eppendorf) and vortexed for 15 s. To separate the solid components of the sample, the mixture was centrifuged at 20,000 × g for 1 min. Finally, 200 µl of the supernatant was transferred to a new 1.5 ml tube, and DNA extraction was continued using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) as described by the manufacturer.

The DNA extraction method for the clostridial or bacterial colonies recovered from agar plates was performed using the direct (heating) extraction method as described in previous studies (Mang et al., 2021)

2.2.2. Quantitative PCR (qPCR)

The DNA extracts were tested using three qPCR methods (qPCR 1, 2, and 3, see Table 1). qPCRs 1 and 2 were used to check for the presence of clostridia and to identify the species. Samples that gave an inconclusive or negative result in qPCRs 1 and 2 (for clostridia) were then subjected to qPCR 3 (for universal bacteria) to confirm the success of the DNA extraction.

Primer pairs and probes were carried over from previous studies (Table 1), except for the probe for the species *C. gasigenes*, which was newly developed in this study. The validation of the specificity of the probe for the detection of *C. gasigenes* (qPCR 2, Cgas) was performed as described in a previous study (Dorn-In et al., 2018). Table S1 (supplementary data) shows the specificity of this probe, which was tested by qPCR 2 with 51 bacterial species/strains. The target gene of all three qPCR methods is the 16S rRNA gene. The amplicon size is approximately 566 bp for qPCR 1 and 2 (for clostridia) and 604 bp for qPCR 3 (for universal bacteria).

The master mix for qPCR contained the following components: 0.25 µM per primer, 0.1 µM per probe, 10 µl SensiFast™ Probe No-Rox sample (Bioline™, Meridian™), 2 µl of the respective DNA sample, and filled up with RNA-free water to the total volume of 20 µl per reaction. The qPCR protocol in the CFX Opus Real-Time PCR Systems (Bio-

Table 1
Primer and probes for three qPCR methods.

qPCR	Specificity	Primer/ probes	Fluorescence (5'-3')	Sequence (direction 5'-3')	Reference ^a
1	<i>Clostridium</i> spp.	CI94-F	–	CGGGGACGGGTGAGTAAC	1, 2
		CI642-R	–	OCTCTCTGCACCTCTAGA	2
	<i>Clostridium</i> spp.	CI555	FAM	OCTTTACROCCAGTAAATCOGGAC	3
	<i>C. estertheticum</i>	Cest	Hex	CAAAGGAATTTTCGGAATTCACITTTGAG	2
	<i>C. frigidophilum</i>	Cigrpl	Cy3.5	CAAAGGAATAGTCTTCGGATTATTTCACT	2
	<i>C. putrefaciens</i> & <i>C. algidicarnis</i>	Cpal	Cy5	ACCCATAACATAGGATTATGGATG	4
	<i>C. tagluense</i> -like	Ctag-like	Cy5.5	CAAAGGATTTTCTTCGGAATTCAC	2
	<i>Clostridium</i> spp.	CI94-F	–	CGGGGACGGGTGAGTAAC	1, 2
		CI642-R	–	OCTCTCTGCACCTCTAGA	2
	<i>Clostridium</i> spp.	CI555	FAM	OCTTTACROCCAGTAAATCOGGAC	3
2	<i>C. estertheticum</i>	Cest	Hex	CAAAGGAATTTTCGGAATTCACITTTGAG	2
	<i>C. frigidophilum</i>	Cigrpl	Cy3.5	CAAAGGAATAGTCTTCGGATTATTTCACT	2
	<i>C. bowmanii</i>	Cbow	Cy5	CAAAGGATTCCTTCGGAGATTCCAC	2
	<i>C. gasigenes</i>	Cgas	Cy5.5	TOGGGCTCAACCGAGAAGCTGC	This study
	Universal bacteria	Uni335-F	–	CADACTCTACGGGAGGCG	5
		Uni923-R	–	CTTGCGGGGCCCGGT	6
		Uni799	Cy5.5	AACAGGATTAGATACCTCGTAGTC	6
	Universal bacteria	Uni799	Cy5.5	AACAGGATTAGATACCTCGTAGTC	6

^a Reference: 1: Brightwell and Clemens (2012); 2: Dorn-In et al. (2018); 3: Dorn-In et al. (2022); 4: Mang et al. (2021); 5: Dorn-In et al. (2015); 6: Dorn-In et al. (2023).

Rad™) device started with initial denaturation at 95 °C for 5 min. For each of the following 40 cycles, denaturation at 95 °C for 5 s was followed by annealing and elongation at 60 °C for 30 s for qPCR 1 and 2 (for clostridia) and at 62 °C for 20 s for qPCR 3 (for universal bacteria).

Positive and negative controls were included to demonstrate the validity of the qPCR. For each PCR run, DNA extracts of six *Clostridium* species were used as positive controls: *C. estertheticum* subsp. *estertheticum*, *C. frigidophilum*, *C. bowmanii*, *C. tagluense*-like, *C. algidicarnis*, and *C. gasigenes*. The constant Ct-values of the positive controls were defined in relation to the cut-off of the relative fluorescence unit (RFU). If one of the amplified samples yielded an RFU value that was below the cut-off value, the corresponding sample was evaluated as negative.

2.2.3. Sequencing

The DNA of bacterial colonies identified as *Clostridium* spp. by qPCR was subjected to sequencing analysis. For this purpose, the PCR amplicons from qPCRs 1 or 2 were purified using the E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega) according to the manufacturer's instructions and subsequently sequenced at Microsynth Austria GmbH (Vienna, Austria). The forward primer (CI94-F) was used for sequencing. The sequences obtained were compared with those of the reference sequences in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in order to identify or confirm the species of the isolated clostridia.

2.3. Cultural examination

PYGS enrichments from faeces and hide wipe samples were incubated at 4 °C for 4–5 weeks for the first isolation phase and 14–16 weeks for the second isolation phase.

All PYGS enrichments ($n = 520$) were subjected to the culture method in the first isolation phase. For this purpose, 0.5 ml of PYGS enrichment was transferred to a 1.5 ml reaction tube and heated in a ThermoMixer™ (Eppendorf™) at 80 °C for 5 min to kill the vegetative cells of the accompanying microorganisms (Dorn-In et al., 2022). Subsequently, 50 µl of the heat-treated PYGS were dropped onto a blood agar plate (CBA, Columbia blood agar + 5 % sheep blood, BioMérieux™) and incubated anaerobically at 10 °C for 3–4 weeks. Colonies grown on CBA with different morphologies were subcultured onto two CBA plates, one of which was incubated aerobically and the other anaerobically at 10 °C for 3 weeks. The colonies that grew only under anaerobic conditions were subjected to DNA extraction using a direct (heating) method. The DNA extracts were subjected to qPCR 1 and qPCR

2 and, in some cases, qPCR 3 if qPCR 1 gave negative results. If the tested colonies were positive for clostridia, their PCR products were subjected to sequencing. If qPCR was negative for universal bacteria, the bacterial suspension was again subjected to DNA extraction using the High Pure Template Preparation Kit (Roche) and retested with qPCR 1, 2, and if necessary, with qPCR 3.

The clostridial isolates from the first isolation phase were subjected to the test of growth temperature. For this purpose, the colonies of the same isolate were subcultured onto five CBA plates using an inoculation loop. The CBA plates were then incubated anaerobically for 3 weeks at 4 °C, 10 °C, 22 °C, 30 °C, and 37 °C, then growth was categorised as good (++) if the colonies grew closely together, as weak (+) if only small single colonies grew, or as having no growth (–).

In the second isolation phase, only the PYGS enrichment samples that were qPCR-positive for *C. estertheticum* and *C. frigidophilum* were subjected to the culture method. Heat treatment and subcultivation on CBA were performed as in the first isolation phase. In addition, PYGS enrichments (without heat treatment) were streaked on CBA using a 10-µl inoculation loop, anaerobically incubated at 10 °C for 3 weeks. Colonies grown on CBA with different morphologies were then suspended and pooled in 0.5 ml of sterile water in a 1.5 ml tube using an inoculation loop. These pooled colonies were subjected to DNA extraction and then qPCR 1. The pooled colony samples that yielded positive results for *C. estertheticum* or *C. frigidophilum* in qPCR were subcultured onto new CBA plates using a 10 µl inoculum loop and incubated anaerobically at 10 °C for 3 weeks. The DNA of the single colonies with different morphologies was then extracted using the direct (heating) DNA extraction method. The extracted DNA was subjected to qPCR 1 to check whether it was *C. estertheticum* or *C. frigidophilum*, and qPCR 3 if all probes of qPCR 1 gave negative results.

3. Results

3.1. Molecular biological examination

Supplementary data Table S2 shows the Ct-values of the probe CI555 of the three extraction methods tested for pure isolates of *C. estertheticum*, *C. gasigenes*, and *C. algidicarnis*, as well as the Ct-values of a native faecal sample and three faecal samples contaminated with the aforementioned *Clostridium* species. Overall, a combination of the InhibitEX Buffer and the High Pure Template Preparation Kit (Roche) showed the lowest Ct-values for all contaminated faecal samples and was therefore used to extract clostridial DNA from all faecal and wipe

samples.

The number and percentage of farms and animals that tested positive by qPCR for *Clostridium* spp. and the species *C. estertheticum*, *C. frigorophilum*, *C. bowmanii*, *C. tagluense*-like, *C. algidicarnis*, and *C. gasigenes* are shown in Table 2 for faecal samples and in Table 3 for hide wipe samples. The Ct-values of the probes for the respective clostridia species were categorised as strongly positive (Ct-values <30), moderately positive (Ct-values between 30 and 36), and weakly positive (Ct-values >36). All samples that showed no Ct-values (RFU below the cut-off value) were assessed as negative.

While almost all faecal samples were strongly and moderately positive for *Clostridium* spp., only a few hide wipe samples were found positive in these categories. As almost all DNA extracts from hide wipe samples were only weakly positive for *Clostridium* spp., they were tested with a qPCR for universal bacteria to check whether DNA extraction was successful. A total of 97.0 % ($n = 252$) of the hide wipe samples showed Ct-values below 30 PCR cycles (strongly positive), and 3.0 % ($n = 7$) had Ct-values between 30 and 36 PCR cycles. This confirms that the DNA extraction of the hide wipe samples worked well, as the DNA of the universal bacteria was detected in large quantities, but these wipe samples contained little clostridial DNA.

3.2. Cultural examination

The PYGS enrichments ($n = 520$) were incubated for 4–5 weeks when they were subjected to the first isolation phase: A total of 690 colonies were isolated and subcultured, of which 223 (32.3 %) grew exclusively under anaerobic conditions. Of these, $n = 152$ (42.2 %) isolates proved positive in the clostridia qPCR and were confirmed by sequencing of the 16S rRNA gene. Table 4 shows the prevalence of the identified clostridia and summary of their growth temperatures. The detailed growth temperature and haemolysis activities of the individual isolates are listed in the supplementary data, Table S3. The haemolysis activities of some strains vary depending on the incubation temperature and growth rate. The most frequently isolated species are *C. subterminale*, *C. gasigenes*, *Lactinisporea algidixylanolytica*, *C. tagluense*, *C. tagluense*-like, and *C. botulinum*. *La. algidixylanolytica* was previously named as *Clostridium algidixylanolyticum* by Broda et al. (2000a) and was reclassified by Haas and Blanchard (2020). In qPCR-positive samples, the isolation rate of *C. gasigenes* is relatively high compared to the isolation rates of *C. tagluense*-like and *C. bowmanii* (see Table 6). The species *C. algidicarnis* was weakly detected in the enrichment of two hide wipe samples from one farm by qPCR and could be isolated. In contrast, *C. estertheticum* and *C. frigorophilum* could not be isolated from any sample of the first isolation attempt, although they showed stronger signals than *C. algidicarnis*. There is no correlation between the species isolated from faeces and from hide wipe samples from the same animal. This means that the same *Clostridium* species was isolated from either faecal or hide wipe samples, but never from both samples from the same animal.

C. estertheticum is the best-known *Clostridium* species to cause BPS in vacuum-packed meat. Therefore, it is important that this and its closely related species, *C. frigorophilum*, are isolated as pure cultures to ensure that the PCR results were correct. For this reason, all PYGS enrichments

of faecal and hide wipe samples reacted positively to these two species were subjected to the second isolation phase (see Table 5). At this point, the PYGS enrichments had already been incubated at 4 °C for 14–16 weeks. Of the untreated PYGS enrichments, all CBA plates were overgrown by other accompanying microbiota, and only pooled colonies collected from three CBA plates contained DNA from *C. estertheticum*. Attempts to isolate individual colonies of *C. estertheticum* from these pooled colony samples were unsuccessful (see Table 5). In contrast, isolation rates from PYGS enrichments subjected to heat treatment gave better results, i.e., *C. estertheticum* could be isolated from 35.6 % ($n = 21/59$) and *C. frigorophilum* from 17.6 % ($n = 6/34$) PCR-positive samples (see Tables 5 and 6). It should be noted that the high isolation rate of both species originates from strongly PCR-positive PYGS enrichments (see Table 5).

4. Discussion

The habitat of the cold-tolerant clostridia is permafrost and soil in temperate and subtropical climate zones (Spring et al., 2003; Suetin et al., 2009). Cattle can ingest these bacteria when grazing on pastures or through contaminated feed. The conditions in the animals' intestines are not optimal for the growth of the psychrophilic, but possibly some cold-tolerant *Clostridium* species. The spores are excreted with the faeces and can germinate and multiply if the conditions in the stable or on the pasture are favourable. The animals can then become re-contaminated on their hides which can later lead to contamination of the carcasses and meat in the abattoir.

Faecal and hide wipe samples were first enriched in a PYGS broth in order to increase the number of spores and thus the chance of successful detection and isolation (Brightwell and Clemens, 2012; Broda et al., 1998b; Lund et al., 1990; Moschonas et al., 2009). Using qPCR, *C. estertheticum* was detected in 22.3 %, *C. frigorophilum* in 11.2 %, *C. bowmanii* in 32.7 %, *C. tagluense*-like in 33.8 %, and *C. gasigenes* in 14.2 % of the 260 faecal samples (see Table 2). Only very few hide wipe samples were PCR-positive for these clostridial species (see Table 3).

The results of the faecal samples from this study are consistent with the results of Moschonas et al. (2009) and Wambui et al. (2021), which were conducted in Ireland and Switzerland, respectively. In slaughterhouses in Ireland, Moschonas et al. (2009) found that 17.9 % and 25.4 % of cattle faecal samples were PCR-positive for *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, respectively, while in Switzerland a *C. estertheticum*-like group was detected in 39 % of faecal samples by RT-PCR (Wambui et al., 2021). In faecal samples from cattle farms in Ireland, 8.5 % and 45 % of samples were qPCR-positive for *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, respectively, while in New Zealand the corresponding species were detected in 4 % and 18 % of samples (Esteves et al., 2020, 2021).

There is little information available on the contamination of cold-tolerant clostridia on bovine hide. A single relevant study was conducted by Moschonas et al. (2009), who found that 13.3 % and 18.8 % of animal hides were PCR-positive for *C. estertheticum* and *C. gasigenes*, respectively. This result differs significantly, as only 0.8 % of the hide wipe samples analysed in the present study were positive for *C. estertheticum*, while *C. gasigenes* was not detected in a single hide wipe

Table 2
Number and percentage of farm and faecal samples tested positive by qPCR.

Species	Positive farm		Positive faecal samples strong		moderate		weak		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Clostridium</i> spp.	26	100.0	191	73.5	64	24.6	3	1.2	258	99.2
<i>C. estertheticum</i>	23	88.5	15	5.8	28	10.8	15	5.8	58	22.3
<i>C. frigorophilum</i>	10	38.5	14	5.4	9	3.5	5	1.9	29	11.2
<i>C. bowmanii</i>	17	65.4	26	10	46	17.7	13	5.0	85	32.7
<i>C. tagluense</i> -like	21	80.8	19	7.3	52	20	17	6.5	88	33.8
<i>C. gasigenes</i>	5	19.2	17	6.5	11	4.2	9	3.5	37	14.2
<i>C. algidicarnis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3
Number and percentage of farm and hide wipe samples tested positive by qPCR.

Species	Positive farm		Positive hide wipe samples		moderate		weak		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Clostridium</i> spp.	26	100.0	3	1.2	36	13.8	187	71.9	226	86.9
<i>C. estertheticum</i>	1	3.8	0	0	1	0.4	0	0	1	0.4
<i>C. frigoriphilum</i>	2	7.7	0	0	2	0.8	4	1.6	6	2.3
<i>C. bowmanii</i>	1	3.8	0	0	0	0	3	1.2	3	1.2
<i>C. ingluense</i> -like	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. gisigenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. algidicarnis</i>	1	3.8	0	0	0	0	2	0.8	2	1.6

Table 4
Isolated species from the first isolation phase and their growth temperatures (n farm 26; n faecal samples 260; n hide wipe samples 260; n total animals 260).

Species identified by sequencing	Pos. farm		Isolated from		Hide		Total		Growth temperature ^a					
	n	%	n	%	n	%	n	%	4 °C	10 °C	22 °C	30 °C	37 °C	
<i>La. albidicyanolytica</i>	6	23.1	2	0.8	18	6.9	20	7.7	+/-	++/+	++	++	++	++/ ±
<i>C. bocalium</i>	4	15.4	4	1.5	7	2.7	11	4.2	+/-	++	++	++	++	++
<i>C. bowmanii</i> **	3	11.5	3	1.2	1	0.4	3	1.2	+/-	++	++	++	++	++
<i>C. butyricum</i>	1	3.8	1	0.4	0	0	1	0.4	-	++	++	+	+	+
<i>C. frigidicarnis</i>	3	11.5	1	0.4	2	0.8	3	1.2	+	++	++	++	++	++
<i>C. gisigenes</i> **	7	26.9	22	8.5	0	0	22	8.5	++	++	++/+	++/ ±	++/ ±	++/ ±
<i>C. algidicarnis</i>	1	3.8	0	0	2	0.8	2	0.8	+	++	++	+	+	+
<i>C. serratiforme</i>	4	15.4	3	1.2	1	0.4	4	1.5	+/-	+	++	++	++	++
<i>C. subterminale</i>	14	53.8	11	4.2	15	5.8	26	10.0	+/-	++	++	++/ ±	++/ ±	++/ ±
<i>C. sulfidigenes</i>	1	3.8	1	0.4	0	0	1	0.4	+	++	++	++	++	++
<i>C. ingluense</i>	5	19.2	19	7.3	0	0	19	7.3	+/-	++	++	++	++	++
<i>C. ingluense</i> -like**	8	30.8	18	6.9	0	0	18	6.9	++/ ±	++	++	++	++	++
<i>C. vincentii</i>	1	3.8	1	0.4	0	0	1	0.4	-	++	++	+	-	-
<i>Clostridium</i> spp.	12	46.2	19	7.3	2	0.8	21	8.1	++/ ±	++	++	++/ ±	++/ ±	++/ ±

^a Growth grading: good (++), weak (+), or no growth (-); *** were also identified by qPCR 1 or 2 (see Table 1).

Table 5
Number and percentage of qPCR positive PYGS enrichment and culturable samples for *C. estertheticum* and *C. frigoriphilum*.

qPCR positive-PYGS	n	n (%) Culturable PYGS		Heated (80 °C, 5 min)	
		Untreated Pooled ^a	Single ^a **	Pooled ^a	Single ^a **
Strongly positive					
<i>C. estertheticum</i>	15	1 (6.7 %)	-	15 (100 %)	14 (93.3 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	14	-	-	4 (28.6 %)	3 (21.4 %)
Moderately positive					
<i>C. estertheticum</i>	29	2 (6.9 %)	-	5 (17.2 %)	3 (10.3 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	11	-	-	2 (18.2 %)	3 (27.3 %)
Weakly positive					
<i>C. estertheticum</i>	15	-	-	4 (26.7 %)	4 (26.7 %)
<i>C. frigoriphilum</i>	9	-	-	1 (11.1 %)	-
Total (both species)	93	3 (3.2 %)	-	31 (33.3 %)	25 (26.8 %)

^a PCR positive in pooled colonies; ** Single (pure) colony could be isolated and identified as *C. estertheticum* or *C. frigoriphilum* by qPCR 1.

Table 6
Number and percentage of positive animals (either faecal or hide wipe samples) tested by qPCR and culture methods and species isolated by culture from qPCR-positive samples (total animals, n = 260).

Species	Positive animal				%
	qPCR		Culture		
	n	%	n	%	
<i>C. estertheticum</i> ^a	59	22.7	21	8.1	35.6
<i>C. frigoriphilum</i> ^a	34	13.1	6	2.3	17.6
<i>C. bowmanii</i>	85	32.7	4	1.5	4.7
<i>C. ingluense</i> -like	88	33.8	18	6.9	20.5
<i>C. gisigenes</i>	37	14.2	22	8.5	59.5
<i>C. algidicarnis</i>	2	0.8	2	0.8	100.0

^a Can only be culturally isolated in the second isolation phase after the incubation period has been extended to 14–16 weeks.

sample. This could be due to differences in the sampling method and the degree of contamination of the hide with dirt or faeces. The study by Moschonas et al. (2009) took place in the abattoir, and pieces of the animals' hide were taken for examination, whereas in the present study the samples were obtained by wiping the hide of cattle on the farm where the animals normally live. The contamination of animal hides with faeces or soil was not explicitly scaled in this study or recorded in the study of Moschonas et al. (2009). However, on each farm visit it was found that the animals were kept dry in the barn and no significant amounts of faeces or other dirt particles were found on the skin of the cattle during sampling.

To isolate cold-tolerant clostridia, a minimum of eight weeks is required, or longer if the first cultivation attempt was unsuccessful. Faecal samples contain a wide variety of microorganisms, including cold-tolerant facultatively anaerobic bacteria, which can grow excessively on the non-selective CBA plates, as shown by the results of the cultivation of the untreated PYGS enrichment in this study (see Table 5). However, CBA is rich in nutrients and is, in principle, suitable as a culture medium for bacteria that are difficult to cultivate. It has already been used in many studies for the isolation of cold-tolerant clostridia (e. g., Broda et al., 2009; Moschonas et al., 2009). Two methods are usually used to reduce the number of non-spore-forming accompanying microorganisms in the sample suspensions before they are spread on CBA plates, i.e., by heating at 80 °C for 10 min or by treatment with ethanol 50 % v/v (Broda et al., 1998b; Moschonas et al., 2009; Wambui et al., 2021).

The first isolation test was performed after the PYGS broths (n = 520) had been enriched for 4–5 weeks. The clostridial isolates were subjected to the test of the growth temperature. Almost all isolates can grow very well at temperatures between 10 °C and 30 °C, while only isolates of *C. gisigenes* (n = 22) can grow very well at 4 °C–30 °C (see Table 4). It is possible that many of the isolated clostridia are unable to germinate at 4 °C. The spores simply survive this temperature and germinate after activation by heat and grow at an incubation temperature of 10 °C. This

assumption is consistent with the results that *La. algidixylanolytica*, *C. subterminale*, *C. botulinum*, and *C. algidicarnis* were isolated from 18, 15, 7, and 2 hide wipe enrichments, respectively, although the PCR results of the toxin samples are only weakly positive for *Clostridium* spp. (Ct-values >36). In addition, the pure isolates of these three species do not grow or grow poorly at 4 °C. Among the isolated clostridia, the species *C. botulinum*, including psychrotrophic strains, are considered pathogenic as they can produce toxins (Broda et al., 1998a; Dahlsten et al., 2015). *C. botulinum* was isolated from 4.2 % of the animals examined in this study. All strains showed haemolytic activity and can grow well at temperatures between 10 °C and 37 °C; no other characteristics of these strains were analysed in the present study. However, it should be noted that the toxin production potential of these *C. botulinum* strains remains to be fully assessed in a follow-up study to determine whether they may pose a risk to animal or human health. This can be done using qPCR specific for botulinum toxin types A-F (Hill et al., 2010; Lindström et al., 2001; Prévot et al., 2007) and toxicity testing using cell culture-based methods (Hong et al., 2016; Rust et al., 2017).

C. estertheticum and *C. frigidophilum* could not be isolated from any sample of the first isolation phase. Similarly, Moschonas et al. (2009) showed that *C. estertheticum* can be isolated to a very small extent with a 10-min treatment at 80 °C. However, in a previous experiment (Dorn-In et al., 2022), the survival rate was higher after heating the PYGS enrichment of contaminated meat juice. In the present study, *C. estertheticum* and *C. frigidophilum* could only be isolated from the PCR-positive samples after a long incubation period of 14–16 weeks from the second isolation attempt. The isolation rate of *C. estertheticum* from all PCR-positive samples was 35.6 %, while the isolation rate from strongly PCR-positive samples was 93.3 %, which is very high. In contrast, the isolation rate from samples with moderately and weakly positive PCR results was very low.

The detection of cold-tolerant clostridia in faecal and environmental samples is difficult due to their slow growth and the lack of selective culture media. Therefore, in addition to cultivation, molecular biological methods such as PCR have often been used in parallel. The positive rate of cold-tolerant clostridia determined by the culture method is very low compared to that determined by qPCR, as shown in this and other studies (Esteves et al., 2020; Moschonas et al., 2009; Wambui et al., 2021). In this context, the PCR results should be interpreted with caution, as PCR-positive samples could be due to inactivated or non-culturable forms of clostridia, especially the enrichments that produce Ct-values >36. Enrichment steps are required for faecal and environmental samples, and a strongly positive PCR result (Ct-values <30) is to be expected if clostridia multiply in the enrichment. On the other hand, the cultivation conditions for these bacteria may not be optimal, as the vegetative cells died during handling of the sample and therefore cannot be cultivated. Furthermore, different clostridial strains can behave differently in terms of sporulation and even their robustness to environmental changes. The incubation period of 4 weeks at 4 °C is generally sufficient to detect the growth of cold-tolerant clostridia by qPCR. However, it is not certain that they can produce sufficient numbers of spores at this stage to survive a 5-min treatment at 80 °C and can be detected in a small volume (50 µl) of PYGS dropped onto the CBA. If the enrichment contains only a small number of spores, increasing the volume of heat-treated PYGS spread onto the CBA can increase the isolation rate. However, due to the large number of samples and replicates analysed, this was not performed for reasons of space and time constraints.

5. Conclusion

A total of 260 faecal and 260 hide wipe samples were taken from 260 cattle from 26 farms in Austria. Molecular biological and cultivation methods were applied to all samples. The results show that cold-tolerant clostridia are widespread in Austrian cattle farms. The prevalence of cold-tolerant clostridia associated with meat spoilage, such as

C. estertheticum, *C. frigidophilum* and *C. gasigenes*, in faecal samples can be classified as high. However, they could only be detected in a few skin wipe samples, as the animals were housed in a good housing systems and the animals' skin was kept dry and clean. In general, dairy cows in pasture-based housing systems, such as those in this study, are kept under good hygienic conditions, especially when compared to other housing systems such as free-range or confined housing systems, where animals may be more intensively exposed to soil or faecal contamination. The results of this study clearly demonstrate that cattle faeces represent a habitat of cold-tolerant clostridia. Thus, hides contaminated with faeces can also be a significant source of contamination for meat. As the dehiding of animals is one of the critical steps in the cattle slaughter process, it is important that cattle farms pay attention to the cleanliness of the cattle delivered for slaughter. At the same time, slaughterhouses must also ensure strict hygiene during dehiding in order to minimise contamination of the carcasses and meat. Beef production is associated with high consumption of resources such as agricultural land, feed and water, and significantly contributes to environmental problems. In addition, to reduce microbial spoilage and ensure food safety, effective hygiene measures and close co-operation among all stakeholders are essential to prevent microbial contamination and minimise avoidable meat losses.

CRedit authorship contribution statement

Samart Dorn-In: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Data curation, Conceptualization. **Vanessa Zand:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Joachim Angerer:** Writing – review & editing, Investigation. **Kahraman Özbek:** Investigation. **Cassandra Eibl:** Data curation. **Karin Schwaiger:** Writing – review & editing, Resources.

Funding

This work was financially supported by the “BIOS Science Austria” (www.bios-science.at).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Andrea Pauker, Dimitri Sofka, Michaela Mach, and Morten Sorig for their support and help with the laboratory work at the Unit of Food Hygiene and Technology (Centre for Food Science and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna). Great thanks to Prof. Dr. Johannes Lorenz Khol from the Research and Teaching Extension for Alpine Ruminant Medicine (Clinical Centre for Ruminant and Camelid Medicine, Clinical Department for Farm Animals and Food System Science, University of Veterinary Medicine Vienna) for supporting part of the samples for investigation and required information.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2025.104838>.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

- Brightwell, G., Clemens, R., 2012. Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. Estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat Sci.* 92, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.025>.
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L., 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 335–352. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00070-4).
- Broda, D.M., Boerema, J.A., Bell, R.G., 1998a. A PCR survey of psychrotrophic *Clostridium botulinum*-like isolates for the presence of BoNT genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 27, 219–223. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1998.00420.x>.
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R.G., 1998b. Efficacy of heat and ethanol spore treatments for the isolation of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats. *Int. J. Food Microbiol.* 39, 61–66. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00119-0).
- Broda, D.M., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 1999. *Clostridium frigidicarnis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1539–1550. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1539>.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 2000a. *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylan-degrading, spore-forming bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 623–631. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-623>.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, R.G., Musgrave, D.R., 2000b. *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 107–118. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-107>.
- Broda, D.M., Boerema, J.A., Brightwell, G., 2009. Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *J. Appl. Microbiol.* 107, 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04193.x>.
- Dahlsten, E., Lindström, M., Korkeala, H., 2015. Mechanisms of food processing and storage-related stress tolerance in *Clostridium botulinum*. *Res. Microbiol.* 166, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.09.011>.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M., 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *J. Sci. Food Agric.* 49, 473–486. <https://doi.org/10.1002/jfpa.2740490410>.
- Dorn-In, S., Bassitta, R., Schwaiger, K., Bauer, J., Hölzel, C.S., 2015. Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *J. Microbiol. Methods* 113, 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.001>.
- Dorn-In, S., Schwaiger, K., Springer, C., Barta, U., Ulrich, S., Gareis, M., 2018. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigidiphilum*, *C. bovis* and *C. Tagliuense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.020>.
- Dorn-In, S., Marg, S., Schwaiger, K., 2022. A simple method for the isolation of cold-tolerant *Clostridium* spp. from meat samples. *Int. J. Food Microbiol.* 378, 109836. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109836>.
- Dorn-In, S., Führer, L., Gareis, M., Schwaiger, K., 2023. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. *Food Microbiol.* 109, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104147>.
- Esteves, E., Whyte, P., Gupta, T.B., Bolton, D.J., 2020. An investigation into the ecological niches and seasonal nature of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* in the Irish beef farm environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 71, 660–666. <https://doi.org/10.1111/lam.13344>.
- Esteves, E., Gupta, T.B., Whyte, P., Brightwell, G., Bolton, D., 2021. An investigation of the environmental niches of blown pack spoilage causing *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on New Zealand beef and sheep farms. *Food Microbiol.* 98, 103769. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103769>.
- Haas, K.N., Blanchard, J.L., 2020. Redefinition of the *Clostridium clostridioforme* and *Clostridium sphenoides* clades as *Enterocloster* gen. nov. and *Lacrimispora* gen. nov., including reclassification of 15 taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, 23–34. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003698>.
- Hill, B.J., Skerry, J.C., Smith, T.J., Aron, S.S., Douek, D.C., 2010. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes. *BMC Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-267>.
- Hong, W.S., Pezzi, H.M., Schuster, A.R., Berry, S.M., Sung, K.E., Beebe, D.J., 2016. Development of a highly sensitive cell-based assay for detecting botulinum neurotoxin type A through neural culture media optimization. *SLAS Discov* 21, 65–73. <https://doi.org/10.1177/1087057115608103>.
- Lindström, M., Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hietu, S., Korkeala, H., 2001. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5694–5699. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5694-5699.2001>.
- Lawson, P., Dainty, R.H., Kristiansen, N., Berg, J., Collins, M.D., 1994. Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 153–157. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00930.x>.
- Lund, B.M., Graham, A.F., George, S.M., Brown, D., 1990. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic, type B *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 481–492. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01539.x>.
- Marg, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., Dorn-In, S., 2021. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigidiphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 340, 109053. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>.
- Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., 2009. Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* 7, 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>.
- Prévot, V., Tweepenninckx, F., Van Herom, E., Linden, A., Content, J., Kimpe, A., 2007. Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. *Zoonoses Public Health* 54, 320–327. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01070.x>.
- Rast, A., Doran, C., Hart, R., Binz, T., Stickings, P., Sesardic, D., Peden, A.A., Davletov, B., 2017. A cell line for detection of botulinum neurotoxin type B. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00796>.
- Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppendstedt, R.M., Hippe, H., Staackebandt, E., 2003. Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigidis* sp. nov., *Clostridium lacusfrigidensis* sp. nov., *Clostridium bovis* sp. nov. and *Clostridium psychrophilum* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1019–1029. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.02554.0>.
- Suetin, S.V., Sheherbakova, V.A., Chavilskaya, N.A., Rivkina, E.M., Suzina, H.E., Lysenko, A.M., Gilchinsky, D.A., 2009. *Clostridium agguense* sp. nov., a psychrotolerant, anaerobic, spore-forming bacterium from permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1421–1426. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.002295-0>.
- Thornton, C.G., Passen, S., 2004. Inhibition of PCR amplification by phytic acid, and treatment of bovine fecal specimens with phytase to reduce inhibition. *J. Microbiol. Methods* 59, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2004.06.001>.
- Wambui, J., Ghelmetti, G., Morach, M., Hochreutener, M., Stephan, R., 2021. Detection of psychrophilic *Clostridium* spp. in fecal samples from cattle of different ages sampled at the slaughterhouse level. *J. Food Prot.* 84, 58–62. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-259>.

Anlage 2: Beitrag und Posterpräsentation bei DVG Tagung, 2023

Vorkommen kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich

Samart Dorn-In ¹, Vanessa Zand ¹, Cassandra Eibl ², Johannes Lorenz Khol ^{2,3}, Karin Schwaiger¹

¹ Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Veterinärmedizinische Universität Wien

² Universitätsklinik für Wiederkäuer, ³ Außenstelle „Der Wiederkäuer im Alpenraum“ (Innsbruck), Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin, Universitätsklinik für Wiederkäuer, Veterinärmedizinische Universität Wien

Abstract

Kältetolerante *Clostridium* spp. (z. B. *C. estertheticum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes*) sind als Verderbserreger von vakuumverpacktem frischem Rindfleisch bekannt ([Mang et al., 2021](#)). Sie befinden sich in Permafrostböden und verbreiten sich in allen Böden des gemäßigten und subtropischen Klimas. Als Kontaminationsquellen für Fleisch gelten Kot und Felle von geschlachteten Tieren. Der Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien ist teilweise an der Aufblähung der Verpackung erkennbar, die sogenannte „Blown Pack Spoilage“ (BPS), verursacht durch CO₂- und H₂-Bildung. Auch wenn einige Clostridien Spezies/Stämme Gas nur in geringer Menge produzieren, kann das betroffene Fleisch deutliche Verderbszeichen zeigen, z. B. starker Verlust von Fleischtropfsaft, Entfärbungen, Änderung der Fleischkonsistenz und sensorische Abweichungen wie der an faule Eier erinnernde Sulfidgeruch ([EFSA, 2016](#); [Mang et al., 2021](#)).

Die beschriebene Problematik wurde für viele Länder, insbesondere für solche mit hoher Fleischproduktion und/oder hohem Fleischkonsum beschrieben, wie Brasilien, Irland, Neuseeland, das Vereinigte Königreich und die Vereinigten Staaten. In Deutschland sind laut eigener Studien 34 – 53 % des vakuumverpackten Rindfleischs mit kältetoleranten Clostridien belastet ([Bonke et al., 2016](#); [Mang et al., 2021](#)). In Österreich gibt es bisher keine Daten zum Vorkommen von kältetoleranten Clostridien in Tierbeständen, Schlacht- und

Fleischverarbeitungsbetrieben sowie in vakuumverpacktem Fleisch und Fleischprodukten im Handel.

Ziele des Projekts sind daher, die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich festzustellen. Dazu werden Kot- (n = 600) und Fellproben (Schwammproben, n = 600) von Rindern aus verschiedenen Tierbeständen (n = 60) in Österreich kulturell auf das Vorkommen kältetoleranter Clostridien untersucht. Clostridien-Isolate werden auf Spezies-Ebene identifiziert. Die Ergebnisse werden präsentiert und diskutiert, womit erstmals Daten bezüglich des Vorkommens kältetoleranter Clostridien in Rinderbetrieben in Österreich und in Europa dargestellt werden. Anhand der Daten kann die Kontaminationsgefahr für Rindfleisch abgeschätzt werden, woraus sich ggfs. risikominimierende hygienische Maßnahmen während der Rinderschlachtung sowie in den weiteren Schritten der Fleischverarbeitung ableiten lassen.

Referenzen

Bonke, R., Drees, N., Gareis, M., 2016. Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *Fems. Microbiol. Lett.* 363, 1-7.

EFSA: European Food Safety Authority, 2016. Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA J.* 14, 4523.

Mang, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., Dorn-In, S., 2021. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigidophilum* and *C. aldicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 340, 1-8.

Korrespondenzadresse:

Dr. med. vet. Samart Dorn-In
Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln
Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und öffentliches
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin,
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1
Gebäude GA/III
A-1210 Wien
Österreich
E-Mail: Samart.Dorn-In@vetmeduni.ac.at

Vorkommen kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich

Samart Dorn-In ¹, Joachim Angerer ¹, Vanessa Zand ¹, Cassandra Eibl ², Johannes Lorenz Khol ^{2,3}, Karin Schwaiger ¹

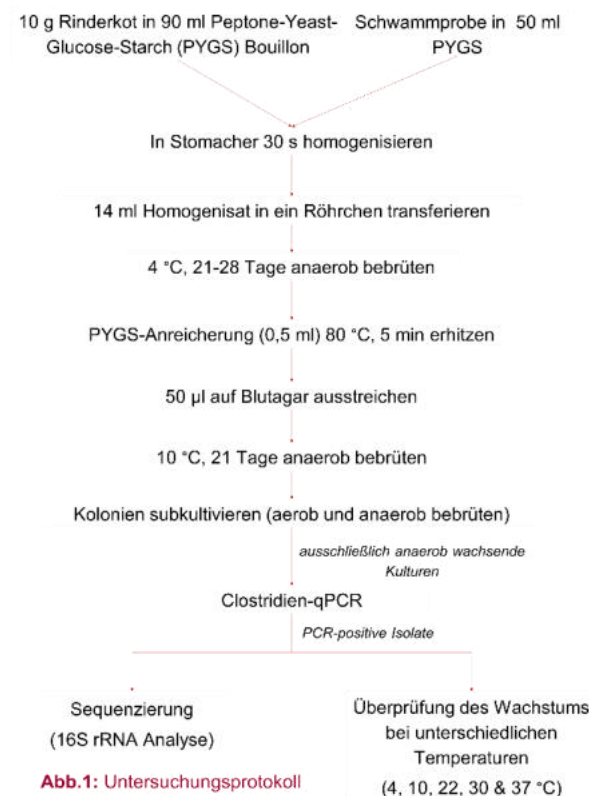
¹ Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, ² Universitätsklinik für Wiederkäuer, ³ Universitätsklinik für Wiederkäuer, Außenstelle Tirol, Veterinärmedizinische Universität Wien

Einleitung

Einige kältetolerante Clostridien sind als Verderbserreger von vakuumverpacktem Rindfleisch, Verursacher der sogenannten „Blown Pack Spoilage“ (BPS), bekannt. Als Kontaminationsquellen gelten Kot und Felle von geschlachteten Tieren. Abgesehen von einer Studie von Moschonas et al., 2009, gibt es bisher generell nur wenige Informationen über mögliche Kontaminationsquellen. Ziel des Projekts ist es daher, die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in österreichischen Rinderbeständen festzustellen. Anhand der Daten kann die Kontaminationsgefahr für Rindfleisch abgeschätzt werden, woraus sich ggfs. risikominimierende Hygienemaßnahmen während der Rinderschlachtung sowie in den weiteren Schritten der Fleischverarbeitung ableiten lassen.

Material und Methodik

Jeweils 230 Rinderkotproben, sowie Schwammproben (18x10x0,3 cm) von Rinderhäuten von 23 Rinderbetrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol (Österreich) wurden im Zeitraum April - Juni 2023 beprobt und kulturell qualitativ auf kältetolerante Clostridien untersucht (Abb. 1).



Referenz:

Dorn-In et al., 2023. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. Food Microbiol 109. Moschonas et. al, 2009. Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. J. Appl. Microbiol. 7, 616-624.

63. DVG - Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz- Kontakt: Abteilung für Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, Gebäude GA/III, 1210 Wien, Österreich – Samart.Dorn-In@vetmeduni.ac.at

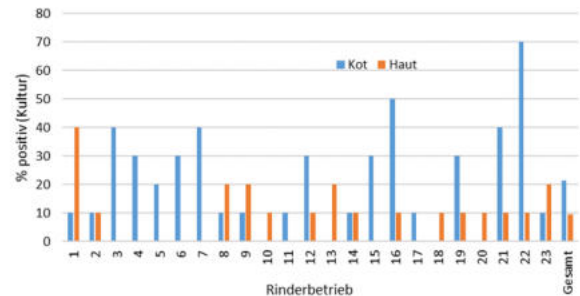


Abb. 2: Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbetrieben

Tabelle 1: Clostridien-Isolate und Wachstumstemperaturen

Identifizierung	n pos. Betrieb	n der Isolate aus		Wachstumstemperatur (°C)*				
		Kot	Haut	Gesamt	4	10	22	30
<i>C. albidolytica</i>	5	2	7	9	+/+	+/+	++	++
<i>C. botulinum</i>	3	4	1	5	+/+	++	++	++
<i>C. bowmanii</i>	3	2	1	3	+/+	++	++	++
<i>C. butyricum</i>	1	1	0	1	-	++	++	+
<i>C. frigidicarnis</i>	3	1	2	3	+	++	++	++
<i>C. gasigenes</i>	7	22	0	22	++	++	++	++
<i>C. putrefaciens</i>	1	0	2	2	+	++	++	+
<i>C. sartagoforme</i>	4	3	1	4	+/+	+	++	++
<i>C. subterminale</i>	14	11	15	26	+/+	++	++	++
<i>C. sulfidigenes</i>	1	1	0	1	+	++	++	++
<i>C. tagluense</i>	1	1	0	1	++	++	++	++
<i>C. vincentii</i>	1	1	0	1	-	++	++	+
<i>Clostridium</i> spp.	11	9	2	16	++	++	++	++

* Wachstumsgrad: ++: gut, +: gering, -: kein Wachstum

Ergebnisse & Diskussion

Insgesamt wurden 690 Kolonien subkultiviert, 223 (32,3 %) davon wuchsen ausschließlich unter anaeroben Bedingungen. Von diesen erwiesen sich nach DNA-Extraktion in der Clostridien-qPCR (Dorn-In et al., 2023) n = 94 (42,2 %) als positiv. Die Speziesbestimmung erfolgte mittels Sequenzierung und Vergleich der 16S-rRNA mit BLASTn (NCBI).

Abb. 2 zeigt die Clostridien-Prävalenz in den beprobten Rinderbetrieben (n = 23), die durchschnittlich bei 21 % der Kot- und 10 % der Hautproben lag. Tabelle 1 zeigt die identifizierten Spezies der Gattung *Clostridium* und deren Wachstumstemperaturen. Von besonderer Bedeutung ist *C. gasigenes* als bekannter BPS-Verursacher. Diese Spezies wurde in 30 % der untersuchten Rinderbetriebe, sowie in 9,6 % der untersuchten Rinderkotproben nachgewiesen. Mit ähnlicher Methodik wurden in Irland 12,3 % der Rinderkotproben eines Schlachthofes positiv auf diese Spezies getestet (Moschonas et al., 2009).

Anhand dieser Ergebnisse ist die Prävalenz von kältetoleranten Clostridien in bzw. auf Rinderkot- und -haut als gering zu bewerten. Grund hierfür könnte eine geringe Zahl an gebildeten Sporen sein, denn die vegetativen Zellen selbst überstehen die Hitzebehandlung während der Anreicherung nicht. Um dies zu überprüfen, werden im Anschluss an diese Arbeit Probenanreicherungen mittels qPCR untersucht mit den Ergebnissen mit der Kultur verglichen.

Förderungen: Gefördert vom „BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften“ und vom „Land Tirol im Rahmen der Stiftungsprofessur Wiederkäuermedizin im Alpenraum“.

Anlage 3: Beitrag und Posterpräsentation and für Kongressband bei ALVA-Tagung, 2025

Vorkommen kältetoleranter Clostridien, Verderbserreger von Fleisch, in Rinderbetrieben in Österreich

Occurrence of cold-tolerant Clostridia, spoilage organisms of meat, in cattle farms in Austria

Samart Dorn-In^{1*}, Vanessa Zand¹, Joachim Angerer¹, Kahraman Özbek², Cassandra Eibl³ und Karin Schwaiger¹

Einleitung

Mit einem Fleischkonsum von 86,6 kg pro Person und Jahr gehört Österreich in Europa und weltweit zu den Ländern mit dem höchsten pro Kopf-Verbrauch von Fleisch (STATISTIK AUSTRIA, 2025). Die Herstellung von Fleisch verbraucht enorme Ressourcen (WWF, 2025). Daher zieht jeder Fleischverlust, etwa aufgrund mikrobiellen Verderbs, neben einem hohen wirtschaftlichen Verlust auch negative Auswirkungen auf die Umwelt nach sich. Fleisch ist auf allen Stufen seiner Produktionskette einem Risiko durch Kontamination mit Mikroorganismen ausgesetzt, beginnend bei der Schlachtung über die Zerlegung, Verarbeitung, Verpackung, Lagerung, den Transport bis hin zum Verkauf an den Verbraucher. Der Verderbsprozess durch mesophile, aerobe Keime kann durch Vakuumverpackung und Kühlung verlangsamt werden. Unter diesen Bedingungen können sich jedoch strikt anaerobe, kältetolerante Clostridien etablieren - vor allem die Spezies *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes*. Kältetolerante Clostridien kommen in allen Böden der gemäßigten und subtropischen Klimazonen vor. Rinder können diese Bakterien über den Boden und die Umwelt beim Weidegang oder über das Futter aufnehmen. Als Kontaminationsquellen für Fleisch gelten daher Kot und Felle von geschlachteten Tieren. Der Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien ist teilweise an der Aufblähung der Verpackung erkennbar, die sogenannte „Blown Pack Spoilage“ (BPS) - verursacht durch CO₂- und H₂-Bildung (siehe Abbildung 1). Außerdem hat das betroffene Fleisch einen käsigen Fehlgeruch, der auf die von diesen Bakterien produzierten Substanzen Butanol und Buttersäure zurückzuführen ist. Sporen von kältetoleranten Clostridien sind resistent gegen Hitze, verschiedene Umwelteinflüsse und eine Vielzahl von Desinfektionsmitteln. Entsprechende Fälle wurden bereits in vielen Ländern, insbesondere jenen mit hoher Fleischproduktion und/oder -konsum, dokumentiert, darunter Brasilien, Irland, Neuseeland, das Vereinigte Königreich und die Vereinigten Staaten. In Deutschland sind laut eigener Studien 34 – 53 % des vakuumverpackten Fleisches mit kältetoleranten Clostridien belastet (BONKE et al., 2016; MANG et al., 2021). In Österreich gibt es bisher keine Daten zum Vorkommen von kältetoleranten Clostridien in Tierbeständen sowie in Fleisch und in der Lebensmittelkette. Ziel des Projekts ist daher, die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in Rinderbeständen in Österreich festzustellen. Die Ergebnisse können zur Entwicklung einer Strategie beitragen, um hygienische Maßnahmen für die geschlachteten Rinder zu gewährleisten, mit dem Ziel, die Kontamination von kältetoleranten Clostridien in Rindfleisch zu verhindern.



Abbildung 1: A: Darstellung der Rinderhaltung in einer Alpenregion, B: Rindfleisch mit sichtbarer Aufblähung der Vakuumverpackung, verursacht durch *C. estertheticum*

Material und Methoden

Tierproben: Insgesamt wurden 520 Proben, davon 260 Kot- und 260 Hautwischproben, von 260 gesunden Milchkühen aus 26 Milchviehbetrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol gesammelt. Pro Betrieb wurden zehn erwachsene Tiere beprobt. Von ein und demselben Tier wurden eine Kotprobe und eine Hautwischprobe genommen. Die Kotproben wurden direkt aus dem Rektum oder - unter der Voraussetzung, dass die Kühe frischen Kot abgesetzt hatten und das Tier eindeutig identifiziert werden konnte - vom Boden entnommen. Zur Gewinnung der Hautwischproben wurde eine Fläche von einem Quadratmeter im kaudalen Bereich der Kuh mehrmals vertikal und horizontal mit einem angefeuchteten, sterilen Schwammtuch abgewischt.

Mikrobiologische Methode: Die Kot- und Hautwischproben wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme in Anreicherungsmedium (PYGS: Pepton-Hefe-Glukose-Stärke) homogenisiert. Die Anreicherungsproben (14 ml) wurden in ein steriles Glasröhrchen gefüllt und anaerob bei 4 °C 5 Wochen lang bebrütet. Alle PYGS-Anreicherungen (n = 520) wurden der Kulturmethode unterzogen. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit für die hitzestabilen Clostridiensporen wurden 0,5 ml der PYGS-Anreicherung in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten lang bei 80 °C erhitzt, um die vegetativen Zellen der Begleitmikrobiota abzutöten. Anschließend wurden 50 µl der hitzebehandelten PYGS auf eine Blutagarplatte getropft und 4 Wochen bei 10 °C anaerob bebrütet. Alle Kolonien mit unterschiedlicher Morphologie wurden auf einer neuen Blutplatte subkultiviert und 3 Wochen bei 10 °C anaerob bebrütet. Aus den subkultivierten Kolonien wurde die DNA extrahiert und diese anschließend mittels qPCR analysiert.

Molekularbiologische Methode: Die bakterielle DNA in der Anreicherungsprobe (Kot- und Fellwischproben) wurde mit der Extraktionsmethode, einer Kombination von InhibitEX-Buffer (Qiagen) und DNA-Extraktionskit High Pure Template Preparation Kit (Roche), extrahiert. Primerpaare und Sonden sowie die qPCR-Methoden wurden aus eigenen früheren Studien übernommen (DORN-IN et al., 2018; MANG et al., 2021). Es wurden insgesamt 3 Multiplex-qPCR-Verfahren durchgeführt. Mit diesen konnten Bakterien der Gattung *Clostridium* allgemein sowie die Spezies *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii*, *C. tagluense*-like, *C. algidicarnis*, *C. putrefaciens* und *C. gasigenes* nachgewiesen werden. Für den Fall, dass die extrahierte DNA ein positives PCR-Ergebnis für die Gattung *Clostridium*, aber ein negatives Ergebnis für die genannten Arten lieferte, wurde das entsprechende PCR-Produkt aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Microsynth GmbH (Wien) geschickt, um eine Identifikation auf Speziesebene zu ermöglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die Prozentsätze der mittels qPCR und Kultivierung in Rinderbetrieben, Rinderkot und Hautwischproben detektierten Clostridien-Spezies. Es ist zu beachten, dass der Anteil der für die nachgewiesenen Spezies positiv getesteten Betriebe höher ist als jener der Tiere (s. Abbildung 2). Dies basiert auf der Berechnung, dass der Betrieb als positiv eingestuft wird, wenn mindestens eine Kot- oder Hautabstrichprobe aus dem Betrieb positiv auf die betreffende Clostridien-Spezies getestet wurde. Laut qPCR waren 22,3 % der Kotproben positiv für *C. estertheticum*, 33,8 % für *C. tagluense*-like, 32,7 % für *C. bowmanii*, 11,2 % für *C. frigoriphilum* und 14,2 % für *C. gasigenes*. Die strikt anaeroben kältetoleranten Clostridien sind schwer kultivierbar und wachsen extrem langsam. Trotz der Fähigkeit, Sporen zu bilden, ist es auch schwierig abzuschätzen, ob diese Bakterien einfach im Anreicherungsmedium auskeimen können, nachdem sie mit der Luft in Kontakt gekommen sind. Entsprechend reichten die Isolierungsraten der Spezies aus den PCR-positiven Proben von gering (4,7 %) bis mäßig hoch (59,5 %, s. Abbildung 2). Zusätzlich zu den genannten Spezies wurden weitere neun Clostridien-Spezies isoliert, wobei *C. subterminale*, *Lacrimispora algidixylanolytica* (syn. *C. algidixylanolytica*), *C. tagluense* und *C. botulinum* am häufigsten kultiviert wurden (s. Abbildung 3). Die Prävalenz von kältetoleranten Clostridien in den Kotproben von Rindern in Österreich, die mittels qPCR bestimmt wurde, ist deutlich höher als diejenige der Hautwischproben. Letztere könnte mit dem geringeren Kontaminationsgrad der Haut mit Kot oder Erde zusammenhängen.

Die Ergebnisse der Kotproben aus dieser Studie stimmen mit den Ergebnissen der Studien in Irland und der Schweiz überein. In Schlachthöfen in Irland stellten MOSCHONAS et al. (2009) fest, dass 17,9 %

und 25,4 % der Rinderkotproben PCR-positiv auf *C. estertheticum* bzw. *C. gasigenes* waren, während in der Schweiz eine *C. estertheticum*-ähnliche Gruppe in 39 % der Kotproben durch RT-PCR nachgewiesen wurde (WAMBUI et al., 2021). Bei Kotproben aus Rinderbetrieben in Irland waren 8,5 % und 45 % der Proben qPCR-positiv auf *C. estertheticum* bzw. *C. gasigenes*, während in Neuseeland die entsprechenden Spezies in 4 % und 18 % der Kotproben nachgewiesen wurden (ESTEVES et al., 2020, 2021). Über die Kontamination von Rinderhäuten mit kältetoleranten Clostridien liegt bislang nur eine relevante Studie von MOSCHONAS et al. (2009) vor, die feststellten, dass 13,3 % und 18,8 % der Tierhäute PCR-positiv auf *C. estertheticum* bzw. *C. gasigenes* waren. Dieses Ergebnis unterscheidet sich erheblich von dem vorliegenden mit 0,8 % (ausschließlich *C. estertheticum*). Dies könnte auf Unterschiede in der Probennahmemethode und dem Grad der Kontamination der Haut mit Schmutz oder Kot zurückzuführen sein. Der Kontaminationsgrad von Tierhäuten mit Kot oder Erde wurde jedoch weder in dieser Studie noch in der Studie von MOSCHONAS et al. (2009) erfasst.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Weiderinder unter den gegebenen Haltungsbedingungen nur eine geringe Belastung der Haut mit Clostridien aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass gut geführte weidebasierte Haltungssysteme auch aus hygienischer Sicht vorteilhaft sein können. Im Gegensatz dazu kann beispielsweise bei sehr beengten Ställen, zu einem häufigeren Kontakt der Tiere mit Kot oder verschmutztem Boden kommen. Da das Enthäuten der Tiere zu den hygienisch kritischen Schritten im Schlachtprozess zählt, ist die Sauberkeit der Tiere bei Anlieferung neben der hygienischen Durchführung von Enthäutungs- und Ausweideprozessen entscheidend, um eine Kontamination des Rindfleisches mit kältetoleranten Clostridien zu vermeiden.

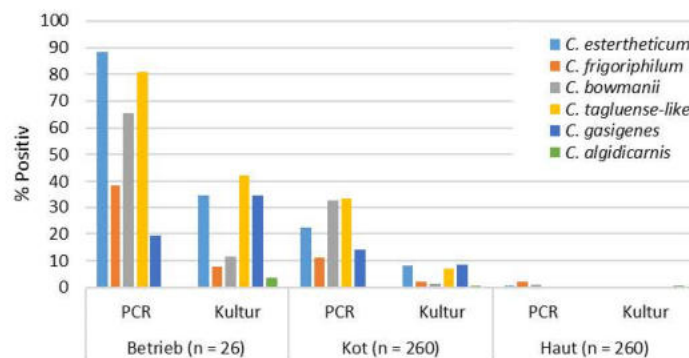


Abbildung 2: Mittels spezifischer qPCR und kultureller Methode detektierte Spezies

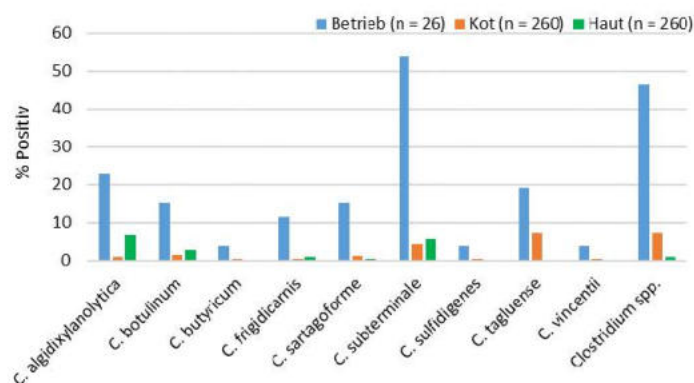


Abbildung 3: Mittels kultureller Methode nachgewiesene Spezies, bestätigt durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Zusammenfassung

Kältetolerante Clostridien sind für den Verderb von vakuumverpacktem Rindfleisch trotz kühler Lagerung und intakter Vakuumverpackung verantwortlich. Rinder können die Bakterien über den Boden und die Umwelt beim Weidegang oder über das Futter aufnehmen. Da die Rinderhaltung in Österreich oft als Weidehaltung betrieben wird, war es das Ziel dieser Studie, die Prävalenz von kältetoleranten Clostridien bei Rindern in diesem Land zu untersuchen und die nachgewiesenen Spezies zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden 260 Kot- und 260 Hautwischproben von 260 gesunden, erwachsenen Rindern aus 26 Betrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol entnommen. Die Proben wurden mit molekularbiologischen (PCR und Sequenzierung) und kulturellen Methoden untersucht. Mittels qPCR waren 22,3 % der Kotproben positiv für *C. estertheticum*, 33,8 % für *C. tagluense*-like, 32,7 % für *C. bowmanii*, 11,2 % für *C. frigoriphilum* und 14,2 % für *C. gasigenes*. Die Isolierungsraten der Spezies aus den PCR-positiven Proben reichten von 4,7 % bis 59,5 %. Zusätzlich zu den genannten Spezies wurden weitere neun Clostridien-Spezies kultiviert, wobei *C. subterminale*, *Lacrimispora algidixylanolytica* (syn. *C. algidixylanolytica*), *C. tagluense* und *C. botulinum* am häufigsten isoliert wurden. Die mittels qPCR ermittelte Prävalenz von kältetoleranten Clostridien in den Kotproben von Rindern in Österreich ist relativ hoch, während sie in den Hautwischproben sehr niedrig ist. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Rinder aus weidebasierten Haltungssystemen unter den untersuchten Bedingungen eine vergleichsweise geringe Hautkontamination mit Kot oder Erde aufwiesen. Dies ist im Hinblick auf den hygienisch kritischen Enthäutungsschritt von Bedeutung und kann zur Minimierung einer Kontamination des Fleisches mit kältetoleranten Clostridien beitragen.

Abstract

Cold-tolerant clostridia are responsible for the spoilage of vacuum-packed beef despite cool storage and intact vacuum packaging. Cattle can ingest the bacteria via the soil and the environment when grazing or via the feed. As cattle farming in Austria is often pasture-based, the aim of this study was to investigate the prevalence of cold-tolerant clostridia in cattle in this country and to identify the species detected. For this purpose, 260 faecal and 260 hide wipe samples were taken from 260 healthy adult cattle from 26 farms in the provinces of Salzburg and Tyrol. The samples were analysed using molecular biological (PCR and sequencing) and cultural methods. Using qPCR, 22.3% of the faecal samples were positive for *C. estertheticum*, 33.8% for *C. tagluense*-like, 32.7% for *C. bowmanii*, 11.2% for *C. frigoriphilum* and 14.2% for *C. gasigenes*. The isolation rates of the species from the PCR-detected samples ranged from 4.7% to 59.5%. In addition, nine *Clostridium* species were isolated by culture, with *C. subterminale*, *Lacrimispora algidixylanolytica* (syn. *C. algidixylanolytica*), *C. tagluense*, and *C. botulinum* being the most frequently found. The prevalence of cold-tolerant clostridia in faecal samples from cattle in Austria, as determined by qPCR, is relatively high, while it is very low in the skin wipe samples. The results of this study indicate that cattle from pasture-based husbandry systems showed comparatively low levels of skin contamination with faeces or soil under the conditions investigated. This is important with regard to the hygienically critical skinning step and can contribute to minimising contamination of the meat with cold-tolerant clostridia.

Förderungen

Dieses Projekt wurde vom „BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften“ gefördert.

Literatur

BONKE R, DREES N, GAREIS M (2016): Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *Fems Microbiol Lett* 363, 1-7.
DORN-IN S, SCHWAIGER K, SPRINGER C, BARTA L, ULRICH S, GAREIS M (2018): Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*,

C. bowmanii and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. Int J Food Microbiol 286, 162–169.

ESTEVE E, WHYTE P, GUPTA TB, BOLTON DJ (2020): An investigation into the ecological niches and seasonal nature of *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* in the Irish beef farm environment. Lett Appl Microbiol 71, 660–666.

ESTEVE E, GUPTA TB, WHYTE P, BRIGHTWELL G, BOLTON D (2021): An investigation of the environmental niches of blown pack spoilage causing *Clostridium estertheticum* and *Clostridium gasigenes* on New Zealand beef and sheep farms. Food Microbiol 98, 103769.

MANG S, SCHWAIGER K, LINDNER R, GAREIS M, DORN-IN S (2021): High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigoriphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. Int J Food Microbiol 340.

MOSCHONAS G., BOLTON DJ, SHERIDAN JJ, MCDOWELL DA (2009): Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. J Appl Microbiol 7, 616–624.

STATISTIK AUSTRIA (2024): Pro-Kopf-Verbrauch von Fleisch 2023 weiter rückläufig. Pressemitteilung: 13 411-177/24. <https://www.statistik.at/fileadmin/announcement/2024/08/20240902VersorgungsbilanzentierischeProdukte2023.pdf>. Abgerufen am 13.04.2025

WAMBUI, J., GHIEMMETTI, G., MORACH, M., HOCHREUTENER, M., STEPHAN, R., 2021. Detection of psychrophilic *Clostridium* spp. in fecal samples from cattle of different ages sampled at the slaughterhouse level. J Food Prot 84, 58-62.

WWF: Weltweiter Fonds für die Natur (2025): Fleischkonsum - Unser großer Hunger. <https://www.wwf.at/nachhaltig-leben/fleisch/>. Abgerufen am 13.04.2025

Adressen der Autoren

¹ Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen, Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen, Veterinärmedizinische Universität Wien.

² Firat University, Elâzığ, Turkey

³ Klinisches Zentrum für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin, Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen, Veterinärmedizinische Universität Wien,

* Ansprechpartner: Samart Dorn-In, samart.dorn-in@vetmeduni.ac.at

Anlage 4: Beitrag in Fachzeitschrift Klauentierpraxis

Kältetolerante Clostridien in vakuumverpacktem Rindfleisch aus Österreich: Vorkommen und Kontaminationswege

Auf einen Blick

- Hohe Nachweisrate von kältetoleranten Clostridien in Rinderkotproben aus österreichischen Rinderbetrieben
- 31 % des vakuumverpackten Rindfleischs aus dem österreichischen Einzelhandel sind mit kältetoleranten Clostridien kontaminiert.
- Hohe Gasproduktion und/oder käsiger Geruch sind Anzeichen für den Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien.
- Eine Kontamination mit kältetoleranten Clostridien führt zu einer kürzeren Haltbarkeitsdauer von vakuumverpacktem Fleisch

Einleitung

Clostridien sind obligat anaerobe sporenbildende Bakterien. Sie werden häufig im Erdboden, in Schlämmen und Abflüssen, in Ablagerungen, in pflanzlichen und tierischen Produkten sowie im Verdauungstrakt von Menschen und Tieren nachgewiesen. Rinder können diese Bakterien über den Boden und die Umwelt beim Weidegang oder über das Futter aufnehmen. Die Clostridiensporen weisen eine hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen und vielen Desinfektionsmitteln auf, weshalb sie in der Umwelt sehr lange (mehrere Jahre) Jahre überleben können.

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Toxinproduktion sind unter anderem *C. perfringens* und *C. botulinum* von großer Bedeutung für die Gesundheit von Tieren und Menschen. Die Toxine von *C. perfringens* sind in der Lage, Wundinfektionen (z. B. Gasbrand), Enteritis und Enterokolitis auszulösen. Die von *C. botulinum* produzierten Botulinum-Neurotoxine zählen zu den stärksten natürlichen Toxinen und können Botulismus verursachen. Betroffene Patienten weisen oft eine akute, fieberfreie, beidseitig absteigende, schlaffe Lähmung auf, welche unbehandelt fast immer tödlich verläuft. Andere Spezies wie *C. tyrobutyricum* und *C. butyricum* können bei niedrigen pH-Werten wachsen. Zudem können sie Butanol, Buttersäure, Wasserstoff und Kohlendioxid produzieren, welche für den Verderb von Silage verantwortlich

sind. *C. tyrobutyricum* und *C. butyricum* können von der Silage auf die Milch übergehen, wo sie anschließend eine Rolle als Verursacher der Spätblähung von Hart- und Schnittkäse spielen. Dadurch kommt es zu erheblichen Verlusten in der Milchindustrie. Die oben genannten Clostridien-Spezies wachsen ausschließlich unter sauerstofffreien Bedingungen bei Raum- bis Körpertemperatur.

In den letzten Jahren wird zunehmend über das Vorkommen kältetoleranter und kälteliebender Clostridien berichtet², vor allem über die Spezies *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. algidicarnis* und *C. gasigenes*. Diese Gruppe von Clostridien kann vakuumiertes Fleisch verderben, auch wenn dieses sachgemäß verpackt und bei maximal 4 Grad gelagert wurde. Während Schweinefleisch direkt nach der Schlachtung und Zerlegung meist zu entsprechenden Fleischprodukten wie Wurst weiterverarbeitet wird, werden Rindfleisch, Lamm oder Wildfleisch in der Regel vakuumverpackt und durchlaufen während der Lagerung bei Kühltemperatur eine lange Reifungsphase, sogenannte Wet Aging (Reifung im Vakuumbeutel). Unter diesen Bedingungen wird das Wachstum der meisten Verderbserreger von Fleisch gehemmt, jedoch können sich Milchsäurebakterien und die oben genannten kältetoleranten Clostridien-Spezies etablieren. Der Verderb von vakuumverpacktem Fleisch durch kältetolerante Clostridien ist teilweise an der Aufblähung der Verpackung erkennbar, die sogenannte „Blown Pack Spoilage“ (BPS). Diese wird durch die Bildung von Kohlendioxid und Wasserstoff verursacht (s. [Abb. 1](#) und [Abb. 2 A](#)). Wasserstoff brennt mit einer schwach bläulichen Flamme, wenn er mit einem Oxidationsmittel wie Luft oder Sauerstoff vermischt und in Kontakt mit einer Zündquelle kommt (s. [Abb. 2 B](#)). Wie bei *C. tyrobutyricum* in der Silage können kältetolerante Clostridien ebenfalls Butanol und Buttersäure produzieren, die einen käsigen Geruch aufweisen. Die Spezies *C. estertheticum* produziert nach aktuellem Kenntnisstand keine Toxine, daher ist der Verzehr von Fleisch, das mit diesem Bakterium kontaminiert ist, nicht gesundheitsschädlich ([BfR, 2010](#)). Über die Toxinproduktion der anderen kältetoleranten Clostridien-Spezies ist derzeit nichts bekannt. Unabhängig davon darf verdorbenes Fleisch nach EU-Recht ([EU-VERORDNUNG \(EG\) Nr. 178/2002](#)) nicht für den menschlichen Verzehr in Verkehr gebracht und auch nicht an der Lebensmittelgewinnung dienenden Tiere verfüttert werden.

Als Kontaminationsquellen für Fleisch gelten Kot und Felle von geschlachteten Tieren. Diese Bakterien wurden in vielen Ländern wie Brasilien, Irland, Neuseeland, der Schweiz, dem Vereinigten Königreich und den Vereinigten Staaten nachgewiesen. In Deutschland sind laut eigenen Studien 34 – 53 % des vakuumverpackten Fleisches mit kältetoleranten Clostridien

belastet (BONKE et al., 2016; MANG et al., 2021); in Österreich existieren bislang keine entsprechenden Daten. Ziel dieser Studie war es daher, einen Überblick über die Prävalenz kältetoleranter Clostridien-Spezies in Kot und Fellen von Tieren aus Rinderbetrieben und in vakuumverpacktem Fleisch im Lebensmitteleinzelhandel in Österreich zu geben. Die Ergebnisse ermöglichen eine Einschätzung des Übertragungsrisikos dieser Bakterien vom Tier auf das Fleisch. Dadurch kann diese Studie zur Entwicklung von Empfehlungen zur Etablierung effektiver Hygienemaßnahmen bei geschlachteten Rindern beitragen und so die Kontamination von Rindfleisch mit kältetoleranten Clostridien verhindern.

Material und Methodik

Betriebe und Kot- und Fellwischproben

Im Rahmen der Studie wurden von März 2023 bis Juli 2023 insgesamt 520 Proben (davon 260 Kot- und 260 Fellwischproben) von 260 Rindern aus 26 Betrieben in den Bundesländern Salzburg und Tirol gewonnen. Pro Betrieb wurden zehn erwachsene Tiere zur Probengewinnung herangezogen, von denen je eine Kot- und eine Fellwischprobe gewonnen wurde. Die Kotproben wurden rektal oder, wenn das Rind frischen Kot abgesetzt hatte und die Zuordnung zum Tier eindeutig möglich war, vom Boden genommen. Zur Gewinnung der Fellwischproben wurde ein 1 m² großer Bereich am Hinterviertel der Rinder mit einem angefeuchteten handelsüblichen Schwammtuch mehrmals vertikal und horizontal abgewischt. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 bis 48 h nach der Beprobung in flüssigem Nährmedium homogenisiert und angereichert.

Fleisch aus dem Einzelhandel

Insgesamt wurden 71 vakuumverpackte Rindfleischproben aus fünf verschiedenen Einzelhandelsgeschäften in Wien erworben. Die Fleischproben wogen zwischen 0,15 kg und 0,8 kg. Sie wurden unter der Bedingung ausgewählt, dass alle Produktionsschritte, von der Geburt der Rinder bis zur Verpackung des Fleisches, in Österreich stattfanden. Die ersten 30 Proben wurden zwischen Mai und Juli 2023 bezogen, während die restlichen 41 Rindfleischproben zwischen Mai und Juli 2024 gesammelt wurden. Alle Proben stammten aus verschiedenen Chargen. Alle Rindfleischproben wurden bei 4 °C 1 bis 2 Wochen lang nach dem Ablauf des Verbrauchsdatums gelagert. Anschließend wurden sie auf Anzeichen von Verderb und auf das Vorkommen kältetoleranter Clostridien untersucht.

Charakterisierung der Fleischprobe und Verderbsparameter

Die Fleischproben wurden nach der Lagerung visuell und sensorisch charakterisiert. Vor dem Öffnen der Packung wurde die Gasproduktion bzw. der Grad der Gasbildung (Blown Pack Spoilage, BPS) mittels eines Scores von 0 bis 5 bewertet. Nach dem Öffnen der Packung (ca. 10 min) wurden die Geruchsabweichungen von zwei Personen bestimmt und der Geruch-Score (0 bis 4) vergeben. Die Beschreibung von BPS und Geruch-Score wird zusammen mit den Ergebnissen dargestellt (siehe Abschnitt Ergebnisse und Diskussion). Anschließend wurde der Fleischtropfsaft mittels einer Pipette entnommen und in ein Röhrchen überführt.

Nachweis von kältetoleranten Clostridien

Zu den Schwammtuchproben (Fellwischproben) in den Stomacherbeuteln wurden je 50 ml PYGS (Peptone-Yeast-Glucose-Starch)-Bouillon hinzugefügt. Es wurden 10 g der Kotprobe in einen Stomacherbeutel eingewogen und mit 90 ml PYGS-Bouillon vermischt. Danach wurden die Proben in einem Schüttler (Bag Mixer) für 30 sec homogenisiert. Die Probensuspensionen (14 ml) der Fellwisch- und Kotproben wurden jeweils in Glasröhrchen überführt. Für den Fleischtropfsaft wurde je 1 ml Probe mit 10 ml PYGS in einem Glasröhrchen vermischt. Alle Probensuspensionen in Glasröhrchen wurden anaerob bei 4 °C für 4 bis 6 Wochen bebrütet (s. [Abb. 3](#)). Im Anschluss an die Anreicherung wurden eine DNA-Extraktion (mittels InhibitEX-Buffer der Firma Qiagen und DNA-Extraktionskit High Pure Template Preparation Kit der Firma Roche) und drei Multiplex-qPCR mit Sonden durchgeführt. Mit Hilfe dieser qPCR-Verfahren kann die DNA aller Bakterien der Gattung *Clostridium* detektiert und gleichzeitig 7 Clostridien-Spezies identifiziert werden, im Einzelnen: *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii*, *C. tagluense-like*, *C. algidicarnis*, *C. putrefaciens* und *C. gasigenes* ([DORN-IN et al., 2018](#); [MANG et al., 2021](#)).

Im Falle jener PYGS-Anreicherungen, die per qPCR positiv auf Clostridien getestet wurden, erfolgte eine kulturelle Untersuchung. Hierfür wurden 0,5 ml der jeweiligen PYGS-Anreicherung in ein 1,5-ml-Reaktionsröhrchen übertragen und für 5 min bei 80 °C erhitzt, um die nicht-sporenbildende, vegetative Begleitmikrobiota abzutöten und so den Nachweis der hitzeresistenten Clostridiensporen zu erleichtern. Unmittelbar nach der Erhitzung wurden 400 µl der hitzebehandelten Anreicherungsproben auf eine Blutagarplatte ausplattiert (s. [Abb. 3](#)). Anschließend wurden die Blutagarplatten anaerob für 3 bis 4 Wochen bei 10 °C bebrütet. Im letzten Schritt wurden die gewonnenen Kolonien auf neuen Blutagarplatten subkultiviert und wieder bei 10 °C für 2 bis 3 Wochen bebrütet. Die gewachsenen Reinkulturen wurden zur

Speziesbestimmung nach der DNA-Extraktion einer qPCR und ggf. einer Sequenzierung unterzogen.

Ergebnisse und Diskussion

Rinderbetrieb, -kot und -haut

Abb. 4 zeigt die mittels qPCR und Kultivierung detektierten Clostridien-Spezies in Kot- und Hautwischproben in Prozent. Ein Betrieb wurde dann als „positiv“ eingestuft, wenn mindestens eine Kot- oder Fellwischprobe von einem der jeweils 10 beprobten Tiere positiv für eine Clostridien-Spezies war (s. Abb. 4).

Mittels qPCR waren 88,5 % (n = 23/26) der Rinderbetriebe positiv auf *C. estertheticum*. Dies ist die bekannteste Spezies in der Gruppe kältetoleranter Clostridien und der Hauptverursacher der Aufblähung kühlgelagerten, vakuumverpackten Fleisches, gefolgt von *C. tagluense-like*, *C. bowmanii*, *C. frigoriphilum* und *C. gasigenes*. In dieser Studie waren 22,3 % der Kotproben positiv für *C. estertheticum*, 33,8 % für *C. tagluense-like*, 32,7 % für *C. bowmanii*, 11,2 % für *C. frigoriphilum* und 14,2 % für *C. gasigenes*. Die Isolierungsraten der Spezies aus den PCR-positiven Proben reichten von 4,7 % bis 59,5 % (s. Abb. 4). Die Spezies *C. algidicarnis* wurde in keiner Probe detektiert, jedoch aus 2 Proben mittels Kultivierung isoliert.

Während die Prävalenz kältetoleranter Clostridien in den Rinderkotproben, die mittels qPCR bestimmt wurden, relativ hoch ist, fiel sie in den Hautwischproben sehr niedrig aus. Letzteres könnte auf eine geringe Kontamination der Haut mit Schmutz und Fäkalien zurückzuführen sein. In dieser Studie wurde der Verschmutzungsgrad der Rinderhaut nicht explizit protokolliert; bei den Probenahmen fielen jedoch keine nennenswerten Kotmengen oder sonstige Verschmutzungen ins Auge. Dies deutet darauf hin, dass gut geführte weidebasierte Haltungssysteme nicht nur aus Sicht des Tierwohls, sondern auch hinsichtlich hygienischer Aspekte vorteilhaft sein können. Im Gegensatz dazu kann es beispielsweise bei sehr beengten Ställen zu einem häufigeren Kontakt der Tiere mit Kot oder verschmutztem Boden und in der Folge zu einem erhöhten Kontaminationsrisiko für die Fleischproduktion kommen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Kot eine wesentliche Kontaminationsquelle für kältetolerante Clostridien auf dem Fleisch geschlachteter Rinder darstellt. Insbesondere die Tierhaut spielt eine zentrale Rolle, wenn sie bei der Anlieferung mit Kot verschmutzt ist. Während des Enthäutens können trockene Kotpartikel durch Luftzug in der Schlachthalle

verteilt werden und so Clostridiensporen auf Schlachtkörper, Arbeitsflächen oder Personal übertragen. Dies kann zu einer weiterführenden Kontamination des Fleisches auch nach der Enthäutung führen. Da das Enthäuten zu den hygienisch kritischsten Schritten im Schlachtprozess zählt, sind sowohl der hygienische Zustand der Tiere bei der Anlieferung als auch eine sorgfältige Durchführung von Enthäutungs- und Ausweideschritten entscheidend, um eine Verunreinigung des Rindfleisches mit kältetoleranten Clostridien zu vermeiden.

Fleisch aus dem Einzelhandel

Die vakuumverpackten Rindfleischproben wurden 1 bis 2 Wochen nach Ablauf des Verbrauchsdatums auf Anzeichen von Verderb wie Gasbildung (BPS-Score) und Fehlgeruch untersucht. Anschließend wurde der Fleischtropfsaft entnommen, im Anreicherungsmedium angereichert und auf das Vorhandensein von kältetoleranten Clostridien untersucht. [Abb. 5](#) zeigt, dass insgesamt 7 Clostridien-Spezies detektiert und identifiziert wurden. Insgesamt waren 31,0 % ($n = 22/71$) der Fleischproben positiv für Clostridien, wobei die Spezies *C. frigidophilum* am häufigsten mit qPCR detektiert wurde. Die niedrigen Isolierungsraten lassen sich vermutlich durch die hohen Ansprüche dieser Bakterien an die Kultivierungsbedingungen erklären. Die schwierige Anzucht auf Agarplatten kann dazu führen, dass die tatsächliche Prävalenz unterschätzt wird. Auch in einer deutschen Studie wurden, ähnlich zu den vorliegenden Ergebnissen, in 34,4 % der untersuchten Proben ($n = 33/96$, vakuumiertes Lamm- und Rindfleisch, [BONKE et al., 2016](#)) Clostridien mittels qPCR nachgewiesen. Eine weitere deutsche Studie von [MANG et al. \(2021\)](#) ergab einen mittels qPCR nachgewiesenen Anteil von 53,3 % ($n = 32/60$) in vakuumiertem Rindfleisch.

Hinsichtlich der Verderbsanzeichen wurde Fleisch mit einem BPS-Score von 1 (wenige, kleine Gasblasen im Fleischsaft sichtbar) nicht als „verdorben“ beurteilt, da kleine Bläschen auch auf die Freisetzung von Gas aus dem Muskel oder dem Fett zurückzuführen sein können. Ein Geruch-Score von 1 könnte ebenfalls auf die Vakuumverpackung zurückzuführen sein und wird nicht unbedingt als Verderb angesehen. Aus diesen Gründen wurde nur vakuumverpacktes Rindfleisch mit einem BPS- und/oder einem Geruch-Score von ≥ 2 als verdorben beurteilt.

[Abb. 6](#) und [Abb. 7](#) zeigen jeweils die Verteilung der BPS- und Geruch-Scores von Fleischproben aus dem Einzelhandel in Abhängigkeit der Clostridien-Spezies. Einige Proben waren für zwei Clostridien-Spezies positiv. Nicht alle Clostridien-Spezies sind in der Lage, große Mengen an Gas oder deutlichen Verderbsgeruch zu produzieren – aber auch innerhalb der gleichen

Spezies führten unterschiedliche Stämme zu verschiedenen Ergebnissen, unter anderem abhängig von der Clostridienzahl in den Fleischproben. Es ist anzumerken, dass die Spezies *C. estertheticum*, *C. frigoriphilum* und *C. algidicarnis* einen ausgeprägten Verderbsgeruch erzeugen. Insgesamt kam es bei 45,5 % (n = 10/22) der positiven Proben zu einer verstärkten Gasbildung (BPS-Score ≥ 2 : Verlust des Vakuums aufgrund von Gasbildung durch Bakterien), während dieser Anteil bei den negativen Proben 14,3 % (n = 7/49) ausmachte. Fehlgerüche (Geruch-Score ≥ 2 : Abweichung vorhanden) konnten bei 77,3 % (n = 17/22) der positiven Proben und nur bei 8,2 % (n = 4/49) der negativen Proben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Fleisch, das mit kältetoleranten Clostridien kontaminiert ist, eine kürzere Haltbarkeitsdauer aufweist als die Clostridien-negativen Fleischproben.

Schlussfolgerung

Kältetolerante Clostridien sind in österreichischen Rinderbetrieben weit verbreitet. Die Nachweisrate dieser Bakterien in Kotproben von Rindern war relativ hoch. Allerdings konnten sie nur in wenigen Hautwischproben nachgewiesen werden, da die Tiere in einem guten Haltungssystem untergebracht waren und die Haut der Tiere trocken und sauber gehalten wurde. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die kotkontaminierte Haut auch eine bedeutende Kontaminationsquelle für das Fleisch darstellen kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die Rinderbetriebe auf die Sauberkeit der zur Schlachtung angelieferten Rinder und die Schlachthöfe auf die Hygiene beim Enthäuten der Tiere achten, um eine Kontamination der Schlachtkörper zu verringern. Zur Beurteilung der Verderbsanzeichen wurden vakuumverpackte Rindfleischproben kühl gelagert und 1 bis 2 Wochen nach dem Verbrauchsdatum analysiert. Es zeigte sich, dass Rindfleischproben, die positiv auf Clostridien getestet wurden, eine hohe Gasbildung oder einen ausgeprägten Verderbsgeruch aufwiesen und daher kürzer haltbar waren als Clostridien-freie Rindfleischproben. Die Rindfleischerzeugung ist mit einem hohen Verbrauch an Ressourcen wie Agrarflächen, Futtermitteln und Wasser verbunden und trägt erheblich zu Umweltproblemen bei. Um Fleischverluste durch vermeidbaren mikrobiellen Verderb zu vermeiden, sind effektive Maßnahmen und eine enge Zusammenarbeit der beteiligten Akteure erforderlich.

Förderungen

Die hier dargestellten Ergebnisse sind Teile von Projekten, die vom „BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften“ und dem Bundesministerium für Land- und

Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft (BML), Projektnummer 101844, gefördert wurden.

Referenz

BONKE, R., DREES, N., GAREIS, M. (2016): Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. Fems Microbiol Lett 363, 1-7.

BfR: Bundesinstitut für Risikobewertung (Deutschland) (2010): *Clostridium estertheticum* in vakuumverpacktem Rindfleisch: Ein gesundheitliches Risiko durch den Verzehr ist unwahrscheinlich Stellungnahme Nr. 030/2010 des BfR vom 6. Juli 2010

DORN-IN, S., SCHWAIGER, K., SPRINGER, C., BARTA, L., ULRICH, S., GAREIS, M. (2018): Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. Int J Food Microbiol 286, 162-169.

MANG, S., SCHWAIGER, K., LINDNER, R., GAREIS, M., DORN-IN, S., 2021. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigoriphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. Int J Food Microbiol 340, 1-8.

VERORDNUNG (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit

Anschrift der Verfasser

DR. SAMART DORN-IN, MSC (Email: samart.dorn-in@vetmeduni.ac.at)

JOACHIM ANGERER, MSC

MAG. VANESSA ZAND

SARA CASARIN

UNIV. PROF. DR. KARIN SCHWAIGER

Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, 1210 Wien,

DR. CASSANDRA EIBL

Universitätsklinik für Wiederkäuer, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1,
1210 Wien

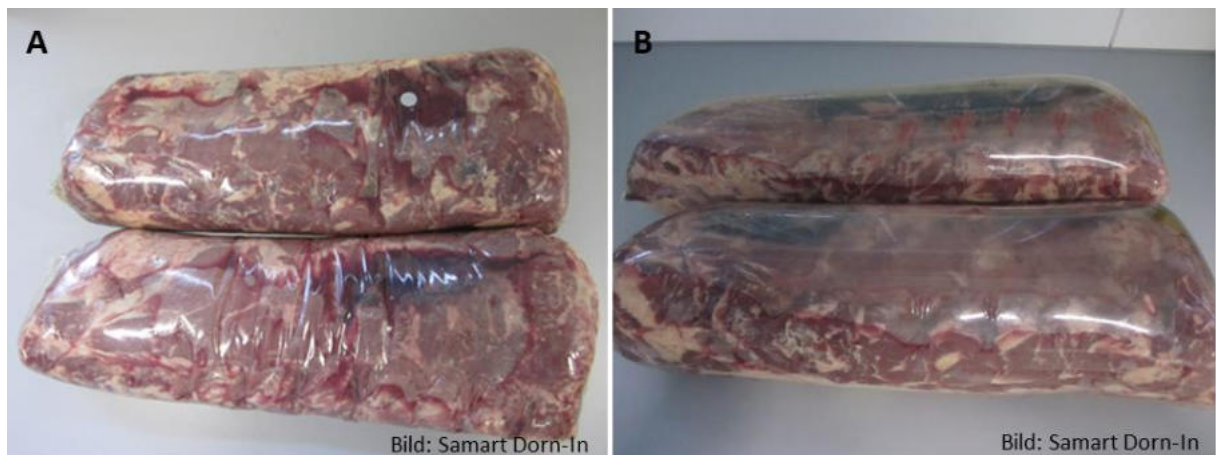


Abb. 1: A: Verdächtiges vakuumverpacktes Rindfleisch aus dem Fleischhandel (Blown Pack Spoilage, BPS-Score = 2) bei der Anlieferung für die Untersuchung ; B: Aufblähung der gleichen Fleischproben nach 21 Tagen Lagerung bei 4 °C (BPS-Score = 5). Ergebnis der Laboruntersuchung: positiv für *C. estertheticum* (Bildquelle: Samart Dorn-In)

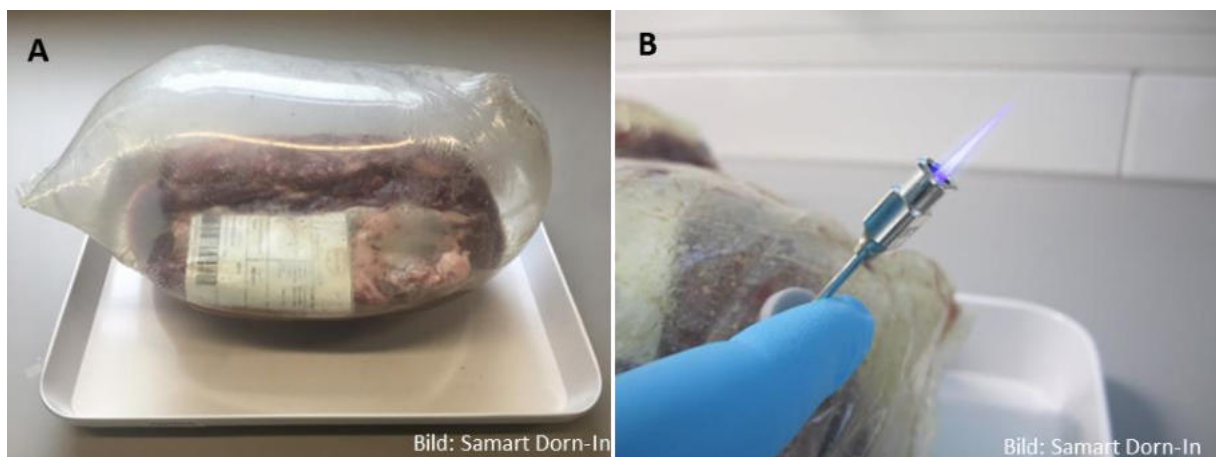


Abb. 2: A: Aufblähung eines vakuumverpackten Rindfleisches aus dem Fleischhandel (BPS-Score = 5); B: Dasselbe Fleischproben mit bläulicher Flamme bei dem Verbrennungstest. Ergebnis der Laboruntersuchung: positiv für *C. estertheticum* (Bildquelle: Samart Dorn-In)



Abb. 3: Material für die Kultivierung kältetoleranter Clostridien: Glasröhrchen mit PYGS-Anreicherung, Anaerobiertopf mit Anaerobiererezeuger und Blutagarplatten (Bildquelle: Samart Dorn-In)

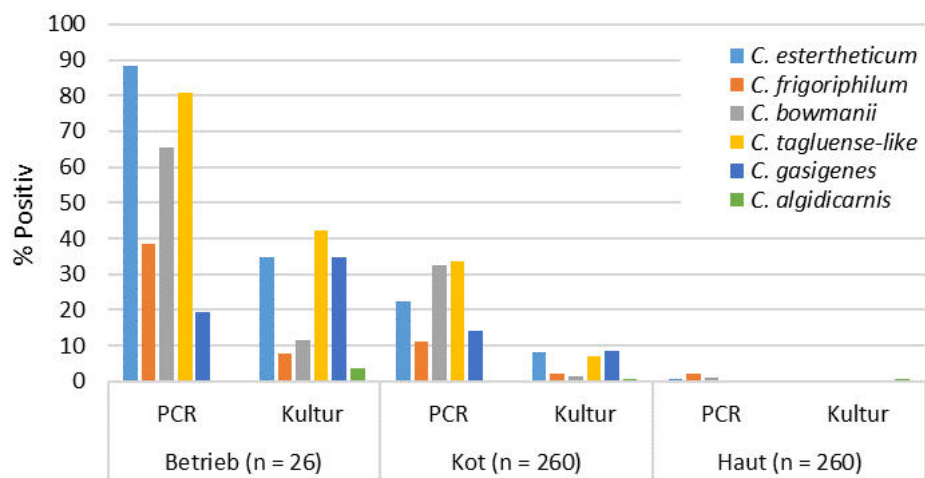


Abb. 4: Prozentsatz der positiv auf Clostridien getesteten Rinderbetriebe, Rinderkot und Hautproben, ermittelt mittels qPCR und Kultur

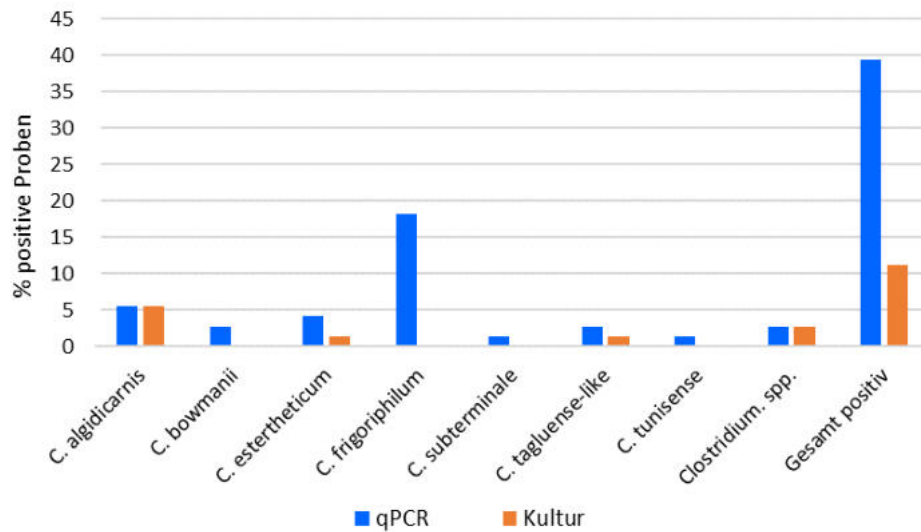


Abb. 5: Prozentsatz der positiv auf Clostridien getesteten Fleischproben aus dem österreichischen Handel

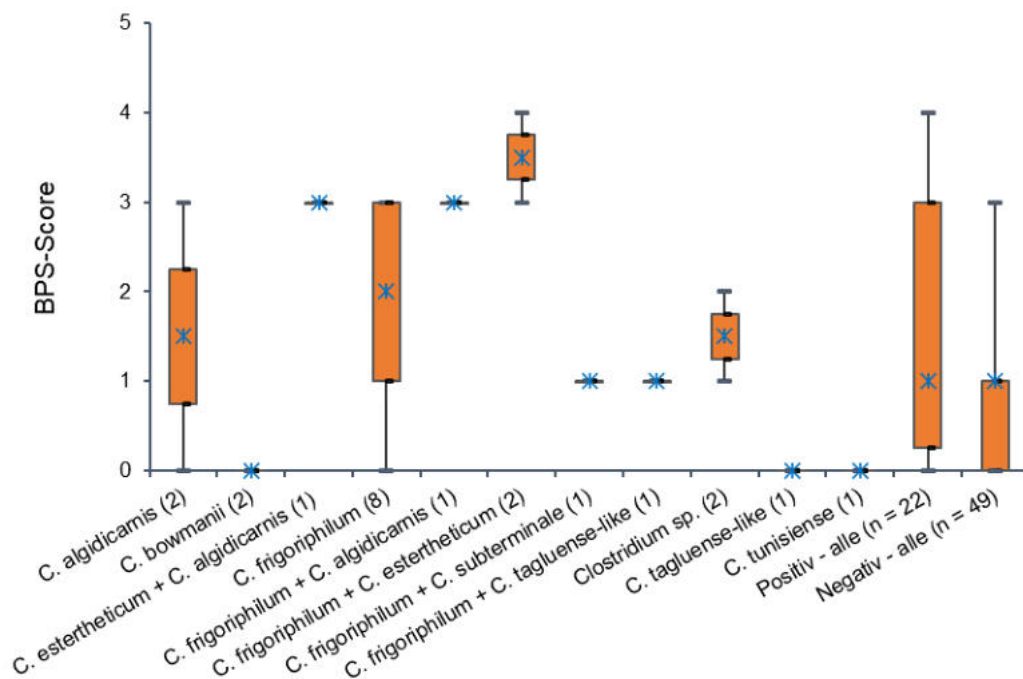


Abb. 6: Per PCR detektierte Spezies und Grad der Aufblähung von Fleisch aus dem Handel. Aufblähungsgrad (BPS-Score): 0: Keine Gasblasen, 1: Einzelne Gasblasen sichtbar; 2: Aussehen wie Vakuumverlust; 3: Großflächige Hohlräume zwischen Folie und Fleisch; 4: Packung ist auf volle Größe aufgebläht; 5: Verpackung ist prall aufgebläht, Folie straff gespannt. Die Linien über und unter den Boxplots sind die Maximal- und Minimalwerte des Datensatzes. Die Boxen zeigen die Bereiche zwischen dem Median der unteren und der oberen Hälfte des Datensatzes an. Die Sterne innerhalb der Boxen sind die Medianwerte aller Proben.

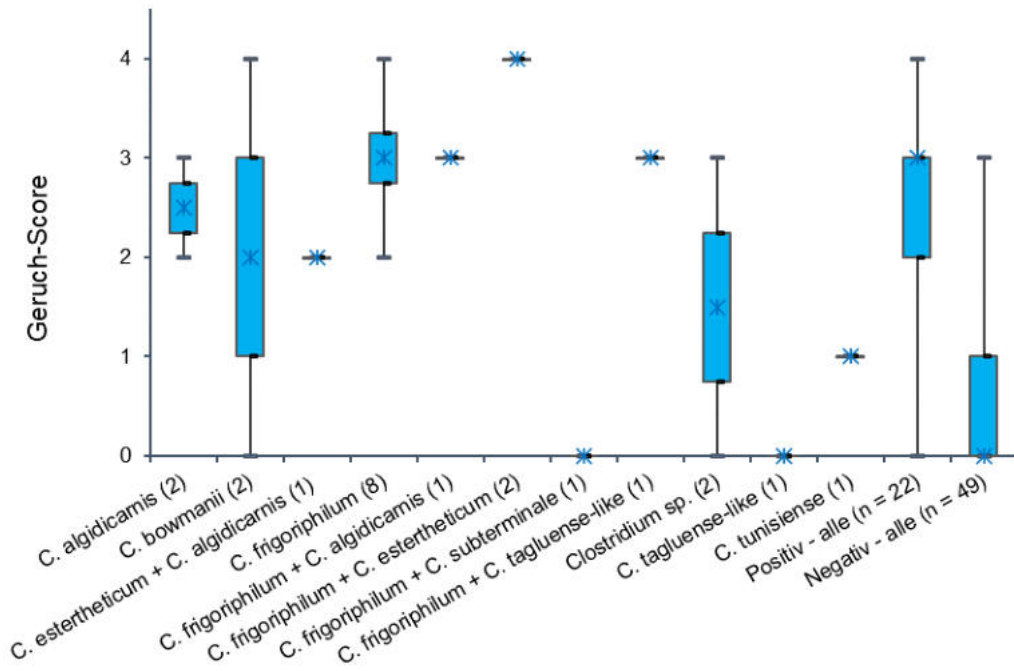


Abb. 7: Per PCR detektierte Spezies und Grad der Geruchabweichung von Fleisch aus dem Handel: Geruch-Score: 0: einwandfrei (neutral); 1: Akzeptabel, leichte Abweichung; 2: Gerade noch akzeptabel, Abweichung vorhanden; 3: Nicht mehr akzeptabel, deutlicher Verderbsgeruch; 4: Extremer Verderbsgeruch.

Anlage 5: Publikation im „International Journal of Food Microbiology“

International Journal of Food Microbiology 430 (2025) 111069



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



Spoilage characteristics of sous-vide beef caused by *Clostridium estertheticum*

Samart Dorn-In^{*}, Riem El-Seniti, Karin Schwaiger

Unit of Food Hygiene and Technology, Centre for Food Science and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

Blown pack
Spoilage odour
pH
Drip loss
Meat microbiota
Vacuum packed

ABSTRACT

The increasing popularity of sous-vide (SV) cooking necessitates research into the microbiological quality, sensory changes, and shelf life of SV products. Studies show that SV cooking significantly reduces the levels of meat microbiota and pathogens, positively affecting the shelf life and safety of SV products. However, the meat spoilage organism *Clostridium estertheticum* can survive SV cooking as it can produce heat-tolerant spores. These spores can germinate and multiply during storage at refrigerated temperatures, leading to spoilage of SV meat. Therefore, the aim of this study was to characterise the spoilage of SV beef caused by *C. estertheticum* compared to non-SV beef. In addition to the determination of spoilage characteristics, all beef samples were subjected to culture and qPCR analysis to determine the numbers of total bacteria, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, yeasts, and *C. estertheticum*. Species identification of the colonies on the culture media was performed using MALDI-TOF MS. The tests were carried out at three different times (three repetitions). A total of 90 beef samples were analysed, of which 54 samples were artificially contaminated with three strains of *C. estertheticum* and vacuum-packed. Of these, 27 beef samples underwent SV cooking (55 °C, 70 min). After 28 days of storage at 4 °C, the SV beef samples exhibited significantly higher levels of gas and stronger spoilage odour compared to non-SV samples ($p < 0.05$). While drip loss and pH levels were also higher in SV beef, these were not considered specific spoilage characteristics caused by *C. estertheticum*. Microbiological and qPCR analyses revealed that all SV beef samples had very low bacterial and yeast counts but very high numbers of *C. estertheticum*, which strongly correlated with the sensory changes observed. We concluded that SV beef containing *C. estertheticum* has a shorter shelf life than contaminated non-SV beef. This is the first study to examine the spoilage of SV beef by *C. estertheticum*. The results may help raise awareness among meat producers and restaurants about the risk of meat losses due to spoilage caused by these bacteria.

1. Introduction

Vacuum packaging in combination with storage at chilled temperatures is an efficient method for extending the shelf life of fresh beef, as under these conditions, conventional aerobic spoilage bacteria such as *Pseudomonas* spp. either cannot grow or grow only very slowly (Dorn-In et al., 2023). Under anaerobic and cold storage conditions, however, meat can be spoiled by cold-tolerant facultative anaerobic microorganisms such as lactic acid bacteria (LAB) and *Enterobacteriaceae* (Dorn-In et al., 2023) and additionally by strictly anaerobic cold-tolerant *Clostridium* spp. (Bonke et al., 2016; Brightwell and Clemens, 2012; Dorn-In et al., 2018; Mang et al., 2021).

While there are numerous studies on the microbial spoilage of fresh and vacuum-packed meat, there are only few studies on spoilage of vacuum-packed heat-treated meat products such as sous-vide beef. Sous-

vide (SV) is a technology in which food (vegetables or meat) is vacuum-packed and then heated in a sous-vide bath at a relatively low and constant temperature between 50 °C and 85 °C for a specific period of time (approximately 1 to 48 h) (Latoch et al., 2023). Temperature and duration depend on the type of food, weight and/or thickness of the meat (Latoch et al., 2023). The advantages of SV cooking are that it preserves moisture, natural flavours, and nutrients in the package. It also produces a uniform texture, maintains the desired colour, and prevents cross-contamination during storage (Baldwin, 2012; Douglas et al., 2023). This method has been used to produce ready meals since the 1960s and was used by restaurants in the 1970s. In the 1990s, food scientists became actively involved in SV processing, focusing particular on extending the shelf life of minimally processed foods (Baldwin, 2012). To this day, ready-made SV baths and SV devices are available on the market. This technology is increasingly used for the preparation of

^{*} Corresponding author.

E-mail address: samart.dorn-in@vetmeduni.ac.at (S. Dorn-In).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111069>

Received 26 September 2024; Received in revised form 6 December 2024; Accepted 12 January 2025

Available online 14 January 2025

0168-1605/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

meat and vegetables in private households as well as in catering and restaurants.

In addition to preserving the nutritional value and creating specific sensory properties of meat, the SV process can extend the shelf life and improve safety. It can inactivate or stress common spoilage microorganisms such as LAB and *Enterobacteriaceae*, as well as pathogenic bacteria such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *E. coli*, by the heating process (Baldwin, 2012; Díaz et al., 2008; Latoch et al., 2023; Onyeaka et al., 2022; Patil et al., 2024). Mesophilic and spore-forming bacteria such as pathogenic *C. perfringens*, *C. botulinum*, or *Bacillus cereus* can survive this process (Baldwin, 2012; Latoch et al., 2023; Onyeaka et al., 2022), however, they generally do not grow under the storage conditions of SV meat, which are usually between 2 °C and 4 °C. Therefore, SV meat should be cooled rapidly after cooking to prevent the growth of these bacteria (Zavadlav et al., 2020).

Although the presence of spore-forming cold-tolerant and cold-loving clostridia in vacuum-packed fresh meat (beef, lamb, and game meat) has been widely reported, very little information is available on the extent to which these bacteria grow in SV meat and alter the properties of the meat. The occurrence of *C. estertheticum*, the best-known psychrophilic *Clostridium* species, is reported from all over the world, including Brazil, Canada, Germany, Ireland, New Zealand, Switzerland, the United Kingdom, and the United States (Mang et al., 2021). *C. estertheticum* can produce a large amount of CO₂ and H₂, along with significant amounts of butanol, butyric acid, acetic acid, and butyl esters (Broda et al., 1996). This leads to swelling of the pack, known as blown pack spoilage (BPS), and a cheesy odour (Boerema et al., 2007; Broda et al., 1996). Similar to other *Clostridium* species, they can produce heat-tolerant spores (Dorn-In et al., 2022; Moschonas et al., 2009), which can also play an important role in heat-treated meat and meat products stored under anaerobic conditions and at cool temperatures. The aim of this study is therefore to characterise the spoilage of SV meat (beef) caused by three strains of *C. estertheticum*. Spoilage characteristics investigated included gas formation, spoilage odour, loss of drip/meat juices, and pH changes. Samples were then analysed using culture methods and qPCR to determine the number of meat microbiota in SV and non-SV meat. Additionally, MALDI-TOF MS was performed to identify the species of other meat microbiota grown on agar plates.

This study highlights the role of *C. estertheticum* in spoilage of SV beef compared to non-SV beef and provides additional insights into the complexity of the meat microbiota. Since meat production requires substantial resources, any spoilage-related loss contributes to economic losses and negatively impacts resource sustainability. Therefore, the results of this study should raise the awareness among meat producers and the food industry about preventing food waste caused by *C. estertheticum* and support consumer protection efforts.

2. Material and methods

2.1. Samples

2.1.1. *Clostridium estertheticum*

Three strains of *C. estertheticum* were used to inoculate beef samples, namely strain DSM 8809 (C1), one strain isolated from vacuum-packed beef (C2, Dorn-In et al., 2022) and another strain from bovine faeces (C3, in this study, unpublished). The latter two isolates were identified by specific qPCR (see Section 2.4) and sequencing of the 16S rRNA gene. All *C. estertheticum* strains showed haemolytic activity on Columbia blood agar (CBA, Columbia agar with 5 % sheep blood, BioMérieux™). Each strain was subcultured on CBA and anaerobically incubated at 10 °C for 3 weeks. The grown colonies on CBA were subcultured in peptone-yeast-glucose-starch broth (PYGS, Lund et al., 1990) and incubated anaerobically at 10 °C for 8, 10, and 16 weeks for the first, second, and third biological replication, respectively. The long incubation period was intended to stimulate sporulation of *C. estertheticum* so that they could survive heat treatment during SV cooking of beef

samples.

To prepare an inoculum of each *C. estertheticum* strain, 1.5 ml of each PYGS enrichment was filled into two 2 ml tubes, centrifuged at 15,000 ×g for 2 min, the supernatant discarded, and the tube was filled up with 1.5 ml of 0.90 % NaCl, then vortexed for 10 s or until the pellet had completely dissolved. The bacterial suspensions from both tubes were pooled, and 100 µl were used to inoculate each beef sample.

Then, 200 µl of each inoculum were subjected to DNA extraction in duplicate, followed by qPCR with standards to quantify *C. estertheticum* (cfu/ml) in the inoculum. To determine the exact number of culturable *C. estertheticum* (C1, C2, and C3), each inoculum was serially diluted to 10⁻⁵ with 0.90 % NaCl (1:10) in a 1.5 ml tube. In addition, to simulate the SV cooking conditions, 0.5 ml of each inoculum was filled in a 1.5 ml tube, treated at 55 °C for 70 min in a Thermomixer (Eppendorf), and serially diluted to 10⁻⁵. The CBA plate was divided into 6 sectors, and then 50 µl of each dilution were dropped in duplicate onto each section of the CBA. The CBA plates were incubated anaerobically at 10 °C for 18 (±3 days), and the clostridial colonies were counted.

2.1.2. Beef samples

The tests were carried out at three different times with three different beef samples (three biological replications/batches). These beef samples (approx. 10 kg each) were purchased from three different butchers in Vienna, Austria. They were cut into pieces; each piece (subsample) was about 2.0 to 2.5 cm thick and weighed between 240 and 260 g. There was a total of 10 sample groups (groups 1–10, Table 1), with each group containing n = 3 subsamples per batch (n = 9 for three batches). A total of n = 30 subsamples of beef were therefore required for one batch. Accordingly, a total of n = 90 beef subsamples were used for all three batches (Table 1). Fresh beef (sample group 1, n = 9) was analysed for the number of original microbiota, group 2 (n = 9) for the effect of sous vide temperature on the reduction of meat microbiota, and groups 3–10 (n = 72) for the spoilage characteristics of the beef and the number of spoilage meat microbiota.

Beef sample groups 3–5 and groups 7–10 were contaminated with 100 µl of *C. estertheticum* inoculum (see Table 1). Beef sample groups 2–10 were vacuum packed using a vacuum packing machine (model: Max, Boss GmbH) with an automatic program (high vacuum level). The vacuum-packed beef sample groups 2–6 were placed in the SV bath (model: SVGVA16, GGM Gastro International, GmbH) at a temperature of 55 °C for 70 min. This followed the recommendation that a 2.5 cm thick beef to be used as a medium-rare steak should be cooked at this

Table 1
Sample groups (1–10) for all three biological replicates with a total of n = 90 beef subsamples.

Group	Sample*	n	Sous vide cooking	Storage temperature	Investigating day
1	Fresh beef	9	–	–	1
2	Beef	9	✓	–	1
3	Beef & C1	9	✓	4 °C	28
4	Beef & C2	9	✓	4 °C	28
5	Beef & C3	9	✓	4 °C	28
6	Beef	9	✓	4 °C	28
7	Beef & C1	9	–	4 °C	28
8	Beef & C2	9	–	4 °C	28
9	Beef & C3	9	–	4 °C	28
10	Beef	9	–	4 °C	28

* Fresh beef samples (group 1) are non-vacuumed. Beef contaminated with *C. estertheticum*: C1 = DSM 8809; C2 = isolated from vacuumed packed beef; C3 = isolated from cow faeces.

temperature (Grillfuerst, 2024). All samples were then stored at 4 °C for 28 days.

2.2. Spoilage determination of beef

After 28 days of storage at 4 °C, all stored meat samples (groups 3–10, n = 72) were analysed for their spoilage characteristics, i.e., the blown pack spoilage (BPS) score, spoilage odour, percentage of drip loss, and pH value.

Firstly, the BPS value was determined as described by Boerema et al. (2007) (see Fig. 1). After opening the meat package, the meat drip was taken using a 10 ml pipette, filled into a 50 ml Falcon tube, and weighed. The weight of the drip was related to the weight of the meat (w/w), giving the results of the drip loss as a percentage (Stella et al., 2019). The surface of the beef was then cut into small pieces with sterile scissors and tweezers, weighed to 10 g, placed in a stomacher bag, and stored at 4 °C for microbiological investigation, which was performed immediately after the sensory testing was completed. The next step was to evaluate the spoilage odour after opening the package for at least 10 min using 5 scores as described previously (Dorn-In et al., 2023). As the last step of the sensory determination, the pH value was determined using the Testo 230 device (Testo). The determination of BPS score and spoilage odour was carried out by two persons (Wang et al., 2021).

2.3. Microbiological examination

All beef samples (groups 1–10, n = 90) were subjected to microbiological examination. For each sample, 10 g of beef in a stomacher bag were homogenised with 90 ml of peptone water in a Bag Mixer (Inter-science) for 30 s. Then 10 ml of meat homogenate (dilution 10^{-1}) were filled into a Falcon tube and serially diluted ($1:10$ ml) to 10^{-3} for fresh meat (group 1) and for SV meat (groups 2–6), and to 10^{-5} for non-SV meat (groups 7–10). Subsequently, 100 µl of the last three dilutions were spread in duplicate to the respective agar.

The following agars and incubation conditions were applied: Plate Count Agar (PCA; Merck) for total aerobic/anaerobic plate count (PC, aerobic/anaerobic, 30 °C for 72 h), Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD, Merck) for *Enterobacteriaceae* (anaerobic, 30 °C for 48 h), DeMan Rogosa Sharpe Agar (MRS; Merck) was used for lactic acid bacteria (LAB, anaerobic, 25 °C for 72 h), while yeasts were cultured on Wort Agar (Merck, aerobic, 25 °C for 72 h). The AnaeroGen™ (Thermo Fisher Scientific, Oxoid) was used to create anaerobic conditions in the bags or jars with PCA (for anaerobic plate count), VRBD, and MRS agar plates.

2.4. Molecular biological examination

The number of *C. estertheticum* in all samples was determined by qPCR. The High Pure Template Preparation Kit (Roche) was used to extract DNA from beef homogenate (dilution 10^{-1}). DNA extraction and qPCR for *Clostridium* spp. were performed as previously described by Dorn-In et al. (2018, 2022, 2023). The qPCR for clostridia included primer pair Cl93-F and Cl642-R and five TaqMan probes, namely for *Clostridium* spp. (Cl555-FAM), *C. estertheticum* (Cest-Hex), *C. frigidophilum* (Cfgrpl-Cy3.5), *C. bowmanii* (Cbow-Cy3.5), and *C. tagliuense*-like (Ctag-like-Cy5.5). Standard dilutions of *C. estertheticum* (DSM 8809) from 10^6 to 10^1 cfu/g were used to quantify *C. estertheticum* in the inocula and beef samples (Dorn-In et al., 2023). The probes for *C. frigidophilum*, *C. bowmanii*, and *C. tagliuense*-like were included in the qPCR to check whether the samples were naturally contaminated with these clostridial species.

2.5. MALDI-TOF MS

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation — Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to identify the species of colonies on PCA (aerobic and anaerobic), MRS, VRBD, and Wort agar.

The *Enterobacteriaceae* colonies on VRBD agar were first subcultured on CBA and then incubated aerobically at 30 °C for 24 h before being

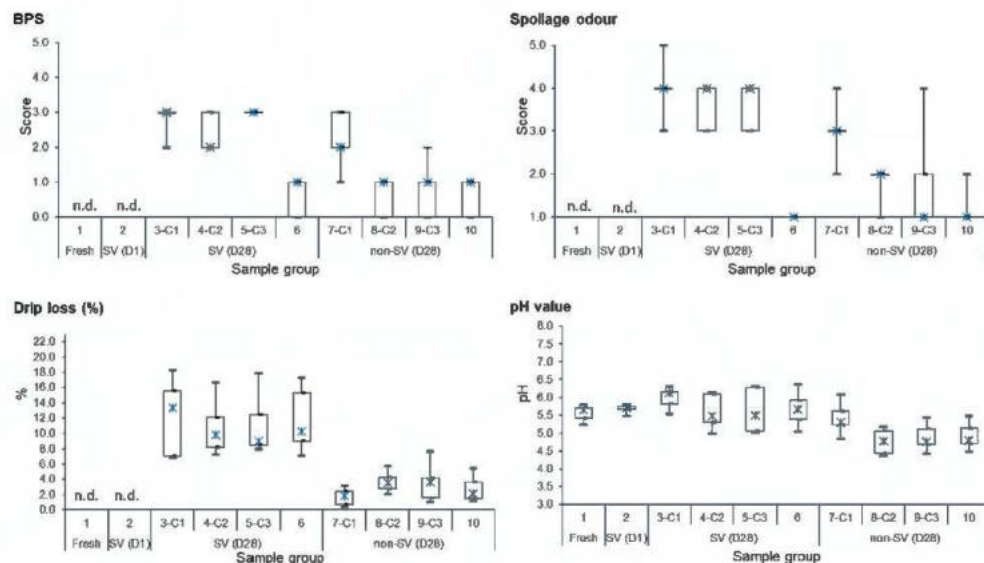


Fig. 1. Spoilage characteristics of beef samples (groups 1–10, see Fig. 3). BPS score: 0: no gas production, 1: small bubbles in drip, package intact, 2: loss of vacuum through gas production, 3: blown, puffy packs, 4: fully distended, without tightly stretching the pack, 5: overblown, tightly stretched packs/packages leaking. Spoilage odour score: 1: fresh, almost odourless; 2: slight deviation, still acceptable; 3: distinct deviation; 4: spoilage odour (unpleasant and repellent); 5: distinct spoilage odour. n.d. — not done.

analysed by MALDI-TOFMS. The colonies on the other agar plates (PCA, MRS, and Wort agar) were directly subjected to MALDI-TOF MS. Up to five colonies with different morphologies were taken per sample and culture medium. Colonies were subjected to protein extraction using the extended transfer method as described in the instruction manual (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Samples were spotted in duplicate on a polished steel plate. The generated protein spectra were compared with the MALDI-TOF biotyper database (Bruker Daltonik GmbH, Germany).

2.6. Statistical analysis

The values of spoilage parameters of SV and non-SV samples artificially contaminated with *C. estertheticum* strains (groups 3–5 and groups 7–9, respectively) were statistically analysed using the Microsoft Excel *t*-test. Differences were considered statistically significant if the *p*-value was <0.05.

In addition, the Pearson's correlation coefficient (*r*, Microsoft Excel, 2020) was used to determine the correlation between numbers of *C. estertheticum* and spoilage characteristics of vacuum-packed beef samples stored for 28 days. The strength of the correlation was interpreted as follows: *r* = 0–0.19 is considered as very weak, 0.20–0.39 as weak, 0.40–0.59 as moderate, 0.60–0.79 as strong, and 0.8–1.0 as very strong (Evans, 1996). Subsequently, the *p*-value was calculated based on a two-tailed *t*-test to determine whether the correlation was statistically significant (*p* < 0.05, Dorn-In et al., 2023).

3. Results and discussion

3.1. Spoilage determination of beef

Stored beef samples (groups 3–10, *n* = 72) were analysed for their spoilage characteristics (see Fig. 1), while sample groups 1 (*n* = 9) and group 2 (*n* = 9) were only subjected to microbiological investigation. In general, the storage life or shelf life of vacuum-packed fresh beef is at least 10 to 12 weeks, when stored below 4 °C @@@@ (CSIRO, 2003). The storage life may be shorter if the initial bacterial contamination of the beef is high. For this reason, the storage life of SV beef (sample group 6) must be longer than that of fresh beef. However, the aim of the present study was not to investigate the shelf life of SV beef, but to reveal the role of *C. estertheticum* as a spoilage agent in SV beef. Sample groups 6–10 were used for comparison with the results of sample groups 3–5. In the first replicate, the BPS values of the beef packs were recorded every week. After about 3 to 4 weeks, sample groups 3–5 (contaminated and SV) showed significantly higher gas production than samples from groups 7 to 9 (contaminated, non-SV), indicating that *C. estertheticum* accelerates the spoilage of SV beef. Therefore, the storage time for all replicates was designed at 4 weeks (28 days).

The stored meat with a BPS score of 1 (small bubbles in the drip, packaging intact) is not considered spoiled if the spoilage odour (score > 2) was not present. Carbon dioxide can be released from the meat muscle and nitrogen from the fat tissue, resulting in small gas bubbles after the meat has been vacuum-packed for hours and increasing during storage (CSIRO, 2001). After 28 days of storage, all SV control samples (group 6, *n* = 9) were considered fresh as no signs of spoilage were detected. In the non-SV control samples (group 10, *n* = 9), one sample from the third replicate showed spoilage odour with score 2 (slight deviation).

The values of spoilage parameters of SV and non-SV samples contaminated with *C. estertheticum* (groups 3–5 and groups 7–9, respectively) were compared and statistically analysed to determine whether SV cooking accelerates the growth of *C. estertheticum* and thus the spoilage of vacuum-packed beef due to reduced competitive microbiota. Overall, SV samples contaminated with *C. estertheticum* (groups 3–5) showed statistically significantly higher BPS and spoilage odour scores than non-SV samples (groups 7–9, *p* < 0.05).

The gas produced by *C. estertheticum* is a combination of hydrogen

and carbon dioxide. Hydrogen can combine with sulphur, which is present in some amino acids, to form hydrogen sulphide, resulting in an unpleasant sulphurous or foul odour (Broda et al., 1996; Broda et al., 2000; Dainty et al., 1989). In addition, various volatile compounds, especially butanol, butyl ester, and butyric acid, produced by *C. estertheticum* contribute to the spoilage odour of meat, which is regularly described as cheesy or dairy off-odour (Dainty et al., 1989; Kalechayanand et al., 1989; Broda et al., 1996). On the contrary, the spoilage odour caused by LAB is usually described as sour and acidic due to the high production of lactic acid (Casaburi et al., 2015; EFSA, 2016; Jääskeläinen et al., 2012). In the present study, these spoilage odours in almost all SV beef samples contaminated with *C. estertheticum* (groups 3–5) were on average at score 4 (unpleasant and repellent). Lower scores of 1 to 2 were determined for almost all non-SV beef samples that were contaminated with the same clostridial strain (groups 7–9, Fig. 1).

When looking at the individual samples, it was found that sample groups 8 and 9 (non-SV and contaminated with *C. estertheticum* strains isolated from beef (C2) and from cow faeces (C3), respectively) had similar BPS, and spoilage odour scores as control samples (group 6: SV and group 10: non-SV). This indicates that these *C. estertheticum* strains (C2 & C3) may not grow very well in vacuum-packed beef samples, as the conditions are not optimal with respect to some influence factors like numbers of meat microbiota and pH values (see Sections 3.2 and 3.4 for further discussion).

In the present study, the term drip loss, which is normally used for vacuum-packed beef samples, also refers to the cooking loss of SV samples. The cooking loss, or meat drip, is a combination of water and soluble substances such as minerals (Przybylski et al., 2021; Aaslyng et al., 2003). In general, the term cooking loss is used for cooked meat and refers to the weight loss after cooking the meat, either with traditional cooking methods or with SV cooking (Jeong et al., 2020). During the cooking process, the muscle fibres shrink and condense, resulting in a deformation of the muscle fibres and a reduction in the physical space in which free water is retained in the meat, thereby increasing the cooking loss (Shin et al., 2023). For the reasons described, the percentage drip loss is statistically significantly higher for all SV samples than for non-SV samples (*p* < 0.05). Accordingly, percentage drip loss is not appropriate parameters for distinguishing whether SV meat is contaminated with *C. estertheticum*.

Fresh beef normally has a pH value of 5.5 to 5.8 (Broda et al., 1997; Węglarz, 2010). The pH value may increase after SV cooking as the heat exposure contributes to a reduction of available carboxyl groups in the cooked meat (Berdigaliuly et al., 2022; Gómez et al., 2019). However, Bhat et al. (2020) concluded that SV cooking has only a small effect on the pH of beef, while some other studies show that SV cooking increases the pH of beef (Berdigaliuly et al., 2022) or other meats such as chicken breast (Hasani et al., 2021). The results of the present study showed that the pH of SV beef (group 2, pH 5.7 ± 0.1) was slightly higher than that of fresh beef (group 1, pH 5.6 ± 0.2), suggesting that SV cooking can increase the pH of meat, but only with minimal effects, similar to those observed by Bhat et al. (2020). After the samples were stored at 4 °C for 28 days, the pH values of the non-SV samples (groups 7–10, pH 5.0 ± 0.4) decreased statistically significantly compared to the SV samples (groups 3–6, pH 5.7 ± 0.4, *p* < 0.05). This supposed to be a consequence of the growth of LAB in the non-SV beef samples (see Fig. 4).

3.2. Microbiological and molecular examination

C. estertheticum strains (C1, C2, and C3) in inocula were quantified by qPCR and culture methods. Fig. 2 shows that the number of all three *Clostridium* strains detected by qPCR and culture was similar. In almost all samples, the number of clostridia in fresh culture is slightly higher than in samples treated at 55 °C for 70 min, but not statistically significant (*p* < 0.05). This indicates that the heat treatment conditions did not significantly affect the viability of all tested *C. estertheticum* strains that were enriched in the PYGS broth and incubated at 10 °C for a long

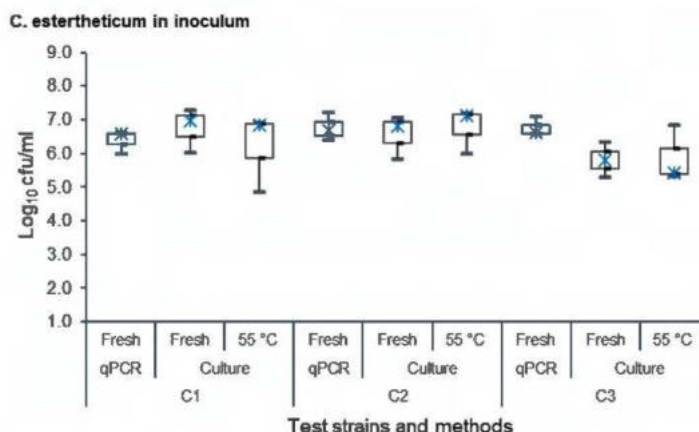


Fig. 2. *C. estertheticum* (strains C1: DSM 8809; C2: isolated from beef; C3: isolated from bovine faeces) in inocula, quantified by qPCR (for fresh culture) and culture method (for fresh culture and culture treated at 55 °C for 70 min).

period of time (8, 10, and 16 weeks). This prolonged incubation allows them to produce heat-resistant spores and thus survive the conditions of SV meat production. From these results, the number of viable cells of strains C1, C2, and C3 artificially contaminated in beef was on average 2.4, 2.6, and 2.0 log₁₀ cfu/g beef, respectively.

In general, enumeration of *C. estertheticum* in fresh meat and non-SV samples (groups 1, and 7–10) using the culture method is very difficult due to the overgrowth of the other meat microbiota, especially LAB. Although the culture method can probably be used to quantify *C. estertheticum* in SV beef samples (groups 3–5), the qPCR method was chosen for this purpose as it is suitable for all sample groups (fresh beef, SV, and non-SV beef). As the same analysis method is used, the results of all sample groups can be reliably compared.

Fig. 3 shows the initial contamination of the fresh meat samples (group 1) from all three biological replicates. Fresh beef from the first replication contained the lowest number of microbial contaminations,

while that from the third replication has the highest contamination rate. Clostridia were not detected in any of the samples of fresh beef (<2.0 log₁₀ cfu/g).

Fig. 4 shows the number of microorganisms analysed in all samples (groups 1–10, n = 90). In some samples of group 2 (directly after SV cooking), only aerobic plate counts were detected. After a 28-day storage of SV beef samples (groups 3–6), total aerobic/anaerobic bacterial counts were detected in 50 % (n = 18/36) of the samples. They were found from the detection limit (2.0 log₁₀) up to about 3.5 log₁₀ cfu/g in SV beef @@@samples of the 2nd and 3rd replication but could not be detected from SV samples of the 1st replication. In all these stored SV samples (groups 3–6), LAB, *Enterobacteriaceae*, and yeasts were not detected (<2.0 log₁₀ cfu/g). In this context, the applied SV cooking conditions may deactivate the majority of vegetative and non-spore forming meat microbiota. The high survival rate was observed in meat that initially contained a high number of meat microbiota, as observed

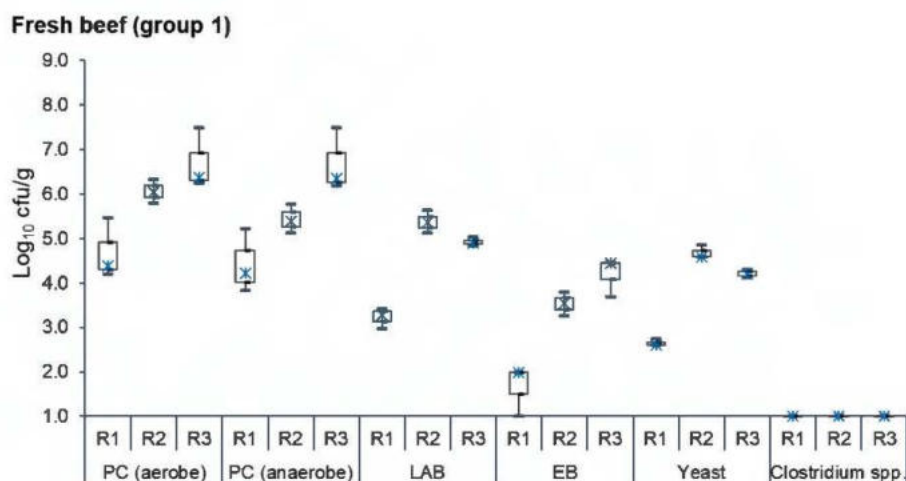


Fig. 3. Number of microorganisms (log₁₀ cfu/g) in fresh beef (group 1) from all three biological replicates (R1 to R3), determined by the culture method (for PC, LAB, *Enterobacteriaceae*: EB, and yeast) and qPCR (for *Clostridium* spp.).

The comparison between SV samples (groups 3–5) and non-SV samples (groups 7–9) showed that the number of *C. estertheticum* was higher in SV samples than in non-SV samples. The largest differences were particularly observed between samples of group 4 and group 8 (contaminated with strain C2 isolated from beef) and between samples of group 5 and group 9 (contaminated with strain C3 isolated from bovine faeces). This result indicates that the conditions of the SV beef sample in this study (pH values of about 5.7 ± 0.4 and low number of meat microbiota) favour the growth of all *C. estertheticum* strains. As observed, *C. estertheticum* strain C1 was highly adaptable compared to strains C2 and C3, as it grew well in all non-SV beef samples (group 7) and caused spoilage close to the level of SV beef samples contaminated with this clostridial strain. Overall, the present study showed that the growth of *C. estertheticum* could be inhibited by the meat microbiota, especially LAB. On the other hand, the growth of other meat microbiota (aerobic/anaerobic plate count, LAB, *Enterobacteriaceae* and yeast) was

not influenced by any *C. estertheticum* strain, as the number of these bacteria in sample groups 7–9 (contaminated and non-SV) was at a similar level as in the control sample group 10 (uncontaminated and non-SV).

As mentioned in the [Introduction](#) section, SV cooking is of interest to extend shelf life and ensure safety of meat, as the combination of temperatures (50–85 °C) and time (1–48 h) can kill almost all spoilage microorganisms and pathogens (Baldwin, 2012; Díaz et al., 2008; Latoch et al., 2023; Onyeaka et al., 2022; Patil et al., 2024). This assumption is correct, as shown by sample group 6 (uncontaminated and SV cooking), which showed no signs of spoilage and whose meat microbiota count remained low at least until the study date (day 28 of storage). When contaminated with *C. estertheticum*, the storage life of the SV beef samples decreased significantly in terms of signs of spoilage, although the number of other meat microbiota was very low. This point is important because *C. estertheticum* or other cold-tolerant clostridia are not

Table 2
Species of meat microbiota identified using MALDI-TOF MS.

No.	Species	Samples and number of colonies												Total
		Replicate 1				Replicate 2				Replicate 3				
		1	2	3-6	7-10	1	2	3-6	7-10	1	2	3-6	7-10	
1	<i>Acidovorax temperans</i>	1												1
2	<i>Acinetobacter albensis</i>	1												1
3	<i>Aeromonas eucremophila</i>									5				5
4	<i>Aeromonas hydrophila</i>									1				1
5	<i>Aeromonas</i> sp.									1				1
6	<i>Aeromonas veronii</i>									5				5
7	<i>Brochothrix thermosphacta</i>					5			4	3				12
8	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	5			3	2								10
9	<i>Candida zeylanoides</i>	1			1	3			3					8
10	<i>Carnobacterium divergens</i>	17			23	3		13	15	9		4	14	98
11	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>				3			4	6	3			2	18
12	<i>Cutaneotrichosporon curvatum</i>	3				1								4
13	<i>Hafnia alvei</i>	1			11	2			3	1			10	28
14	<i>Janthinobacterium lividum</i>	1												1
15	<i>Kocuria rhizophila</i>	2					4	11			1	5	5	28
16	<i>Kocuria salsicia</i>	1									3			4
17	<i>Lactilactobacillus curvatus</i>					2								2
18	<i>Lactilactobacillus sakei</i>	9			11	6			35	5			18	84
19	<i>Lactococcus piscium</i>				8	2			7					17
20	<i>Lactilactobacillus fuchuensis</i>				4	2			2	2			3	13
21	<i>Leuconostoc carnosum</i>					2			6	8			12	28
22	<i>Leuconostoc gelidium</i>	1			11	3			4				7	23
23	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5							1					6
24	<i>Macrococcus caseolyticus</i>						2	1						3
25	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	1												1
26	<i>Micrococcus luteus</i>							1	2					3
27	<i>Moraxella osloensis</i>					2	2				1			5
28	<i>Paracoccus yeei</i>				2									2
29	<i>Pseudomonas antarctica</i>					1								1
30	<i>Pseudomonas bremeri</i>									1				1
31	<i>Pseudomonas coelina</i>								1					1
32	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>					2			1					3
33	<i>Pseudomonas fragi</i>				7	1		1	14	1			11	35
34	<i>Pseudomonas kilonensis</i>								1					1
35	<i>Pseudomonas libanensis</i>								1					1
36	<i>Pseudomonas lundensis</i>				3	2		5	3				2	15
37	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1												1
38	<i>Pseudomonas toetrolensis</i>				1	1		4	7				2	15
39	<i>Rahnella aquatilis</i>				1					5			2	8
40	<i>Rahnella inusitata</i>	2			6	2				4			11	25
41	<i>Serratia grimesii</i>					2			2					4
42	<i>Serratia liquefaciens</i>				2	5			3	7			2	19
43	<i>Serratia proteamaculans</i>				3	2			4	2			12	23
44	<i>Staphylococcus capitis</i>				1									1
45	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				2				1				1	4
46	<i>Staphylococcus hominis</i>							3						3
47	<i>Staphylococcus warneri</i>				1			2						3
48	<i>Yarrowia deformans</i>					1								1
49	<i>Yersinia enterocolitica</i>				3				1				1	5
50	<i>Yersinia ruckeri</i>				3				4				19	26
51	Not identifiable	14			18	2	2	2	23	2	2	2	25	91

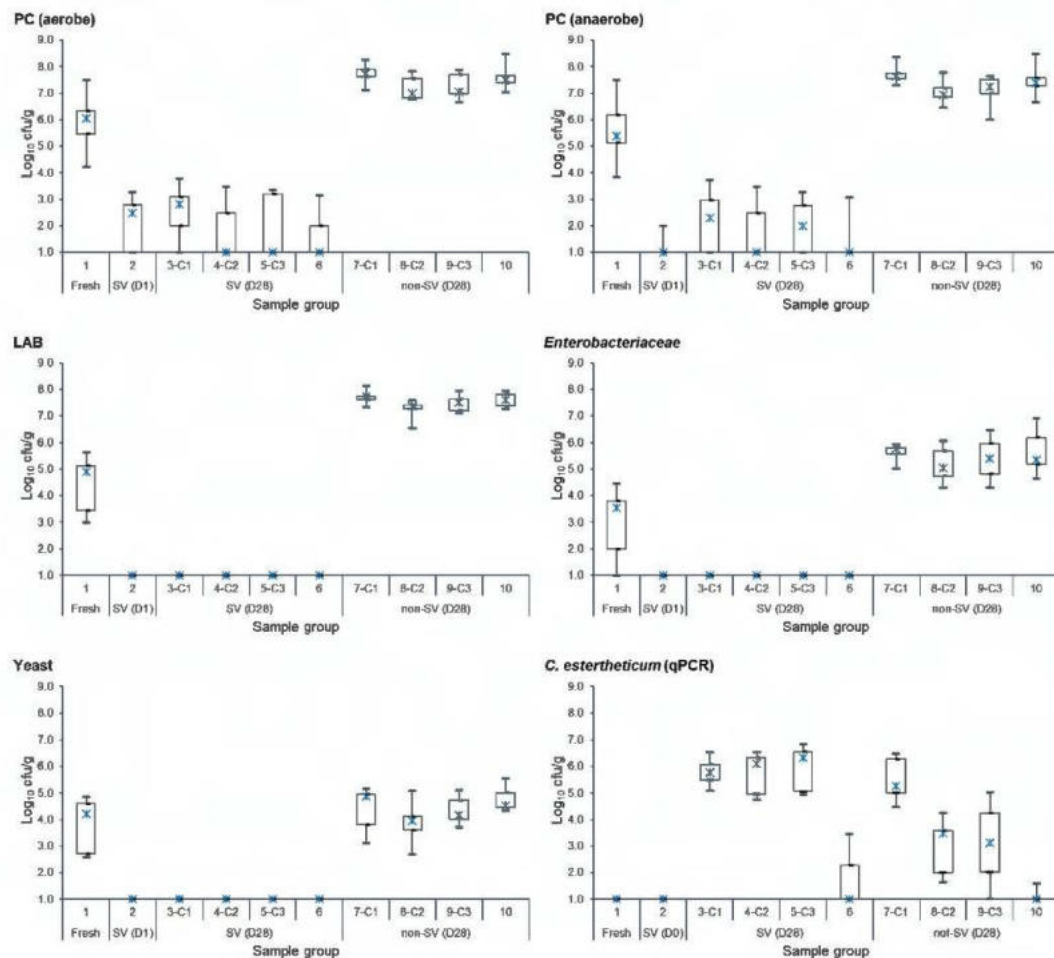


Fig. 4. Number of microorganisms (\log_{10} cfu/g) in each sample (groups 1–10, see Table 1) determined using culture method (PC, LAB, *Enterobacteriaceae*, and yeast) and qPCR (for *C. estertheticum*). The limit of detection for all target microorganisms was $2.0 \log_{10}$ cfu/g.

in fresh beef (group 1) from the 2nd and 3rd replicates (see Fig. 3).

On the contrary, the non-SV-cooked beef samples (groups 7–10), which were also stored for 28 days, showed a high number of aerobic and anaerobic mesophilic bacteria ($>6.5 \log_{10}$ cfu/g), LAB ($>7.0 \log_{10}$ cfu/g), and *Enterobacteriaceae* ($>5.0 \log_{10}$ cfu/g, Fig. 4). Yeasts were found at similar levels (approximately 3.0 – $5.0 \log_{10}$ cfu/g) as in fresh meat, indicating that they do not grow very well under the incubation conditions. LAB usually grow slowly at refrigeration temperatures and reach a concentration of 7.0 to $8.0 \log_{10}$ cfu/g after about 6 weeks of storage (CSIRO, 2003). They will stay at this level for the rest of the storage life of the product but do not produce signs of spoilage until several weeks after the maximum population of bacteria is reached (CSIRO, 2003). Therefore, only a weak to moderate correlation was found between spoilage parameters such as odour changes and LAB numbers (Dorn-In et al., 2023). Generally, meat considered as spoiled when there are changes in sensory properties. However, regarding food safety and consumer protection aspects described in the regulation of the European Union, total plate count and *Enterobacteriaceae* in fresh

beef at retail should not exceed 6.5 , and $5.0 \log_{10}$ cfu/g, respectively (European Commission Regulation (EC) No 2073/2005, n.d.). In addition, the European Food Safety Authority recommends that LAB on meat should not exceed $7.0 \log_{10}$ cfu/cm² (EFSA, 2016). Therefore, some of beef samples without sensory spoilage evidence (e.g., groups 10) may be considered unfit for human consumption due to high bacterial contamination as described above and in Article 14 (Food safety requirements) of the European Commission Regulation (EC) No 178/2002 (n.d.).

Although *C. estertheticum* was not detected in any sample of fresh beef (group 1) from all three replicates, it was detected in sample group 6 (SV beef) and group 10 (non-SV beef) in the first replicate. This means that these samples were naturally or accidentally contaminated with *C. estertheticum* but were not detected in fresh meat as the contamination rate was below the detection limit of qPCR ($2.0 \log_{10}$ cfu/g). However, the contamination rate is rather low, and the typical spoilage caused by *C. estertheticum* was not observed in these samples as they had a BPS and spoilage odour score of 1.

routinely investigated in almost all laboratories and affected samples may only be subjected to microbiological examination of the usual meat microbiota. Specialised procedures are required to culture clostridia and the isolation process takes time (Dorn-In, 2018). Therefore, qPCR may be a better option for screening and then culture can be performed for the PCR-positive samples if required (Mang et al., 2021).

3.3. MALDI-TOF and species identification

Table 2 shows the microorganisms identified and the number of colonies in the three replicates. A total of 699 colonies were subjected to species identification using MALDI-TOF MS. Of these, 608 colonies were identified, and 91 were not identifiable. 289 (41.3 %) colonies belonged to LAB, while 138 (19.7 %) colonies were classified as *Enterobacteriaceae*. The remainder (37.1 %) belonged to other bacterial groups such as *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Kocuria* spp., and *Staphylococcus* spp. Most of the yeasts could not be identified, only 13 (1.9 %) colonies were identifiable. The most abundant species were *Carnobacterium divergens* (14.0 %), followed by *Lactobacillus sakei* (12.0 %) and *Pseudomonas fragi* (5.0 %). The species *Hafnia alvei*, *Kocuria rhizophila*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidum*, *Rahnella immitata*, *Serratia proteamaculans*, and *Yersinia ruckeri* were found in between 3.0 % and 4.0 % of the colonies subjected to MALDI-TOF MS.

The detected bacterial species, especially those belonging to the LAB and *Enterobacteriaceae*, have also been found in vacuum-packed meat in other studies (Dorn-In et al., 2023; Hernández-Macedo et al., 2011). In general, *Pseudomonas* spp. play an important role as spoilage organisms in meat stored under aerobic conditions (ERSA, 2016). In vacuum-packed meat, *Pseudomonas* spp. can utilise the residual oxygen in the packaging and grow during the first days of storage. In the present study, they were detected using PC plates. *Pseudomonas fragi* was the predominant species, as it has a short storage phase and therefore grows very rapidly even at refrigeration temperatures (Hernández-Macedo et al., 2011).

3.4. Correlation between number of *C. estertheticum* and spoilage parameter

In general, and as previously described, the other spoilage bacteria can also produce gas, resulting in a low BPS score (Mang et al., 2021). However, as shown in Fig. 1, all non-SV meat samples had a lower BPS score than the SV samples. This indicates that in the SV samples, where the number of other meat microbiota is very low, all *C. estertheticum* strains can grow very well, leading to a significant increase in gas production and the typical spoilage odour. In line with this, strong correlations were found between the number of clostridia and the BPS value ($r = 0.75$), and the number of clostridia and the odour ($r = 0.87$). These correlations were found to be statistically significant ($p = 5.1E-14$ and $p = 2.9E-23$, respectively). Although the correlations between the number of clostridia and drip loss ($r = 0.27$) and pH ($r = 0.27$) were very weak, they were found to be statistically significant ($p = 0.02$ for both correlations). However, this result should be interpreted with caution. As mentioned in Section 3.1, the drip loss of meat was a result of the SV process.

There are several factors that can promote the growth of *C. estertheticum* in SV beef. For example, high drip loss can contribute to the rapid growth of clostridia, as the meat juice is a source of water-soluble minerals that are released from the meat and are available to the clostridia. In addition, there are only a small number of other meat microbiota in SV meat; thus, there was little or no competition with other microorganisms for the uptake of nutrients. Moreover, the growth of other meat microbiota, especially LAB, leads to an increase of substances such as lactic acid that lower the pH of the meat, resulting in growth inhibition of *C. estertheticum* in non-SV meat. Almost all non-SV meat samples containing very low numbers of *C. estertheticum* had pH values of 5.0 ± 0.4 , while the SV meat samples containing high numbers

of *C. estertheticum* had pH values of 5.7 ± 0.4 . Since *C. estertheticum* can grow at a pH of 5.5 to 7.5, with an optimal range between 5.8 and 6.8 (Wambui, 2019), the pH values of SV beef provide another optimal condition for the growth of these bacteria. In addition, SV treatment at moderately high temperature over a long period of time (55 °C, 70 min) can lead to activation of the spores for germination.

These results indicate that a high number of *C. estertheticum* leads to increased gas production (BPS value) and to the typical spoilage odour, regardless of whether it is SV or non-SV beef. On the other hand, the ability of LAB to produce lactic acid, which lowers the pH sufficiently to inhibit the growth of *C. estertheticum*, may extend the shelf life of vacuum-packed meat caused by at least some strains of *C. estertheticum*. As shown in this study, the field strains isolated from vacuum-packed beef (strain C2) and from bovine faeces (strain C3) did not grow very well when the competing meat microbiota was present in large numbers.

4. Conclusion

In general, the SV process can extend the shelf life of beef because the common spoilage bacteria are killed, inactivated or stressed so that they cannot grow very well. However, the results of this study show that in vacuum-packed beef samples contaminated with *C. estertheticum* and subjected to SV cooking, the clostridial spores survive the SV process and can grow very well in SV beef because of the lack of competing microorganisms (especially LAB). In addition, the high volume of meat drip produced during SV processing can serve as a nutrient source for these bacteria. The growth of *C. estertheticum* leads to remarkable gas production and a spoilage odour after 28 days of storage at 4 °C. Therefore, the shelf life of SV beef containing *C. estertheticum* is generally shorter than that of non-SV meat containing *C. estertheticum*.

CRedit authorship contribution statement

Samart Dorn-In: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization. Riem El-Seniti: Writing – original draft, Investigation, Data curation. Karin Schwaiger: Writing – review & editing, Supervision, Resources.

Funding

This work was financially supported by the BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Andrea Pauker, Dimitri Solka, Joachim Angerer, Michael Bader, and Morten Sorig for their support and help with the laboratory work at the Unit of Food Hygiene and Technology at the University of Veterinary Medicine, Vienna.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

References

- Aadnyng, M.D., Bejerholm, C., Erbjerg, P., Bertram, H.C., Anderren, H.J., 2003. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. *Food Qual. Prefer.* 14, 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00086-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00086-1).
- Baldwin, D.E., 2012. Sous vide cooking: a review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 1, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2011.11.002>.

- Berdigaliy, S., Baybolova, L., Davtydenko, N., Kulashanov, T., Kulashanov, Y., Čapla, J., Zając, P., 2022. Perspectives for the application of the sous-vide cooking in the development of products for public catering. *Potr. Slov. J. Food Sci.* 16, 137–148. <https://doi.org/10.5219/1719>.
- Bhat, Z.F., Morton, J.D., Zhang, X., Mason, S.L., Bekhit, A.B.-D.A., 2020. Sous-vide cooking improves the quality and in-vitro digestibility of semitendinosus from culled dairy cows. *Food Res. Int.* 127, 108708. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108708>.
- Boerema, J.A., Broda, D.M., Penney, N., Brightwell, G., 2007. Influence of peroxyacetic acid-based carcass rinse on the onset of “blown pack” spoilage in artificially inoculated vacuum-packed chilled beef. *J. Food Prot.* 70, 1434–1439. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.6.1434>.
- Bonke, R., Drees, N., Gareis, M., 2016. Detection of psychrophilic and psychrotolerant *Clostridium* spp. in chilled fresh vacuum-packed meat using different PCR methods. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv218>.
- Brightwell, G., Clemens, R., 2012. Development and validation of a real-time PCR assay specific for *Clostridium estertheticum* and *C. estertheticum*-like psychrotolerant bacteria. *Meat Sci.* 92, 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.06.025>.
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L., 1996. Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with “blown pack” spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 335–352. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00070-4).
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Cook, R.L., Bell, R.G., 1997. Prevalence of cold-tolerant clostridia associated with vacuum-packed beef and lamb stored at abusive and chill temperatures. *N. Z. J. Agric. Res.* 40, 93–98. <https://doi.org/10.1080/00288233.1997.9513236>.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, R.G., Murgrave, D.R., 2000. *Clostridium* gasigenes sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 107–118. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-107>.
- Casaburi, A., Piombino, P., Nychas, G., Villani, F., Ercolini, D., 2015. Bacterial populations and the volatiles associated to meat spoilage. *Food Microbiol.* 45, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>.
- CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 2001. Gas bubbles in vacuum-packed meat. In: *Meat Technology Update*. https://meatupdate.csiro.au/data/MEAT_TECHNOLOGY_UPDATE_01-3.pdf. Accession date 20 August 2024.
- CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, 2003. Vacuum-packed meat: storage life and spoilage. <https://meatupdate.csiro.au/VPmeat-spoilage-storage.pdf>. Accession date 22 November 2024.
- Dainty, R.H., Edwards, R.A., Hibbard, C.M., 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *J. Sci. Food Agric.* 49, 473–486. <https://doi.org/10.1002/jfsc.2740490410>.
- Díaz, P., Nieto, G., Garrido, M.D., Bañón, S., 2008. Microbial, physical-chemical and sensory spoilage during the refrigerated storage of cooked pork loin processed by the sous vide method. *Meat Sci.* 80, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.002>.
- Dorn-In, S., Schwaiger, K., Springer, C., Barta, L., Ulrich, S., Gareis, M., 2018. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigidiphilum*, *C. bovis* and *C. tagliuense*-like from blown pack spoilage (BPS) meat and from wild boar. *Int. J. Food Microbiol.* 286, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.020>.
- Dorn-In, S., Mang, S., Schwaiger, K., 2022. A simple method for the isolation of cold-tolerant *Clostridium* spp. from meat samples. *Int. J. Food Microbiol.* 378, 109836. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109836>.
- Dorn-In, S., Führer, L., Gareis, M., Schwaiger, K., 2023. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. *Food Microbiol.* 109, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104147>.
- Douglas, S.L., Bernardez-Morales, G.M., Nichols, B.W., Belk, A.D., Reyes, T.M., Ball, J.J., Sawyer, J.T., 2023. Influence of sous vide cooking on ground beef patties. *Foods* 12, 3664. <https://doi.org/10.3390/foods12193664>.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2016. Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA J.* 14. <https://doi.org/10.2903/jefsa.2016.4523e04523>.
- European Commission Regulation (EC) No 178/2002. Of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>.
- European Commission Regulation (EC) No 2073/2005. Of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
- Evans, J.D., 1996. *Straightforward Statistics for the Behavioral Sciences*. Brooks/Cole Publishing, Pacific Grove, CA.
- Gómez, I., Banaez, F.C., Berain, M.J., 2019. Physicochemical and sensory properties of sous vide meat and meat analog products marinated and cooked at different temperature-time combinations. *Int. J. Food Prop.* 22, 1693–1708. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1666869>.
- Grillfuert, 2024. *Sous Vide Garen — das Geheimnis hinter Vakuumgaren und 2 tolle Rezepte*. <https://www.grillfuert.de/magazin/bbq-guides/grillmethoden/sous-vide-garen/>. Accession date 29 January 2024.
- Harari, E., Kenezel, G., Dalmadi, I., 2021. Comparison of the single-step and double-step sous-vide treatment effect on the quality attributes of chicken breast. *Prog. Agric. Eng. Sci.* 17, 61–68. <https://doi.org/10.1556/446.2021.30008>.
- Hernández-Macedo, M.L., Barancelli, G.V., Contreras-Castillo, C.J., 2011. Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: a review. *Braz. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100001>.
- Jääskeläinen, E., Johanson, P., Korttinen, O., Nieminen, T., Schmidt, G., Somervuo, P., Mohtma, M., Vaininen, P., Auvinen, P., Björkroth, J., 2012. Significance of heme-based respiration in meat spoilage caused by *Leuconostoc gastroenteritum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1078–1085. <https://doi.org/10.1128/AEM.02943-12>.
- Jeong, S.H., Kim, E.C., Lee, D.U., 2020. The impact of a consecutive process of pulsed electric field, sous-vide cooking, and reheating on the properties of beef semitendinosus muscle. *Food* 16, 1674. <https://doi.org/10.3390/foods9111674>.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Field, R.A., Johnson, M.C., 1989. Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. *J. Food Prot.* 52, 424–426. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.424>.
- Latoch, A., Gluchowski, A., Czarniecka-Skubina, E., 2023. Sous-vide as an alternative method of cooking to improve the quality of meat: a review. *Foods* 12, 3110. <https://doi.org/10.3390/foods12163110>.
- Land, B.M., Graham, A.F., George, S.M., Brown, G.D., 1990. The combined effect of incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Microbiol.* 69, 481–492.
- Mang, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., Dorn-In, S., 2021. High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigidiphilum* and *C. algaeharum* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. *Int. J. Food Microbiol.* 340, 109053. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>.
- Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., McDowell, D.A., 2009. Isolation and sources of blown pack spoilage clostridia in beef abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* 7, 616–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04229.x>.
- Onyaka, H., Nwabor, O., Jang, S., Obileke, K., Hart, A., Anumadu, C., Miri, T., 2022. Sous vide processing: a viable approach for the assurance of microbial food safety. *J. Sci. Food Agric.* 102, 3503–3512. <https://doi.org/10.1002/jsf.11836>.
- Patil, K., Adhikari, M., Rubinelli, P., Desiree, K., Mierck, K.R., Acuff, J.C., 2024. Evaluating the safety of sous-vide cooking for beef products inoculated with single strains of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157. *J. Food Prot.* 87, 100252. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100252>.
- Przybyłski, W., Jaworska, D., Kajak-Siemanko, K., Salek, P., Pakula, K., 2021. Effect of heat treatment by the sous-vide method on the quality of poultry meat. *Food* 10, 1610. <https://doi.org/10.3390/foods10071610>.
- Shin, D.M., Yune, J.H., Kim, D.H., Han, S.G., 2023. Effect of sous-vide cooking conditions on the physicochemical, microbiological and microstructural properties of duck breast meat. *Anim. Biosci.* 36, 1596–1603. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0039>.
- Stella, S., Garavaglia, D., Francini, G., Viganò, V., Bernardi, C., Tirloni, E., 2019. Evaluation of the weight loss of raw beef cuts vacuum-packaged with two different techniques. *Ital. J. Food Saf.* 8, 8111. <https://doi.org/10.4081/jifs.2019.8111>.
- Wambui, J., Stephan, R., 2019. Relevant aspects of *Clostridium estertheticum* as a specific spoilage organism of vacuum-packed meat. *Microorganisms* 7, 142. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050142>.
- Węgliarz, A., 2010. Meat quality defined based on pH and colour depending on cattle category and slaughter season. *Czech J. Anim. Sci.* 55, 548–556.
- Zavadlav, S., Blatić, M., Van de Velde, F., Vignatti, C., Fenoglio, G., Magentini, A.M., Pirovani, M.E., Perotti, C.M., Burzac Kovačević, D., Putnik, P., 2020. Sous-vide as a technique for preparing healthy and high-quality vegetable and seafood products. *Foods* 25, 1537. <https://doi.org/10.3390/foods9111537>.

Anlage 6: Beitrag für Kongressband und Powerpoint-Präsentation bei DVG-Tagung, 2025

Verderbscharakteristiken von Sous-Vide-Rindfleisch, verursacht durch *Clostridium estertheticum*

Samart Dorn-In, Riem El-Seniti, Karin Schwaiger

Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln, Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Universität Wien

Einleitung

Die zunehmende Beliebtheit des Sous-Vide-Garens (SV) macht die Erforschung der mikrobiologischen Qualität, der sensorischen Veränderungen und der Haltbarkeit von SV-Produkten erforderlich. Studien zeigen, dass das SV-Garen die Anzahl an Verderbserregern und Pathogenen deutlich reduziert, was sich positiv auf die Haltbarkeit und Sicherheit von SV-Produkten auswirkt. *Clostridium estertheticum*, ein Verderbserreger von vakuumverpacktem Fleisch, kann aufgrund seiner Fähigkeit zur Bildung hitzeresistenter Endosporen jedoch das SV-Garen überleben. Diese Sporen können während der Lagerung bei Kühlschranktemperaturen auskeimen und sich vermehren, was zum Verderb von SV-Fleisch führt, erkennbar an der aufgeblähten Verpackung (blown pack spoilage, BPS). Außerdem hat das betroffene Fleisch durch Bildung von Butanol und Buttersäure einen käsigen Geruch. Ziel dieser Studie war es daher, den durch *C. estertheticum* verursachten Verderb von SV-Rindfleisch im Vergleich zu Nicht-SV-Rindfleisch visuell (Gasbildung) und sensorisch (Geruchsabweichung) zu charakterisieren [1, 2]. Zusätzlich zur Bestimmung der Verderbsanzeichen wurden alle Rindfleischproben einer mikrobiologischen und qPCR-Untersuchung unterzogen, um die Anzahl aerober und anaerober mesophiler koloniebildender Einheiten (Gesamtkeimzahl, GKZ) und die Anzahl von Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae, Hefen und *C. estertheticum* zu bestimmen.

Untersuchungsvorgang und Ergebnis

Die Tests wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Fleischproben (drei biologische Replikate: Durchläufe) durchgeführt. Insgesamt wurden 90 Rindfleisch-Teilproben (jeweils 240-260 g) analysiert (siehe [Tabelle 1](#)). Die Anzahl der Sporen und vegetativen Zellen von *C. estertheticum*, mit denen das Rindfleisch artifiziell kontaminiert

wurde, betrug im Durchschnitt $2,4 \log_{10}$ KbE/g Rindfleisch. Beim SV-Garen wurden die vakuumverpackten Rindfleischproben in einem SV-Bad bei 55 °C 70 Minuten lang erhitzt. Die Proben der Gruppen 1 und 2 wurden am ersten Tag analysiert, während die Proben der Gruppen 3 bis 10 bei 4 °C 28 Tage lang gelagert wurden.

Tabelle 1: Probengruppen (1 - 10) für alle drei biologischen Replikate mit insgesamt n = 90 Rindfleisch-Teilproben

Gruppe	Proben *	n	Sous-Vide Garen	Lagerungs- temperatur	Tag der Untersuchung
1	Frisches Rindfleisch	9	-	-	1
2	Rindfleisch	9	√	-	1
3	Rindfleisch & C1	9	√	4 °C	28
4	Rindfleisch & C2	9	√	4 °C	28
5	Rindfleisch & C3	9	√	4 °C	28
6	Rindfleisch	9	√	4 °C	28
7	Rindfleisch & C1	9	-	4 °C	28
8	Rindfleisch & C2	9	-	4 °C	28
9	Rindfleisch & C3	9	-	4 °C	28
10	Rindfleisch	9	-	4 °C	28

* Frische Rindfleischproben (Gruppe 1) sind nicht vakuumiert. Mit *C. estertheticum* kontaminiertes Rindfleisch: C1 = DSM 8809; C2 = isoliert aus vakuumverpacktem Rindfleisch; C3 = isoliert aus Rinderkot

Nach 28 Tagen Lagerung bei 4 °C wiesen die kontaminierten SV-Rindfleischproben (Gruppen 3-5) im Vergleich zu den kontaminierten Nicht-SV-Proben (Gruppen 7-9) eine statistisch signifikant höhere Gasproduktion und einen stärkeren Verderbsgeruch auf ($p < 0,05$). Obwohl der Fleischtropfsaftverlust ($11,5 \pm 3,6$ % vs. $2,9 \pm 1,7$ % w/w) und der pH-Wert ($5,7 \pm 0,4$ vs. $5,0 \pm 0,4$) bei kontaminierten SV-Rindfleischproben ebenfalls höher waren, wurden diese nicht als spezifische, durch *C. estertheticum* verursachte Verderbsmerkmale angesehen. Der hohe Verlust des Fleischtropfsafts der Gruppen 3-6 ist auf das SV-Garen zurückzuführen, während die niedrigen pH-Werte im Nicht-SV-Fleisch (Gruppen 7-10) durch das Wachstum von Milchsäurebakterien verursacht wurden.

Die mikrobiologischen Ergebnisse zeigten, dass das SV-Garen den größten Teil der Fleischmikrobiota abtötete. Frisches Fleisch (Gruppe 1) wies folgende Werte auf: GKZ (aerob und anaerob) $3,8-7,5 \log_{10}$ KbE/g (= \log_{10}), Milchsäurebakterien $3,0-5,6 \log_{10}$, Enterobacteriaceae $< 2,0-4,5 \log_{10}$ und Hefen $2,6-5,0 \log_{10}$. Nach dem SV-Garen waren die meisten Proben in Gruppe 2 negativ für GKZ, Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae und Hefen; nur in drei Fällen konnten Werte von 2,4 bis $3,3 \log_{10}$ nachgewiesen werden. Nach der Lagerung für 28 Tage bei 4 °C wiesen kontaminierte SV-Rindfleischproben (Gruppen 3-5)

weiterhin sehr niedrige Keimzahlen auf. Die GKZ (aerob und anaerob) lagen bei $< 3,5 \log_{10}$, während Milchsäurebakterien, Enterobacteriaceae und Hefen nicht nachweisbar ($< 2,0 \log_{10}$) waren. In den kontaminierten Rindfleischproben, die nicht SV-gegart wurden (Gruppe 7–9) liegt die GKZ (aerob und anaerob) und Milchsäurebakterien bei $6,7\text{--}8,5 \log_{10}$, Enterobacteriaceae bei $4,3\text{--}6,5 \log_{10}$ und Hefen bei $2,5\text{--}5,6 \log_{10}$.

Da *C. estertheticum* schwer zu kultivieren ist und oft von der konkurrierenden Fleischmikrobiota überwuchert wird, wurde diese Spezies mittels qPCR für *C. estertheticum* quantifiziert [3]. In allen artifiziell kontaminierten SV-Proben (Gruppen 3–5) wurden sehr hohe Zahlen von *C. estertheticum* ($5,5\text{--}6,5 \log_{10}$) nachgewiesen. In den artifiziell kontaminierten, aber nicht SV-behandelten Fleischproben (Gruppe 7–9) variierten die Zahlen jedoch von $2,0$ bis $6,5 \log_{10}$, wobei $70,4\%$ ($n = 19/27$) der Proben die Werte unter $5,0 \log_{10}$ hatten. Die Proben mit hohen Zahlen von *C. estertheticum* korrelierten stark mit den sensorischen Veränderungen (Aufgasung und Geruchsabweichung). Abgesehen von drei Fällen in Gruppe 6 des ersten Durchgangs, die leicht positiv ($2,3$ bis $3,5 \log_{10}$) für *C. estertheticum* waren, waren alle anderen Kontrollproben (Gruppen 6 und 10) negativ für das Bakterium. Alle Kontrollproben, auch diejenigen, die leicht positiv für *C. estertheticum* waren, zeigten keine Verderbsanzeichen.

Fazit

Im Allgemeinen kann das SV-Garen die Haltbarkeit von Rindfleisch verlängern, da die überwiegende Anzahl der Mikroorganismen abgetötet, inaktiviert oder gestresst und somit die Vermehrung verhindert wird. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass bei vakuumverpackten Rindfleischproben, die mit *C. estertheticum* kontaminiert sind und dem SV-Garen unterzogen werden, die Sporen das SV-Garen überleben. Da es in SV-Proben keine oder nur eine geringe Anzahl an konkurrierender Fleischmikrobiota (insbesondere Milchsäurebakterien) gibt, können die auskeimenden Sporen von *C. estertheticum* in SV-Rindfleisch sehr gut wachsen. Darüber hinaus kann die große Menge an beim SV-Garen entstehende Fleischtropfsaft als Nährstoffquelle für diese Bakterien dienen. Das Wachstum von *C. estertheticum* führt nach 28 Tagen Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu Gasproduktion und Verderbsgeruch. Dies belegt, dass SV-Rindfleisch, das *C. estertheticum* enthält, eine kürzere Haltbarkeitsdauer hat als kontaminiertes Nicht-SV-Rindfleisch. In dieser Studie wurde erstmals der Einfluss des Sous-vide-Garens auf den durch *C. estertheticum* verursachten Verderb von Rindfleisch untersucht [4].

Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Samart Dorn-In, MSc VPH
Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln
Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen
Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen
Veterinärmedizinische Universität Wien
Veterinärplatz 1, Gebäude GA/III
A-1210 Wien, Österreich
E-Mail: samart.dorn-in@vetmeduni.ac.at

Literaturverzeichnis

1. Mang, S., Schwaiger, K., Lindner, R., Gareis, M., Dorn-In, S., 2021: High incidence of cold-tolerant *Clostridium frigoriphilum* and *C. algidicarnis* in vacuum-packed beef on retail sale in Germany. Int. J. Food Microbiol. 340. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109053>
2. Dorn-In, S., Führer, L., Gareis, M., Schwaiger, K., 2023. Cold-tolerant microorganisms causing spoilage of vacuum-packed beef under time-temperature abuse determined by culture and qPCR. Food Microbiol. 109, 104147. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104147>.
3. Dorn-In, S., Schwaiger, K., Springer, C., Barta, L., Ulrich, S., Gareis M., 2018. Development of a multiplex qPCR for the species identification of *Clostridium estertheticum*, *C. frigoriphilum*, *C. bowmanii* and *C. tagluense*-like from blown pack spoilage (BPS) meats and from wild boars. Int. J. Food Microbiol. 286, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.020>
4. Dorn-In, S., El-Seniti, R., Schwaiger, K., 2025. Spoilage characteristics of sous-vide beef caused by *Clostridium estertheticum*. Int. J. Food Microbiol. 430, 111069. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111069>

Verderbscharakteristiken von Sous-vide-Rindfleisch, verursacht durch *Clostridium estertheticum*

Visuelle, sensorische, mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchung

Samart Dorn-In, Reim El-Seniti, Karin Schwaiger

Unit Hygiene und Technologie von Lebensmitteln
Zentrum für Lebensmittelwissenschaften und Öffentliches Veterinärwesen
Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen
Veterinärmedizinische Universität Wien

Veterinärmedizinische Universität Wien
Seite 2/14

Einleitung

Sous-vide-Garens (SV)

- = Vakuumgaren, in einem Wasserbad oder Dampfgarer bei niedrigen, präzisen Temperaturen
- Reduzierung der Anzahl an Verderbserregern und Pathogenen deutlich
- Erhaltung des Nährwerts und Schaffung spezifischer sensorischer Eigenschaften von Fleisch
- Zunehmende Beliebtheit, sowohl in der Gastronomie als auch im Haushalt

C. estertheticum

- Psychrophile, Wachstumstemperatur-4 bis +20 °C
- Sporen: hitzetolerant
- Verderbserreger vom vakuumverpackten Fleisch
- Vorkommen: Weltweit, häufig in subtropischer Klimazone

Einleitung

Fragestellung:

Was passiert, wenn Rindfleisch mit den Sporen von *C. estertheticum* kontaminiert, vakuumverpackt und dem SV-Garen unterzogen und anschließend bei 4°C gelagert wird?

Ziel:

Den durch *C. estertheticum* verursachten Verderb von SV-Rindfleisch im Vergleich zu Nicht-SV-Rindfleisch zu charakterisieren und zu analysieren.

- visuell (Gasbildung durch Ansammlung von CO_2 und H_2)
- sensorisch (Geruchsabweichung durch Butanol und Buttersäure)

Methode

Mikrobiologie (ISO-Norm):

- Gesamtkeimzahl (aerob)
- Gesamtkeimzahl (anaerob)
- Milchsäurebakterien,
- *Enterobacteriaceae*
- Hefen

Quantitative PCR:

- *Clostridium estertheticum* (Dorn-In et al., 2018)

Analytik:

- GC-MS-Analyse (Argyri et al., 2015)

Verderbsparameter (Mang et al., 2021):

- Aufgasungsgrad (Blown-Pack-Spoilage: BPS-Score)
- Geruch
- Fleischtropfsaftverlust (w/w, %)
- pH-Wert

Proben

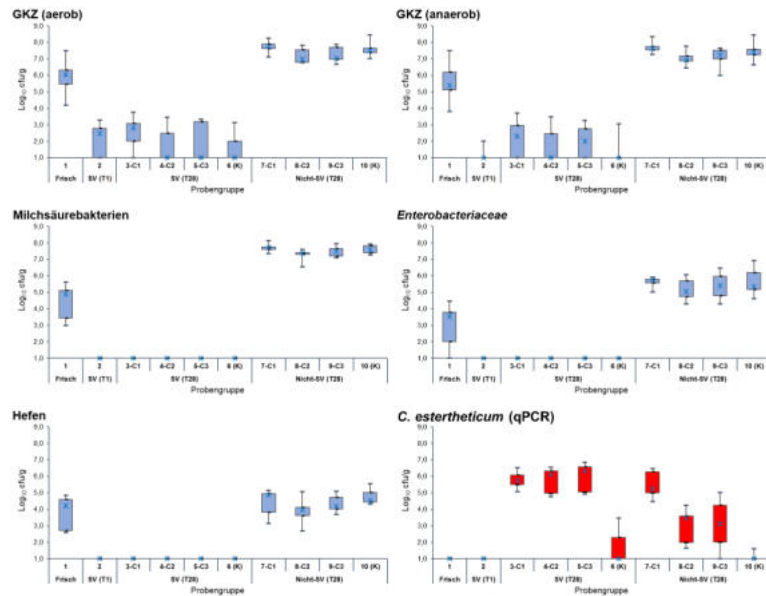
Gruppe	Proben	n	Sous-vide Garen	Lagerungs- temperatur	Tag der Untersuchung
1	Frisches Rindfleisch	9	-	-	1
2	Rindfleisch	9	√	-	1
3-C1	Rindfleisch & C1	9	√	4 °C	28
4-C2	Rindfleisch & C2	9	√	4 °C	28
5-C3	Rindfleisch & C3	9	√	4 °C	28
6 (K)	Rindfleisch (Kontrolle)	9	√	4 °C	28
7-C1	Rindfleisch & C1	9	-	4 °C	28
8-C2	Rindfleisch & C2	9	-	4 °C	28
9-C3	Rindfleisch & C3	9	-	4 °C	28
10 (K)	Rindfleisch (Kontrolle)	9	-	4 °C	28

- Drei biologische Replikate; insgesamt n = 90 Rindfleisch -Teilproben (jeweils 240 -260 g)
- Artifizelle Kontaminierung mit drei *C. estertheticum*-Stämmen: C1 = DSM 8809; C2 = isoliert aus vakuumverpacktem Rindfleisch; C3 = aus Rinderkot.
- Konzentration von Sporen bei der Kontaminierung: 2,0 bis 2,6 log₁₀ KbE/g Fleisch
- SV-Garen-Verfahren: 55 °C für 70 min (= medium rare für Rindersteak)

vetmeduni

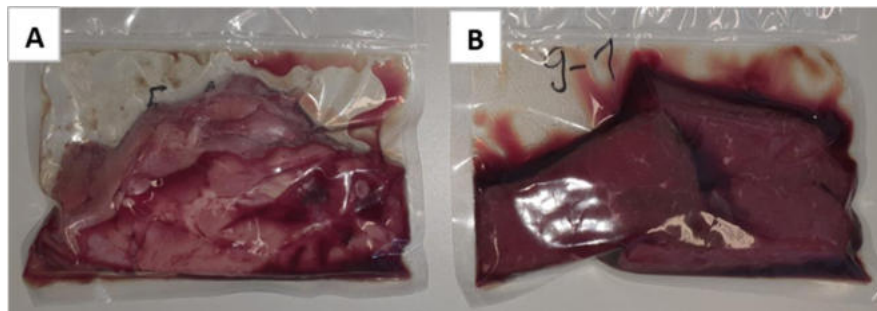
Ergebnis

Mikrobiologische- und qPCR-Untersuchungen



Veterinärmedizinische Universität Wien
Seite 8/14

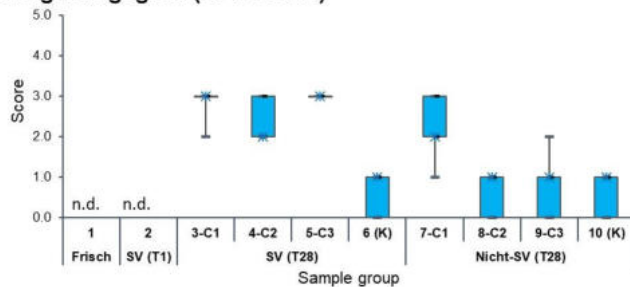
Verderbscharakteristiken von SV- vs. Nicht-SV-Rindfleisch



A: SV-Fleisch mit der Aufgasung (Score = 3). B: Nicht SV-Fleisch (ohne Aufgasung, Score = 0),

Abgebildet nach der Lagerung bei 4 °C 28 Tage

Aufgasungsgrad (BPS-Score)

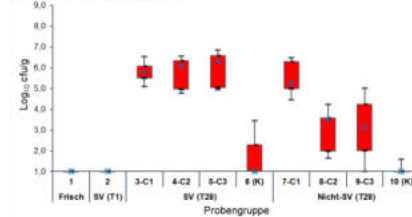


Beurteilung der BPS-Score:

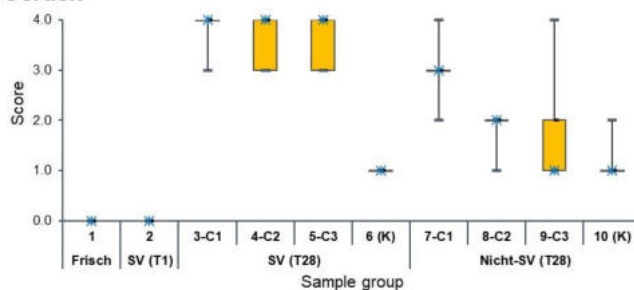
- 0: Keine Gasblasen
- 1: Wenige, kleine Gasblasen im Fleischsaft sichtbar
- 2: **Aussehen wie bei Vakuumverlust**
- 3: Offensichtlich aufgebläht, puffig
- 4: Auf volle Größe aufgebläht, Folie noch nicht straff gespannt
- 5: Auf volle Größe aufgebläht, Folie straff gespannt

- Starke Korrelationen zwischen der Anzahl der Clostridien und dem BPS - Score ($r = 0,75$)
- statistisch signifikant, $p = 5,1E-14$

C. estertheticum (qPCR)



Geruch

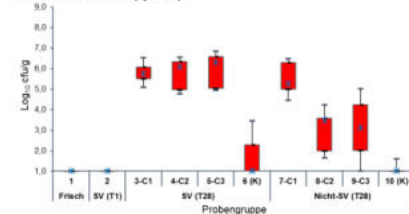


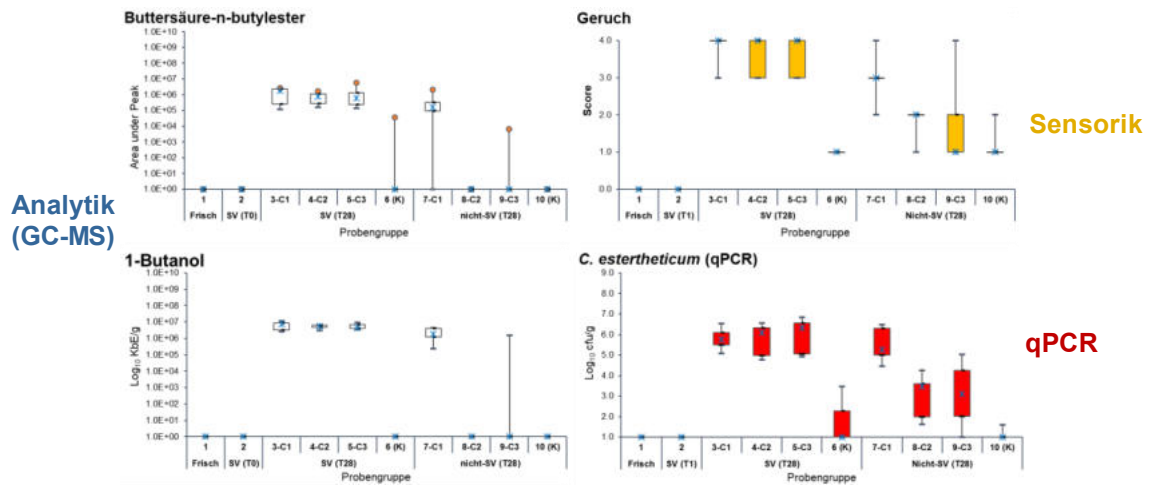
Geruch-Score;

- 0: Völlig einwandfrei
- 1: Akzeptabel, leichte Abweichung
- 2: **Gerade noch akzeptabel, Abweichung vorhanden**
- 3: Nicht mehr akzeptabel, deutlicher Verderbsgeruch
- 4: Extremer Verderbsgeruch

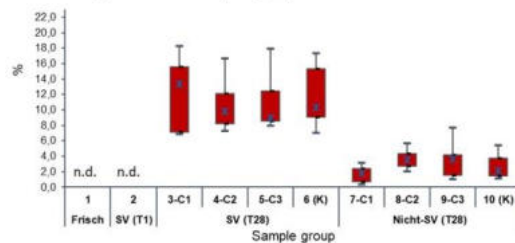
- Starke Korrelationen zwischen der Anzahl der Clostridien und dem Geruch ($r = 0,87$)
- statistisch signifikant, $p = 2,9E-23$

C. estertheticum (qPCR)

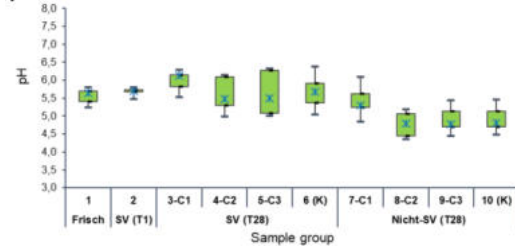




Fleischtropfsaftverlust (w/w, %)

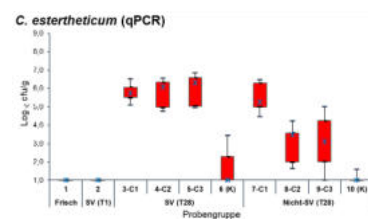


pH-Wert



Bei SV-Fleischproben

- Hohe Fleischtropfsaftverlust durch Erhitzung und Schrumpfung des Fleisches
- Hohe pH-Wert, da kein Wachstum von Milchsäurebakterien ist



Zusammenfassung

- Im Allgemeinen kann das SV-Garen die Haltbarkeit von Rindfleisch verlängern, da die überwiegende Anzahl der Mikroorganismen abgetötet, inaktiviert oder gestresst und somit die Vermehrung verhindert wird.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass **Nach** der Lagerung von 28 Tagen bei 4 °C:

- Fleisch + *C. estertheticum* → SV-Garen → geringe Anzahl an Fleischmikrobiota → Beschleunigung des Wachstums von *C. estertheticum* → alle Proben (n = 27) - **innerhalb** von 28 Tagen verdorben
- Fleisch + *C. estertheticum* → Nicht-SV-Garen → Wachstum von Milchsäurebakterien → Wachstumshemmung bei 2 von 3 Stämmen von *C. estertheticum* → n = 19/27 (70%) zeigten kein Verderbsanzeichen
- Kontrollgruppen (negativ von Clostridien, sowohl SV- als auch Nicht-SV-Fleisch) → kein Verderbsanzeichen

vetmeduni



Das Projekt wurde vom „BIOS Science Austria – Verein zur Förderung der Lebenswissenschaften“ gefördert

Weitere Information:



Spoilage characteristics of sous-vide beef caused by *Clostridium estertheticum*

Samart Dorn-In^{*}, Riem El-Seniti, Karin Schwaiger

Unit of Food Hygiene and Technology, Centre for Food Science and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria