



Hochschule Neubrandenburg
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmitteltechnologie

Studiengang Lebensmitteltechnologie

Wintersemester 2020-2021

Reduzierung von Listerien durch Bakteriophagen bei Schweinefleisch

Bachelorarbeit eingereicht

Von

Eric Hantel

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis-2020-0165-3

Erstprüfer: Prof. Dr. Michael Sandmann

Zweitprüfer: Dr. Rahmatollah Abdi Baghi

Neubrandenburg, den 30.10.2020

Danksagung

Ich möchte mich an Herr Doktor Abdi und Herr Professor Sandmann bedanken das sie mir so ein interessantes Thema vorgeschlagen, ermöglicht haben es zu bearbeiten und in der Durchführung geholfen haben

Vielen Dank an das Team der Hochschule Neubrandenburg für ihre Hilfe trotz der ganzen Probleme durch Corona. Insbesondere an Frau Kulik, Frau Winkler und der Arbeitsgruppe um Fabien Schulze.

Als letztes möchte ich mich bei Johannes Lippmann und Kiana Zebarjadi für ihre Hilfe bedanken. Ohne sie wäre es nicht möglich gewesen die Arbeit durchzuführen in den Rahmen, wie wir es geschafft haben.

Einheitenverzeichnis

h	Zeit	Stunde
min		Minute
°C	Temperatur	Grad Celsius
KbE/g	Keimbela<stung	Koloniebildende Einheiten je Gramm
ml	Volumen	Milliliter
g	Masse	Gramm
kg		Kilogramm
nm	Wellenl&aeuml;nge	Nanometer
g/l	Konzentrationsangabe	Gramm je Liter
%		Prozent
Mol/l		Mol je L
Cm ²	Oberfl&aeuml;che	Quadratzentimeter
pH-Wert		

Abkürzungsvverzeichnis

BfR	Bundesinstitut für Risikoberwertung
RKI	Robert Koch Institut
Laves	Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
EFSA	Europ&aeuml;ische Behürde für Lebensmittelsicherheit
NA	Nicht Auszælbar

Inhalt

1.	Einleitung	7
2.	Listerien.....	8
2.1	Allgemein.....	8
2.2	Listeriose.....	8
2.3	Listerien in der Praxis	10
3.	Phagen	12
3.1	Allgemein.....	12
3.2	Funktionsweise.....	12
3.3	Der Listeria Phage P100.....	13
4.	Methodik	14
4.1	Allgemein.....	14
4.2.	Vorversuch Fähigkeit der Phagen in saurer Umgebung Bakterien abzutöten	15
4.2.1	Aufgabenstellung	15
4.2.2	Materialien und Chemikalien.....	16
4.2.3	Methoden Bestimmung der Bakterienkonzentration mithilfe der optischen Dichte..	16
4.3 1	Hauptversuch Schweinehackfleisch.....	17
4.3.1	Aufbau und Durchführung	17
4.3.2	Materialien und Chemikalien.....	18
4.3.3	Nachweis der Bakterien	19
4.4 2.	Hauptversuch Schweine-Minutensteaks	22
4.4.1	Aufbau.....	22
4.4.3	Isolierung der Bakterien.....	23
5.	Ergebnisse, Auswertung und Diskussion.....	24
5.1	Vorversuch Einfluss des pH-Wertes auf die verwendeten Listerien und Phagen.....	24
5.2	Physikalische Messwerte beim Fleisch.....	25
5.3	1. Hauptversuch Hackfleisch	26
5.3.1	Ergebnisse	26

5.3.2	Auswertung Hauptversuch 1	27
5.4 2.	Hauptversuch Stückfleisch.....	30
5.4.1	Ergebnisse	30
5.4.2	Auswertung Hauptversuch 2	32
5.5	Diskussion.....	34
6.	Ausblick	37
7.	Zusammenfassung.....	38
8.	Quellen	39
9.	Abbildungsverzeichnis	42
10.	Tabellenverzeichnis.....	43
	Anhang	44

Abstract

Listeria is one of the most common bacteria which could be spread with the food supply chain. Meat and meat products have an especially high risk for listeria. One possible solution to fight against them are bacteriophages. Bacteriophages are small microorganisms that are capable to attack and kill bacteria.

To evaluate a potential use in the meat industry we contaminated ground(grinded) porkchop and steaks with a culture of *Listeria innocua* and incubated them for 24 h at 6°-8°C. After the 24 h we used Palcam agar to gain the number of Listeria in the probe and added some contaminated probes to the phage culture P100 Listex from Mircros Food System and incubated them again for 24 h at 6°-8°C. After that the probes were tested with Palcam agar again for Listeria to compare the grades of contaminations.

We were able to reduce the number of Listeria with phages by four-tenth in groundmeat and in the steaks.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren gab es in der Fleisch- und fleischverarbeitenden Industrie Deutschlands einige Skandale mit großflächigen Lebensmittelrückrufen, die im Zusammenhang mit dem Bakterium *Listeria Monocytogenes* stehen. Einer der folgenreichsten betraf den Fleischverarbeiter Wilke aus Twistetal in Hessen im vergangenen Jahr. Infolge eines Listerienausbruchs bei Wilke-Produkten gab es nach Presseberichten mindestens 37 Krankheitsfälle und sogar drei Tote. (Spiegel, 2019) Listerien sind eine weltweite Bedrohung. In den USA berichtete die CDC(2020) allein für das Jahr 2018 4 Ausbrüche mit insgesamt 43 bekannten Erkrankten und davon sind 4 verstorben. Darum ist die Suche nach einer Möglichkeit die Gefahr von Listerien zu senken einer großer potentieller Markt.

Eine Möglichkeit, um eine Listerienkontamination in Lebensmitteln zu bekämpfen, wäre der Einsatz von Bakteriophagen. Bakteriophagen können speziell Bakterien abtöten. Während in Ländern wie den USA, Kanada, Australien, Neuseeland und Schweiz der Einsatz von Phagen in der Lebensmittelherstellung bereits üblich ist, ist dieser in der EU umstritten. Der EU-Kommission liegt seit Jahren ein Antrag zur Genehmigung eines Präparates zur Bekämpfung von Listerien in Lebensmitteln und Produktionsanlagen vor. Bisher wurde nicht über ihn entschieden und die Rechtssituation ist immer noch unklar.(Presseportal, 2019)(Horn, 2019)

Für Wurstwaren ist die Abnahme und mögliche praktischer Einsatz bereits beschrieben und veröffentlicht worden.(Microos, 2016) Es ist davon auszugehen, dass wenn es bereits Verfahren für direkt Hackfleisch oder Stückware gibt, sie noch nicht publiziert worden sind, um ein Wettbewerbsvorteil zu erhalten.

Um die Möglichkeiten für den Einsatz in Hackfleisch- und Stückfleischproduktion zu evaluieren, wird in der ersten Phase die pH-Toleranz der Phage untersucht. In der zweiten Phase wird dann mit Listerien kontaminiertes Fleisch mit einem ,für Listerien spezifischen, Phagenlysat behandelt und die Keimbelastung überwacht.

2. Listerien

2.1 Allgemein

Listerien ist der deutsche Ausdruck für die Bakterien die unter den wissenschaftlichen Namen *Listeria* firmieren. Listerien sind grampositive Kokken, die keine Sporen bilden können. Sie kommen in der Natur vor und können eine Krankheit namens Listeriose verursachen. Diese tritt nicht nur bei Menschen, sondern auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren, wie Schafen oder Rindern, auf. Das Bakterium ist aufgrund seiner Eigenschaft, für Lebensmittel extreme Bedingungen zu überleben, sehr gefährlich. Der Keim ist nämlich beispielsweise in der Lage, bei Temperaturen, die im Kühlschrank auftreten, zu überleben und sich sogar zu vermehren. (Krämer, 2011)

Allerdings liegt die Gefahr nicht nur in der Eigenschaft, dass *Listeria* in extremen Bedingungen überleben können, sondern auch darin, dass sie keine Anzeichen für Verderb entwickeln. Somit lassen sich kontaminierte Proben von unbedenklichen Proben nicht anhand der Sensorik unterscheiden. (BfR, 2017)

2.2 Listeriose

Listeriose stellt für Menschen mit einem gut funktionierenden Immunsystem keine größere Gefahr dar. Für Altersgruppen, die bereits ein geschwächtes oder noch kein ausgebildetes Immunsystem sind diese jedoch eine große Gefahr. Leider gibt es keine genau bekannte Infektionsdosis für den Menschen. (RKI, 2010) Aber man geht als benötigte Dosis zum Ausbruch von um die 10 000 Bakterien aus. (Krämer, 2011)

Von *Listeria* sind mehr als sechs Spezies bekannt. Für die meisten pathogenen Ausbrüche ist *Listeria Monocytogenes* verantwortlich. Davon sind 13 Serovare bekannt. Ein Großteil der Ausbrüche wird durch die Serovare I/2A und I/2B verursacht. Neben *Listeria Monocytogenes* können auch unter anderem *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* zu Krankheitsausbrüchen führen. Erwiesenermaßen gehören *Listeria innocua* und *Listeria grayi* zu den für Menschen ungefährlichen Bakterien. (Krämer, 2011)

Der Mensch nimmt die Listerien klassischerweise über den Magen/Darm auf, aber auch Aufnahmen durch die Haut sind möglich. Ein Großteil der Bakterien wird durch die Magensäure abgetötet. Die Bakterien bilden verschiedene Virulenzfaktoren aus. Mithilfe dieser ist das Bakterium in der Lage sich in Großteil aller Körperzellen zu internalisieren, eine Vakuole bilden und sich vervielfachen. Die Infektion ist in der Lage sich von Zelle zu Zelle

sich auszubreiten oder extrazellulär. Normalerweise würde die Immunabwehr das Bakterium angreifen und abtöten, aber die Listerien besitzen mehrere Abwehrmechanismen, die diese Reaktion verhindern.

Einer der Wege mit die Listerien die Immunabwehr erschweren sind von Listeria spezifisch gebildete Enzyme, sogenanntes Listeriolysine, die diese Reaktion verhindern. Diese Enzyme beschädigen die Vakuole und dadurch können sich die Bakterien in der Zelle vermehren. Die andere Strategie die Listerien verfolgt basiert auf die Anlagerung der Bakterien innerhalb der Wirtszellen. Dadurch können keine Antikörper die Bakterien angreifen. Klassischerweise erfolgt die Immunabwehr aufgrund der Eigenschaften von Listeria durch T-Zellen. Wenn die Listeria in das lymphatische System und den Blutkreislauf gelangen, können sie den ganzen Körper befallen. Sie können eine Sepsis oder eine Meningitis verursachen(Krämer, 2011)

Listeriose zählt in Deutschland zu den meldepflichtigen Krankheiten. Dem Robert Koch-Institut sind im Jahr 2018 701 Listeriose-Fälle gemeldet worden. In der demographischen Verteilung tritt der überwiegende Teil der Fälle bei Neugeborenen und Menschen im Alter von über 70 Jahren auf. Nach Geschlechtern betrachtet, sind Männer, im speziellen ältere, stärker gefährdet. (RKI, 2019)

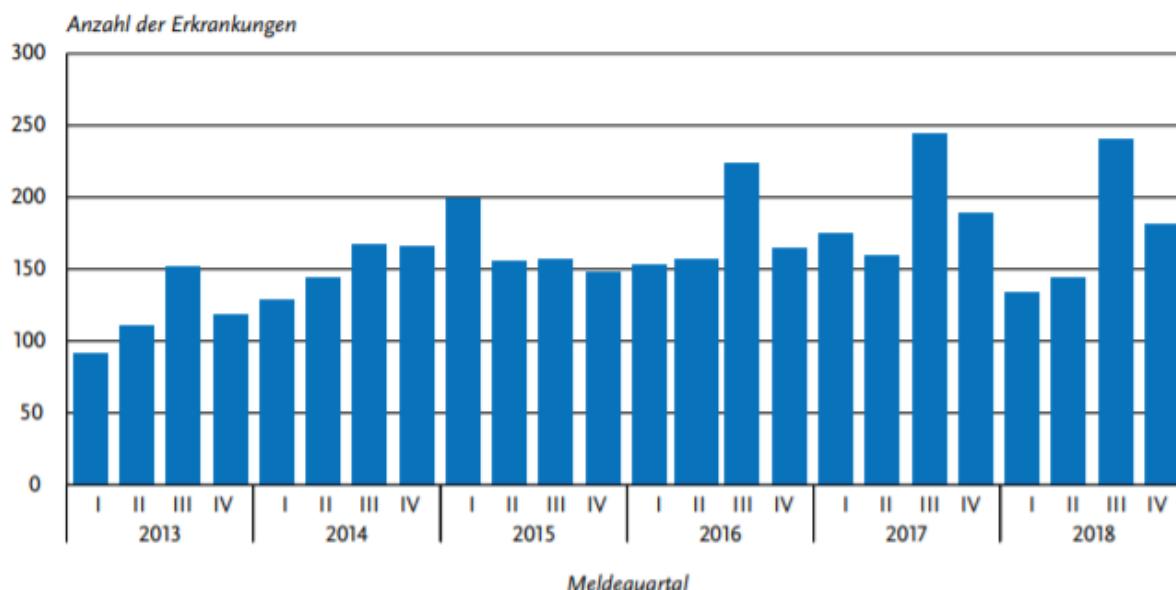


Abbildung 1: Entwicklung der Listeriose-Fälle in Deutschland (Quelle: RKI, 2019)

2.3 Listerien in der Praxis

Listerien können in vielen verschiedenen Lebensmittel auftreten. Allerdings sind tierische Produkte besonders stark betroffen

Tabelle: Eine Auswahl betroffene Produkte (CDC, 2020), (Laves, 2020)

Fleisch- und Fischprodukte	Milch und Milchprodukte	Pflanzliche Lebensmittel
- Rohes Fleisch	- Rohmilch	- Fertigsalat
- Rohwurst	- Frischkäse	- Tiefgefrorenes Gemüse
- Wurstaufschnitt	- Weichkäse	- Pilze

Die Grenzwerte für *Listeria Monocytogenes* sind in der EU nach der Verordnung 2073/2005 definiert worden. In dieser Verordnung werden die Grenzwerte nach verschiedenen Produktkategorien und zu verschiedenen Zeitpunkten festgelegt.

Fleisch ist ein verderbliches Produkt. Nach dem Anhang Kapitel 1 Absatz 1.2 dürfen während der Produktion keine Listeria in 25 g Produkt nachgewiesen werden. Während der gesamten Haltbarkeit darf die *Listeria-Monocytogenes*-Konzentration maximal 100 KbE/Gramm betragen. (EU, 2005)

Laut EFSA wurden 2018 in der EU in 1,8 % aller untersuchten Proben von Ready to eat Produkten aus Fleisch Listerien nachgewiesen. Es wurden über 22 500 Proben untersucht. Prozentual konnten in Fisch und Fischprodukten mit 6 % bei über 6 700 untersuchten Proben die höchsten Kontaminationslevel nachgewiesen werden. (EFSA, 2018)

Um Listerien in Fleisch und Fleischprodukten zu unterdrücken, gibt es mehrere Möglichkeiten. Eine Möglichkeit ist die Milchsäuregärung. Dabei wird durch die entstehende Milchsäure die Vermehrung von Listerien signifikant verlangsamt. Eine weitere Möglichkeit ist die Reifung von Fleischwaren. Diese hindert Listerien aber nur dann am Wachstum, wenn sie fachgerecht durchgeführt wird. Eine gängige Methode ist auch die thermische Behandlung. In der Praxis hat sich eine thermische Behandlung bei 60° C für 6-8 min als ausreichend erwiesen. (Branscheid et al, 1998) Allerdings ist eine thermische Behandlung auch nicht möglich bei allen Produkten, beispielsweise Rohwürsten, wie Salami. Aber diese Methoden sind nicht immer möglich. Darum sollte man so viel wie möglich unternehmen, um eine Kontamination zu verhindern.

Listerien haben in der Fleischindustrie mehrere mögliche Kontaminationsursachen und -ketten. Die gängigsten Quellen sind unsachgemäß gereinigte Arbeitsflächen und Geräte, Umwelteinflüsse sowie die Angestellten. In der Produktion gibt es viele mögliche Kontaminationsketten, beispielweise Arbeitstische zum Zerlegen, Geräte, wie Fleischwölfe oder Schneidemaschinen.

Aber sogar eine thermische Behandlung ist kein Garant für eine vollständige Abtötung von Listerien, denn es müssen die Critical Control Points eingehalten werden und diese sind in solchen Fällen die Kerntemperatur im Produkt und die Haltezeit. Auch nach der Herstellung muss die Hygiene während der Verpackung eingehalten werden. Auch nach der Herstellung muss die Hygiene während der Verpackung und Transport eingehalten werden.

Allerdings reicht eine Hygiene, die nur die Arbeitsflächen und Geräte betrifft, nicht aus. Es muss auch der sonstige Hygienestatus im Betrieb stimmen, denn in Abflüssen oder sogar in der Reinigungsaurüstung können sich Listerien festsetzen und überleben. Darum muss eine gründliche und regelmäßige Reinigung in den Betrieben Standard sein. (Penn State University, 2016)

3. Phagen

3.1 Allgemein

Bakteriophagen gehören zu den am häufigsten vorkommenden Mikroorganismen auf der Erde. Sie sind in der Lage, Bakterien zu infizieren und sie abzutöten. Phagen können sich allein nicht bewegen, sondern sind von Strömungen abhängig, die sie zu Trägerzellen bringen, damit sie diese infizieren können. Einer ihrer Hauptvorteile ist ihre stark ausgeprägte Selektivität an Wirtsorganismen, die sie angreifen und abtöten.

Das bedeutet, sie können gezielt eingesetzt werden, um potenziell schädliche Keime gezielt abzutöten, ohne die sonstige Fauna im Produkt irreparabel zu schädigen, wie bei einer thermischen Behandlung. Sie sind nämlich auch nicht besonders temperaturabhängig bei der Inkubation. (Heller et al, 2011)

3.2 Funktionsweise

Wenn ein Phage auf einen passenden Mikroorganismus trifft, versucht er sich als erstes an die Zellmembran zu heften. Sobald er dies geschafft hat, beginnt er sich durch die Zellmembran zu bohren und seine DNS in das Bakterium zu injizieren.

Durch die Injektion der DNS wird das Bakterium angeregt, Phagen-Bestandteile zu synthetisieren. Innerhalb der Zelle werden die Phagen fertig zusammengesetzt.

Sobald innerhalb der Zelle die Phagenkonzentration zu hoch ist, beginnt die Phagenlyse. Eine gängige Methode dafür ist das Zerstören der Zellmembran durch Enzyme. Durch das Zerstören der Zellmembran verliert die Zelle ihren Turgor und ist abgetötet. Die neu gebildeten Phagen werden dann durch die Strömungen verteilt. Wenn sie auf neue Bakterien treffen, die sie infizieren können, beginnt der Kreislauf von vorne. (Heller et al, 2011)

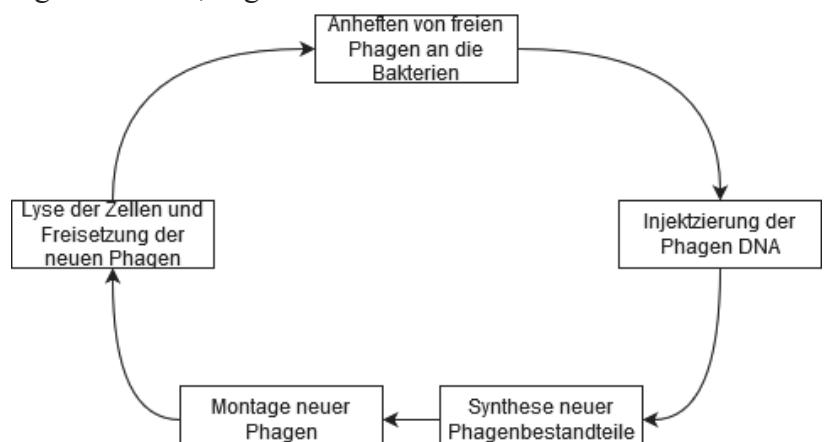


Abbildung 2: Lebenszyklus einer Phage

3.3 Der Listeria Phage P100

In dieser Arbeit wird der Phage P100 verwendet. Er wird von der niederländischen Firma Microeos unter dem Namen Phageguard Listex vermarktet (siehe Abbildung 1). Sie wird in einer Lösung geliefert, die man direkt einsetzen kann. Sie muss dunkel und kühl gelagert werden.

Der Phage P100 kann Listerien abtöten. Er kann einen Großteil aller bekannten Serovare von *Listeria Monocytogenes* abtöten. (Microeos, 2020)

Der Phage P100 hat von der Federal Drug Administration (FDA) der USA den GRAS Status. GRAS steht für Generally Recognized As Safe und ist ohne Einschränkungen in der Lebensmittelindustrie benutzbar. (Heller et al, 2011)

In Europa ist die rechtliche Lage noch nicht klar definiert. Es gibt ein Gerichtsurteil des Europäischen Gerichtshof, worauf man sich berufen kann, wenn man es benutzen will, was den Einsatz erlaubt. Die Europäische Kommission ist vom Parlament Food System angehalten worden, eine entsprechende Verordnung zum Umgang mit Phagen zu erstellen, um einen klaren Rahmen zum Einsatz zu definieren. (Presseportal, 2019)

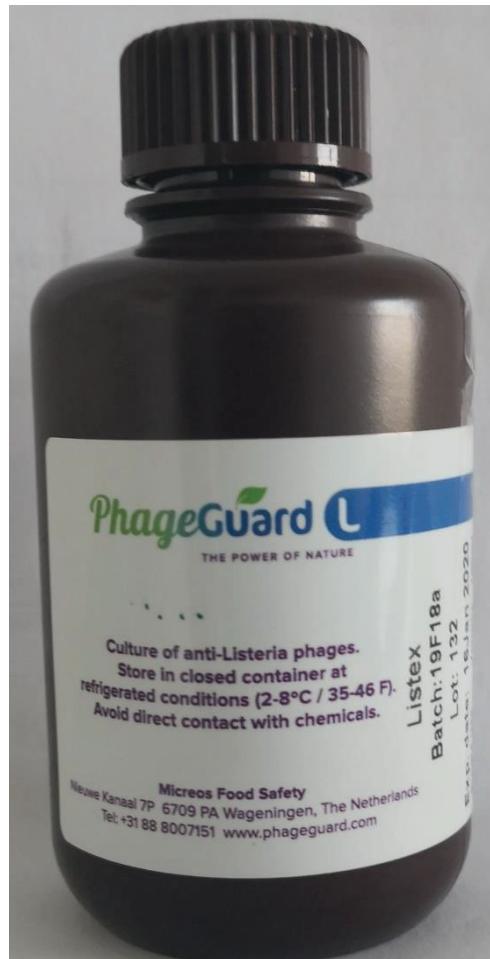


Abbildung 3: Das verwendete Phagenpräparat P100 von Microeos

4. Methodik

4.1 Allgemein

In dieser Arbeit wird als erstes untersucht, ob die Phagen auch in einer sauren Umgebung Listerien abtöten können. Dieser Schritt ist wichtig, da Fleisch einen leicht sauren pH-Wert hat. (Branscheid et al, 1998)

Danach wird überprüft, ob die Phagen in der Lage sind, die Bakterien in Fleisch und Fleischprodukten abzutöten. Dafür wird ein Teil der Proben mit *Listeria Innocua* beimpft und inkubiert. Nach einer definierten Zeit wird die Listerienkonzentration in den Proben ermittelt und das Phagenlysat zu der Hälfte der beimpften Proben gegeben. Danach werden die Proben erneut für eine bestimmte Zeit inkubiert und die Bakterienkonzentration ermittelt.

4.2. Vorversuch Fähigkeit der Phagen in saurer Umgebung Bakterien abzutöten

4.2.1 Aufgabenstellung

Listerien sind unter anderem so gefährlich, weil sie sich auch unter sauren Bedingungen vermehren können. Darum ist es wichtig zu überprüfen, wie sich die verwendeten Listerien und Listex gegenüber einem sauren pH-Wert verhalten.

Um das zu überprüfen, wird autoklavierte Caso Bouillon verwendet. Der gemessene pH-Wert der ursprünglichen Caso Bouillon beträgt 6,9. Ein Teil dieser Caso Bouillon wird mit 2 mol/l Salzsäure und Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von fünf eingestellt. Jeweils 100 ml der angesäuerten Caso Bouillon und der ursprünglichen Caso Bouillon werden in jeweils zwei Erlenmeyerkolben überführt. Danach werden alle vier mit Listerien beimpft und zur Durchmischung in einen temperierten Schüttler gestellt, damit sich die Bakterien nicht am Gefäßboden absetzen können. Die Temperatur ist auf 30°C eingestellt gewesen. Die Zunahme an Listerien in der Caso Bouillon wird alle 30 min über ein Photometer bei einer definierten Wellenlänge bestimmt. Sobald die optische Dichte stark zugenommen hat und die Grenze von 0,3 überschritten hat, wird jeweils 1 ml Phagenlysat in einen der beiden Erlenmeyerkolben, bei dem entsprechenden pH-Wert, gegeben.

Anschließend wird die Entwicklung der optischen Dichte der reinen Listerienkultur und der mit Phagen kontaminierten Kultur verglichen. Daraus kann man dann schließen, ob die Phagen einen Einfluss auf die Vermehrung der Listerien haben.

Daneben wird jeweils das erhaltene Ergebnis für die ursprüngliche Bouillon mit der angesäuerten Bouillon verglichen und man kann feststellen, wie sich der veränderte pH-Wert auf die Listerien und Phagen auswirkt.

4.2.2 Materialien und Chemikalien

Das sind nur die Materialien für den Vorversuch

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Ort
Caso Bouillon Pulver	Carl-Roth	Karlsruhe
Entionisiertes Wasser		
Kaliumhydroxid		
Salzsäure		

Tabelle 2: Materialien

Geräte	Hersteller	Ort
Autoklav	SIP Steriltechnik	Detzel, Schloss
Küvetten	Carl-Roth	Karlsruhe
Laborgefäße		
Laborrüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Mikropipetten	Eppendorf	Hamburg
Photometer	Thermospectronic	Waltham, USA
Pipettenspitzen		
Waagen	Sartorius Practus	Göttingen

4.2.3 Methoden Bestimmung der Bakterienkonzentration mithilfe der optischen Dichte

Neben den Methoden, die Bakterienkonzentration über Platten zu bestimmen, was sehr zeitaufwändig ist, kann man die Entwicklung der Konzentration von Mikroorganismen auch mithilfe der optischen Dichte überwachen.

Die Ermittlung der optischen Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge ermöglicht es, Rückschlüsse auf die Konzentration in einer Lösung zu ziehen. In dieser Arbeit werden die Proben bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen. (Matissek, 1992)

4.3 1. Hauptversuch Schweinehackfleisch

4.3.1 Aufbau und Durchführung

Das Hackfleisch muss dafür als erstes mit Listerien kontaminiert werden. Dafür wird Caso Bouillon mit Listerien angesetzt. Nach 20 h werden drei Proben mit jeweils 100 g im Einzelhandel gekauften und unter Schutzatmosphäre verpackten, Schweinehackfleisch, eingewogen und in sterilen Probenbeuteln im Kühlraum gelagert. Die Temperatur im Kühlraum beträgt 6° C.

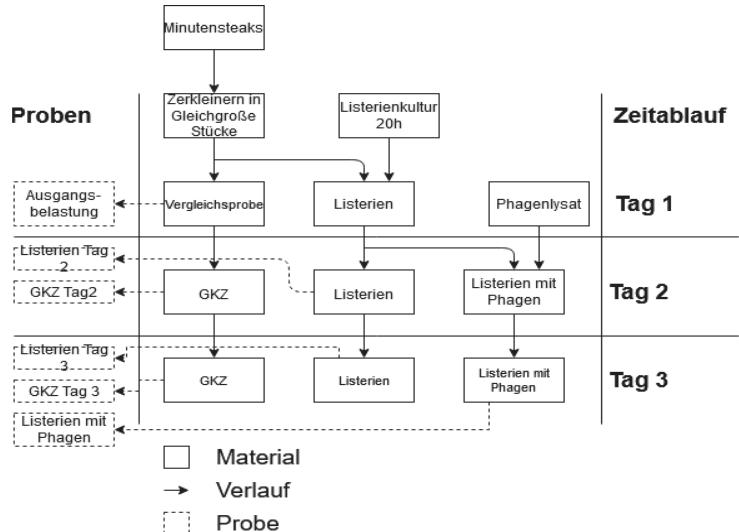


Abbildung 4: Versuchslayout Hackfleisch

Aus einer der Proben wird eine 10 g schwere homogene Stichprobe genommen, die Bakterien werden isoliert und mit Caso Agar auf die Gesamtkeimzahl und mit Palcam Agar auf Listerien hin untersucht.

Danach werden die zwei anderen Proben mit jeweils 20 ml der Listerienvorkultur kontaminiert. Diese werden dann für 24 h in derselben Kühlkammer inkubiert.

Nach den 24 h werden erneut aus der nichtkontaminierten Probe eine 10 g-Stichprobe entnommen, die Bakterien isoliert und die Gesamtkeimzahl ermittelt. Aus einer der zwei kontaminierten Proben wird eine 10 g schwere Stichprobe genommen, die Bakterien isoliert und die Listerienanzahl ermittelt. Zu einer der beiden kontaminierten Proben werden 8 ml des Phagenlysat zugesetzt, danach wird dies homogen in der Probe verteilt und alle Proben werden wieder für 24 h inkubiert.

Nachdem 24 h vergangen sind, werden wieder 10 g schwere homogene Stichproben aus den inkubierten Proben entnommen, die Bakterien isoliert und auf die Bakterienanzahl untersucht. Die nichtkontaminierte Probe wird auf die Gesamtkeimzahl und die mit Listerien kontaminierten Proben werden auf die Listerienanzahl untersucht.

Zur Schnellbestimmung der Bakterienanzahl wird erneut die optische Dichte genutzt. Außerdem wird jeweils auch Extrakt in Eppendorfgefäß tiefgefroren und gelagert.

4.3.2 Materialien und Chemikalien

Diese Leben Materialien werden auch im Hauptversuch 2 verwendet.

Chemikalien	Hersteller	Ort
Caso Bouillon Pulver	Carl-Roth	Karlsruhe
Caso Agar	Carl-Roth	Karlsruhe
Ethanol		
Entionisiertes Wasser		
Kochsalz	Carl-Roth	Karlsruhe
Palcam Agar	Carl-Roth	Karlsruhe
Palcam Agar Supplement	Carl-Roth	Karlsruhe

Geräte	Hersteller	Ort
Autoklav	Steriltechnik AG	Detzel Schloss
Brenner und Streichhölzer		
Brutschränke	Heraeus Instruments	Hanau
Drigalskispatel		
Koloniezählgerät	Schütt Labortechnik	Göttingen
Kühlraum	GÜNTHER KÄLTETECHNIK GMBH	Plüderhausen
Küvetten	Carl-Roth	Karlsruhe
Laborrüttler	Heidolph Instruments Gmbh	Schwabach
Laborgefäße		
Mikropipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen		
Photometer	Thermospectronic	Waltham, USA
pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte	Berlin
Stomacher+Beutel	Kleinfeld Labortechnik	Gehrden
Sterile Einwegpetrischalen		
Labortrichter		
Waage	Sartorius Practus	Göttingen
Wasserbad	GFL	Burgwedel
Vortexmixer	Heidolph Instruments Gmbh	Schwabach

4.3.3 Nachweis der Bakterien

4.3.3.1 Isolierung der Bakterien

Zur Reisolierung der Bakterien werden die Proben in Stomacherbeutel gegeben, diese in 90 ml steriler 0,85%iger Kochsalzlösung gelöst und mithilfe eines Stomachers für 1 min homogenisiert.

Nach dem Homogenisieren der Proben werden diese in sterile Erlenmeyerkolben überführt und mit dem Rütteltisch bei 120 Umdrehungen je Minute für 30 min durchmischt. Nach den 30 Minuten ist es allerdings nicht möglich, eine Probe aus der Lösung zu ziehen, da Fett und Fleischpartikel die Pipettenspitzen sofort verstopfen. Um das zu verhindern, muss das Extrakt für 20 Minuten stehen, damit sich die großen Partikel absetzen. Dann werden daraus die Proben für die Verdünnungsreihen bei der Keimzahl und die Bestimmung der optischen Dichte genommen.

4.3.3.2 Aerobe Gesamtkeimzahlbestimmung mit Caso Agar

Zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl werden selbst gegossene Caso Agar Platten verwendet. Für den Caso Agar wird das Caso Pulver in entionisiertem Wasser gelöst und danach autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird der Caso Agar im Wasserbad auf 50° C erhitzt und auf die sterilen Einwegpetrischalen gegossen. Die Platten kühlen bei Raumtemperatur ab und das Kondenswasser wird abgeschüttelt. Danach werden die Platten bis zur Verwendung im Kühllraum gelagert, um die Absorption auf den Agar zu verbessern, für mindestens 48 h. Aus den vorher homogenisierten Verdünnungsreihen werden dann jeweils 0,1 ml auf die Platten gegeben. Zur Verteilung der Verdünnungsreihen werden ein steriler Drigalskispatel und ein Rotationstisch verwendet. Für die Sterilisation wird der Drigalskispatel in Ethanol getränkt und dann mit einem Bunsenbrenner abgeflammt. Zur Verteilung wird die Platte mit dem Rotationstisch in Rotation versetzt und durch gleichmäßige Bewegung des Drigalskispatel wird die Verdünnung auf der Platte gleichmäßig verteilt. Danach werden die Platten bei 30° C für 24 h im Wärmeschrank inkubiert und danach die Kolonien ausgezählt. Mithilfe des gewichteten Mittelwerts wird dann anhand der Kolonieanzahl die Belastung errechnet.

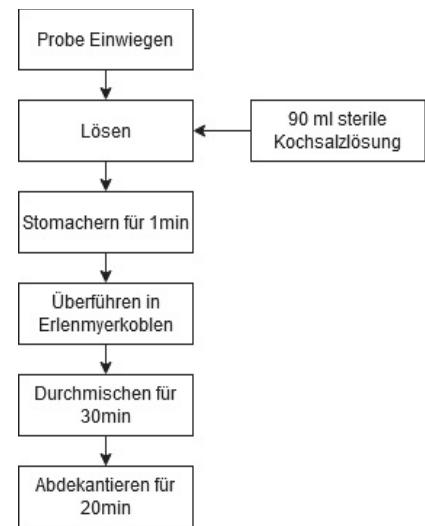


Abbildung 5: Bakterienisolierung

4.3.3.3 Bestimmung von Listerien mit Palcam Agar

Um Listerien von anderen Keimen zu unterscheiden, wird Palcam-Selektiv Agar verwendet. Er unterdrückt viele Bakterien und die Listerien entwickeln darauf eine charakteristische Graufärbung, mit schwarzem Hof auf der normalerweisen roten Platte.

Der Agar besteht aus zwei Teilen. Als erstes wird mit entionisiertem Wasser Palcam Agar Basis gelöst. Danach werden die Agar Basis und weiteres entionisiertes Wasser autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wird mit autoklaviertem entionisiertem Wasser das lyophilisierte Palcam Supplement gelöst und dem Agar zugesetzt. Die Lösung wird gut per Hand geschüttelt, damit sich das Supplement gleichmäßig löst. Danach wird der Agar mittels Wasserbad auf 50° C erwärmt. Anschließend wird der Agar in sterile

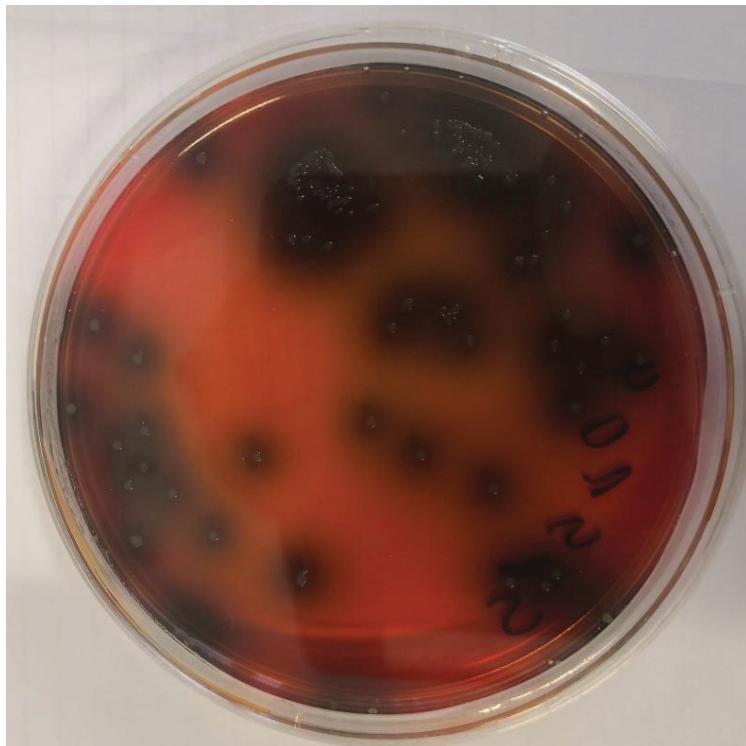


Abbildung 6: Listerien auf Palcam Agar. Man kann sehr gut die silbernen Kolonien mit den schwarzen Höfen erkennen.

Petrischalen gegossen und gewartet, bis er sich verfestigt hat. Nun werden die Proben bis zur Benutzung im Kühlraum gelagert, damit die Platten besser in der Lage sind die Flüssigkeiten zu absorbieren, für mindestens 48 h. Danach wird auf den Proben genauso wie bei der Gesamtkeimzahl eine Verdünnung auf den Platten ausgestrichen. Die Platten werden bei 30° C für 48 Stunden inkubiert. Die grauen Kolonien mit den schwarzen Vorhöfen werden ausgezählt und mit dem gewichteten Mittelwert wird die Belastung ausgerechnet.

Der fertige Agar enthält Lithiumchlorid, Acriflavin-HCl, Ceftazidim und Polymyxin-B-Sulfat. Diese Verbindungen sind in der Lage, ein Großteil der Listerien am Wachstum zu hemmen, womit diese dann nicht in der Lage sind, Kolonien auf dem Agar zu bilden. Der Farbumschlag wird durch das enthaltene Äskulin verursacht. Diese Verbindung kann durch Listerien abgebaut werden. Das Abbauprodukt reagiert mit den enthaltenen Eisenionen zu der charakteristischen Schwarzfärbung. Die sonstigen Bakterien, die nicht gehemmt werden, sind in der Lage Mannit zu verstoffwechseln und das sorgt für eine pH-Änderung im Agar, welcher durch den Indikator Phenolrot angezeigt wird. (BD, 2003)

4.4 2. Hauptversuch Schweine-Minutensteaks

4.4.1 Aufbau

Die Minutensteaks werden in annähernd gleich große Stücke geschnitten. Um eine Listerienbelastung in den Minutensteaks zu simulieren, wird zu einem Teil der Proben 5 ml einer 20 h-*Listeria-Innocua*- Kultur zugesetzt, die in Caso Bouillon angesetzt wurde. Die Kultur wird per Hand in die Proben einmassiert, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Die Kultur wächst bei 30° C unter konstanter Durchmischung durch einen Laborrührer. Die anderen Proben werden als Vergleich

zurückgehalten. Am ersten Tag wird die Ausgangsgesamtkeimzahl ermittelt. Die Proben werden auf eine eventuelle Vorbelastung mit Listerien untersucht. Alle Proben werden danach für 24 h im Kühlraum bei 6°C inkubiert.

Nach den 24 h werden die Vergleichsproben auf ihre Gesamtkeimzahl und die mit Listerien kontaminierten Proben auf ihre Listerienkontamination hin untersucht. Zu einem Teil der kontaminierten Proben werden 2 ml des Phagenlysats gegeben, homogen verteilt. Die Proben werden dann erneut für 24 h im Kühlraum inkubiert.

Wenn die Inkubation abgeschlossen ist, werden die Proben mit Listerien und Listerien mit Phagen auf ihre Listerienkontamination untersucht und die Vergleichsproben auf ihre Keimbelaustung.

Ebenfalls wird versucht, das Bakterienwachstum mit der optischen Dichte zu überwachen.

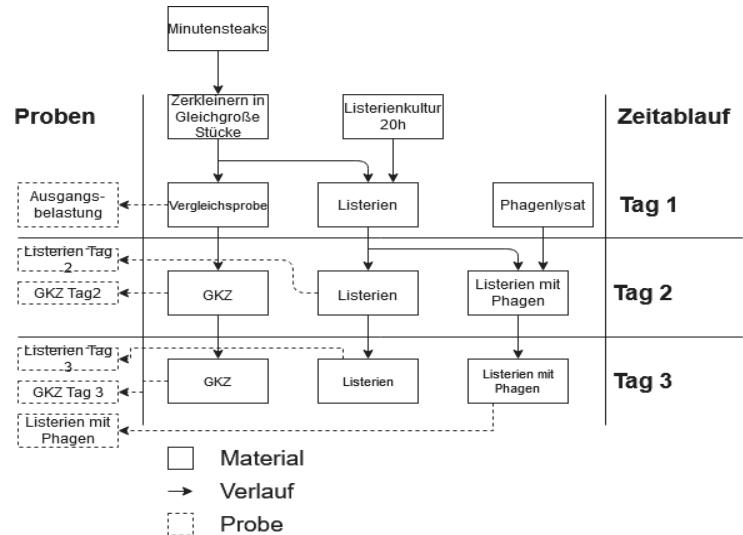


Abbildung 7: Versuchsaufbau 2. Hauptversuch Schweineminutensteaks

4.4.3 Isolierung der Bakterien

Es werden 2 Methoden zur Isolierung der Bakterien evaluiert.

Bei der Methode spülen werden die Proben auf eine sterile Trichterwand gelegt und gleichmäßig mit 10 ml 0,85%iger Kochsalzlösung abgespült.

Der Trichter steht auf einem sterilen Erlenmeyerkolben. Die aufgefangene Spüllösung ist das Bakterienisolat, was für die weiteren Untersuchungen verwendet wird.

Die zweite Methode ist das sogenannte Schneiden. Dabei werden die Proben in sterile Petrischalen überführt, gewogen und mit sterilen Einwegskalpellen klein geschnitten. Im nächsten Schritt werden diese in den Stomacherbeutel überführt, mit 90 ml steriler 0,85%iger Kochsalzlösung aufgefüllt und mit einem Stomacher für 2 min homogenisiert.

Anschließend wird die Probe in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit einem Laborrührer bei 120 Umdrehungen pro Minute für 30 min durchmischt. Danach stehen die Proben für 20 min, damit sich die Fleischpartikel absetzen können, denn sonst würden sie die Pipettenspitzen sofort verstopfen (siehe Abbildung 9). Der erhaltene Überstand ist das Extrakt, das auf den Keimgehalt und die optische Dichte untersucht wird.

Zum Nachweis der Bakterien werden dieselben Materialien wie in Hauptversuch 1 verwendet.

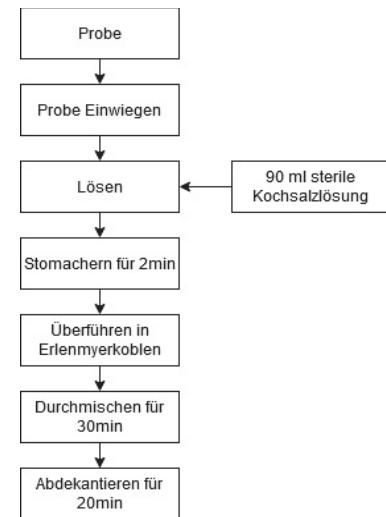


Abbildung 8: Probennahme Schneiden

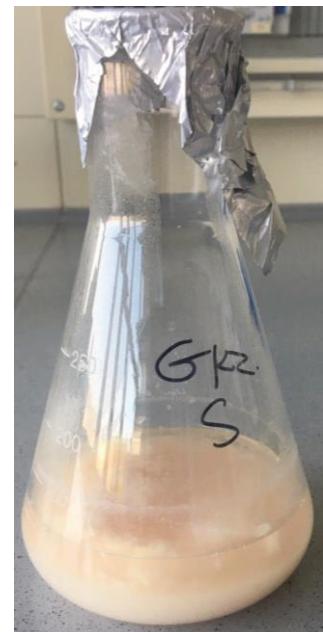


Abbildung 9: Das gewonnene Fleischextrakt beim Schneiden

5. Ergebnisse, Auswertung und Diskussion

5.1 Vorversuch Einfluss des pH-Wertes auf die verwendeten Listerien und Phagen

Im Vorversuch soll die Funktionalität der Phagen in einem sauren pH-Wert untersucht werden. Es ist sehr wichtig, für die späteren Versuche zu garantieren, dass die Phagen und die verwendeten Listerien in einem sauren pH-Wert überleben und sich vermehren können. Der Grund dafür liegt im erwarteten pH-Wert von Fleisch. Dieser

sollte nach der Schlachtung um 5,8 betragen. (Branscheid et al, 2007)

In Abbildung 10 ist gut zu erkennen, dass die Listerien in der Lage sind, sich sowohl im neutralen als auch im sauren Bereich zu vermehren.

Die Bouillon, die nur die Listerienkultur enthält, ist deutlich milchiger im Vergleich zur Kultur, der Phagen zugesetzt wurden (siehe Abbildung 11). Diese Trübung wird durch die vorhandenen Bakterien verursacht. Die Zunahme der Trübung ist auch sehr gut optisch erkennbar während der Aufnahme der optischen Dichte.

Allerdings ist das Wachstum im sauren Bereich sehr viel langsamer. Im direkten Vergleich der beiden pH-Werte ist die Lag-Phase im sauren Bereich an die 150 min und im neutralen Bereich nur um die 60 min lang. Ebenso ist die Verdopplungszeit merklich von annähernd 59 min auf 86 min erhöht.

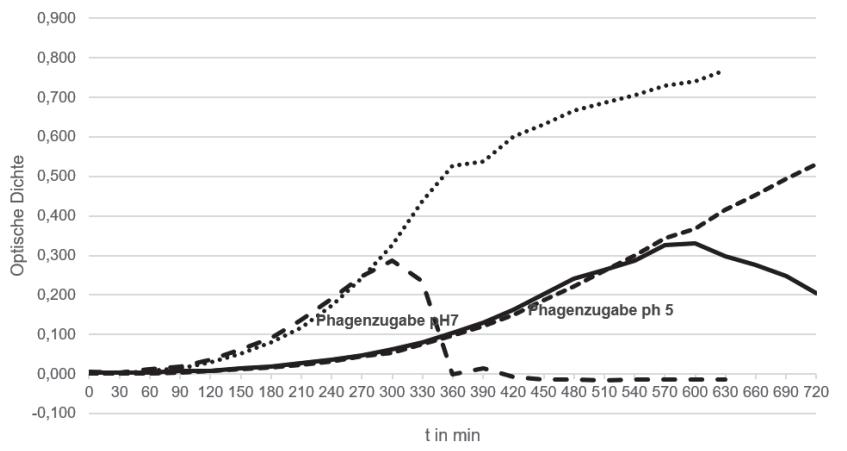


Abbildung 10: Entwicklung der Bakterienkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten



Abbildung 11: Caso Bouillon mit Listerien links und mit Listerien und Phagen rechts

Dass *Listeria Innocua* sich am schnellsten bei einem neutralen pH-Wert vermehrt, deckt sich mit den Erkenntnissen von Lebert et al(1997). Seine Verdopplungszeiten für *Listeria Innocua* und *Listeria Monocytogenes* bei einem neutralen pH-Wert lagen zwischen 12 und 54 min, allerdings hat er ein anderes Nährmedium verwendet und dieses bei 37° C anstelle der 30° C inkubiert. Das sind die wahrscheinlichsten Gründe für die vorliegende längere Verdopplungszeit.

Die mehr als Verdopplung der ermittelten Lag-Phase von 60 min auf 150 min deckt sich auch mit den Beobachtungen von Lebert et al(1997). Er stellte bei seinen Untersuchungen bei 37°C fest, dass sich die durchschnittliche Lag-Phase von 54 min bei einem pH-Wert von 7 auf über 200 min bei einem pH-Wert von 5,6 verlängert. Die Werte für die im Versuch verwendete Kultur liegen allesamt in den Grenzen, die er für die unterschiedlichen Bedingungen ermittelte.

Der pH-Wert beeinflusst allerdings negativ die Effektivität der Phagen und reduziert signifikant die Geschwindigkeit, mit dem sie die Bakterien abtöten. Bei einem neutralen pH-Wert halbierte sich knapp alle 4 min die Bakterienzahl, dagegen halbierte sie sich bei dem sauren pH-Wert nur annähernd alle 3 h. Allerdings sind sie auch bei einem pH-Wert von 5 in der Lage, die Bakterien abzutöten. Dieser pH-Wert ist viel niedriger als die zu erwartenden pH-Werte der Proben und somit sollte unter diesem Gesichtspunkt die Abtötung der Listerien in den Proben möglich sein, allerdings müssten vielleicht die Inkubationszeiten verlängert werden, damit eine Abnahme messbar ist.

5.2 Physikalische Messwerte beim Fleisch

Alle Proben wurden im Lebensmitteleinzelhandel gekauft. Die Proben waren alle unter Schutzatmosphäre verpackt und wurden aus der Kühltheke gekauft. Sie wurden direkt vor dem Versuchen gekauft.

Neben den mikrobiologischen Parametern wurden von den Proben auch der aW- und der pH-Wert aufgenommen.

Tabelle 3: Physikalische Messwerte der Proben

Hersteller	Produkt	Versuch	pH-Wert	aW-Wert	
K-Classic	Schweinehackfleisch	1	5,77	0,986	0,987
K-Classic	Schweineminutensteaks	2	5,82	0,994	0,955

5.3 1. Hauptversuch Hackfleisch

5.3.1 Ergebnisse

Der Isolationsprozess für die einzelnen Proben konnte ohne Probleme durchgeführt werden und das Bakterienisolat gewonnen werden.

Tabelle 4: Entwicklung der Gesamtkeimzahl

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Keimbelastung in KbE/g	$2,1 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$

Tabelle 5: Entwicklung der Listerienkonzentration in den Proben

	Listerien in KbE/g	Listerien mit Phagen in KbE/g
Tag 1	0	
Tag 2	$2,3 \cdot 10^6$	
Tag 3	$5,6 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^3$

Tabelle 6: Entwicklung der optischen Dichte

	Tag 1	Tag 2	Tag 3			
Kochsalz			0,06			
Vergleichsproben	1,051	1,014	0,281	0,418	0,414	0,409
Listerien			0,545	0,547	0,591	0,598
Listerien mit Phagen					0,284	0,229

5.3.2 Auswertung Hauptversuch 1

An Tag 1 wurde in den Proben keine Ausgangslisterienbelastung auf den Platten gefunden. Auch am letzten Tag war bei den nicht kontaminierten Proben keine Listerienbelastung feststellbar. Das geht konform mit der EU-Verordnung 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. In dieser ist festgelegt, dass in Lebensmitteln innerhalb des Verfallszeitraums unter 100 KbE/g *Listeria Monocytogenes* enthalten sein dürfen. Somit ist das Produkt zu diesem Zeitpunkt verkehrsfähig. Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl ergab eine Belastung von $2,2 \cdot 10^4$ KbE/g. Dieser Wert liegt unter dem, den das Hackfleisch am Ende der Produktion maximal haben darf.

Interessanterweise fiel die KbE/g von Tag 1 auf Tag 2 um mehr als eine 10er-Potenz auf $1,4 \cdot 10^3$. Das lässt sich wahrscheinlich auf eine Fremdkontamination auf den Platten zurückführen. Dagegen nahm die aerobe Gesamtkeimzahl von Tag 2 auf 3 auf $3,5 \cdot 10^3$ KbE/g zu.

Durch die Zugabe der Listerienkultur an Tag 1 und der nachfolgenden Inkubation wurde pro Gramm Hackfleisch eine Keimzahl von $3,4 \cdot 10^6$ KbE/g nachgewiesen. Da am ersten und letzten Tag keine Listerien nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass diese Listerien durch die Zugabe der Vorkultur verursacht wurden. Die Listerienkonzentration stieg in den darauffolgenden 24 h auf $4,8 \cdot 10^8$ KbE/g und erhöhte sich somit nochmal um fast zwei Zehnerpotenzen. In den Proben, die an Tag 2 mit dem Phagenlysat behandelt wurden, konnten am dritten Tag $6,7 \cdot 10^4$ KbE/g nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Das entspricht einer Reduktion von fast 2 Zehnerpotenzen. Das bedeutet, dass sich die Keimbelaistung innerhalb von 24 h um 98 % Prozent reduziert hat. Da im selben Zeitraum in den Proben, die nur mit Listerien kontaminiert sind, sich sogar die Listerienbelastung in KbE/g um mehr als eine Zehnerpotenz erhöht hat, lässt sich feststellen, dass die Phagen in der Lage sind, die Listerienkontamination zu bekämpfen und nicht nur zu verlangsamen.

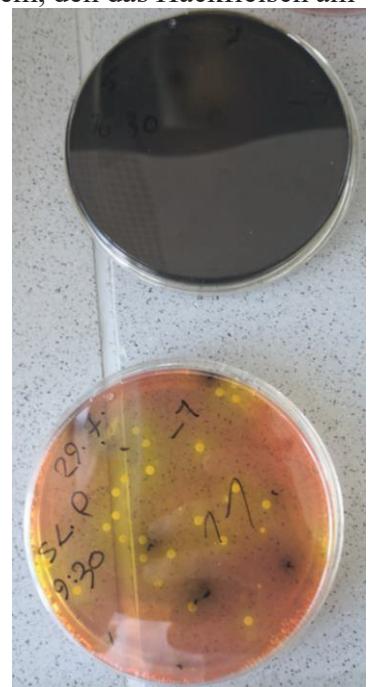


Abbildung 12: Direkter Vergleich zwischen den Proben. Auf der Platte oben sind nur Listerien und unten die Listerien mit Phagen in derselben Verdünnungsstufe. Es lässt sich schon optisch eine deutliche Abnahme der charakteristischen Silbernen Kolonien bei der mit Phagen behandelte probe feststellen.

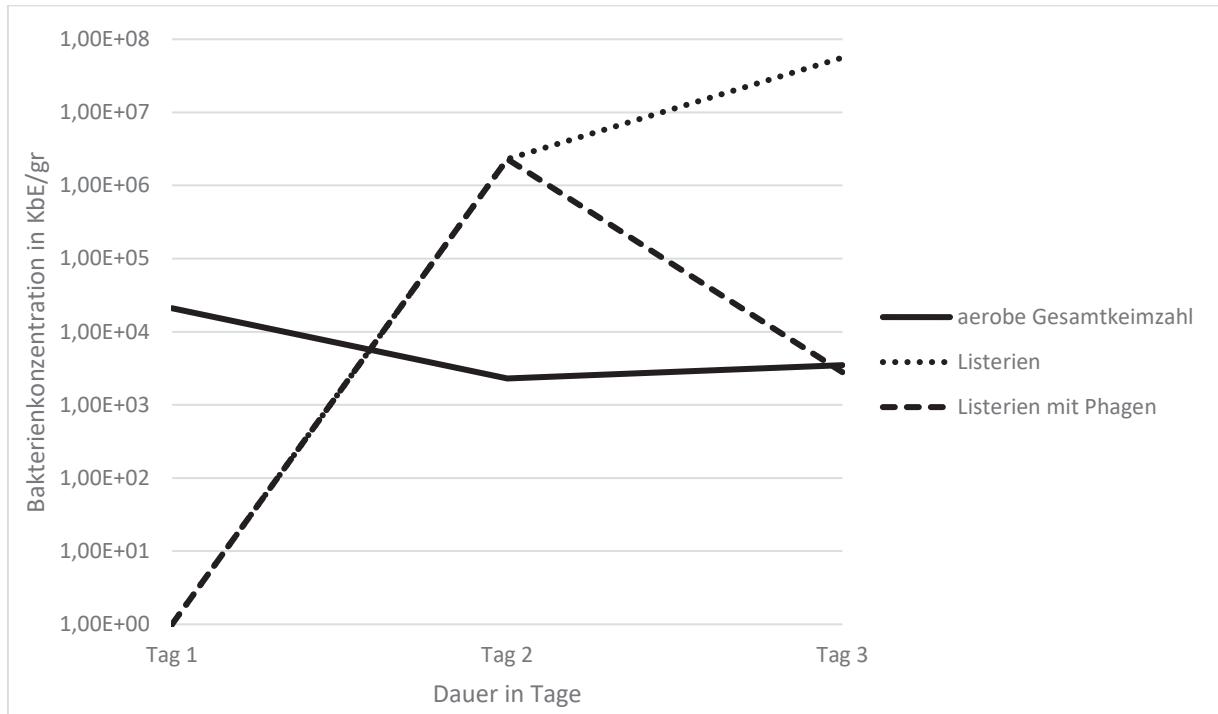


Abbildung 13: Entwicklung der Bakterienkonzentration während des Versuches

An Tag 3 wurden die Proben auch nach einigen sensorischen Merkmalen verglichen: Geruch, Farbe und Konsistenz. Die beiden mit Listerien kontaminierten Proben wiesen einen starken, nicht definierbaren Geruch auf im Vergleich zur nicht kontaminierten Probe. Dieser Geruch entsprach der für die Vorkultur verwendeten Caso Bouillon und lässt sich damit erklären. Ansonsten ließ sich kein sensorischer Unterschied zwischen den verschiedenen Proben erkennen. Aufgrund des kleinen Panels von drei Personen ist das Ergebnis zwar nicht statistisch belegbar und aussagekräftig, aber ein erster Eindruck.

Die vom Rührtisch genommen Proben mussten für 20 Minuten vor der Benutzung absedimentieren. Ansonsten wäre es nicht möglich gewesen, eine Probe aus dem Extrakt zu ziehen, ohne dass sofort die Pipettenspitze verstopft. Allerdings ziehen die Fleischpartikel auch mögliche Bakterien herunter und reduzieren somit die Bakterienanzahl im Bakterienextrakt. Dadurch könnte sich das Ergebnis verfälschen.

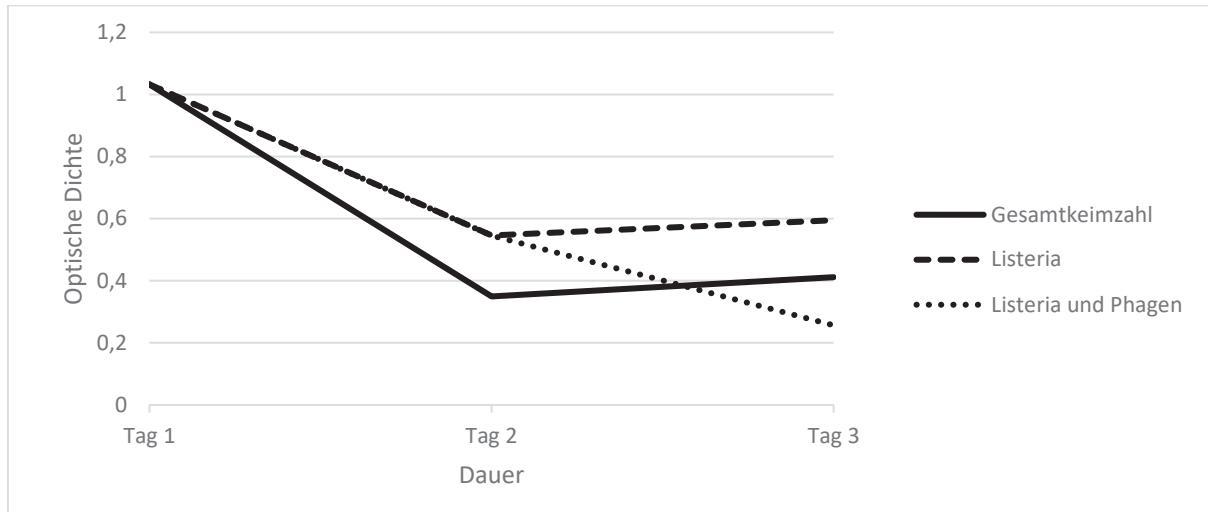


Abbildung 14: Entwicklung optische Dichte bei Hackfleisch

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, ist die optische Dichte des Gesamtkeimzahlextrakts ungewöhnlich stark von Tag 1 auf Tag 2 gefallen. Sie hat sich mehr als halbiert, aber die individuellen Messungen hatten auch eine große Spannweite und schwankten um teilweise +/- 0,2. Die optische Dichte der mit Listerien kontaminierten Proben ist höher als die des Gesamtkeimzahlextrakts. Das entspricht auch den ermittelten Werten an Bakterien, denn allein die Listerienbelastung der Proben die mit Listerien kontaminiert ist um 3 Zehnerpotenzen an KbE/g höher im Vergleich zu der aeroben Gesamtkeimzahl.. Die optische Dichte beim Extrakt der Gesamtkeimzahl ist an Tag 3 leicht gestiegen. Im Vergleich der optischen Dichte der Listerien und der Listerien mit Phagen an Tag 3 ließ sich auch die Abnahme an Listerien nachweisen. Interessanterweise ist die optische Dichte der Proben mit Listerien und Phagen sogar deutlich unter den Wert der optischen Dichte des Gesamtkeimzahlextrakts gefallen.

Bei weiteren Untersuchungen zur optischen Dichte der Fleischproben ist aufgefallen, dass alle Messungen massiven Schwankungen unterliegen und sehr stark von der Probe abhängig sind. Diese Schwankungen werden wahrscheinlich durch Matrixeffekte von Fett, Fasern und Proteinen vom Fleisch verursacht. Darum ist festzuhalten, dass wenn selbst wie in diesem Fall die optische Dichte die Abnahme bestätigt, definitiv keine konstanten Ergebnisse liefert und die Ergebnisse auf den Platten aussagekräftiger sind.

5.4 2. Hauptversuch Stückfleisch

5.4.1 Ergebnisse

Der Isolationsprozess für die einzelnen Proben konnte ohne Probleme durchgeführt werden und das Bakterienisolat gewonnen werden.

Tabelle 7: Entwicklung der Gesamtkeimzahl beim Spülen

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Keimbela ^{stung} in KbE/cm ²	1,5	56	0

Tabelle 8: Entwicklung der Listerien beim Spülen

	Listerien in KbE/cm ²	Listerien mit Phagen in KbE/cm ²
Tag 1	0	
Tag 2	$3,5 \cdot 10^6$	
Tag 3	$7,9 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^1$

Tabelle 9: Entwicklung der optischen Dichte beim Spülen

	Tag 1	Tag 2	Tag 3			
Kochsalz				0,06		
Vergleichsproben	0,056	0,054	0,033	0,038	0,029	0,027
Listerien			0,108	0,071	0,055	0,064
Listerien mit Phagen					0,225	0,229

Tabelle 10: Entwicklung der Gesamtkeimzahl beim Schneiden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Keimbela st tung in KbE/g	$1,6 \cdot 10^3$	0	0

Tabelle 11: Entwicklung der Listerien beim Schneiden

	Listerien in KbE/g	Listerien mit Phagen in KbE/g
Tag 1	0	
Tag 2	$4 \cdot 10^6$	
Tag 3	$3,9 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^3$

Tabelle 12: Entwicklung der optischen Dichte beim Schneiden

	Tag 1	Tag 2	Tag 3		
Kochsalzlösung			0,06		
Vergleichsproben	1,213	1,203	0,747	0,757	0,695
Listerien			0,646	0,86	1,185
Listerien mit Phagen				0,927	1,619

5.4.2 Auswertung Hauptversuch 2

In den Minutensteaks wurde an Tag 1 ebenfalls mit keiner Isolierungsmethode eine Kontamination mit Listerien nachgewiesen. Auch die Gesamtkeimzahlprobe wurde in den darauffolgenden Tagen auf Listerien untersucht. Es waren keine Listerien nachweisbar. Somit war das Fleisch zu diesen Zeitpunkten nach der EU-Verordnung 2073/2005 verkehrsfähig.

Im Vergleich zwischen den beiden Isolierungsmethoden, insbesondere bei der aeroben Gesamtkeimzahl, siehe Tabelle 7 und Tabelle 10, ist eine große Differenz ersichtlich. Die aerobe Gesamtkeimzahl ist beim Schneiden größer als beim Spülen. Der Grund dafür liegt in der größeren verfügbaren Oberfläche durch das Zerkleinern. Dadurch können auch Bakterien aus dem Inneren der Proben isoliert werden.

Auf der Oberfläche der Fleischstücke konnten kaum eine Ausgangskeimbelastung nachgewiesen werden, während der Dauer des Versuches. Nach der Listerienkontamination und der anschließenden Inkubation konnte durch das Spülen eine Listerienbelastung von $3,5 \cdot 10^6$ KbE/cm² nachgewiesen werden. Der Wert stieg nach weiteren 24 h auf $7,9 \cdot 10^6$ KbE/cm² an. Dagegen fiel die Listerienbelastung bei den Proben, die mit Phagen behandelt wurden, auf $1,5 \cdot 10^1$ KbE/cm² (siehe Abbildung 15). Das entspricht einer Reduzierung der Listerienbelastung von über 6 Zehnerpotenzen und dem entsprechend 99,9 % gegenüber dem Vortag. Das bedeutet, dass die Phagen sehr gut in der Lage sind, auf der Oberfläche Listerien abzutöten.

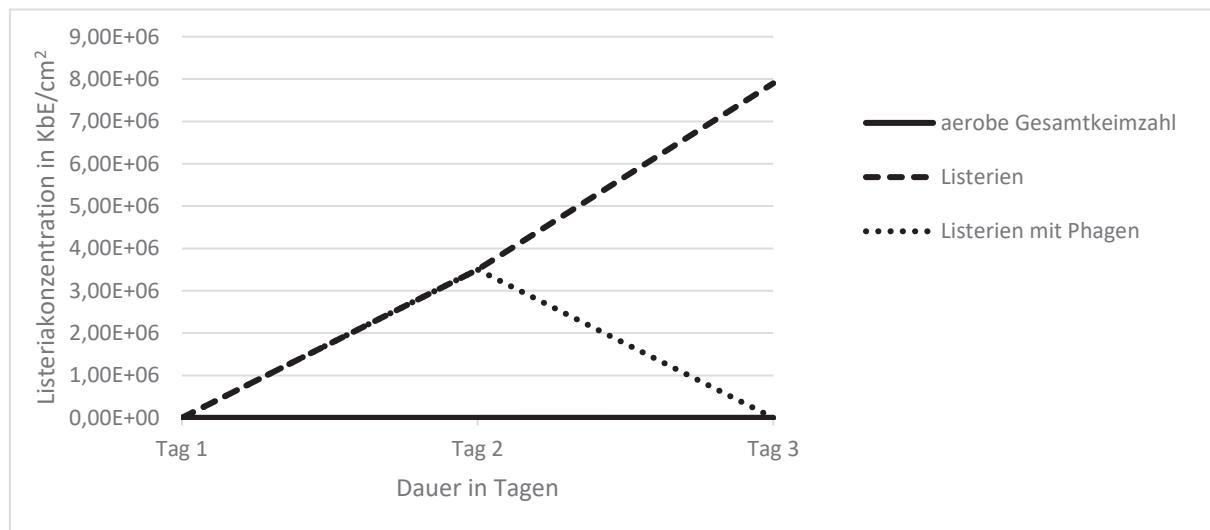


Abbildung 15: Entwicklung der Listerienkontamination auf der Oberfläche während des Versuches

Nach der ersten Inkubation ließ sich in den kontaminierten Proben eine Listerienkonzentration von $4 \cdot 10^6$ KbE/g durch das Schneiden nachweisen. Dieser Wert ist im Vergleich zum Spülen um 31 % höher.

Auf die Masse bezogen stieg die Listerienkontamination um annährend eine 10er-Potenz nach der nächsten Inkubation. In den mit Phagen behandelten Proben sank die Listerienkontamination um mehr als drei Zehnerpotenzen. Das entspricht auch wieder einer Abtötung von weit über 99 % im Vergleich vor der Zugabe der Phagen. Das belegt, dass Phagen auch in Stückfleisch Listerien abtöten können

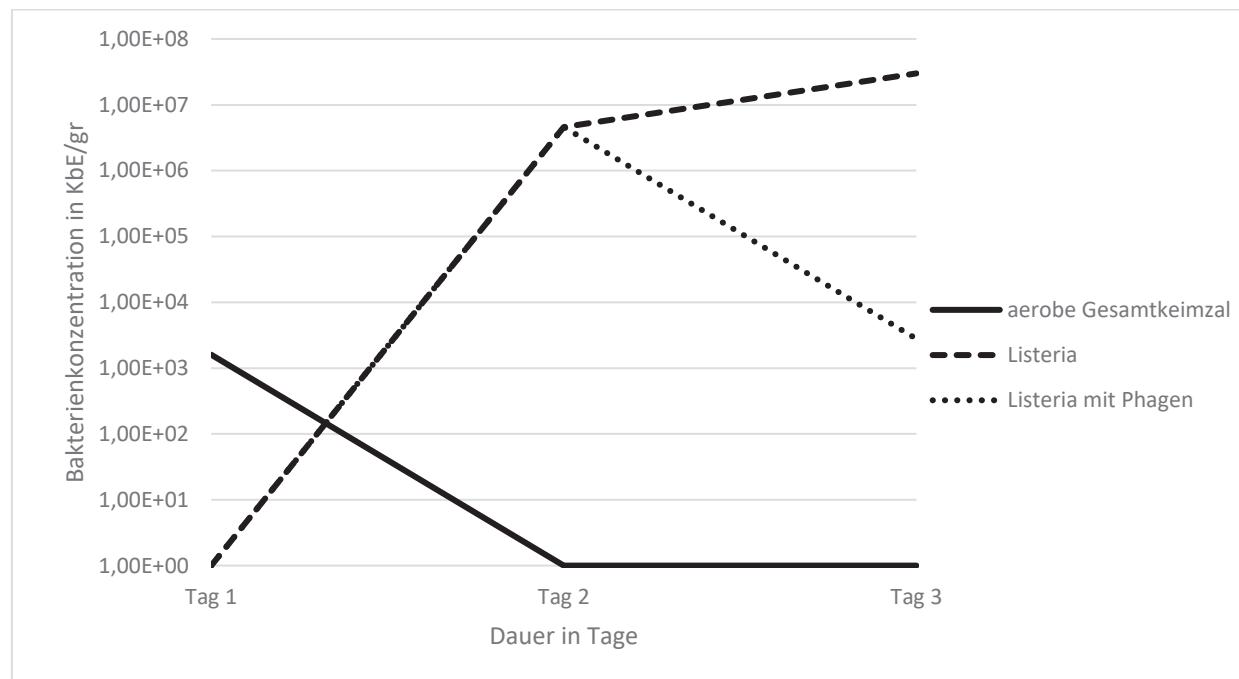


Abbildung 16: Entwicklung der Bakterienkonzentration im Fleisch während des Versuches

In der sensorischen Beurteilung der verschiedenen Proben zeichneten sich die mit der Caso Bouillon angeimpft Proben durch einen starken Geruch nach dieser aus. Es ließ sich keine Differenz in der Konsistenz oder Farbe zwischen den verschiedenen Proben feststellen. Allerdings ist das Panel nicht groß genug, um eine aussagekräftige Antwort zu erhalten.

5.5 Diskussion

In den beiden Fleischproben ist die Listerienbelastung um mindestens rund drei Zehnerpotenzen gesunken und auf der Oberfläche der Schweineminutensteaks sogar um fünf. Allerdings würde es bei der industriellen Anwendung dieser Methode zu erheblichen Preissteigerungen bei den Produkten kommen. 100 ml des Phagenlysats kosten zurzeit bei Microeos Food System 200 €. Bei den in den Versuchen eingesetzten Mengen würde der Preis pro kg Schweinehackfleisch von 4,82 € auf 164,82 € in unserem Fall steigen. Solch eine Preissteigerung würden die Konsumenten nicht akzeptieren.

Besonders bedeutsam ist die Beobachtung, dass auf der Oberfläche der Minutensteaks die Keimbelaistung um mehr als fünf Zehnerpotenzen reduziert werden konnte, denn ein möglicher Kontaminationsweg wären die Schneidewerkzeuge und dabei würden die Keime auf der Oberfläche verteilt werden. Dadurch kann ein möglicher Kontaminationsweg sehr effektiv bekämpft werden.

Eine mögliche Zugabe wäre zum Beispiel der Einsatz von Sprühdüsen. Die Sprühdüsen überführen das Phagenlysat in ein Aerosol. Das Aerosol wird auf gleichmäßig auf die Schnittflächen verteilt (siehe Abbildung 13). Diese Technik ist bereits erprobt und ist bereits beschrieben worden. In Wurstwaren ist es beispielsweise durch diese Methode möglich den Listeriengehalt um bis zu 98% zu reduzieren. (Microeos Food Safety BV, 2016)

Ein weiterer Faktor, der sich als problematisch erweisen könnte, wäre der Einsatz in der Produktion. In unseren Fall ist das Phagenlysat per Hand gleichmäßig auf die Proben verteilt worden. In der Massenproduktion ist das nicht möglich, unter anderem wegen der Hygienebedingungen, der hohen Arbeitsintensität und der Unzuverlässigkeit bei der Verteilung des Phagenlysats.

Bei der Hackfleischherstellung ließe sich das vielleicht sehr gut beim Zerkleinern gewährleisten, da das Hackfleisch dabei stark homogenisiert wird. Eine andere bereits



Abbildung 13: Anwendung von Listex beim Slicen von Wurstwaren. Das Phagenlysat würde direkt auf das Produkt mit Düsen aufgebracht werden (Quelle: Microeos Food Safety BV, 2016)

untersuchte Möglichkeit wäre das Benetzen der Fleischstücke vor dem Wolfen. Sie waren in der Lage dadurch ihre Keimbelastung um 50% im Endprodukt zu reduzieren (David, 2011)

Eine weitere noch ungeklärte Frage ist die nach der rechtlichen Zuordnung und Deklaration von Phagen. Die Deklarierung ist nämlich davon abhängig, ob sie als Lebensmittelzusatzstoff oder als Verarbeitungshilfsstoff gelten.

Nach Artikel 3, Absatz 2a der Verordnung (EG) Nr. 1333/2008(A) ist

„ „Lebensmittelzusatzstoff“: ein Stoff mit oder ohne Nährwert, der in der Regel weder selbst als Lebensmittel verzehrt noch als charakteristische Lebensmittelzutat verwendet wird und einem Lebensmittel aus technologischen Gründen bei der Herstellung, Verarbeitung, Zubereitung, Behandlung, Verpackung, Beförderung oder Lagerung zugesetzt wird, wodurch er selbst oder seine Nebenprodukte mittelbar oder unmittelbar zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden oder werden können.“

Und nach Artikel 3, Absatz 2b, Verordnung (EG) Nr. 1333/2008 ist

„ „Verarbeitungshilfsstoff“: ein Stoff, der

- i) nicht als Lebensmittel verzehrt wird
- ii) bei der Verarbeitung von Rohstoffen, Lebensmitteln oder deren Zutaten aus technologischen Gründen während der Be- oder Verarbeitung verwendet wird und
- iii) unbeabsichtigte, technisch unvermeidbare Rückstände des Stoffes oder seiner Derivate im Enderzeugnis hinterlassen kann, sofern diese Rückstände gesundheitlich unbedenklich sind und sich technologisch nicht auf das Enderzeugnis auswirken;“.

Es müssen nämlich nach Artikel 20 Verordnung 1169/2011 die Verarbeitungshilfsstoffe nicht gekennzeichnet werden, allerdings ist die Anwendung eben durch die Definition eingeschränkt, da nur noch Rückstände vorhanden sein dürfen (Artikel 3, Absatz 2b, Verordnung (EG) Nr. 1333/2008). Darum wäre eine Zulassung als Lebensmittelzusatzstoff eine gute Möglichkeit für eine breitere Anwendung.

Gesetzlich erfordert der Einsatz als Lebensmittelzusatzstoff normalerweise eine Zulassung, aber da Phagen eigentlich zu den Mikroorganismen zählen, könnten sie nach 6 Abs. 2LFGB zulassungsfrei sein.

Von der Überlebensfähigkeit ist auch die Möglichkeit für die präventiver Einsatz gegen Listerien. Dafür müsste untersucht werden, wie lange die Phagen in Fleisch überleben können. Wenn der Phage in Fleisch stabil ist, könnte er am Anfang der Produktion zugesetzt werden und somit sofort potenzielle Listerien, die während der Produktion in das Produkt kommen, abtöten. Beispielsweise ist über die Phage A511 bekannt, dass sie in gegartem Truthahnfleisch für bis zu 6 Tage stabil ist. (Guenther et al, 2009) In Zwiebelmettwurst ist bekannt das P100 nur sehr begrenzt im Produkt überlebensfähig ist.

Allerdings gibt es zurzeit für den Einsatz von Phagen immer noch keinen gesetzlichen Rahmen und eine Verwendung würde sich in einer Grauzone bewegen. (Horn, 2019)(Jagow, Teufer et al, 2007)

Durch die starke, aber nicht vollständige, Abtötung der Listerien durch das Phagenlysat, ist wie bereits die EFSA(2016) schon bereits für Ready to eat Gerichte festgestellt hat, eine weitere Barriere für die Produktsicherheit und ist keine Entschuldigung für eine schlechtes HCP oder GMP System.

6. Ausblick

Da bewiesen werden konnte, dass der Phage P100 in der Lage ist, Listerien in Fleisch und Hackfleisch abzutöten, müssten noch mehrere Faktoren und Probleme untersucht werden.

Aktuell ist die Preissteigerung für den Endverbraucher immens und würde ihn vom Kauf abschrecken. Eine Möglichkeit wäre die Herabsetzung der Dosierung. Dann stellt sich allerdings die Frage, wie stark die Abtötung von der Konzentration abhängig ist.

Es konnte mit den Hauptversuchen nachgewiesen werden, dass Phagen Listeria Innocua in Fleisch und Fleischprodukten abtöten können, allerdings müssten die Ergebnisse mit Listeria Monocytogenes in einer darauf aufbauenden Phase wiederholt werden, um die Ergebnisse zu bestätigen

Ein weiterer Aspekt, der noch betrachtet werden müsste, ist die Verbraucherakzeptanz. Für den Endverbraucher dürfte der Begriff Phage weitestgehend unbekannt sein und möglicherweise zur Verunsicherung führen. Der Konsument müsste erst über die Funktion und die Ungefährlichkeit für den menschlichen Organismus aufgeklärt werden.

7. Zusammenfassung

Durch den Vorversuch konnte nachgewiesen werden, dass die Phagen in der Lage sind, auch in einem sauren Milieu Listerien abzutöten, wenn auch die Abtötungsrate langsamer ist als bei einem neutralen pH-Wert.

In den darauffolgenden Versuchen konnte im Hackfleisch eine Reduktion um annährend drei Zehnerpotenzen an KbE/g, im Vergleich zum Vortag, nachgewiesen werden. Das zeigt, Phagen sind nicht nur in der Lage, eine Vermehrung einer möglichen Kontamination zu verzögern, sondern auch zu bekämpfen.

Auf der Oberfläche der Minutensteaks ist sogar ein noch stärkerer Abfall um fünf Zehnerpotenzen an KbE/cm², im Vergleich zum Vortag, nachweisbar, was in der Praxis relevant sein könnte. Auf die Masse bezogen ist ein Abfall, im Vergleich zum Vortag, um drei Zehnerpotenzen an KbE/g nachweisbar.

Somit sind Phagen in der Lage, Listerien auch in Fleisch und Fleischwaren abzutöten. Die Phagen sind nicht in der Lage die Gefahr komplett zu neutralisieren, allerdings könnten sie als zusätzliche Präventionsmaßnahme fungieren. Allerdings gibt es noch beträchtliche rechtliche, wirtschaftliche und soziale Hürden, die einen möglichen Einsatz erschweren.

8. Quellen

Amtsblatt der Europäischen Union(EU): VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel(Text von Bedeutung für den EWR)[Online], 2005, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:DE:PDF>

Amtsblatt der Europäischen Union(EU): VERORDNUNG (EG) Nr. 1333/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über Lebensmittelzusatzstoffe [Online], [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1333&from=DE>

Amtsblatt der Europäischen Union(EU): VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission [Online], [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1169&from=DE>

Becton Dickinson GmbH, GEBRAUCHSANWEISUNG – GEBRAUCHSFERTIGE PLATTENMEDIEN BD PALCAM Listeria Agar[Online], September 2011, Heidelberg , [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25606>

Branscheid, W., Honikel K. O., von Lengkern G., Troeger K.: Qualität von Fleisch und Fleischwaren Band 1, 2 überarbeitete und erweiterte Auflage, Frankfurt am Main, Deutscher Fachverlag, 2007

Branscheid, W., Honikel K. O., von Lengkern G., Troeger K.: Qualität von Fleisch und Fleischwaren Band 1, 1 Auflage, Frankfurt am Main, Deutscher Fachverlag, 1998

Bundesinstitut für Risikobewertung, Schutz vor Lebensmittelinfektionen mit Listerien[Online], 2017, Berlin, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter:

<https://www.bfr.bund.de/cm/350/verbrauchertipps-schutz-vor-lebensmittelinfektionen-mit-listerien.pdf>

Center for Disease Control and Prevention: NORS Dashboard: [Online], Oktober 2020, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/norsdashboard/>

Center for Disease Control and Prevention: *Listeria* Outbreaks [Online], Oktober 2020, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>

David, E. P.: Der prophylaktische Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien im Produkt Zwiebelmettwurst[Online], Hamburg, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: https://deposit.haw-hamburg.de/bitstream/20.500.12738/5647/1/lsab12_8.pdf

EFSA: Evaluation of the safety and efficacy of Listex TM P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products, [Online], Juni 2016, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2016.4565>

EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017[Online], Dezember 2018, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5500>

Guenther S. , Huwlyer D., Richard S., Loessner M. J.: Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods[Online], American Society for Microbiology Journals, November 2018, Zürich(Schweiz), [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://aem.asm.org/content/aem/75/1/93.full.pdf>

Heller, K.J., Fieseler, L., Loessner, M. J.: Pathogene Mikroorganismen-Bakteriophagen-Grundlagen, Rolle in LM und Anwendungen zum Nachweis sowie d. Kontrolle v. Krankheitserregern, 1 Auflage, Hamburg, Behrs Verlag, 2011

Horn, D.: Aktuelle rechtliche Einstufung des Einsatzes von Phagen bei der Herstellung von Lebensmitteln[Online], 20. BfR-Forum Verbraucherschutz Bakteriophagen - 7. & 8. 11. 2019 – Berlin, November 2019, Berlin, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://www.bfr.bund.de/cm/343/aktuelle-rechtliche-einstufung-des-einsatzes-von-phagen-bei-der-herstellung-von-lebensmitteln.pdf>

Von Jagow, C., Teufer T.: Das große Fressen Bakteriophagen in der Lebensmittelherstellung: eine rechtliche Einordnung[Online], Januar 2007, Hamburg, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://www.cdc.gov/norsdashboard/>

<https://www.micreos.com/upload/content/file/Das%20Grosse%20Fressen%20ZLR%201-2007.pdf>

Krämer, J.: Lebensmittelkrobiologie, 6. Auflage, Stuttgart, Ulmer UTB, 2011

Lebert, A., Lebert I., Begot C.: Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions[Online], Food Microbiology, Oktober 1997, Clermont-Ferrand(Frankreich), [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/248565119_Variability_of_the_response_of_66_Listeria_monocytogenes_and_Listeria_innocua_strains_to_different_growth_conditions

LFBG(Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch): Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB) § 6 Verbote für Lebensmittelzusatzstoffe[Online], Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz[Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: https://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/_6.html

Matissek, R.: Lebensmittelanalytik: Grundzüge-Methode-Anwendungen, 2. Auflage, Springer, Berlin: 1992

Micreos Food Safety BV: PhageGuard Listex Application Data Sheet Meat[Online], 2016, Wageningen, Niederlande, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://phageguard.com/wp-content/uploads/2019/10/PhageGuard-Listex-Application-Data-Sheet-RTE-Meat-FINAL.pdf> Pennstate University: Control of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry [Online], Juni 2016, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: <https://extension.psu.edu/control-of-listeria-monocytogenes-in-meat-and-poultry>

Robert-Koch-Institut(RKI): Listeriose[Online], Berlin 2010, [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html

Robert-Koch-Institut(RKI): Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018[Online], März 2019, Berlin [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: [Letzter Zugriff am 7.10.2020], Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung der Listeriose-Fälle in Deutschland (Quelle: RKI, 2019).....	9
Abbildung 2:	Lebenszyklus einer Phage	12
Abbildung 3:	Das verwendete Phagenpräperat P100 von Microeos Food System	13
Abbildung 4:	Versuchslayout Hackfleisch.....	17
Abbildung 5:	Bakterienisolierung	19
Abbildung 6:	Listerien auf Palcam Agar. Man kann sehr gut die silbernen Kolonien mit den schwarzen Höfen erkennen.	20
Abbildung 7:	Versuchsaufbau 2. Hauptversuch Schweineminutensteaks	22
Abbildung 8:	Probennahme Schneiden	23
Abbildung 9:	Das gewonnene Fleischextrakt beim Schneiden	23
Abbildung 10:	Entwicklung der Bakterienkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten. 24	24
Abbildung 11:	Caso Boullion mit Listerien links und mit Listerien und Phagen rechts.....	24
Abbildung 12:	Direkter Vergleich zwischen den Proben. Auf der Platte oben sind nur Listerien und unten die Listerien mit Phagen in derselben Verdünnungsstufe. Es lässt sich schon optisch eine deutliche Abnahme der charakteristischen Silbernen Kolonien bei der mit Phagen behandelte probe feststellen.	27
Abbildung 13:	Anwendung von Listex beim Slicen von Wurstwaren. Das Phagenlysat würde direkt auf das Produkt mit Düsen aufgebracht werden (Quelle: Microeos Food Safety BV, 2016)	
	34

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien	16
Tabelle 2:	Materialien	16
Tabelle 3:	Physikalische Messwerte der Proben	25
Tabelle 4:	Entwicklung der Gesamtkeimzahl	26
Tabelle 5:	Entwicklung der Listerienkonzentration in den Proben	26
Tabelle 6:	Entwicklung der optischen Dichte	26
Tabelle 7:	Vorversuch optische Dichten Teil 1	44
Tabelle 8:	Vorversuch optische Dichten Teil 2	45
Tabelle 9:	Gesamtkeimzahl Hauptversuch 1	46
Tabelle 10:	Listerienbestimmung im Hackfleisch.....	47
Tabelle 11:	Hauptversuch 2 Tag 1	48
Tabelle 12:	Hauptversuch 2 tag 2	49
Tabelle 13:	Hauptversuch 2 Tag 3	50

Anhang

Vorversuch

Tabelle 7: Vorversuch optische Dichten Teil 1

t in min	Leerwert	30	60	90	120	150	180	210	zu 4	240	Phagenzugabe	270	300	330	360
1. pH 5 in optische Dichte	0,13	0,129	0,13	0,132	0,135	0,14	0,144	0,152	0,16			0,172	0,182	0,203	0,225
2. pH 5 in optische Dichte	0,134	0,133	0,134	0,137	0,139	0,145	0,149	0,157	0,166			0,178	0,192	0,211	0,233
3. pH 7 in optische Dichte	0,155	0,154	0,16	0,167	0,182	0,204	0,232	0,271	0,326			0,397	0,479	0,591	0,679
4. pH 7 in optische Dichte	0,16	0,159	0,167	0,174	0,191	0,217	0,246	0,291	0,347			0,403	0,442	0,39	0,154

Tabelle 8: Vorversuch optische Dichten Teil 2

	420	450	480	510	540	570	600	630	660	690	720
0,25	0,278	0,315	0,35	0,388	0,429	0,472	0,496	0,543	0,58	0,622	0,659
0,26	0,293	0,331	0,371	0,394	0,418	0,456	0,461	0,427	0,407	0,378	0,334
0,691	0,755	0,784	0,819	0,839	0,859	0,883	0,894	0,922			
0,169	0,147	0,142	0,141	0,14	0,141	0,141	0,141	0,142			

Hauptversuch 1

Tabelle 9: Gesamtkeimzahl Hauptversuch 1

Verdünnung	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
Tag 1									
Messung 2	0	14	0	0	7	0	0	0	0
Messung 1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Tag 2									
Messung 1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Messung 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Tag 3									
Messung 1	34	0	0	0	1	0	0	0	0

Tabelle 10: Listerienbestimmung im Hackfleisch

Verdünnung	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Tag1							
Bestimmung 1	0	0	0	0	0	0	
Bestimmung 2	0	0	0	0	0	0	
Tag 2							
Bestimmung 1	Nicht Ausählbar(NA)	1125	430	68	1		
Bestimmung 2	NA	864	525	54	2		
Tag 3							
Listerien auf Palcam							
Bestimmung 1	NA	NA	4	1	5	1	
Bestimmung 2	NA	NA	930	130	5	0	
Listerien + Phagen							
Bestimmung 1	66	32	0	1	0	0	
Bestimmung 2	37	11	0	0	0	0	

Hauptversuch 2 Stückfleisch

Tabelle 11: Hauptversuch 2 Tag 1

Verdünnung	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4
GKZ					
spülen 65 cm^2	1	0	0	0	0
Schneiden 18,3g	29	2	0	0	8
Palcam					
Schneiden 19,2g	0	0	0	0	0
Spülen 68 cm^2	0	0	0	0	0

Tabelle 12: Hauptversuch 2 tag 2

	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
GKZ							
spülen 72 cm ²	4	0	0	0	0	0	0
Schneiden 20,3g	0	0	0	0	0	0	0
Listerien							
Schneiden 16,1		n. a.	736			2	0
spülen 67 cm ²		n. a.	1440	780	102	10	

Tabelle 13: Hauptversuch 2 Tag 3

Verdünnung	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
Spülen 67 cm ²	0	0	0	0	0	0	0
Schneiden 18,7g	0	0	0	0	0	0	0
Listerien							
Schneiden 13,2g		NA	420	1			
spülen 69cm ²		NA	561	46	1		1
Listerien Phagen	1	2	3	4	5		
Schneiden 19,3g	5						
spülen 68,5cm ²	1						

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich/wir, dass die vorliegende Arbeit von mir/uns selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich/wir keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe/n. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet. Ich/wir erkläre/n weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

Ort, Datum

Eigenhändige Unterschrift/