Hochschule Neubrandenburg

Fachbereich Agrar- und Lebensmittelwissenschaften

Studiengang Master Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie

Vertiefungsrichtung Lebensmittelproduktmanagement

Eignung eines Biolumineszenz-Messsystems als Schnelltest zur Beurteilung der Oberflächenreinheit in der Fruchtsaftproduktion

Masterthesis

vorgelegt von Arne Gerhardt

Zur Erlangung des akademischen Grades

„Master of Science“

(M. Sc.)

Prüfer:	Prof. Dr. Karl Steffens (Hochschule Neubrandenburg)
	Dr. Gabriele Wagner (Sonnländer Getränke GmbH)
Bearbeitungszeitraum:	24.04.2015 – 24.10.2015
URN:	urn:nbn:de:gbv:519-thesis 2015 – 0646 – 1

Rostock, 15.10.2015

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl Steffens für die Betreuung der Masterthesis seitens der Hochschule Neubrandenburg und Frau Dr. Gabriele Wagner (Sonnländer Getränke GmbH) für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themas im Unternehmen, sowie Herrn Dipl. Ing. Bernhard Baumgartner für das Zustandekommen meiner Tätigkeit bei der Sonnländer Getränke GmbH.

Weiterhin möchte ich Frau Stefanie Hohmann, Sandra Brendel, Ulrike Barz sowie dem gesamten Labor- und Tankwart-Team für die uneingeschränkte Unterstützung danken.

Rostock, 15.10.2015 _____

Arne Gerhardt

Abstract

Pilot experiments have shown strong correlation between vegetative organisms and luminescence values across several decimal powers. In comparison to literature data similarities could be found out. Parallelism towards reference procedures (DIN 10113-1, -3) was demonstrated. The sensitivity of the luminescence meter is on average 20 % lower than that of classical procedures regarding the detection of microorganisms.

A luminescence based tolerance of approximately 10.000 RLU could be set for stainless steel storage tanks after Cleaning-In-Place procedure being secured by reference methods. Values taken in enamel storage tanks reach 37.000 RLU effected by deviating cleaning conditions. Those values could also be found negative with conventional methods. Due to the proximity of positive findings a safety coefficient (0,67) was involved. Values between corrected and highest one should be proved with conventional methods. Further measurements should be incorporated.

80 % of hygiene monitoring points could be found suitable for luminescence based measurement with the Charm novaLum II and the Pocket Swab® Plus system. Changes in cleaning station can further be determined using this instrument. With that information the need of cleaning actions can be discovered more quickly. Reference measurements are advisable periodically.

Data series taken by different users show less normal distribution and more outliers. The need of training could be found out concerning handling and interpretation of results. The significant time advantage combined with comparatively easy handling are the main reasons for acquiring this Instrument. In comparison to 3 measurement systems of concurrence products this could be found the most suitably for the fruit juice producing company (Sonnländer Getränke GmbH). The use of the Charm novaLum II is particularly advantageous in high capacity utilization.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
2 Stand der Wissenschaft und Technik 2
2.1 Fruchtsaft 2
2.1.1 Rechtliche Regelungen und Vorschriften 2
2.1.2 Mikrobiologische Risiken – Getränkeschädlinge im AfG-Bereich 3
2.2 Reinigung, Desinfektion und Hygieneanforderungen 8
2.3 Verfahren zur Beurteilung mikrobiologischer Risiken 12
2.3.1 Konventionelle, analytische und alternative Untersuchungsmethoden 12
2.3.2 Praxisrelevante Methoden zur Untersuchung von Oberflächen 13
2.3.3 Beurteilung des Hygienestatus per Biolumineszenz 14
3 Material und Methoden 19
3.1 Mikrobiologische Modelluntersuchungen 19
3.1.1 Kultivierung, Stammhaltung verwendeter Mikroorganismen – Herstellen der Untersuchungsmedien 19
3.1.2 Auswahl, Reinigung, Präparation der Testoberflächen, Kontrollmessungen 21
3.1.3 Planung der Testreihen 23
3.1.4 Durchführung der Biolumineszenz- und Referenzmessungen 25
3.2 Praxisbezogene Untersuchungen 29
3.2.1 Temperatureinfluss und Genauigkeit des Messgerätes 29
3.2.2 Ermittlung von Grenz- und Toleranzwerten für gereinigte Tanklager 30
3.2.3 Einfluss unterschiedlicher Anwender im Produktionsprozess 31
3.2.4 Hygienemonitoring in der laufenden Fruchtsaftproduktion 32
3.3 Berechnungen und Statistik 34
4 Ergebnisse 36
4.1 Untersuchungen der verschiedenen Kontaminanten 36
4.1.1 Einfluss der Oberfläche auf die Ausprägung der Messwerte 36
4.1.1.1 Detektion von Produktkontaminationen 36
4.1.1.2 Detektion von *Saccharomyces cerevisiae* auf Emaille- und Edelstahloberflächen 40
4.1.2 Detektierbarkeit weiterer AfG – spezifischer Mikroorganismen 45
4.1.2.1 Detektion von Milchsäurebakterien 45
4.1.2.2 Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris 48

4.1.2.3 Detektion von Schimmelpilzen 55
4.1.3 Zusammenfassung der Untersuchungen von Mikroorganismen 59
4.2 Praxisbezogene Untersuchungen 62
4.2.1 Einfluss der Temperatur und Genauigkeit des Messsystems 62
4.2.2 Ermittlung von Toleranz- bzw. Richtwerten 66
4.2.3 Einfluss unterschiedlicher Anwender 69
4.2.4 Hygienestatus per ATP-Messungen an ausgewählten Stellen der Produktion 73
5 Diskussion 78
6 Zusammenfassung 91
7 Literaturverzeichnis 92
8 Rechtliche Vorschriften, Leitsätze und Normen 102
9 Abbildungsverzeichnis 104
10 Tabellenverzeichnis 106
11 Gleichungsverzeichnis 108
Erklärung über die eigenständige Anfertigung dieser Arbeit 109
Anlagenverzeichnis – Anlagen I

Abkürzungsverzeichnis

2,6-DBP	2,6-Dibromphenol
A. at.	*Alicyclobacillus acidoterrestris*
A. n.	*Aspergillus niger*
ADP	Adenosindiphosphat
AfG	Alkohol-freie-Getränke
AMP	Adenosinmonophosphat
aq	aquatisiert, in Lösung
AS nt.	Apfelsaft naturtrüb
ATP	Adenosintriphosphat
BGL	Bundesverband Güterverkehr Logistik und Entsorgung (BGL) e. V.
CIP	Cleaning-in-Place
DEV	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DVTI	Deutscher Verband für Tankinnenreinigungen
EHEDG	European Hygienic Engineering & Design Group
ENFIT	Europäischer Verband zur Förderung innovativer Technologien für Reinigung, Logistikmanagement und Service für Transport- und Lagerbehälter e. V.:
EPS	extrazelluläre polymerische Substanzen
FDA	Food and Drug Administration of the United States
GKZ	Gesamtkeimzahl
GRAS	Generally Regarded/Recognized As Safe
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	High Pressusure/Performance Liquid Chromatography
IFU	International Federation of Fruit Juice Producers
K	Konfidenz
LOD	Limit of Detection
MRSA	Multiresistenter *Staphylococcus aureus*
MRS-Agar	de Man-Rogosa-Sharpe-Agar
MSB	Milchsäurebakterien
NVT	Normalverteilung
o. V.	ohne Verfasser
OF	Oberfläche

OFA	Oberflächenausstrich
OFS	Orangen-Furchtserum(-Agar)
OGYE-Agar	Oxytetracycline-Glucose Yeast Extract-Agar
OTA	Ochratoxin A
PCA	Per-Chlor-Säure
PMT	Photomultiplier Tube
R	Streuung der Messwerte
SH-Gruppen	Schwefelwasserstoff-Gruppen
SOP	Standard Operation Practice
TCA	Tri-Chlor-Säure
TD	Transfrigoroute Deutschland (TD) e. V.
TTFC	Tissue Fluid Contamination Test
VBNC	Viable But Non-cultivable
VDF	Verband der Deutschen Fruchtsaft-Industrie
WFR	Wiederfindungsrate

Einheitenverzeichnis

°Brix	Grad Brix
°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KbE/cm^2	Kolonie-bildende Einheit pro Quadratzentimeter
KbE/ml	Kolonie-bildende Einheit pro Milliliter
$\log_{10}$(KbE)	dekadischer Logarithmus (Koloniebildende Einheiten)
$\log_{10}$(RLU)	dekadischer Logarithmus (Relative Light Units)
min	Minute
ml	Milliliter
mmol	Millimol
µl	Mikroliter
µS/cm	Mikro Siemens pro Quadratzentimeter
NTU	Nephelometric Turbidity Unit
ppm	parts per million
RLU	Relative Light Units, Relative Lichteinheiten
vol%	Volumenprozent

1 Einleitung

Hygienekontrollen auf produktberührenden Oberflächen sind wichtige Schritte zur Einhaltung von Kundenanforderungen sowie gesetzlichen Anforderungen bei der Produktion von Fruchtsäften. Diese Produkte werden in der Praxis fast ausschließlich pasteurisiert. Im Hinblick auf die biologische Sicherheit wird hier der Begriff der kommerziellen oder praktischen Sterilität geprägt (Wisotzkey, et al., 1992) (Müller, et al., 1996) (Keding, 1993). Betreffende Produkte bieten den meisten Mikroorganismen aufgrund des niedrigen pH-Wertes lebenswidrige Bedingungen. Doch auch in diesem Fall gibt es Gruppen von Mikroorganismen, die als Getränkeschädlinge aktiv sind (Back, 2000) (Snaidr, et al., 2008) (Klein, et al., 2009). Um derartige Probleme im Voraus zu erkennen, werden auf Oberflächen mit Produktkontakt in der Regel klassische sensitive mikrobiologische Methoden wie Abklatsch- oder Abstrichtests laut DIN 10113-1/2/3 durchgeführt. Seit Längerem werden auf dem Markt verschiedene Ausführungen von Biolumineszenz-basierten Geräten angeboten. Das Prinzip basiert auf der photometrischen Messung von Lichtblitzen, die durch die enzymatisch katalysierte Luciferin-Luciferase-Reaktion ausgelöst werden. Dieses Enzym wird vor allem aus Leuchtkäfern der Gattung *Photinus* gewonnen. Substanzen in Form von Mikroorganismen oder organischem Material besitzen ATP, das als Indikatorsubstanz mit der genannten Enzymreaktion nachgewiesen werden kann. Hauptvorteil ist die erhebliche Zeitersparnis gegenüber konventionellen Methoden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Anwendung eines Biolumineszenz-Messsystems (Charm novaLum II, Charm Science Inc., Lawrence, USA) als Schnelltest auf die Anwendbarkeit in der Fruchtsaftproduktion zu prüfen. Dazu wird das Gerät Charm NovaLum II mit dem dazugehörigen Pocket Swab® Plus System verwendet und auf die Eignung für wichtige Untersuchungen wie die Entscheidung der Freigabe von Tankinnenräumen geprüft. Verschiedene Einflussfaktoren wie die Art der abzustreichenden Fläche, der Temperatureinfluss auf die Enzymreaktion sowie die Genauigkeit des Messsystems wurden – angepasst an die Fruchtsaftproduktion der Sonnländer Getränke GmbH am Standort Rostock – untersucht. Durch Modellversuche wird die quantitative ATP-Messung in relevante Risikofaktoren zerlegt, um Einblick in die Detektierbarkeit bestimmter Kontaminanten zu erhalten. Mögliche Korrelationen zwischen vegetativer Zellzahl und Lumineszenz-Intensität sollen festgestellt und mit Literaturangaben verglichen werden. Weiter im Fokus steht die Anwendbarkeit bzw. Praktikabilität des Gerätes im Unternehmen sowie die Beurteilung zur Eignung eines Hygienemonitorings. Durch einen Vergleich mit Geräten anderer Hersteller soll die Rentabilität des Messsystems geprüft werden.

2 Stand der Wissenschaft und Technik

2.1 Fruchtsaft

2.1.1 Rechtliche Regelungen und Vorschriften

Der sogenannte AfG- (Alkoholfreie Getränke) Bereich umfasst Getränkegruppen wie Fruchtsäfte, Fruchtnektare, Fruchtkonzentrate, Fruchtpürees, Erfrischungsgetränke und Wässer. Trotzdem verhältnismäßig wenige Organismenarten diese Produkte verderben oder die Verbrauchersicherheit beeinträchtigen können, werden Fruchtsäfte als potentiell gefährdet eingestuft (Back, 2000) (Snaidr, et al., 2008). In der Fruchtsaft- und Errischungsgetränkeverordnung gilt explizit für Fruchtsaft die Definition als *„das gärfähige, jedoch nicht gegorene, aus dem genießbaren Teil gesunder und reifer Früchte (frisch oder durch Kälte haltbar gemacht) einer oder mehrerer Fruchtarten gewonnene Erzeugnis, das die für den Saft dieser Frucht/Früchte charakteristische Farbe, das dafür charakteristische Aroma und den dafür charakteristischen Geschmack aufweist.“* Weiterhin sind Qualitätsparameter wie der BRIX-Wert beschrieben, der auch nach dem Ausmischen im Fall der Konzentratverarbeitung dem Wert des ursprünglichen, unveränderten Saftes entsprechen muss [FrSaftErfrischGetrV, 2004] (Back, 2000). Säfte aus Konzentrat dürfen nur mit Trinkwasser aufbereitet werden, das der Richtlinie 98/83/EG des Rates (03.11.1998) sowie der Trinkwasserverordnung entspricht [Richtlinie 98/83/EG] [TrinkwV 2001]. Weiter sind in der Fruchtsaftverordnung die Charakteristika der Produkte Fruchtsaft, konzentrierter Fruchtsaft (Fruchtsaftkonzentrat), getrockneter Fruchtsaft (Fruchtsaftpulver) und Fruchtnektar geregelt. Der Unterschied von Fruchtsaft zu Nektar besteht darin, dass Letzterer eine Kombination aus Fruchtsaft bzw. Fruchtmark ist, der mit Wasser und Zucker, Zuckerarten oder Honig kombiniert wird. Mindestfruchtgehalte liegen abhängig von verwendeten Fruchtarten zwischen 25 und 50 %. Ein Fruchtsaft muss stets einen Fruchtgehalt von 100 % aufweisen. In Anlehnung an die Fruchtsaftverordnung sind in den Leitsätzen des Deutschen Lebensmittelbuches weitere konkrete Qualitätsparameter beschrieben. Die Definition wird hier erweitert, indem Höchstgehalte von Alkohol (3,0 g/l), flüchtige Säuren (berechnet als Essigsäure, 0,4 g/l), Milchsäure (0,5 g/l) und andere Parameter beschrieben sind [Leitsätze für Fruchtsäfte, 2002]. Ein weiteres Charakteristikum für Fruchtsäfte ist der Gehalt an Patulin, einem Mykotoxin, das beispielsweise durch *Penecillium expansum*, *Byssoclamys spp.* oder *Paecilomyces variotii* gebildet wird (Back, 2000). Der Grenzwert für Patulin in Fruchtsäften beträgt 50 µg/l [VO (EG) Nr. 1881/2006].

2.1.2 Mikrobiologische Risiken – Getränkeschädlinge im AfG-Bereich

Fruchtsäfte besitzen aufgrund des Säuregehalts einen Eigenschutz, der für die meisten pathogenen Mikroorganismen lebenswidrige Bedingungen bietet. Getränkeschädlinge bzw. Verderbsorganismen sind hauptsächlich Hefen, Schimmelpilze, Milchsäurebakterien, Essigsäurebakterien, Bazillen und Alicyclobazillen. Aufgrund des zumeist niedrigen pH-Wertes von ca. 2,5-4,5 können fast ausschließlich acidotolerante oder acidophile Spezies wachsen (Back, 2000) (Back, 2008) (Snaidr, et al., 2008) (Firnhaber, 1999). Diese Organismen haben meist zugleich eine höhere Osmotoleranz, wodurch sie in Fruchtsäften und ähnlichen Produkten wachsen können (Klein, et al., 2009). Kontaminationen mit diesen Organismen sind in den seltensten Fällen gesundheitsgefährdend für den Verbraucher. Wichtiger ist in dieser Hinsicht die Produktakzeptanz. Verdorbene Produkte führen zu Imageschäden und Verlusten (Snaidr, et al., 2008). Durch Karbonisieren der Getränke, zum Beispiel in Fruchtsaftschorlen, wird ein fast anaerobes Umfeld geschaffen und die Zahl der potentiellen Verderbsorganismen weiter begrenzt. Diese Getränke sind dennoch anfällig für Milch- und Essigsäurebakterien sowie Hefen. Nicht-karbonisierte Getränke werden meistens pasteurisiert, um vegetative Keime zu eliminieren. Vertreter der Gattung *Alicyclobacillus* sind als Sporenbildner in der Lage, diesen Temperatureinfluss zu tolerieren. Somit können nach der Pasteurisation Produktschäden entstehen (Snaidr, et al., 2008).

Hefen. Hefen sind die wohl am häufigsten auftretenden Getränkeschädlinge und unter Anderem nach ihrer Gärfähigkeit eingestuft (Tabelle 2-1) (Back, 2000) (Back, 2008).

Tabelle 2-1 Einteilung und Beispiele verschiedener Hefen nach Back (2000)

gärkräftig	***gärfähig***	***gärschwach***	***Atmungshefen (nicht gärfähig)***
Saccharomyces cerevisiae	*Saccharomyces kluyveri*	*Candida boidini*	*Rhodotorula glutinis*
S. cerevisiae var. *uvarum*	*Torulaspora delbrückii*	*Pichia anomala*	*Cryptococcus albidus*
Zygosaccharomyces bailii	*Zygosaccharomyces microellipsoides*	*Brettanomyces claussenii*	viele Kahmhefen

Saccharomyces cerevisiae gehört zu den gärkräftigen Hefen und tritt am häufigsten in Erscheinung. Weitere Vertreter der gleichen Gattung weisen Unterschiede in der Gärfähigkeit

auf. Durch die hauptsächliche Verwertung von Saccharose, Glucose und Fructose entsteht zumeist ein typisches Gäraroma, das vor allem durch bestimmte Ester, Diacetyl, (2,3)-Pentadion oder Schwefelverbindungen hervorgerufen wird. Ein Auftreten von Bombagen durch CO_2-Produktion ist möglich (Back, 2000). Dabei kann Ethanol in Mengen von über 3,0 g / l (Grenzwert) produziert werden, was die Verkehrsfähigkeit ausschließt [Leitsätze für Fruchtsäfte, 2002] (Back, 2000). Vereinzelt können sogar pathogene Hefen wie Stämme der Art *Candida albicans* in unmittelbarer Umgebung der Fruchtsaftproduktionsstätten nachgewiesen werden (Back, 2000).

Bakterien. Bakterien beschränken sich in diesem Zweig der Lebensmittelbranche auf verhältnismäßig wenige Gattungen. Diese können jedoch Trübungen sowie sensorisch wahrnehmbare Fehlaromen hervorrufen (Back, 2000). Milchsäurebakterien wie *Leuconostoc mesenteroides* oder *Lactobacillus paracasei* vergären Saccharose, wodurch Diacetyl entsteht (Firnhaber, 1999) (Back, 2000). Die Unterart *dexstranicum* des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* verursacht weiterhin eine Viskositätserhöhung durch Schleimbildung. Ferner können in seltenen Fällen auch Essigsäure-produzierende Bakterien auftreten (Back, 2000). Seit den achtziger Jahren wurden mehr und mehr Fälle von Fruchtsaftverderb der Gattung *Bacillus* zugeordnet, deren thermo-acidophilen Vertreter zu einer neuen Gattung, den Alicyclobazillen, zusammengefasst wurden (Wisotzkey, et al., 1992). Der Name ist von den ω-alicyclischen Fettsäuren hergeleitet, die als Hauptbestandteil der Membran identifiziert werden konnten (Lee, et al., 2002). Die Gattung *Alicyclobacillus* zeichnet sich als Fruchtsaft-verderbender Organismus unter Anderem durch die Bildung von Metaboliten aus, die einen medizinischen, Rhabarber-ähnlichen oder Desinfektionsmittelgeruch oder -Geschmack bewirken. Verantwortlich ist vor Allem der Stoff Guajakol (Jensen, et al., 2003) (Pettipher, et al., 1997) (Borlinghaus, et al., 1997). Ein sogenannter Precursor von *Alicyclobacillus acidoterrestris* zur Produktion von Guaiakol ist Vanillinsäure, die die Vorstufe der geruchsaktiven Substanz darstellt (Yokota, et al., 2008) (Savaş Bahçeci, et al., 2005). Des Weiteren produzieren nicht alle Arten dieser Gattung den geruchsaktiven Stoff Guajakol (Chang, et al., 2005). Wichtige Vertreter, die den charakteristischen Off-Flavour verursachen sind *A. acidoterrestris* und *A. acidocaldarius* (Smit, 2009) (Chang, et al., 2013) (Chang, 2008). Die Gattung ist Gram-positiv, stäbchenförmig und betreibt einen aeroben Stoffwechsel. Hauptcharakteristikum ist die pH- und Temperaturresistenz. Der D-Wert beträgt laut Jensen (1999) $D_{95°C}$ = 5,3 min (z = 9,5°C, in OrangenSaft, pH 4,1, 5,3°Brix). Die

Brisanz des Auftretens von *Alicyclobacillus acidoterrestris* kann diesbezüglich durch die Tabelle 2-2 verdeutlichet werden.

Tabelle 2-2 D- und z-Werte von *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Produkt	***°Brix***	***pH***	***Erhitzungs-Temperatur (°C)***	***D-Wert (min)***	***z-Wert (°C)***	***Quelle***
Apfelsaft	11,4	3,5	85 90 95	56,0 23,0 2,8	7,7	(Splittstoesser, et al., 1994)
Apfelsaft	11	3,55	88 90 92 95	22,7-35,8 13,9-18,8 7,6-11,3 2,2	6,4-7,5	(Previdi, et al., 1997)
Orangensaft	11,2	3,82	88 90 92 95	30,2-44,2 16,2-21,9 9,7-12,6 3,4-3,6	6,5-7,4	(Previdi, et al., 1997)
Orangensaftgetränk	4,1	5,3	95	5,3	9,5	(Baumgart, et al., 1997)

Verschiedene Quellen schildern unterschiedliche D-Werte, abhängig von Substrat, °BRIX, pH-Wert und Temperatur. Dennoch kann dieser Organismus selbst nach über ca. 2 Minuten bei 95°C in Sporenform überleben. Alkoholfreie Getränke wie Fruchtsäfte werden in der Regel pasteurisiert, wodurch ein gewisses Gefahrenpotential bestehen bleibt. *Alicyclobacillus spp.* ist zur Endosporenbildung befähigt (Jensen, 1999). Er vermehrt sich bei pH-Werten zwischen 2,2 und 5,8 (Wisotzkey, et al., 1992). Lee et al. (2002) fanden in einer Studie heraus, dass 60% der von ihnen befragten Unternehmen Erfahrungen mit Verderbserscheinungen hatten. Davon gingen 35% auf *Alicyclobacillus acidoterrestris* zurück (Lee, et al., 2002). Weiter schildern verschiedene Autoren, dass die Anwesenheit zumeist erst durch Reklamationen bekannt wird (Pinhatti, et al., 1997) (Walls, et al., 1998). Weitere Quellen beschreiben unterschiedlich hohe Kontaminationsrisiken durch *Alicyclobacillus spp.* in Abhängigkeit der Fruchtsaftart als Substrat (Tabelle 2-3) (Müller, et al., 2002) (Friedrich, et al., 2009) (Walker, et al., 2008).

Tabelle 2-3 Kontaminationsrisiken durch *Alicyclobacillus spp.*

Produktart	***Kontaminationsrisiko in %***
Apfelsaft zum Anmischen	9,0 – 42,1
Apfelsaftkonzentrat	30,5 – 75,0
Orangensaftkonzentrat	82,1
Frisch gepresste Produkte/Direktsäfte	32,0
Orangensaft	17,4
Fruchtkonzentrate (Orange, Mango, Kokosnuss, Ananas)	8,0

nach (Müller, et al., 2002) (Friedrich, et al., 2009) (Walker, et al., 2008)

Ein weiteres Risiko der Fruchtsaft-produzierenden Industrie ist die Formierung von Biofilmen bei dauerhaft unzureichender Reinigung oder längeren Standzeiten der Apparate und Anlagen. Im Abschnitt 2.2 werden die Gefahren von Biofilmen im Kontext der Reinigung und Desinfektion geschildert.

Schimmelpilze. Schimmelpilze sind nahezu in der gesamten Wertschöpfungskette von Fruchtsäften vertreten. Kontaminationen erfolgen bereits beim Anbau und der Ernte der Früchte. Sie sind ubiquitär verbreitet und können Fruchtsäfte mit niedrigem pH-Wert verderben (Firnhaber, 1999). Ihr Wachstum ist allerdings an das Vorhandensein von Sauerstoff gebunden. Für Fruchtsaftbetriebe können Schäden daher vorwiegend in stillen, nicht-karbonisierten Getränken auftreten. Natürlicherweise findet das Wachstum in verschlossenen Flaschen oder anderen Verpackungen an der Oberfläche des Produktes statt, da hier Restsauerstoff im Kopfraum des Gefäßes verbleibt. Bei einem Befall von Schimmel entstehen neben visuellen Schäden auch oft ein bitterer Geschmack sowie ein muffiger Geruch (Back, 2000). Neben der Gefahr der Synthese von Mykotoxinen (z.B. Patulin, Abschnitt 2.1.1) besteht eine weitere unerwünschte Eigenschaft. Durch die pektolytische Aktivität, das Freisetzen von Pektinesterasen, kann in trüben Getränken das Pektingerüst abgebaut werden, was ein Ausklaren der Säfte sowie einen unerwünschten Bodensatz und Flockenbildung hervorrufen kann (Back, 2000). Back (2000) beschreibt innerhalb der Fruchtsaftindustrie das Auftreten zweier besonders häufig vorkommender Schimmelpilze, die entweder grüne (*Penicillium expansum*) oder schwarze Myzelien (*Aspergillus niger*) bilden. Der verhältnismäßig schnell wachsende Schimmelpilz *Aspergillus niger* gehört zur Gruppe der Ascomyceten. Aspergillus-Arten sind oft auch unter dem Namen Gießkannenschimmel

bekannt. Der filamentöse Pilz ist ubiquitär verbreitet und weitestgehend pH-tolerant (Gautam, et al., 2011). Er spielt in der Biotechnologie eine entscheidende Rolle bei der Gewinnung organischer Säuren und Enzymen unter kontrollierten Bedingungen (Ali, et al., 2002) (Baker, 2006) (Schuster, et al., 2002). Durch die biotechnologische Nutzung erhielt er auf diesem Gebiet den sogenannten GRAS-Status durch die FDA (Gautam, et al., 2011) (Perrone, et al., 2007). Aufgrund seiner weiten Verbreitung kommen Verbraucher jedoch ständig in Kontakt mit der vegetativen Form sowie Sporen des Pilzes, der bei immunsensiblen Menschen allergische Reaktionen verursachen kann (Gautam, et al., 2011). In unkontrollierbarer Umgebung ist er in der Lage, Mykotoxine wie Ochratoxin A (OTA) zu bilden (Soares, et al., 2013) (Joosten, et al., 2001) (Lucchetta, et al., 2010) (Abarca, et al., 1994), dass als Schimmelpilzgift eine schlecht einzuschätzende Gefahr für Verbraucher darstellt (Abarca, et al., 1994). Aufgrund seines Stoffwechsels und den genannten Lebensweisen ist dieser Pilz ein weiterer Verderbsorganismus, der für Fruchtsäfte als Substrate relevant ist (Back, 2000). Arten der Gattung *Penicillium* (Pinselschimmel) haben in der Lebensmittelindustrie eine vielfältige Bedeutung. *Penecillium expansum* ist wie *Aspergillus niger* ein ebenfalls schnell wachsender Pilz. Visuell äußert sich ein Befall in der Praxis durch eine gelb-grüne bis blau-grüne Erscheinung durch die Bildung von Konidien, die für Sekundärkontaminationen verantwortlich sein können (Back, 2000). Einige Arten, wie *Penicillium expansum*, sind in der Lage, Patulin zu produzieren. Das Auftreten von Patulin ist demnach Indikator für eine Schimmelkontamination (Andersen, et al., 2004) (Sommer, et al., 1974) (Harwig, et al., 1973). Bezüglich der Höchstgehalte laut VO (EG) Nr. 1881/2006 wird für Patulin ein Grenzwert von 50 µg/kg Produkt angegeben (Abschnitt 2.1.1) [VO (EG) Nr. 1881/2006]. Besonders *Penecillium expansum* ist in Fruchtprodukten häufig für die Produktion von Patulin verantwortlich. In einer Studie von Tournas et al. (2006) wurden verschiedene Arten von Fruchtsäften auf Kontaminationen mit Schimmelpilzen untersucht. Es stellte sich heraus, dass 22 % der Proben mit Schimmelpilzen kontaminiert waren. Dabei handelte es sich unter Anderem um *Penecillium expansum* (Tournas, et al., 2006).

2.2 Reinigung, Desinfektion und Hygieneanforderungen

Verschmutzungen in der Getränkeindustrie können verschiedenste Ursachen haben und müssen nicht zwangsläufig mit Mikroorganismen assoziiert sein. Generell unterscheidet man in der Lebensmittel- bzw. in der Getränkeindustrie Produktionsrückstände und technologisch-maschinentechnische Rückstände (Tabelle 2-4) (Schröder, 1998).

Tabelle 2-4 Typische Verschmutzungen in der Getränkeindustrie (Schröder, 1998)

Art der Verschmutzung	***Produktionsrückstände***	***Technologisch-maschinentechnische Rückstände***
wasserlöslich	Zucker, Säuren, Salze	Reste von Reinigungsmittelbestandteilen
säurelöslich	z.B. Bierstein	Wasserhärteausfällungen
wasserquellbar	Polysaccharide und Eiweißverbindungen	Leime, Klebstoffe, Dextrine
emulgierbar	flüssige Fette, Öle, Lipoide	flüssige Schmier- und Dichtungsstoffe, Pflanzenöle
suspendierbar	Ablagerungen, Staub, grobe Feststoffe	Metall- und anderer Abrieb, Feststoffablagerungen

Die Wirkung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln im Lebensmittelbereich ist stark an den Hygienestatus bzw. das Risikopotential eines lebensmittelverarbeitenden Betriebes gebunden. Geeignete Mittel zeichnen sich durch eine gute Wirksamkeit sowie einer guten Materialverträglichkeit aus. Die Bildung von Rückständen sollte so gering wie möglich sein (Brunner, et al., 2000). Eine optimale Reinigung, gleichbedeutend mit einem möglichst vollständigen Entfernen organischer Bestandteile, reduziert die Anzahl von Mikroorganismen bis zu 99 % (Schmidhofer, 1988). Weiterhin ist die Entstehung von Biofilmen ein Problem der Lebensmittelindustrie. Dabei formieren sich Mikroorganismen und schließen dabei auch extrazelluläre, organische und anorganische Substanzen ein. Diese können sie vor äußeren Einflüssen schützen. Rückstände aus Produktionsprozessen begünstigen die Kolonisierung der Mikroorganismen (Bakke, et al., 1984) (Allison, et al., 1987) (Ganesh Kumar, et al., 1998). Ein Biofilm ist demnach eine funktionelle Einheit, die in extrazellulären polymerischen Substanzen (EPS) eingebettet ist (Costerton, et al., 1987) (Ganesh Kumar, et al., 1998). Die Bildung von Biofilmen durch pathogene Spezies ist generell eine Gefahr der

Lebensmittelbranche. Mikroorganismen wie *Listeria monocytogenes*, *Yersina enterocolitica*, *Campylobacter jejunii* oder *Escherichia coli* O157:H7 zählen dazu (Farber, et al., 1991) (Kumar, et al., 1994) (Stern, et al., 1989) (Doyle, et al., 1988) (Doyle, 1991). In der Fruchtsaftproduktion sind diese genannten Keime aufgrund der niedrigen pH-Werte der Produkte jedoch nicht oder nur sehr selten anzutreffen (Back, 2000). In Fruchtsaft-verarbeitenden Betrieben ist im Bezug auf Biofilme der in Abschnitt 2.1.2 beschriebene Keim *Alicyclobacillus acidoterrestris* relevant. Dos Anjos et al. (2013) untersuchen die Resistenz von Sporen dieses Keims gegenüber verschiedenen industriellen Desinfektionsmitteln, sowie die Bildung von Biofilmen. Edelstahl- und Nylon-Oberflächen zeigen höhere Zelladhäsionen als PVC-Oberflächen. Peressigsäure erwies sich als das effektivste Mittel gegen *A. acidoterrestris*, wobei die Keimzahl um drei Zehnerpotenzen auf PVC-Oberflächen reduziert wurde. Andere Desinfektionsmittel reduzierten die Keimzahl um 2 Zehnerpotenzen (dos Anjos, et al., 2013). Abgesehen von bakteriellen Sporenbildnern wurden verschiedene Arten von Hefen ebenfalls auf die Bildung von Biofilmen untersucht. Dabei ist das Vorhandensein stehender Flüssigkeiten nicht zwingend notwendig. Brugnoni et al. (2011) beschrieben die Bildung von Biofilmen durch die Arten *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, *Zygosaccharomyces spp.* und *Rhodotorula mucilaginosa* während laminarer Strömung des umgebenden Mediums. Die Autoren fanden heraus, dass Zellzahlen von *Kluyveromyces marxianus*, *Candida krusei*, und *Rhodotorula mucilaginosa* unter laminaren Strömungsbedingungen um eine Zehnerpotenz geringer ausfielen als unter stationären Bedingungen. Ausnahme bildete *Zygosaccharomyces spp.*. Der Organismus zeigte um 0,5 Zehnerpotenzen höhere Zellzahlen (Brugnoni, et al., 2011).

Die Inaktivierung von bakteriellen Sporenbildnern und ihren Dauerformen ist für Produzenten von Lebensmitteln wie Fruchtsäften von entscheidender Bedeutung. Reinigungsmittel in CIP-Anlagen müssen eine ausreichende reduzierende Wirkung auf Endosporen haben. Friedrich et al. (2009) untersuchten den Keimzahl-reduzierenden Effekt von Chlordioxid (aq) und Natriumhypochlorid auf die Endosporenform von *Alicyclobacillus spp.* auf Edelstahl-, Holz- und Gummi-Förderband-Oberflächen. Die Flächen wurden mit Sporensuspensionen kontaminiert und unterschiedlich lang mit dem jeweiligen Mittel behandelt. Nach der Behandlung wurden die Oberflächen neutralisiert und die Keimzahl bestimmt. Die Konzentrationen von 50-100 ppm Chlordioxid (aq) und 1000-2000 ppm Natriumhypochlorid erwiesen sich als die effektivsten Anwendungen. Den geringsten Effekt hatte Chlordioxid (aq) auf Holzoberflächen (Friedrich, et al., 2009).

Übergreifend unterliegen Reinigungsprozesse nationalen und internationalen Vorschriften der Lebensmittelhygiene. In Deutschland dient die Lebensmittelhygiene-Verordnung [LMHV, 2007] als Bestandteil des nationalen Rechts der Umsetzung und Durchführung von Vorgaben der Europäischen Gemeinschaft bezüglich der Lebensmittelhygiene. Die Verordnung (EG) Nr. 852/2004 regelt unter Anderem die Gefahrenanalyse und den Umgang mit kritischen Kontrollpunkten sowie die Handhabung der Guten Hygienepraxis (GHP, Art. 8) [VO (EG) Nr. 852/2004]. Darüber steht die Verordnung (EG) Nr. 178/2002, die in Deutschland durch das Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch komplettiert wird [LFGB, 2005]. Darin befindet sich eine Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren für bestimmte Lebens- und Futtermittel [§64 LFGB, 2005]. Es existieren in Deutschland verschiedene Richtlinien und Normen in Bezug auf die Auslegung von Anlagen im Lebensmittelbereich sowie deren Hygienic Design. Diese Empfehlungen und Normen haben meist sehr ähnliche Ziele. Zur hygienegerechten Gestaltung von Maschinen und Bauteilen gibt es in Deutschland die Vorschrift der DIN EN ISO 14159 (2008). Demnach muss die Reinigbarkeit oder gegebenenfalls die Desinfizierbarkeit bei allen Anlagenteilen gewährleistet sein. Oberflächen müssen weiterhin eine ausreichende Beständigkeit gegenüber Beschädigungen aufweisen. Produktberührende Bereiche sollten korrosionsbeständig, inert und temperaturbeständig sein [DIN EN ISO 14159, 2008]. Nahrungsmittelmaschinen betreffend gibt es die Norm DIN EN 1672-2:2009. Hier gilt beispielhaft, für Wellen und Lager eine ausreichende Reinigung zu gewährleisten. Schmierstoffe von rotierenden Anlagen müssen lebensmittelecht sein. Produktgeschmierte Wellen und Lager müssen gut zu reinigen sein [DIN EN 1672-2, 2009]. Durch die Vorschrift DIN EN ISO 21469 (2006) wird der Umgang mit Schmierstoffen bezüglich der Produkt- und Maschinensicherheit geregelt [DIN EN ISO 21469, 2006].

Bei der Produktion alkoholfreier Getränke sind Edelstähle bevorzugte Materialien für produktführende Bereiche und Oberflächen. Ferner finden Emaille-Oberflächen Anwendung im Bereich der Tanklager. Die European Hygienic Engineering & Design Group (EHEDG) erließ eine Richtlinie, in der „Gestaltungskriterien für hygienegerechte Maschinen, Apparate und Komponenten“ sowie notwendige Eigenschaften verschiedener Edelstahlsorten festgelegt sind. Auch Kondensationen sollten in diesen Bereichen vermieden werden oder Anlageteile und deren Peripherie so ausgelegt sein, dass Kondensat aus produktführenden Bereichen kontrolliert abgeleitet werden kann. Für CIP-fähige Anlagen muss außerdem der Beweis erbracht werden, dass ein ausreichendes Reinigungsergebnis ohne Demontage der Anlage

erzielt werden kann [EHEDG, Doc. 8, 2004]. Hinweise auf die Vermeidung von Totpunkten gibt darüber hinaus die Richtlinie 2006/42/EG (Maschinenrichtlinie). Alle Produktberührenden Teile müssen so konzipiert sein, dass sie eine ausreichend glatte Oberfläche besitzen. Sie dürfen des Weiteren keine Erhöhungen oder Vertiefungen aufweisen, an denen organische Reste verbleiben könnten. In Rohrleitungen müssen stehende Flüssigkeiten vermieden werden [Richtlinie 2006/42/EG, 2006]. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Oberflächenrauigkeit. Diese wird vor Allem durch den sogenannten Mittenrauwert R_a verdeutlicht. Nach der genannten Richtlinie müssen Oberflächen, die rauer als R_a = 0,80 µm sind, einem Reinigungstest unterzogen werden. Die Norm DIN EN ISO 14159 (2008) fordert beispielsweise Praxistests, die unter anderem die Reinigbarkeit bestätigen müssen. Routineabläufe sollen in einem Betriebshandbuch festgehalten werden. Darin sollten Anleitungen für eine eventuelle Demontage einer Maschine zu Reinigungszwecken enthalten sein. Für die Reinigung und Desinfektion von Oberflächen, Räumen, Geräten und Vorrichtungen gilt die Norm DIN 10516 über die Lebensmittelhygiene, die eng mit der Verordnung EG Nr. 852/2004 in Verbindung steht [DIN 10516, 2009-05] [VO (EG) Nr. 852/2004]. Die darin enthaltenen Anweisungen sind Anleitungen zur Planung und Durchführung von Reinigungsprozessen während der Herstellung, dem Behandeln oder Inverkehrbringen von Lebensmitteln. In Bezug auf die Auswahl von Werkstoffen für den Kontakt mit Lebensmitteln schildert die Norm DIN 10528:2009-06 die Vorgehensweise zur Selektion von Werkstoffen, die für Lebensmittel in Frage kommen [DIN 10528:2009-06].

Der Bundesverband Güterverkehr Logistik und Entsorgung (BGL) e. V. veröffentlichte weiterhin die „*Leitlinie für eine gute Hygienepraxis beim Lebensmitteltransport*“. Diese schafft Voraussetzungen für eine Hygienegerechte Beförderung von Lebensmitteln [BGL e. V. / TD – Leitlinie, 2012]. Der Deutsche Verband für Tankinnenreinigung (DVTI) ermöglicht weiterhin einen Informationsaustausch zur Verbesserung und Aufrechterhaltung von Sicherheitsstandards, Arbeitssicherheit, Umweltschutz und Qualitätssicherung. Er gibt Empfehlungen zur Umsetzung spezieller Maßnahmen. Für Fruchtsäfte gibt es dahingehend den Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie, der eine Leitlinie über „*Spezielle Qualitätsanforderungen an Transporte in Tankzügen für die Fruchtsaft-Industrie*“ herausgegeben hat. Darin sind unter Anderem Grenzwerte von Reinigungskontrollen festgehalten. Weiterhin müssen auf dem zu erstellenden Endprotokoll Sicht- und Geruchsprüfung dokumentiert werden. Für Biolumineszenzmessungen wird ein Wert von weniger als 150 RLU als Mindestanforderung für Standard-Reinigungen angegeben [VdF-

Leitlinie, 2012]. Auch die ENFIT-Leitlinie beruft sich zunächst auf einen Lumineszenzmesswert von <150 RLU für gereinigte Flächen. Weiterhin wird darauf verwiesen, dass eine individuelle Anpassung des Wertes stattfinden kann [ENFIT-Leitlinie, 2011]. Für Trübungsmessungen gilt laut VdF-Leitlinie ein Grenzwert von 1,0 NTU des verwendeten Wassers. Die Leitfähigkeit darf 2500 µS/cm nicht überschreiten. Der pH-Wert richtet sich nach dem zur Reinigung verwendeten Trinkwasser mit tolerierten Abweichungen von ± 0,5 [VdF-Leitlinie, 2012]. Gefährdungen der Tankhygiene sind oft auf Mikroorganismen zurückzuführen. Eine Kontrolle der mikrobiologischen Reinheit ist im Hinblick auf die genannten Vorschriften und Leitlinien zwingend notwendig.

2.3 Verfahren zur Beurteilung mikrobiologischer Risiken

2.3.1 Konventionelle, analytische und alternative Untersuchungsmethoden

Die Unterscheidung zwischen *Bacillus* und *Alicyclobacillus* kann für Fruchtsafthersteller von entscheidender Bedeutung sein. Al – Holy et al. (2015) beschreiben eine Möglichkeit der Unterscheidung von *Bacillus*-und Alicyclobacillus-Arten per Fourier Transform Infrarot Spektroskopie. Sie identifizierten und unterschieden 4 *Alicyclobacillus*-und *Bacillus*-Arten, die in Apfelsaft angereichert wurden. Allein die Unterscheidung zwischen *Alicyclobacillus*-Stämmen wurde durch Lin et al. (2005) mit diesem Verfahren erreicht (Al – Holy, et al., 2015) (Lin, et al., 2005). Zur Differenzierung, zum Nachweis und zur Unterscheidung von Mikroorgansimen können weiterhin molekularbiologische Methoden angewendet werden. Vor Allem im Bereich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind vielfältige Anwendungen – klassischerweise in Verbindung mit einer elektrophoretischen Auftrennung – möglich (Müller, 2001). Durch die Genomsequenzierung und der spezifischen Primersynthese können per Multiplex-Real-Time-PCR mehrere Organismen in einem Lauf nachgewiesen werden. Dafür kommt zumeist ein Sonden-basiertes System, zum Beispiel Taq Man™-Sonden, zum Einsatz. Diese sogenannten fluorogenen Sonden bestehen aus einer zum RNA- oder DNA-Zielstrang komplementären Sequenz, die endständig mit fluorogenen Molekülen gelabelt sind. Diese Moleküle werden als Reporter und Quencher bezeichnet. Letzterer unterdrückt ein Fluoreszenzsignal des Reportermoleküls solange eine räumliche Nähe zwischen beiden besteht. Die Sonden und spezifischen Primersequenzen, die dem Zielorganismus angepasst sind, lagern sich nach thermischer Aufspaltung/Denaturierung der DNA an die Zielsequenzen. Durch die Aktivität der Polymerase werden die Primer verlängert und somit die Sonde verdrängt. Die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher ist nicht mehr gegeben. Der

Reporter emittiert Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, die dann photometrisch erfasst werden kann. Die Strahlungsmenge ist proportional zur Anzahl oder Menge vorhandener Zielsequenzen. Mit dieser Methode ist darüberhinaus eine Quantifizierung möglich. Das Verfahren lässt sich prinzipiell auf alle lebenden, vermehrungsfähigen Organismen anwenden (Tevfik Dorak, 2006) (Zagon, et al., 2006). Mit der HPLC ist weiterhin der Nachweis von ATP möglich. Prevost et al. (1991) entwickelten eine Methode zum Nachweis von ATP aus Bodenproben. Der ATP-Gehalt wird hier als ein Indikator der mikrobiellen Biomasse beschrieben. Zur Durchführung der Methode benutzten die Autoren eine C18 Säule. Sie setzten einen 50 mmol NaH_2PO_4-Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 ein. Die Extraktionslösungen waren 8 % Perchlorsäure (PCA) sowie 0,5 molare Trichlor-Essigsäure (TCA). Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines nachgeschalteten UV-spektro-photometrischen Detektors. Es wurden Wiederfindungsraten von 36-79 % erreicht. Der ATP-Gehalt der Proben erstreckte sich über einen Bereich von 73-2470 ng / g (Prevost, et al., 1991). Auch zur Beurteilung der Qualität von Fisch kann ATP und dessen Abbauprodukte mit der HPLC nachgewiesen werden. Dabei dient der ATP-Gehalt als Indikator für die Frische der der Produkte (Ryder, 1985).

2.3.2 Praxisrelevante Methoden zur Untersuchung von Oberflächen

Eine Möglichkeit, den mikrobiologischen Zustand von Oberflächen zu untersuchen, ist das sogenannte Direct Surface Agar Plating. Bei diesem Abklatschtest kommt eine mit Nährmedium beschichtete Abklatschvorrichtung zum Einsatz, die gegen die zu untersuchende Oberfläche gedrückt wird. Das Verfahren ist für die Zellzahlbestimmung verschiedener Mikroorganismen geeignet. Nachteil ist wie bei anderen mikrobiologischen Methoden die Inkubationszeit bis zum Vorliegen eines Ergebnisses (Jay, et al., 2005). Die Methodik entspricht im Wesentlichen der DIN 10113-3. Die Norm DIN 10113 beschreibt die Vorgehensweisen zur „Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich“. Sie beinhaltet drei Methoden, die den mikrobiellen Zustand einer Oberfläche betrachten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode ist das Verfahren nach DIN 10113-1, das in Abschnitt 0 genauer erläutert wird. Dabei handelt es sich um das quantitative Tupferverfahren. Das semiquantitative Verfahren laut DIN 10113-2 richtet sich nach dem Erstgenannten mit dem Unterschied, dass zum Abstrich statt zweier Tupfer – trocken und angefeuchtet – lediglich ein Tupfer (trocken) verwendet wird. Die Vorgehensweise ist prinzipiell identisch. Weiter gibt es das sogenannte Abklatsch-Verfahren nach DIN 10113-3, bei dem nährbodenbeschichtete

Entnahmevorrichtungen zum Einsatz kommen. Hierbei gibt es verschiedene kommerziell erhältliche Systeme, bei denen eine mit Nährmedium beschichtete Vorrichtung aus Glas oder Kunststoff gegen eine Oberfläche gedrückt wird. Die Vorrichtung muss in einem verschließbaren Transportgefäß untergebracht sein. In der Praxis haben sich sogenannte „Dip Slides“ bewährt (siehe Abschnitt 0, Schimmeldetektion). Im Vergleich zu den ebenfalls kommerziell erhältlichen Rodac-Platten, die eine nach außen gewölbte Nährbodenbeschichtung aufweisen, haben sie den Vorteil, dass sie beidseitig beschichtet sein können, oft mit 2 unterschiedlichen Nährmedien zum spezifischen und unspezifischen Nachweis von Mikroorganismen. Der Vorgang besteht im Wesentlichen aus den Schritten des Abklatsches, wobei eine Haltezeit von 5 Sekunden erforderlich ist; anschließend wird die jeweilige Entnahmevorrichtung im Transportgefäß je nach Zielkeimgruppe inkubiert. Zumeist kommen Nährmedien wie Plate Count Agar zum Einsatz. Oberflächenspezifische Untersuchungsmethoden müssen darüberhinaus nicht zwangsläufig mit Mikroorganismen zusammenhängen. Poulis et al. (1993) führten dahingehend zusätzlich zu ATP-Messungen einen TTFC-Test durch. Der Tissue Fluid Contamination Test (TTFC) ist im Teststreifenformat erhältlich und kann dazu verwendet werden, Peptide oder reduzierende Zucker zu erkennen. So werden zusätzlich organische, nicht-mikrobielle Kontaminanten erfasst.

2.3.3 Beurteilung des Hygienestatus per Biolumineszenz

Derzeit ist die Nutzung der Biolumineszenz-Reaktion als Indikator für Verschmutzungen in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet. Als Teil von Gefahrenanalysen und zur Beurteilung kritischer Kontrollpunkte dient sie der Prozesskontrolle- bzw. Beherrschung (Shama, et al., 2013). ATP entsteht durch die Stoffwechselvorgänge Atmung und Gärung. Die Erträge sind dabei sehr unterschiedlich. Wird ATP durch Atmung gewonnen (36 ATP, 2 GTP), so entsteht das 19-fache an ATP im Vergleich zur alkoholischen oder Milchsäuregärung (2 ATP). Dieser Fakt ist im Bezug auf die Stoffwechselaktivität von getränkeschädlichen Keimen zu berücksichtigen. Sauerstoffabhängige oder fakultativ aerobe Organismen produzieren während des Wachstums demnach tendenziell mehr ATP als anaerobe oder mikro-aerophile Organismen wie Milchsäurebakterien. Hefen besitzen die Besonderheit als fakultative Anaerobier bei Sauerstoffmangel Gärung zu betreiben. Dabei steigt der Glukoseverbrauch auf das 6-8-fache des Atmungsprozesses, in dem entscheidend weniger Glucose verbraucht wird (Pasteur-Effekt) (Racker, 1974) (Horton, et al., 2008). Die Reaktion der Biolumineszenz setzt

die Anwesenheit von Adenosintriphosphat (Abbildung 2-1) voraus, das in allen lebenden Zellen zu finden ist.

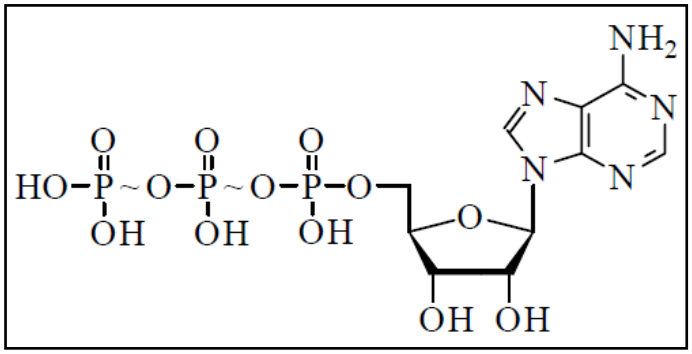


Abbildung 2-1 Struktur eines Adenosintriphosphat-Moleküls (Căpriţă, et al., 2005)

Die Reaktion basiert auf dem Enzym Luciferase, dass für gewöhnlich aus Leuchtkäfern der Gattung *Photinus* isoliert wird (Shama, et al., 2013) (Marques, et al., 2008). Die Leuchtkäfer-Luciferase (EC 1.13.12.7.) ist ein Protein mit einer Molekülmasse von ca. 62.000 Dalton. Dieses ist als Monomer aktiv (Căpriţă, et al., 2005) (Blum, et al., 2006) und besteht aus 2 Untereinheiten (Hall, et al., 1989). Ein Molekül Luciferase bindet 2 Luciferinmoleküle, 1 Mg-ATP-Komplex, 2 ATP sowie 1 Molekül Luciferyladenylat. Es besitzt weiter 2 essentielle SH-Gruppen und ist sehr hydrophob (Hall, et al., 1989). Das Substrat Luciferin wird in Anwesenheit von Sauerstoff und Magnesiumionen zu Oxiluciferin umgesetzt. Dabei wird ATP zu AMP abgebaut. Weiterhin werden Pyrophosphate frei. Die Emittierung von Licht erfolgt im Wellenlängenbereich von 470 bis 700 nm (Gelb bis Grün). Die maximale Emission liegt bei 562 nm (Shama, et al., 2013). Die Wirkungsweise des Enzyms vollzieht sich in mehreren Schritten und wird in den Gleichungen 1-3 dargestellt (Căpriţă, et al., 2005) (Blum, et al., 2006) (Roda, 2011). In der ersten Gleichung wird durch das Enzym Luciferase und D-Luciferin unter ATP-Verbrauch in Anwesenheit von Mg^{2+} Pyrophosphat abgespalten. Es entsteht Luciferyladenylat (Căpriţă, et al., 2005).

$$Luc + LH_2 + ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} Luc \cdot LH_2^- AMP + PP_i \qquad \text{(Gl. 2-1)}$$

$$Luc \cdot LH_2^- AMP + O_2 \longrightarrow Luc \cdot Oxyluciferin^* + AMP + CO_2 \qquad \text{(Gl. 2-2)}$$

$$Luc \cdot Oxyluciferin^* \longrightarrow Luc \cdot Oxyluciferin + Licht \qquad \text{(Gl. 2-3)}$$

Luc = Luciferase; LH_2 = D – Luciferin; PP_i = Pyrophosphat; * = Elektron in angeregtem Zustand; (Căpriţă, et al., 2005) (Blum, et al., 2006) (Roda, 2011).

In Anwesenheit von Sauerstoff reagiert Luciferyladenylat zu Oxyluciferin unter Entstehung von AMP und CO_2. Die Entstehung von Licht wird durch den Übergang aus einem angeregten Zustand des Zwischenprodukts in den Grundzustand bewirkt (Căpriţă, et al., 2005). Der durchschnittliche ATP-Gehalt von Bakterien beträgt laut Trautsch (2003) 1 fg pro Zelle. Somatische Zellen enthalten 30 mal und Hefezellen bis zu 100 mal mehr ATP. Pseudomonaden weisen einen höheren Gehalt auf als Enterobakterien, Kokken dagegen einen niedrigeren als Stäbchenbakterien. Tabelle 2-5 zeigt verschiedene Untersuchungen zu ATP-Gehalten unterschiedlicher Mikroorganismen. Sporen enthalten laut Trautsch (2003) kein ATP (Trautsch, 2003). Verschiedene Quellen behaupten das Gegenteil. Shama et al. (2013) berufen sich auf eine Aussage von Venkateswaran et al. (2003), die den ATP-Gehalt einer Endospore mit $1{,}0 * 10^{-21}$ mol angeben.

Tabelle 2-5 Beispiele von Mikroorganismen und ermittelte ATP-Gehalte laut Literatur

Organismus	***ATP pro Zelle (mol)***	***Publikation***
Mycobacterium tuberculosis (Laborkultivierung)	$6{,}4 - 3{,}4 * 10^{-18}$	(Gengenbacher, et al., 2010)
Listeria monocytogenes (Laborkultivierung)	$3{,}4 * 10^{-21}$	(Li, et al., 2003)
Endosporen von Bakterien (Spezies unbekannt)	$1{,}0 * 10^{-21}$	erwähnt in: (Venkateswaran, et al., 2003)
Saccharomyces cerevisiae (Laborkultivierung)	$1{,}4 * 10^{-23}$	(Autio, et al., 1992)
Saccharomyces cerevisiae (Laborkultivierung)	$4{,}4 * 10^{-17}$	(Guillou, et al., 2003)
Paecilomyces farinosus (Laborkultivierung)	$3{,}0 * 10^{-16}$	(Lane, et al., 1988)

Der ermittelte ATP-Gehalt war wie zu erwarten um ein Vielfaches geringer als der des vegetativen Organismus (Shama, et al., 2013) (Venkateswaran, et al., 2003). Sporen des Pilzes *Paecilomyces farinosus* haben im Vergleich zu bakteriellen Sporen viel mehr ATP, was durch die größere Erscheinung und den generellen Unterschied zwischen Eukaryont und Prokaryont zu erklären ist (Lane, et al., 1988). Abbildung 2-2 zeigt verschiedene Spezies bzw. Gruppen von Mikroorganismen und deren Standpunkt bezogen auf den ATP-Gehalt. Es gibt hier die sogenannten VBNC-Organismen, die in einem Zustand sind, in dem der Stoffwechsel

auf ein Minimum reduziert wurde. In diesem Zustand teilen die Organismen sich nicht. Bakterien erreichen diesen Status, wenn sie Stress ausgesetzt sind. Hefen, Schimmelpilze sowie Gram-positive Bakterien haben weiterhin am meisten ATP, korrelierend mit der Zellgröße (Griffiths, 1996) (Venkateswaran, et al., 2003).

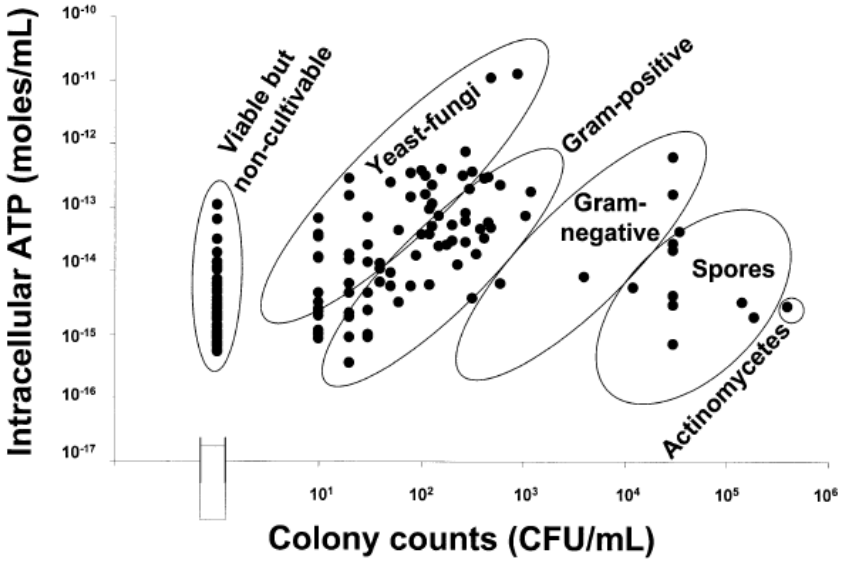


Abbildung 2-2 ATP-Gehalte von Mikroorganismen (Venkateswaran, et al., 2003)

Sporen sind wie zu erwarten mit sehr geringen ATP-Gehalten assoziiert. Diese müssen jedoch nicht zwangsläufig aus dem Inneren der Zelle stammen. ATP kann auch in der jeweiligen Untersuchungsmatrix ubiquitär auftreten. Tabelle 2-6 zeigt Korrelationen zwischen ATP-Messwerten und der gleichzeitig ermittelten Zellzahl verschiedener Studien. Es ist zu berücksichtigen, dass die Versuche der verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Messgeräten bzw. Methoden durchgeführt wurden. Korrelationen um 0,7 sind eher mit der Komplexität des Probenmaterials zu erklären, in denen vorwiegend Mikroorganismen zu finden waren, jedoch auch andere organische Bestandteile messwertbestimmend wirkten. Je schwächer der Einfluss der Matrix ist, desto größer scheinen die Zusammenhänge zwischen RLU und KbE zu sein. Poulis et al. (1993) führten zusätzlich zu Biolumineszenzmessungen TTFC-Tests durch, um einen Überblick über unbelebte Kontaminationsbestandteile zu erhalten. Der Tissue Fluid Contamination Test (TTFC) ist im Teststreifenformat erhältlich und kann dazu verwendet werden, Peptide oder reduzierende Zucker zu erkennen. So werden zusätzlich organische, nicht-mikrobielle Kontaminanten erfasst. Innerhalb dieser Arbeit wird versucht, betriebsspezifische Einflüsse wie die Oberfläche oder Umgebungstemperatur zu berücksichtigen. Im Hinblick auf die zu untersuchenden Mikroorganismen werden ebenfalls

Korrelationen ermittelt, die anschließend mit denen der Tabelle 2-6 verglichen werden können. Vergleichbar werden Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der genannten Tabelle durch die Verwendung desselben vorweg beschriebenen Reaktionsmechanismus, obwohl in den Studien unterschiedliche Geräte verwendet wurden.

Tabelle 2-6 Korrelationen zwischen KbE und ATP-Messergebnissen verschiedener Studien

Application	***Korrelation: ATP-Messwert – Lebendzellzahl***	***Quelle***
E. coli entrapped in hydrogel beads	0.96-0.99	(Wadhawan, et al., 2010)
Melon	0.95 - 0.99	(Ukuku, et al., 2005)
E. coli & *Staphylococcus* in beef broth	0.93	(Luo, et al., 2009)
Animal carcasses	Beef 0.92 Pork 0.93	(Siragusa, et al., 1995)
Pork carcasses	0.87	(Werlein, 2001)
Metalworking fluids	0.74 - 0.89	(Webster, et al., 2005)
Domestic refrigerators	0.82 - 0.85	(Chen, et al., 2006)
Natural waters	0.80	(Hammes, et al., 2010)
Raw milk	0.77	(Bell, et al., 1996)
Disinfected wastewater	0.76	(Tifft, et al., 1976)
Maple syrup	0.73	(Lagace, et al., 2002)
Neck skin of chickens	0.72	(Ellerbroek, et al., 2004)
Cows' udders	0.64	(Finger, et al., 2001)

Biolumineszenz-Schnelltests können in der Praxis keine qualitative Aussage zu Mikroorganismen treffen. Deshalb soll innerhalb dieser Arbeit die Detektierbarkeit einiger relevanter Fruchtsaft-relevanter Organismen in Modellversuchen getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Mikrobiologische Modelluntersuchungen

3.1.1 Kultivierung, Stammhaltung verwendeter Mikroorganismen – Herstellen der Untersuchungsmedien

Saccharomyces cerevisiae. Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurde naturtrüber Apfelsaft (pH = 3,41, 11,2°BRIX; MHD: 28.11.2015; Bar Code Nr. 4316268409858; Sonnländer Getränke GmbH, Lichtenhäger Chaussee 1-3, 18107 Rostock, Deutschland) verwendet, der im Verhältnis von 1:1 mit steriler Ringerlösung (Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt, Deutschland) verdünnt wurde. Übernacht-Kulturen wurden aus 0,5 g Trockenhefe (RUF Lebensmittelwerk KG, 49610 Quakenbrück, Deutschland) und 200 ml des verdünnten Apfelsaftes (naturtrüb) angesetzt und bei 36°C bebrütet. Aus der Suspension, die einen deutlichen Bodensatz aufwies, wurden am Tag der Messung 50 ml nach ausreichender Durchmischung entnommen und mit 200 ml 1:5 verdünntem Apfelsaft (naturtrüb) versetzt. Eine weitere Inkubation erfolgte bei 36°C im Brutschrank für weitere 4 h. Die Gesamtkeimzahlbestimmung erfolgte per Oberflächenausstrich auf OFS-Agar (Döhler GROUP Riedstraße D-64295 Darmstadt, DE). Die 1:5-Verdünnung mit Ringerlösung hatte den Zweck, die Einflüsse des Apfelsaftes als Medium und Produkt auf die Messung so gering wie möglich zu halten, sodass der ATP-Gehalt überwiegend auf die Anwesenheit der Mikroorganismen zurückzuführen sein sollte. Trotzdem musste ein gewisser Anteil an Substrat und Elektrolyten vorhanden sein, um die Zellen weitestgehend vital zu halten.

Milchsäurebakterien. Für Versuche mit Milchsäurebakterien wurden 2 kommerziell erhältliche Mischkulturen zur Joghurtherstellung – Joghurt natur (A. Vogel, Vitalfermente, Bioforce AG, CH-9325 Roggwill; MHD: 20.01.2016, Lot: 4472349630A) und Fermento Diretto Yogurt Probiotico (micromilk S.r.l., Via degli Artigiani, 27/39 – 26010 Cremosano, Italien, MHD 2 - 2016) – verwendet. Diese enthielten zum Einen *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* (A. Vogel Vitalfermente; Bioforce AG) und zum Anderen *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* (micromilk S.r.l.). Das Anreicherungsmedium setzte sich zusammen aus 50 vol% steriler Ringerlösung, 25 vol% haltbarer Milch (1,5 % Fett, Landena Wels KG, Gut & Günstig, Handelsmarke EDEKA; Knorrstr. 8, Wels, A-4600,

Österreich) sowie 25 vol% Apfelsaft (naturtrüb, Sonnländer Getränke GmbH, Lichtenhäger Chaussee 1-3, 18107 Rostock, Deutschland). Die Beimpfung erfolgte unter Zugabe von je 0,25 g jeder Startermischkultur. Der Ansatz wurde 72 h bei 36°C bebrütet. Das Wachstum äußerte sich durch eine Steigerung der Viskosität des Mediums sowie einen Joghurt-typischen, säuerlichen Geruch. Durch eine mikroskopische Kontrolle konnte das Wachstum besonders anhand von *Streptococcus thermophilus* verfolgt werden, dessen kettenförmige Zellanordnung vorrangig zu erkennen war. Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgte auf MRS-Agar. Die Milchsäurebakterien zeigten sich in weiß bis cremefarbenen Kolonien. Erst unmittelbar vor der Messung wurde die Suspension dekadisch verdünnt.

Alicyclobacillus acidoterrestris. Eine Kultur *Alicyclobacillus acidoterrestris* wurde von der Hochschule Neubrandenburg (Brodaer Straße 2, 17033 Neubrandenburg, Deutschland) bezogen. Die Kultivierung auf BAT-Agar (Döhler GROUP Riedstraße D-64295 Darmstadt, Deutschland) ist selektiver im Hinblick auf die Auskeimung von Sporen [IFU Methode Nr. 12]. Auf diesem Medium erschien der Organismus als weiße, zunächst milchig-trübe und runde Kolonie, die auch im Verlauf von mehreren Tagen ihr Aussehen nicht veränderte. Zur Herstellung der Untersuchungs-Suspension wurde Orangensaft mit Fruchtfleisch (MHD: 22.09.2015; Bar Code Nr. 4311501311974; Sonnländer Getränke GmbH, Lichtenhäger Chaussee 1-3, 18107 Rostock, Deutschland) im Verhältnis 1:1 mit steriler Ringerlösung verdünnt. Aus der Stammhaltung des Organismus auf BAT-Agar wurde eine bewachsene Platte mit 5 ml Ringerlösung übergossen und der Überstand per Pipette in ein Reagenzglas überführt. 2 ml der trüben Suspension wurden in 100 ml des Orangensaftmediums überführt und 7d zur Anreicherung bei 45 ± 1 °C inkubiert. Es erfolgte eine Gesamtkeimzahlbestimmung auf BAT-Agar. Laut einer Methode der IFU wird zum Nachweis von Alicyclobacillus eine Pasteurisation der Probe bei 80°C für 10 min durchgeführt [IFU Methode Nr. 12]. Dieser Schritt soll die vegetativen Keime inaktivieren und zeitgleich Sporen zur Keimung aktivieren. Die Verfahrensschritte und Stadien der Untersuchungen sind in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Der Anteil an Endosporen wurde mikroskopisch (Motic Type 102M, Ölimmersion, 10x100/1.25oil) (Motic Deutschland GmbH, Christian-Kremp-Straße 11, 35578 Wetzlar, Deutschland) durch dreimalige Zählung von 100 Zellen bestimmt. Der Wert entspricht einer ungefähren Näherung durch dreimalige Zählung von 100 Zellen pro Versuch.

Schimmelpilzisolierung. *Aspergillus niger* wurde aus der Stammsammlung der Hochschule Neubrandenburg bezogen. Von der bewachsenen Agarplatte wurde eine geringe Menge

Aspergillus niger per Abstrich in sterile Ringerlösung überführt. 1 ml dieser Suspension wurde auf eine OFS-Agarplatte pipettiert und für 36 h bei 28°C inkubiert. Der sehr schnell wachsende Organismus zeigte sich anfangs weißlich bis gelb. Im Verlauf der Inkubation nahm er sein typisches, dunkles Aussehen an. Die Platte wurde vor der Messung mit 10 ml steriler Ringerlösung versetzt. Unter leichtem Schwenken wurden die anfangs hydrophoben Sporen von der Oberfläche abgetrennt. Die trübe Suspension wurde in ein Reagenzglas überführt und dekadisch mit Ringerlösung verdünnt. Die Isolierung einer Kolonie eines im Produktionsumfeld häufig auftretenden, ubiquitär verbreiteten Schimmelpilzes erfolgte zunächst per Dip Slide-Abklatsch (VWR International GmbH, BDH Prolabo®, Plate Count Agar + OGYE Agar, Lot. Nr. 2013090303, Hilpertstraße 20a, 64295 Darmstadt). Die dabei verwendeten doppelseitigen Dip Slides sind mit DEV- sowie OGYE-Agar beschichtet. Letzterer dient dem Nachweis von Schimmelpilzen. Bei dem Pilz handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Art der Gattung *Penicillium* (wahrscheinlich *Penicillium expansum*), wie durch Vergleiche mit dem Farbatlas nach Back (2000) auf OFS-Agar zu erkennen war (Back, 2000). Die Aufbereitung erfolgte analog der bereits beschriebenen Vorgehensweise bei *Aspergillus niger*.

3.1.2 Auswahl, Reinigung, Präparation der Testoberflächen, Kontrollmessungen

Auswahl. Messungen des quantitativen Tupferverfahrens (DIN10113-1/-3) und dem Charm novaLum II (Pocket SWAB Plus) erfolgten einerseits auf einer Emaille-Oberfläche in einem leerstehenden Tank mit Mannloch sowie auf V2A-Stahl, wofür eine 20 x 20 cm Edelstahlplatte verwendet wurde. Die beiden Oberflächen unterschieden sich grundlegend bezüglich der Oberflächenrauigkeit. Emaille als glasierte Oberfläche ist sehr glatt und eben, die unbehandelte, unpolierte V2A-Stahlplatte wies eine deutlich höhere Rauigkeit auf. Unterschiede in der Detektion der Testsubstanzen sollten ermittelt werden.

Reinigung. Ein Emaille-Tank (25000 dm^3) wurde manuell per Mannloch mit herkömmlichem Spülmittel (fit GmbH, Am Werk 9, D-02788 Tittau, Deutschland) mechanisch gereinigt und anschließend gründlich mit heißem Wasser gespült. Kritische Bereiche wie Rohrmündungsbereiche wurden für die Modellversuche mit Mikroorganismen auf Emaille außer Acht gelassen. Am Vortag jeder Untersuchung wurde der bereitgestellte Tank komplett gereinigt. Am Tag der Messung wurde eine Emaille-Fläche großräumig mit Spülmittel gereinigt, mit Wasser abgespült und getrocknet. Die Reinigung des Edelstahls orientiert sich an betriebsspezifischen CIP-Anlagen, wobei in den durchgeführten Modellversuchen

identische Reinigungsmittel verwendet wurden. Die Reinigung erfolgt zunächst mit Wasser und Bürsten, um anhaftende Verschmutzungen zu entfernen. Die Behandlung der Oberfläche wird weiterhin durch Tabelle 3-1 verdeutlicht. In diesem Modellversuch wird ein Druck von 6-7 bar, der bei der CIP-Reinigung in der Praxis beaufschlagt wird, aus Gründen der Machbarkeit vernachlässigt.

Tabelle 3-1 Reinigungsschritte der Edelstahl-Testoberfläche

Reinigungsschritt	***Produktionsrückstände***	***Technologisch-maschinentechnische Rückstände***
Spülen	Heißes Wasser	Mechanisch mit Bürsten
Reinigung, alkalisch	Lerapur® M-CIP (Stockmeier Chemie GmbH & Co. KG, Am Stadtholz 37, 33609 Bielefeld, Deutschland)	3,4 % NaOH-haltiges Reinigungsmittel; Überschichten der Platte, Einwirkzeit von 30 s
Spülen	Heißes Wasser	Mechanisch mit Bürsten
Reinigung, mit Säuren	Leracid® M-CIP (Stockmeier Chemie GmbH & Co. KG, Am Stadtholz 37, 33609 Bielefeld, Deutschland)	Mittel auf Salpetersäurebasis, ca. 400 mg/l Peressigsäure, spezieller Inhibitor gegen die Entstehung von Nitrosegasen
Spülen	Heißes Leitungswasser, dann entmineralisiertes Wasser	Mechanisch mit Bürsten, mehrmaliges Besprühen mit demineralisiertem Wasser

Präparation. Die Kontamination erfolgte per 50 ml Sprühflaschen (Compurei, Wullener Feld 63, 58454 Witten, Deutschland). Dabei wurde eine Fläche von 20 cm^2 gleichmäßig sprühkontaminiert. Der spätere Abstrich erfolgte unter Verwendung einer Kunststoffschablone. Die aufgebrachte Menge Suspension betrug 0,4 ml/100 cm^2 (9 Betätigungen des Sprühknopfes). Im Fall der verwendeten Schimmelpilze wurde aus Gründen der Kontaminationsgefahr des Labors von einer Sprühkontamination abgesehen. Stattdessen wurde eine Fläche von 100 cm^2 mit 100 µl der Testsuspension versetzt. Die Suspension wurde per Drigalski-Spatel verteilt, der nach jeder Betätigung in Ethanol getaucht und abgeflammt wurde. Alle Testsuspensionen wurden dekadisch verdünnt und mit der kleinsten Verdünnung beginnend auf die Testflächen aufgetragen.

Kontrollmessungen. Die Kontrolle der Reagenzien im Pocket Swab® Plus-System wurde durch die Aktivierung des Swabs ohne Abstreichen einer Fläche gewährleistet, was in der

jeweiligen Tabellen-Legende (Abschnitt 4) vermerkt ist (n = 3) (*Reagenzien-Blank*). Die Reinigungskontrolle erfolgte mit dem zu testenden Messgerät dreifach nach jeder zweiten Reinigung, um die Richtigkeit der Messungen während der Prozedur zu bestätigen (*Reinigungskontrolle*). Außerdem wurde die per Sprühkontamination mit der Verdünnungslösung (Ringerlösung) versehene Oberfläche mit Biolumineszenzmessungen beprobt (*Blank-Ringerlösung*).

3.1.3 Planung der Testreihen

Im Hinblick auf die Modellversuche sind die Testreihen laut Tabelle 3-2 vorgesehen. Diese repräsentieren mögliche mikrobielle Gefahrenquellen in der Fruchtsaftproduktion und haben den Zweck, den alleinigen quantitativen Charakter der ATP-Messungen zu umgehen und genaue Aussagen zu bestimmten Kontaminanten treffen zu können.

Tabelle 3-2 Versuchsaufbau, Begründung der Testreihen

Verwendete Oberfläche / ***Suspension***	***Anzahl der Testreihen***		***Begründung der Durchführung / Ziele der Untersuchung***	
	Edelstahl	***Emaille***		
Pasteurisierter Apfelsaft	1	1	Einfluss v. Produktresten	Einfluss der Oberfläche
Saccharomyces Cerevisiae	1	1		
Milchsäurebakterien	1	-	Untersuchung der Detektierbarkeit verschiedener AfG-spezifischer Verderbsorganismen	
Alicyclobacillus acidoterrestris	3	-		
Aspergillus niger	1	-		
Penecillium spp.	1	-		

Pasteurisierter Apfelsaft (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde analog zu Produktrückständen nach einer möglichen unzureichenden Reinigung verwendet. Der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit soll durch die Versuche mit pasteurisiertem Apfelsaft sowie *Saccharomyces cerevisiae* verdeutlicht werden. Kriterium zur Beurteilung ist unter anderem die Wiederfindungsrate des Verfahrens nach DIN 10113-1 gegenüber der Gesamtkeimzahlbestimmung per Oberflächenausstrich. Die Detektion der in Tabelle 3-2 aufgeführten Mikroorganismen erfolgte in insgesamt 9 Testreihen. Bezüglich *Alicyclobacillus acidoterrestris* als Endosporenbildner waren mehrere Testreihen nötig. Dieser Organismus

stellt einen Spezialfall getränkeschädlicher Bakterien dar. Die Untersuchung erfolgte in 3 Schritten gemäß Tabelle 3-3. Durch den Schritt der Pasteurisation sollten vegetative Zellen inaktiviert sein, sodass im Idealfall Rückschlüsse auf den ATP-Gehalt bei überwiegender Anwesenheit von Sporen gezogen werden könnten. Bei der Suspension *A. at. 2* war nach der Pasteurisation eine geringere Zelldichte zu verzeichnen.

Tabelle 3-3 Durchführung der Messungen für *A. acidoterrestris* auf Edelstahl

Versuch Nr./ Bezeichnung	***Verfahrensschritt***	***Temperatur (°C) / Zeit (min / h)***	***Bemerkung***
A. at. 1	Voranreicherung (ca. 70-80 % Sporen)	41°C, 144 h (6 d)	Erreichen einer ausreichenden Ausgangskeimzahl, viele Sporen
A. at. 2	Erhitzung (ca. 90-95 % Sporen)	80°C, 10 min [IFU Methode Nr. 12, 2004]	Sporen werden aktiviert, vegetative Zellen inaktiviert
A. at. 3	Inkubation 1 (ca. 50-60 % Sporen)	41°C, 72 h (3 d)	Auskeimen der Sporen, Anteil vegetativer Zellen > *A. at. 1* und *A. at. 2*

Die Untersuchung eines reinen Sporenisolats ist nicht möglich. RLU-Werte der Versuche *A. at. 1* und *A. at. 3* werden aufgrund des generierten Wachstums wahrscheinlich höher ausfallen, als die vorangegangenen Versuche. Verschiedene Stadien des Sporenbildners sollten erfasst werden. Erkenntnisse über die Detektierbarkeit per ATP-Messung sollen herausgestellt werden.

3.1.4 Durchführung der Biolumineszenz- und Referenzmessungen

Charm novaLum II / Pocket Swab® Plus System. Für die Biolumineszenzmessungen mit dem Charm novaLum II kam die Abstrichvorrichtung Pocket Swab® Plus zum Einsatz. Die Abbildung 3-1 zeigt das Gerät sowie den dazugehörigen Swab. Diese Abstrichvorrichtung besteht aus einem Kunststoffgehäuse, das sich aus zwei auseinanderziehbaren Teilen, dem Abstrichbesteck und dem Reaktionsgehäuse, zusammensetzt. Mit dem Tupfer (Swab), der mit einem Biofilm-Wachstumsregulator sowie einem Puffer befeuchtet ist, erfolgt dann der Abstrich. Zellen werden durch das Befeuchtungsmedium aufgebrochen. Abgestrichen wird gemäß den Angaben des Herstellers eine Fläche von 100 cm^2. Dafür kam eine flexible Schablone aus Kunststoff zum Einsatz. Bei unebenen Bauteilen wie zum Beispiel innerhalb von Probennahmehähnen muss davon abgesehen werden. Durch die genannten Reagenzien wird gewährleistet, dass Zellen zerstört werden, wodurch ATP freigesetzt wird.

Abbildung 3-1 Pocket Swab® Plus und Charm novaLUM II (Links: Swab ohne Reaktionsgehäuse; Mitte: Swab mit Reaktionsgehäuse; Rechts: Charm novaLUM II, Charm Science Inc.)

Alle mit den abgestrichenen Flächen in Berührung kommenden Substanzen des befeuchteten Swabs wurden durch die FDA als sicher eingestuft (GRAS-Status), sodass keine Gefahr von Rückständen durch diese Reagenzien ausgeht. Anschließend werden beide Teile wieder zusammengesetzt, ohne die schraubenartige Vorrichtung zu benutzen. Erst kurz vor der

Messung wurde diese durch Drehen betätigt. Nach der Probennahme kann der Swab bis zur Messung im Reaktionsgehäuse bis zu 6 Stunden aufbewahrt werden. Für die Modellversuche mit Mikroorganismen wurde diese Zeit auf bis höchsten 10 Minuten begrenzt, um die Methode zu vereinheitlichen. Der Swab durchbricht beim Zusammendrehen eine Membran. Im Innern des Gehäuses wird dadurch eine klare Flüssigkeit (Trennmittel / Puffersubstanz) frei, die durch dreimaliges Schütteln per Fliehkraft in den lichtdurchlässigen Reaktionsraum gedrückt wird. Im unteren durchsichtigen Teil des Gehäuses befinden sich die Hauptkomponenten des Reaktionsansatzes – Luciferin/Luciferase. Die Tablettenform gewährleistet eine gleichmäßige Dosierung der Reaktionskomponenten. Der Swab ist nach den beschriebenen Schritten von oben in das Gerät Charm novaLum II einzuführen und die Messung zu starten. Das Prinzip basiert auf einer photometrischen bzw. luminometrischen Messung. Die Umwandlung von D-Luciferin zu Oxyluciferin emittiert Strahlung mit Wellenlängen im Spektralbereich zwischen 390 und 620 nm. Die Erfassung des emittierten Lichtes kann folglich nicht mit der Aufnahme nur einer Wellenlänge erfolgen. Durch den Einsatz eines Photomultipliers (PMT) wird jede Entstehung von Licht im Inneren der Messkammer erfasst. PMT´s haben den Vorteil, dass sie Licht mehrerer Wellenlängen gleichzeitig detektieren können und dessen Signalintensität verstärken. Die Dauer der Messung beläuft sich auf 5 Sekunden. Messwerte werden in Relativen Lichteinheiten bzw. Relative Light Units (RLU) ausgedrückt. Anweisungen des Herstellers zufolge ist es nicht notwendig, die Reaktion sofort nach dem Abstrich zu starten und zu messen (Charm Science, 03.11.2008) (Charm Science, 2010) (Charm Science, 2011) (Charm Science, 2013) (Skiffington, 2000) (University of South Florida, 2003) (Literatur siehe Anlage 6).

Verfahren nach DIN 10113-1. Das Verfahren nach DIN 10113-1 orientierte sich im Wesentlichen an den Vorgaben der Norm. Es wurde mit einem befeuchteten und einem trockenen Tupfer (Büttner-Frank GmbH, Am Wolfsmantel 9-11, 91058 Erlangen, Deutschland) eine definierte Fläche (Kunststoffschablone) von 100 cm^2 abgestrichen. Beide Tupfer wurden in 10 ml Ringerlösung ausgeschüttelt. Die Größe der abzustreichenden Fläche wurde analog zum Abstrich-System der Pocket Swabs und den Empfehlungen des Herstellers (Charm Science, Inc.) gewählt. Auch Costa et al. (2006) verwendeten dieses Flächenmaß für die Untersuchung von Edelstahloberflächen in der Milch-verarbeitenden Industrie (Costa, et al., 2006). Die Art des Abstriches folgte dem Schema laut Abbildung 3-2. Demnach wurde jeweils zehnmal in horizontaler und vertikaler Weise Abgestrichen. Die Tupfer wurden in 10 ml Ringerlösung ausgeschüttelt und per Oberflächenausstrich (100 µl) auf den jeweiligen

Nährboden aufgetragen. Die Schablone wurde nach Verwendung mit Ethanol (70%) und deionisiertem Wasser gereinigt.

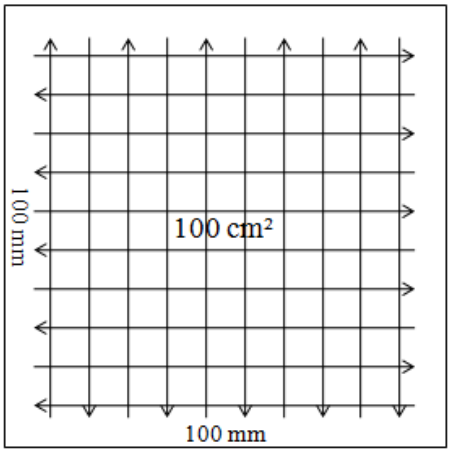


Abbildung 3-2 Maße der Schablone und Abstrichschema

Bei beiden Verfahren erfolgte das Abstreichen in mäanderförmigen Bewegungen. Zu je 3 ATP-Messwerten des Charm novaLum II wurde pro Verdünnungsstufe der Kontaminationssuspension ein Abstrich laut DIN 10113-1 vorgenommen (Costa, et al., 2006). Die Messung nach DIN 10113-1 gilt innerhalb der Untersuchungen als Referenzmethode, die den mikrobiellen Verschmutzungsgrad repräsentiert.

Verfahren nach DIN 10113-3. Dieses Verfahren wurde zum Nachweis und zur Beurteilung der Kontaminationsstärke durch Schimmelpilze angewendet. Die Dip Slides sind doppelseitig mit Plate Count- und OGYE-Agar mit Neutralisatoren beschichtet.

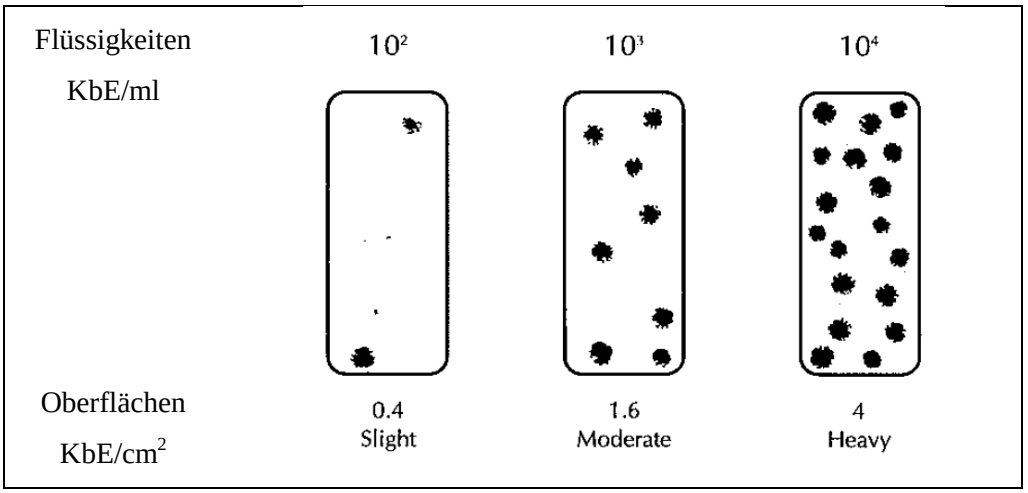


Abbildung 3-3 Dip Slide-Abgleich für Schimmelpilze (VWR International GmbH)

OGYE-Agar dient dem Nachweis und der Keimzählung von Schimmelpilzen. Bei der Untersuchung wurden zunächst beide Seiten verwendet. Die Beschreibung der Kontamination erfolgte aus Gründen der Genauigkeit durch Auszählen der 10 cm^2 großen Fläche. Abbildung 3-3 zeigt beispielhaft drei Kontaminationsstärken und dazugehörige Keimzahlen für Schimmelpilze. In den durchgeführten Versuchen wurden die Abklatschflächen ausgezählt.

3.2 Praxisbezogene Untersuchungen

3.2.1 Temperatureinfluss und Genauigkeit des Messgerätes

Zunächst soll die Temperaturempfindlichkeit des Swab®-Systems und den darin enthaltenen Reagenzien [nach §64 LFGB, L 00.00 131, Anhang B] geprüft werden. Weiter wird die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen bei Wiederholungsmessungen zur Charakterisierung des Charm novaLum II ermittelt. Die Pocket Swab's werden 5 Stunden bei 4 unterschiedlichen Temperaturen (T1 = 3-6 °C, T2 = 20°C, T3 = 28°C, T4 = 41°C) inkubiert. Das Messgerät selbst wurde nicht inkubiert. Dies dient unter Anderem zur Charakterisierung der im Pocket Swab ablaufenden Enzymreaktion und deren Reproduzierbarkeit unter wechselnden Bedingungen. Die 4 Temperaturen wurden nicht in gleichmäßigen Abständen festgelegt, sondern an spezielle betriebliche Bedingungen, zum Beispiel Temperaturen in Sommer- und Wintermonaten angepasst (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 Festlegung betriebstypischer Umgebungstemperaturen

T (°C)	***Produktionsort, Beispiel***	***Bedingungen, Produktart***	***Begründung für die Festlegung***
3-6°C	Tanklager	Kühle Atmosphäre, Lagerung von Konzentraten	Funktion des Systems entscheidend für Tankkontrollen und Freigaben
21,7°C	Innenräume, Produktionsstätten	Raumtemperatur, Ausmischen von Konzentraten etc.	Häufigste Umgebungstemperatur
36°C	Peripheriebereiche von Verpackungsanlagen	beheizte Zufuhrbehälter von Verschlusskappen, Wärmeabgabe aufgrund bewegter Bauteile, Fördereinrichtungen	Überwachen von Schnittstellen zu Sterilbereichen, Behälter für Verpackungsmaterial etc.
41°C	Oberhalb von Verpackungsanlagen	Abfüllung, Wärmeabgabe aufgrund von Reibung, Fließbänder, bewegte Bauteile, Abluftströme etc.	Überwachen von Schnittstellen zu Sterilbereichen, Wartungszugänge oberhalb der Verpackungsanlagen

In Produktionsstätten kann die Umgebungstemperatur stark schwanken, wobei das Messgerät keine erheblichen temperaturbedingten Schwankungen aufzeigen sollte. Als Testsubstanz diente Orangensaft, der mit destilliertem Wasser um den Faktor von 10^3 verdünnt wurde. Dieses Gemisch wurde ebenfalls inkubiert. Eine Kontrolle erfolgte per Handthermometer

(WTW GmbH, ebro Electronic, Peringstraße 10, 85055 Ingolstadt, Deutschland). Die Anzahl der Messwerte pro Temperatur beträgt n = 10. Abstrichmethoden sind stets mit Fehlern behaftet. Deshalb wird bei diesem Versuch von einem klassischen Abstrich abgesehen. Die Vorgehensweise richtet sich nach den Durchführungen von Turner et al. (2010), die ein Aliquot ihres Testgemisches direkt auf den Pocket Swab pipettierten (Turner, et al., 2010). Dadurch sollen an dieser Stelle Verluste und Ungenauigkeiten durch die Wegnahme des Parameters „Fläche“ vermieden werden, um die Menge des aufgenommenen organischen Materials, die wesentlich zur Messwertbildung beiträgt, konstant zu halten. Es wird daher ein Aliquot von 20 µl des verdünnten Orangensaftes (Verdünnungsfaktor f = 10^{-3}) vor der Aktivierung des Pocket Swabs auf das Probennahmesystem pipettiert (Turner, et al., 2010). Temperaturverläufe der zu untersuchenden Lösung wurden zu jeder Einzelmessung durch eine Sonde in einem Referenzgefäß dokumentiert. Reagenzgefäße für die Temperaturen 36°C und 41°C wurden während der Messungen im Wasserbad (Memmert GmbH & Co. KG, Rittersbacher Straße 38, 91126 Schwabach, DE) aufbewahrt, um Schwankungen zu vermeiden. Diese Verfahrensweise ermöglicht weiterhin eine Betrachtung der Messgenauigkeit des Gerätes durch den Ausreißertest nach Grubbs und den Test auf Normalverteilung der Datenreihen nach Anderson und Darling als Voraussetzung für den F-Test nach Fischer.

3.2.2 Ermittlung von Grenz- und Toleranzwerten für gereinigte Tanklager

Produkte und Halbfabrikate werden in Edelstahl- und Emailletanks gelagert. Erstere werden über eine CIP-Anlage gereinigt. Probennahmestellen wurden an Ausläufen oder sofern möglich an der Einlassung / Umrandung von Mischelementen, in Probennahmehähnen sowie am Mannloch festgelegt. Der Status schwierig zu reinigender Bereiche wie dem Mannloch gibt Aufschluss über den Hygienestatus des Tanks (Bell, et al., 1994). Emailletanks werden per Mannloch von innen manuell mit herkömmlichem Spülmittel (fit GmbH, Am Werk 9, D-02788 Tittau, Deutschland) gereinigt. Kritische Bereiche, wie Blindkappen an Ein- oder Ausläufen werden mit Bürsten gereinigt. Besonders das Mannloch und dessen Peripheriebereich stellen dabei ein erhöhtes Risiko dar. Tabelle 3-5 beschreibt die festgelegten Messpunkte. Nach der genannten Reinigung erfolgt die Probennahme per Abstrich. Um die Aussagekraft der Messwerte einzuschätzen, werden konventionelle Abstrichbestecke genutzt, die in SSL-Bouillon für 72 h bei 28°C inkubiert werden (Anreicherung). Positivproben können bereits nach der Anreicherung Hinweise auf eine Kontamination liefern.

Tabelle 3-5 Festgelegte Messpunkte und Art der Reinigung

Tankart	*Messpunkte*	*Bez.*	*Bemerkungen zur Probennahme*	*Reinigungsart*
Edelstahltank	Probennahmehahn	ES 1	Von innen	CIP-Anlage vollautomatisch, Lauge-Wasser-Säure-Wasserspülung, Druck-beaufschlagung (6-7 bar)
	Schwenkrohr	ES 2	Zum Produktauslauf, Verengung / Spalt zur Wandung	
	Auslassventil	ES 2	Von innen, nach CIP – Lauf	
	Mischer	ES 2	Kontaktumrandung zur Tankwandung, in die Tankwand eingelassen	
	Mannlochpassung	ES 3	Kontaktfläche zum Deckel	
Emailletank	Unterer Auslassstutzen	EM 1	Von innen, durch das Mannloch	Einstieg per Mannloch, manuell mit Spülmittel, Besen, Bürsten, Spülung mit heißem Wasser
	Oberer Auslassstutzen	EM 2	Von innen, durch das Mannloch	
	Mannlochpassung	EM 3	Kontaktfläche zum Deckel, unmittelbare Peripherie des Randes	

Wird zu diesem Zeitpunkt sichtbar, dass es sich um eine Kontamination handelt, ist ein weiterer Ausstrich bzw. Plattenguss (OFS-Agar) nicht notwendig. Dies kann der Fall sein, wenn eine Bläschenbildung, deutliche Trübung oder eine Viskositätsveränderung der Bouillon bzw. eine Bildung gelartiger Strukturen oder eine Absatzbildung erfolgt. Andernfalls ist durch das Plattengussverfahren auf OFS-Agar der mikrobielle Status der Probe zu untersuchen.

3.2.3 Einfluss unterschiedlicher Anwender im Produktionsprozess

Im ersten Teil dieser Untersuchung wurden 5 Messpunkte des vorgesehenen Hygienemonitorings ausgewählt, die von 6 unterschiedlichen Anwendern je einmal mit dem Charm novaLum und den Pocket® Swabs gemessen wurden. Die Bezeichnung der Messpunkte ist der Tabelle 3-6 zu entnehmen. Abweichungen in den Messwerten sollen Aufschluss über die Handhabbarkeit liefern. Weiterhin muss generell die Bedienbarkeit des Gerätes sichergestellt sein. Aufgenommene Werte wurden mit denen dieser Arbeit verglichen.

Tabelle 3-6 Bezeichnung und Beschreibung der Messpunkte

Bezeichnung	*Messpunkt*
MP 1	Bereich Ausmischung: Dosierbecher für Zusatzstoffe, Kunststoff
MP 2	Bereich Ausmischung: produktführende Schläuche, von innen, Kunststoff
MP 3	Bereich Ausmischung: Stecksieb-Gewinde, Milchrohrverschraubung, Spalt an der Blindkappe
MP 4	Bereich Abfüllung: beheizter Vorlagebehälter für Schraubverschlüsse, Wandung von innen, Anlage 1
MP 5	Bereich Abfüllung: beheizter Vorlagebehälter für Schraubverschlüsse, Wandung von innen, Anlage 2

Weiterhin misst jeder Anwender täglich wiederholt immer wieder dieselbe Messstelle. Messwertreihen werden mit denen in dieser Arbeit ermittelten verglichen. Eine Wiederholung der Datenreihe ist im Sinne des Vorhabens nicht sinnvoll. Ausreißer werden dokumentiert. Auch der Anderson-Darling-Test auf Normalverteilung liefert Erkenntnisse bezüglich reproduzierbarer und wiederholbarer Messungen. Ist die jeweilige Datenreihe normalverteilt, ist davon auszugehen, dass Ergebnisse der Messungen ausreichend reproduzierbar sind.

3.2.4 Hygienemonitoring in der laufenden Fruchtsaftproduktion

Es wurden 19 Messpunkte festgelegt, von denen eine potentielle Kontamination ausgehen kann. Bei der Abfüllung von Fruchtsäften beschränken sich diese Orte auf eine der wenigen Bereiche, an denen Produktkontakt zur Umgebung oder die Gefahr einer Sekundärkontamination besteht. In der Fruchtsaftindustrie sind diese Bereiche vor Allem in der Rohwarenaufbereitung, Ausmischung oder Abfüllung zu finden. Ziel ist es, zu prüfen, ob Messungen mit dem Charm NovaLum II geeignet sind, den Grad der Verschmutzung während der laufenden Produktion widerzuspiegeln. Dafür wurde ein Oberflächen-Hygienemonitoring angestrebt. Back beschreibt ein solches Monitoring als eine Art Frühwarnsystem durch mikrobiologische Methoden, aus dessen Kontext Maßnahmen zur Einhaltung der Betriebshygiene getroffen werden können. Der biologische Zustand des Produktionsumfeldes soll im Gegensatz dazu per Biolumineszenzmessung ermittelt werden. Die Referenzmessung erfolgt per Abstrich und Anreicherung in SSL-Bouillon sowie nachfolgend per Oberflächenausstrich auf OFS-Agar. Die 19 Messpunkte sind in der Tabelle 3-7 aufgeführt. 6 Messwerte werden pro Messpunkt aufgenommen.

Tabelle 3-7 Bezeichnung und Erläuterung festgelegter Messpunkte

Messpunkt / Bezeichnung	***Entnahmestelle***	***Ort am Messpunkt***	***Material / Beschreibung***
M1	Rührwerktank	Deckelklappe oberhalb des Behälters, von innen	Edelstahl / Deckelrand
M2	Dosierbecher	von innen, stets gereinigter Zustand	Plastik / zur Dosierung verschiedener Stoffe
M3	Kunststoffschläuche	von innen, stets gereinigter Zustand	innerhalb beschichtet mit Kunststoff, produktkontakt
M4	Stecksieb	Verschraubung, Gewindezwischenraum, außen	Edelstahl / Spalt zwischen Schraubkappe und Rohrteil
F1	Flaschenkranz	nach Laugenwäsche der Flaschen	Hartplastik / an der Fassung
F2	Füller 1	oberhalb der Flaschenhalterung	Hartplastik / Oberfläche des Drehkranzes
F3	Füller 2	Einfüllvorrichtung	Hartplastik / Produktkontakt an Flaschenhalter
F4	Vorlaufbehälter	Deckelunterseite, von innen	Edelstahl / Produktkontakt mit Umgebungsluft
F5	Flasche	nach Laugenwäsche, Innenseite	Glas / Flasche gereinigt und erwärmt
E1	Vorlaufbehälter	Deckelinnenseite des Erhitzerbehälters	Edelstahl / feuchte, warme Oberfläche
E2	CIP-Anschluss 1	Anschlussstelle für Rohrleitungen zur Durchführung von CIP	Edelstahl / Rohrmündung am Ventil
E3	CIP-Anschluss 2	Anschlussstelle für Rohrleitungen zur Durchführung von CIP	Edelstahl / Rohrmündung am Ventil
A1	Abfüllanlage	Auslass Sterilluftbereich	Edelstahl / innerhalb geschlossener Anlage
A2	Deckelzufuhr 1	geschlossenes Förderband, Metallschiene	Edelstahl / Kontakt mit Verschlusskappe
A3	Deckelzufuhr 2	geschlossenes Förderband, Metallschiene	Edelstahl / Kontakt mit Verschlusskappe
A4	Wartungsklappe	oberhalb der Anlage, oberhalb des Deckelaufsatzes	Edelstahl
A5	Wartungsklappe	oberhalb der Anlage, oberhalb des Deckelaufsatzes	Edelstahl
A6	Vorlagebehälter	Behälterinnenraum, Vorlagebehälter für Deckel	Edelstahl / beheizter Vorlagebehälter
A7	Vorlagebehälter	Behälterinnenraum, Vorlagebehälter für Deckel	Edelstahl / beheizter Vorlagebehälter

M = Ausmischung; F = Flaschenproduktion; E = Erhitzeranlage; A = Abfüllung

3.3 Berechnungen und Statistik

Alle Berechnungen dieser Arbeit sind mit der Software Excel 2007 sowie *XL*Stat *Pro* 2015 erstellt worden. Zur generellen Beurteilung von Datenreihen wird die Mittelwertbildung ($\bar{x}$), Standardabweichung (s), Spannweite (R) sowie die Obergrenze der Konfidenzintervalle für verschiedene Irrtumswahrscheinlichkeiten herangezogen. Die Konfidenz bzw. der Vertrauensbereich wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\bar{x} + s * \frac{c}{n^{0,5}} \leq \mu \leq \bar{x} + s * \frac{c}{n^{0,5}} \qquad \text{Gl. 3-1}$$

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

c = Wert aus Student-t-Verteilung, für 1 - α

Freiheitsgrade f = n – 1

n = Anzahl der Messungen

μ = Erwartungswert

Die untere Intervallgrenze ist für diese Untersuchungen ohne Bedeutung. Für die Festlegung von Grenzwerten für Tankkontrollen wird das Konfidenzlimit von 99,9 % gewählt (α = 0,001) (Abschnitt 3.2.2). Warnwerte werden mit der höchsten von 10 Messungen angegeben.

Im Hinblick auf Untersuchungen mit Mikroorganismen wird die Konfidenzobergrenze für den Erwartungswert mit einer Eintrittswahrscheinlichkeit von 95,0 % gewählt. Nachweisgrenzen (NWG) für Mikroorganismen werden durch den Vergleich von Bestimmtheitsmaßen (Korrelationen) von Funktionen ermittelt. An der Grenze zu einem exponentiellen Bereich/Zusammenhang werden entsprechende Messwerte von anliegenden, nicht exponentiellen abgegrenzt und so die NWG bestimmt. Für die Untersuchung von Mikroorganismen wird die Sensitivität mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$Sensitivität\ S = \frac{Anzahl\ richtig\ positiver\ Werte}{Anzahl\ falsch\ negativer\ Werte} \qquad \text{Gl. 3-2}$$

Es wird die Ausgangslösung des Substrates und die Zellzahl der aufgetragenen 0,4 ml bestimmt. Davon ausgehend werden den die Datenreihen der RLU-Werte sowie der KbE nach DIN 10113-1 auf Sensitivität untersucht. „*Richtig positive Werte*“ (Grau hinterlegt) entsprechen den Werten oberhalb der Nachweisgrenze, die mit dem Gerät Charm novaLum II ermittelt werden. „*Falsch positive Werte*“ (Grün hinterlegt) befinden sich unterhalb dieser

Nachweisgrenze. Die Sensitivität wird für RLU- sowie KbE-Werte nach DIN 10113-2 bestimmt. Sensitivitäten von Datenreihen der Schimmelpilzdetektion beziehen sich auf Werte, die mit Dip Slides (S = 100,00 %, angenommen) ermittelt werden. Diese sind gesondert von den übrigen zu betrachten. Datenreihen mit verhältnismäßig niedrigen Messwerten, aber hoher empirischer Standardabweichung, können weiterhin durch eine Normierung der Varianz beschrieben werden. Folglich wird ein Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) berechnet (Gleichung 3-3).

$$VarK = \frac{s}{\bar{x}} \ (* 100) \quad [\%] \qquad \text{Gl. 3-3}$$

VarK

s = Streuungsmaß / Standardabweichung

$\bar{x}$ = Lagemaß / Mittelwert

Ist der VarK > 0,5 (> 50 %), gilt das arithmetische Mittel im Allgemeinen als schlechter Repräsentant der Einzelwerte, das heißt die Streueigenschaften sind zu groß. Datenreihen mit durchgehend oder mehrfachen Null-Werten können hiermit nur bedingt charakterisiert werden (Eckstein, 2013). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die absolute Streuung (R) der Messwerte, die zusätzlich für die Beurteilung hinzugezogen werden muss. Die Wiederfindungsrate der DIN 10113-1-Methode wird bezogen auf die Zellzahl der 0,4 ml Kontaminationslösung berechnet.

Versuche zur Temperaturempfindlichkeit des Systems lassen aufgrund der Änderung der Methode (Aliquotierung, kein Abstrich) genauere Aussagen zum Gerät zu. Es werden die Standardabweichungen verglichen bzw. die Varianzhomogenität bestimmt. Voraussetzung dieser Betrachtung sind Ausreißer-freie (Grubbs) und normalverteilte Datenreihen (Anderson-Darling-Test). Durch den F-Test wird letztendlich die Varianzhomogenität untersucht. Bestehen keine signifikanten Unterschiede, ist dies ein Indiz für eine gute Wiederholbarkeit bzw. Reproduzierbarkeit des Messgerätes.

Standardabweichungen, Tests auf Normalverteilungen (Anderson-Darling-Test) und Ausreißer (Ausreißertest nach Grubbs) helfen weiterhin zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit bzw. Wiederholbarkeit der Messungen bei unterschiedlichen Anwendern.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen der verschiedenen Kontaminanten

4.1.1 Einfluss der Oberfläche auf die Ausprägung der Messwerte

4.1.1.1 Detektion von Produktkontaminationen

Zwischen den beiden Oberflächen bestehen hinsichtlich der Detektion des verdünnten Produktes kaum relevante Unterschiede (Abbildung 4-1). Bis zur dritten Untersuchung der Verdünnungslösung verlaufen die Messwerte beider Graphen sehr ähnlich. Ab diesem Punkt differieren sie, wobei auf Edelstahl etwas höhere Werte erzielt werden. Messwerte der Emaille-Versuche nähern sich schneller dem Blank-Wert.

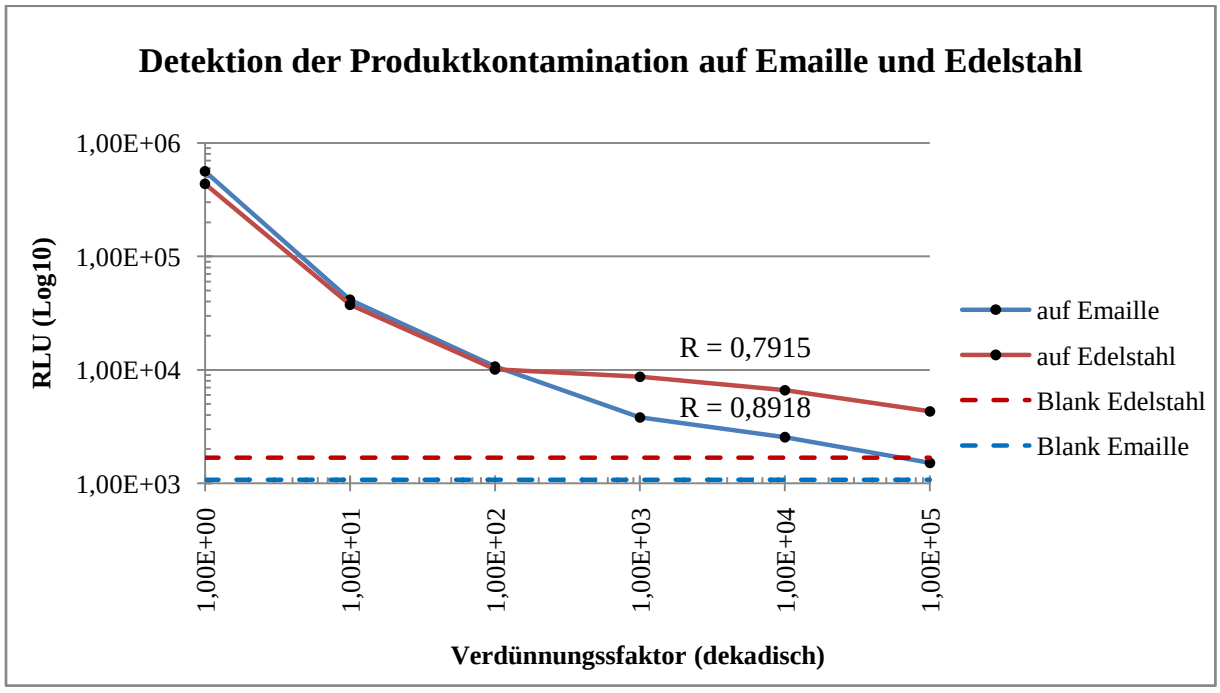


Abbildung 4-1 Abhängigkeit der Messergebnisse von der Oberflächenbeschaffenheit bei Produktkontamination (R = Bestimmtheitsmaß)

Bis zu diesem Punkt verlaufen beide Graphen annähernd linear in logarithmischer Darstellung. Bestimmtheitsmaße sind der Abbildung 4-1 zu entnehmen. Diese zeigen, dass die Linearität der Untersuchungen auf Emaille um ca. 10 % höher ist (R = 0,8918).

Tabelle 4-1 Messergebnisse zu Produktkontamination auf Edelstahloberfläche

Verdünnungsstufe	*AS nt.*	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	*Reinigungs-Kontrolle*	*Blank-Ringerlösung*
	461.921	37.852	10.964	8.252	4.830	4.141	0	2.613
RLU	385.502	36.103	8.814	9.962	6.236	3.749	0	1.076
	460.383	38.536	10.494	7.782	8.707	5.020	0	1.366
Mittelwert	435.935,3	37.497,0	10.090,7	8.665,3	6.591,0	4.303,3	0,0	1.685,0
Standardabweichung	43.683,3	1.254,7	1.130,3	1.147,3	1.962,7	650,9	0,0	816,6
MIN	385.502,0	36.103,0	8.814,0	7.782,0	4.830,0	3.749,0	0,0	1.076,0
MAX	461.921,0	38.536,0	10.964,0	9.962,0	8.707,0	5.020,0	0,0	2.613,0
Streuung R	76.419	2.433	2.150	2.180	3.877	1.271,0	0	1.537
VarK (%)	10,02	3,35	11,20	13,24	29,78	15,13	-	48,46
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	509.579,4	39.612,3	11.996,2	10.599,5	9.899,9	5.400,6	0,0	3.061,8

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; AS nt. = Apfelsaft naturtrüb; Reagenzien-Kontrolle 0 ± 0 RLU (n = 3)

Messwerte auf Edelstahl erreichen ab der dritten Verdünnungsstufe um ca. 3.000-4.000 RLU höhere Werte. Grund dafür ist wahrscheinlich die höhere Oberflächen-Rauigkeit des Edelstahls. Allein anhand der Blankwerte erkennt man bei Verwendung desselben Verdünnungsmediums (Reagenzien-Blank) Unterschiede. Auch die Art der Reinigung kann für die Höhe der Messwerte entscheidend sein. Produktkontaminationen können geeignete Nährmedien für Mikroorganismen sein. Für Reinigungskontrollen ist es deshalb wichtig, mit dem Messgerät verdünnte Rückstände detektieren zu können. Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3 zeigen die Graphen jeweils einzeln mit der Standardabweichung um den Mittelwert.

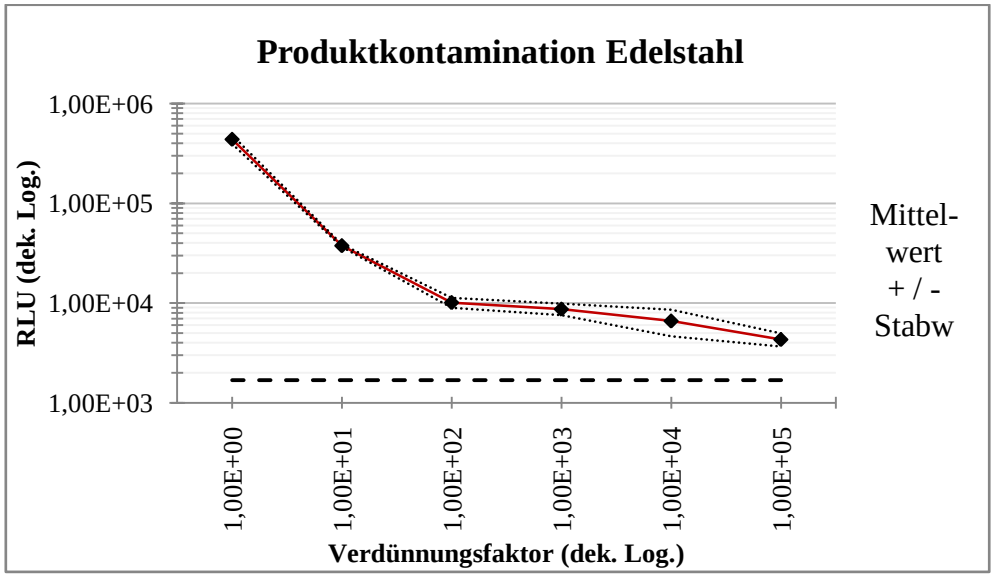


Abbildung 4-2 Darstellung der RLU-Werte pro Verdünnung (Produktkontamination auf Edelstahl; Mittelwerte +/- Standardabweichungen)

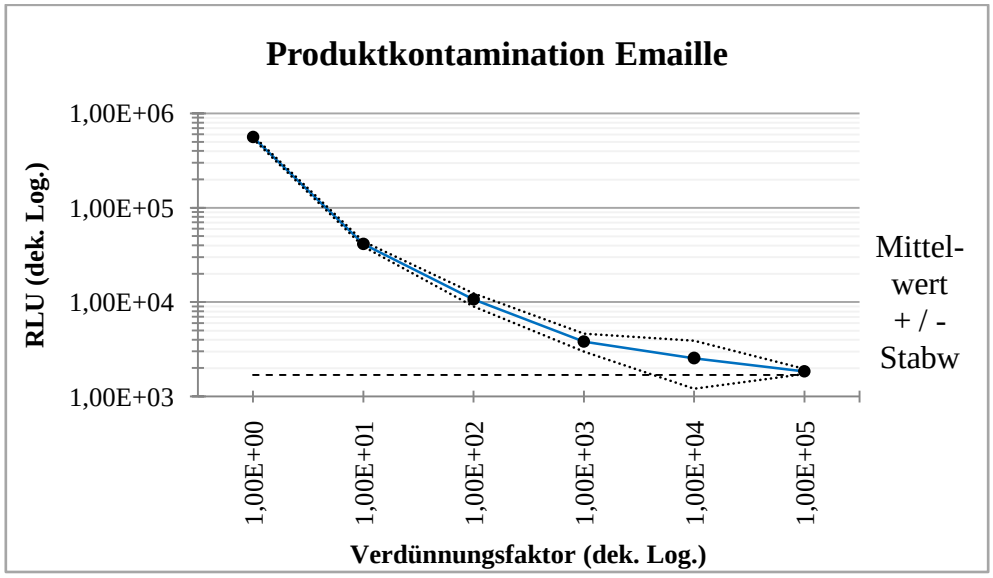


Abbildung 4-3 Darstellung der RLU-Werte pro Verdünnungsstufe (Produktkontamination auf Emaille; Mittelwerte +/- Standardabweichungen)

Tabelle 4-2 Messergebnisse zu Produktkontamination auf einer Emaille-Oberfläche

Verdünnungsstufe	*AS nt.*	*10^{-1}*	*10^{-2}*	*10^{-3}*	*10^{-4}*	*10^{-5}*	*Reinigungs-Kontrolle*	*Blank-Ringerlösung*
	580.068	41.541	10.077	3.869	3.661	1.715	0	1.231
RLU, n = 3	565.316	43.677	12.618	2.974	2.925	1.920	0	936
	537.966	38.879	9.386	4.585	1.063	1.906	0	1.058
Mittelwert	561.116,7	41.365,7	10.693,7	3.809,3	2.549,7	1.847,0	0,0	1.075,0
Standardabweichung	21.362,8	2.403,8	1.702,0	807,2	1.339,1	114,5	0,0	148,2
MIN	537.966,0	38.879,0	9.386,0	2.974,0	1.063,0	1.715,0	0,0	936,0
MAX	580.068,0	43.677,0	12.618,0	4.585,0	3.661,0	1.920,0	0,0	1.231,0
Streuung R	42.102	4.798	3.232	1.611	2.598	205	0	295
VarK (%)	3,81	5,81	15,92	21,19	52,52	6,20	-	13,79
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	597.131,5	45.418,1	13.562,9	5.170,1	4.807,1	2.040,1	0,0	1.324,9

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; AS nt. = Apfelsaft naturtrüb; Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Für beide Graphen konnten ähnliche Standardabweichungen berechnet werden. Dennoch sieht man einen Unterschied im Kurvenverhalten. Emaille-Untersuchungen ergaben einen gleichmäßigeren Verlauf entlang der Messung der Verdünnungssuspensionen. Gleichzeitig wird die Standardabweichung in diesem Bereich deutlich höher als bei Messungen auf Edelstahl (siehe 10^4-Verdünnung, Abbildung 4-3). Die Variationskoeffizienten betragen im Mittel für Edelstahl 13,79 $\pm$ 8,81 % und für Emaille 17,58 $\pm$ 18,41 %. Die unterschiedlich hohen VarK zeigen, dass Messungen auf Emaille tendenziell mehr streuen. Messungen auf einer raueren Oberfläche wie Edelstahl lassen sich geringfügig besser reproduzieren. Der zu erwartende exponentielle Zusammenhang verläuft in beiden Graphen über drei Verdünnungsstufen.

4.1.1.2 Detektion von *Saccharomyces cerevisiae* auf Emaille- und Edelstahloberflächen

Mit dem Referenzverfahren nach DIN 10113-1 konnten in den Laborversuchen auf Edelstahl-Oberflächen von 4 vegetativen Zellen 2 nachgewiesen werden (Tabelle 4-3). Auf Emaille wurden von 4 ebenfalls 2 Zellen nachgewiesen (Tabelle 4-4). Auffallend ist, dass die Wiederfindungsraten auf Emaille durchschnittlich um ca. 31 % höher liegen (Tabelle 4-3, Tabelle 4-4, jeweils letzte Zeile). Wie erwartet können auf glatten Oberflächen mehr Zellen nachgewiesen werden. Abbildung 4-4 zeigt die ermittelten RLU-Werte, die den Keimzahlen laut Referenzmethode (DIN 10113-1) gegenübergestellt sind.

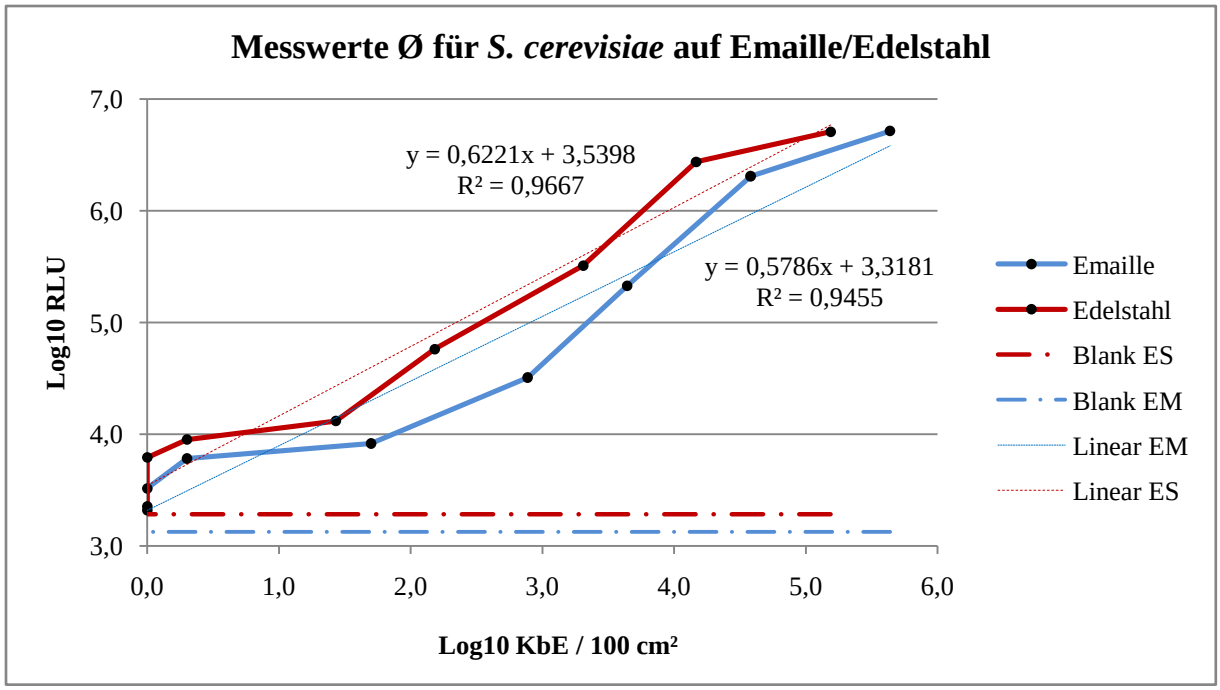


Abbildung 4-4 Darstellung der Messwerte, *Saccharomyces cerevisiae* auf Emaille (EM) und Edelstahl (ES)

Die Graphen zeigen kein einheitlich lineares bzw. exponentielles Verhalten. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Keimzahl und RLU-Werten. Je höher die Keimzahl, desto höher die Biolumineszenz. Dieser Zusammenhang ist jedoch trotz zehnfacher Verdünnungen nicht durchgehend exponentiell. Der höchste gemessene Wert repräsentiert die Kapazitätsgrenze des Systems. Auch er ist nicht in exponentieller Abhängigkeit mit den 4 folgenden Werten. Mit abnehmender Keimzahl scheinen sich beide Graphen asymptotisch dem ermittelten Blank-Wert zu nähern. Weiterhin fällt auf, dass die gemessenen RLU-Werte auf Edelstahl bei gleicher Verdünnungsstufe meist höher sind, als auf der Emaille-Oberfläche. So liefert die Anwesenheit von 64 ermittelten Zellen auf Emaille einen Messwert von ca. 8.000 RLU. Auf Edelstahl bewirken 50 Zellen bereits 13.000 RLU. Die Oberflächenbeschaffenheit wirkt sich

also auch auf die Höhe der Messwerte aus. Andere Faktoren, wie die Reinigbarkeit, Temperatur und verwendete Reinigungsmittel wirken ebenfalls messwertbestimmend. Besser vergleichbar wären die Ergebnisse deshalb bei gleicher Reinigungsart. Die Messungen konnten weiterhin nur um ca. 4 h versetzt durchgeführt werden, was einen unterschiedlichen physiologischen Zustand der Zellen bewirken kann. Am meisten wird der Einfluss der Oberfläche durch den Vergleich der Variationskoeffizienten deutlich. Bei Messungen auf Edelstahl beträgt dieser im Durchschnitt 12,98 $\pm$ 7,96 %, auf Emaille 20,83 $\pm$ 16,39 %. Das belegt eindeutig die höheren Schwankungen der Messwerte auf Emaille unter gleichen experimentellen Bedingungen. Wie auch bei der Detektion von Produktrückständen (Abschnitt 4.1.1.1) weisen Messungen auf Edelstahl geringere Schwankungen auf.

Gereinigte und getrocknete Oberflächen lieferten per Kontrollmessung Werte von 0 ± 0 RLU. Autoklavierte Ringerlösung, das Verdünnungsmedium der Kontaminations-Suspension, bewirkte nach Aufsprühen einen Blindwert von 1920 $\pm$ 110,7 RLU (Edelstahl) und 1338 $\pm$ 495,7 RLU (Emaille) (Tabelle 4-3, Tabelle 4-4). Obwohl durch den Abstrich mehr Zellen von Emaille mit dem Swab aufgenommen werden können, ist die Lichtintensität geringer. Der physiologische Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Messung hat vermutlich den größten Einfluss, sodass trotz identischer Vorgehensweise ein Unsicherheitsfaktor bestehen bleibt. Wie bei allen anderen untersuchten Mikroorganismen fehlt in der Praxis jedoch allein der qualitative Aspekt. Sehr starke Kontaminationen mit Mikroorganismen wie zum Beispiel *Saccharomyces cerevisiae* sind gegenüber den Stammlösungen der Produktkontamination (naturtrüber Apfelsaft) (Tabelle 4-1, Tabelle 4-2, Abschnit 4.1.1.1) um ca. eine Zehnerpotenz höher. Im Vergleich der Oberflächen besteht ein Unterschied in den Wiederfindungsraten für *Saccharomyces cerevisiae* von 31,69 % zugunsten der Emaille-Oberfläche.

Tabelle 4-3 Messergebnisse *Saccharomyces cerevisiae* auf Edelstahl

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***10^{-7}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / ml	6,43E+05	7,35E+04	1,25E+04	1,11E+03	1,24E+02	2,30E+01	0,00E+00	0,00E+00		
KbE / 0,4 ml	2,57E+05	2,94E+04	4,98E+03	4,43E+02	4,96E+01	9,20E+00	0,00E+00	0,00E+00		
RLU (n = 3)	5.421.603	3.209.548	380.387	59.169	11.795	9.214	6.581	2.203	0	2.451
	4.568.210	2.350.674	260.627	56.542	12.299	8.248	4.861	2.380	0	1.469
	5.310.457	2.691.405	329.626	57.494	15.338	9.391	7.096	2.178	0	1.842
Mittelwert	5.100.090,0	2.750.542,3	323.546,7	57.735,0	13.144,0	8.951,0	6.179,3	2.253,7	0,0	1.920,7
Standardabweichung	463.961,9	432.480,1	60.111,0	1.330,0	1.916,7	615,2	1.170,4	110,1	0,0	495,7
MIN	4.568.210,0	2.350.674,0	260.627,0	56.542,0	11.795,0	8.248,0	4.861,0	2.178,0	0,0	1.469,0
MAX	5.421.603,0	3.209.548,0	380.387,0	59.169,0	15.338,0	9.391,0	7.096,0	2.380,0	0,0	2.451,0
Streuung/Abstand	853.393	858.874	119.760	2.627	3.543	1.143	2.235	202	0	982
VarK (%)	9,10	15,72	18,58	2,30	14,58	6,87	18,94	4,89	-	25,81
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	5.882.266,0	3.479.644,5	424.885,6	59.977,2	16.375,3	9.988,2	8.152,4	2.439,3	0,0	2.756,4
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm^2)	1,54E+05	1,47E+04	2,04E+03	1,52E+02	2,70E+01	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	***WFR Ø (%)***	
DIN 10113-1 (KbE / cm^2)	1,54E+03	1,47E+02	2,04E+01	1,52E+00	2,70E-01	2,00E-02	0,00E+00	0,00E+00		
WFR (%)	59,92	50,00	40,96	34,31	54,44	21,74	0,00	0,00	43,56	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Tabelle 4-4 Messergebnisse Saccharomyces cerevisiae auf Emaille

Verdünnungsstufe	*Stammlösung*	*10^{-1}*	*10^{-2}*	*10^{-3}*	*10^{-4}*	*10^{-5}*	*10^{-6}*	*10^{-7}*	*Reinigungs-Kontrolle*	*Blank-Ringerlösung*
KbE / ml	1,52E+06	1,33E+05	1,24E+04	2,12E+03	1,60E+02	1,00E+01	0,00E+00	0,00E+00		
KbE / 0,4 ml	6,08E+05	5,31E+04	4,97E+03	8,48E+02	6,40E+01	4,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		
RLU (n = 3)	5.478.261	2.023.861	207.540	24.145	8.612	4.804	3.061	1.892	0	1.456
	5.165.824	1.899.434	228.253	41.390	6.403	9.884	2.464	2.759	0	1.236
	4.896.312	2.194.605	203.865	30.960	9.801	3.504	4.279	1.623	0	1.324
Mittelwert	5.180.132,3	2.039.300,0	213.219,3	32.165,0	8.272,0	6.064,0	3.268,0	2.091,3	0,0	1.338,7
Standardabweichung	291.238,2	148.189,9	13.148,6	8.685,4	1.724,3	3.371,5	925,0	593,7	0,0	110,7
MIN	4.896.312,0	1.899.434,0	203.865,0	24.145,0	6.403,0	3.504,0	2.464,0	1.623,0	0,0	1.236,0
MAX	5.478.261,0	2.194.605,0	228.253,0	41.390,0	9.801,0	9.884,0	4.279,0	2.759,0	0,0	1.456,0
Streuung/Abstand	581.949	295.171	24.388	17.245	3.398	6.380	1.815	1.136	0	220
VarK (%)	5,62	7,27	6,17	27,00	20,85	55,60	28,30	28,39	-	8,27
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	5.671.120,0	2.289.127,9	235.386,0	46.807,4	11.179,0	11.747,8	4.827,5	3.092,2	0,0	1.525,3
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm^2)	4,36E+05	3,82E+04	4,41E+03	7,73E+02	5,00E+01	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	*WFR Ø (%)*	
DIN 10113-1 (KbE / cm^2)	4,36E+03	3,82E+02	4,41E+01	7,73E+00	5,00E-01	2,00E-02	0,00E+00	0,00E+00		
WFR (%)	71,71	71,94	88,73	91,16	78,13	50,00	0,00	0,00	75,28	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Die Ermittlung der Nachweisgrenze erfolgt per Bestimmung des Korrelationskoeffizienten der Funktionen (Abbildung 4-5, Abbildung 4-6). Die NWG befindet sich im Hinblick auf die ATP-Messung in beiden Fällen zwischen 10 und 100 lebenden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* (Edelstahl > 27 KbE/100cm^2, Emaille > 50 KbE/100cm^2).

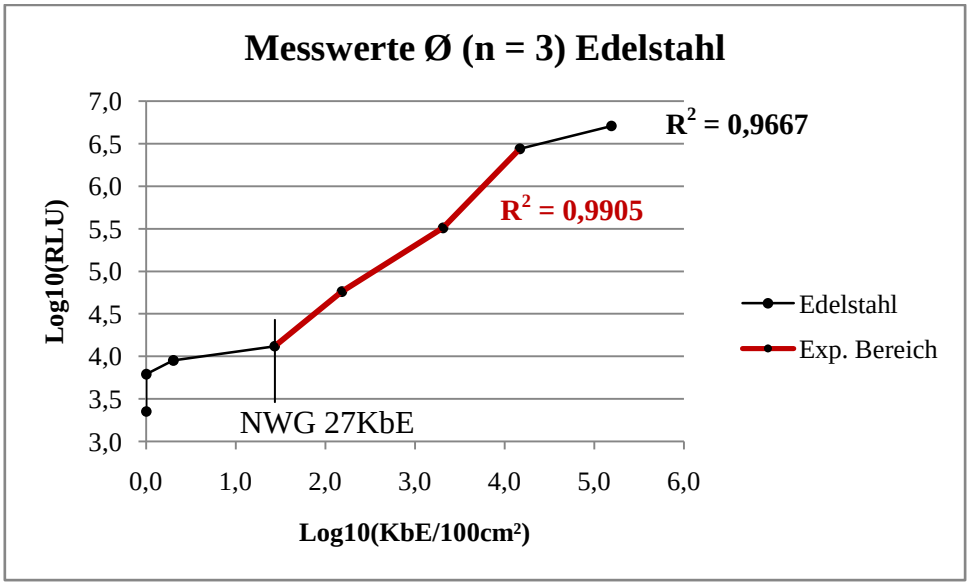


Abbildung 4-5 Exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte auf Edelstahl (n = 3)

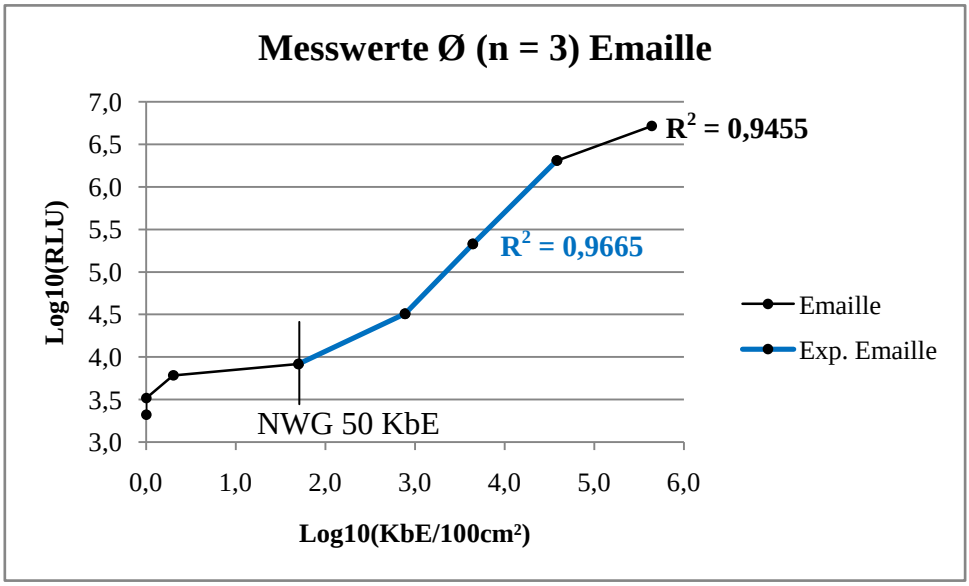


Abbildung 4-6 Exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte auf Emaille (n = 3)

Dafür wurden zunächst für Edelstahl- und Emaille-Untersuchungen alle RLU-Messwerte denen der Referenzmethode gegenübergestellt. Für beide Oberflächenmaterialien wurde der lineare / exponentielle Bereich zusätzlich herausgestellt (Abbildung 4-5, Abbildung 4-6). In

den Abbildungen ist die jeweilige Nachweisgrenze vermerkt. Für Edelstahl verschiebt sich das Bestimmtheitsmaß von R^2 = 0,9667 auf R^2 = 0,9905, für Emaille von R^2 =0,9455 auf R^2 = 0,9665. Die beiden letztgenannten Koeffizienten beider Oberflächenarten kennzeichnen also den exponentiellen Bereich, innerhalb dessen der Zusammenhang zwischen Zellzahl und RLU am größten ist. Der zu erwartende exponentielle Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenz erstreckt sich für Saccharomyces über 4 Zehnerpotenzen.

4.1.2 Detektierbarkeit weiterer AfG – spezifischer Mikroorganismen

4.1.2.1 Detektion von Milchsäurebakterien

Die Ausgangszellzahl der Kontaminations-Suspension betrug $1{,}94 * 10^7$ KbE / ml Milchsäurebakterien. Tabelle 4-5 zeigt die aufgenommenen Daten und Abbildung 4-7 die RLU-Messwerte gegenüber den Keimzahlen nach DIN 10113-1.

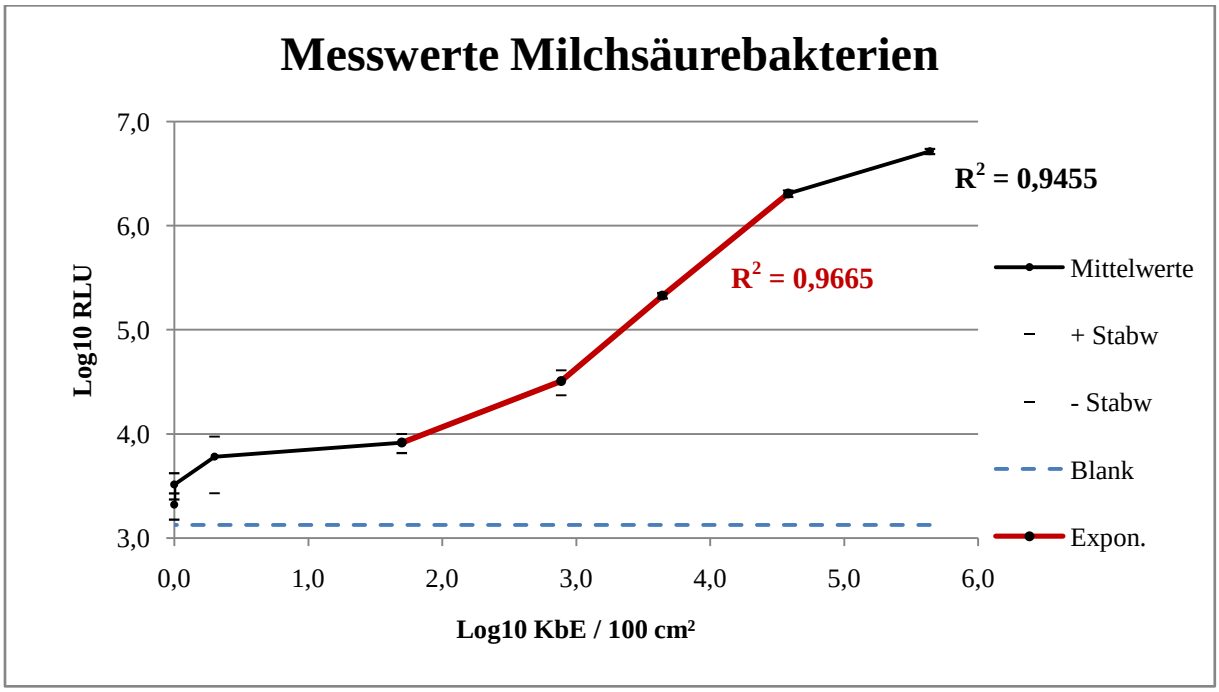


Abbildung 4-7 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte mit Milchsäurebakterien (n = 3)

Das Bestimmtheitsmaß dieses funktionellen Zusammenhangs beträgt R^2 = 0,9455. Werte oberhalb von ca. 10^5 Keimen ergeben keinen exponentiellen Zusammenhang. Auch die asymptotische Annäherung an den Blank-Wert lässt keine klaren Aussagen zu. Allein der lineare Bereich beschreibt eine starke Korrelation zwischen Zellzahl und Lichtmenge, die

durch exponentielles Verhalten bestätigt wird. Das Bestimmtheitsmaß beträgt in diesem Fall R^2 = 0,9665. Die Funktion kann in diesem Fall als annähernd linear beschrieben werden. Unterhalb von 10.000 RLU wird die Einschätzung ungenauer. So konnten mit der Referenzmethode bei Werten von durchschnittlich 4884 RLU immer noch Milchsäurebakterien nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass die Referenzmethode bezüglich der Anwesenheit von Milchsäurebakterien viel sensitiver ist (Vgl. Abschnitt 4.1.3). Das Verfahren nach DIN hat die NWG bei der Verdünnungssuspension mit dem Faktor 10^6 (6 vegetative Zellen). Mit Hilfe der ATP-Messung kann lediglich bis zur Verdünnung mit dem Faktor 10^4 von sicheren Ergebnissen ausgegangen werden (> 264 KbE/100cm^2). Das Messgerät kann nicht eindeutig zwischen 70 (5116 RLU) und 6 Milchsäurebakterien (4884 RLU) unterscheiden bzw. der Unterschied in der verursachten Lichtmenge ist sehr gering. Dies kann auch vom jeweiligen (Rest-) Nährstoffangebot in der jeweiligen Suspension sowie dem physiologischen Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Messung abhängen. Die Nachweisgrenze für Milchsäurebakterien liegt laut den ermittelten Daten (Tabelle 4-5) zwischen $1{,}49 * 10^3$ (22.863 RLU) und $2{,}64 * 10^2$ (7.278 RLU) Zellen pro 100 cm^2. Höchstwahrscheinlich ist diese Tatsache mit der geringeren Größe der Bakterien erklärbar, die auf der rauen Edelstahl-Oberfläche deutlich mehr Schlupf haben als beispielsweise *S. cerevisiae*.

Die Variationskoeffizienten der Datenreihen pro Verdünnungslösung betragen im Mittel 15,84 $\pm$ 6,72 RLU. Im Vergleich zu Produkt- und Hefekontaminationen ist die Streuung auf Edelstahl hier größer.

Tabelle 4-5 Detektion von Milchsäurebakterien auf Edelstahloberflächen

Verdünnungsstufe	***10^{0}***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***10^{-7}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / ml	1,94E+07	2,81E+06	1,27E+05	2,34E+04	1,29E+03	3,70E+02	7,00E+01	5,00E+00		
KbE / 0,4 ml	7,77E+06	1,12E+06	5,09E+04	9,35E+03	5,16E+02	1,48E+02	2,80E+01	2,00E+00		
RLU (n = 3)	3.145.890	806.582	68.963	27.835	6.405	4.269	5.738	4.159	0	1.472
	3.841.561	834.812	65.737	16.918	7.080	6.342	4.024	5.190	0	2.081
	2.458.604	709.771	72.803	23.836	8.348	4.737	4.891	3.975	0	1.716
Mittelwert	3.148.685,0	783.722	69.168	22.863	7.278	5.116	4.884	4.441	0	1.756
Standardabweichung	691.482,7	65.580,2	3.537,4	5.523,2	986,5	1.087,2	857,0	654,9	0,0	306,5
MIN	2.458.604	709.771	65.737	16.918	6.405	4.269	4.024	3.975	0	1.472
MAX	3.841.561	834.812	72.803	27.835	8.348	6.342	5.738	5.190	0	2.081
Streuung/Abstand	1.382.957	125.041	7.066	10.917	1.943	2.073	1.714	1.215	0	609
VarK (%)	21,96	8,37	5,11	24,16	13,55	21,25	17,55	14,75	-	17,45
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	4.314.430,0	894.280,8	75.131,3	32.174,3	8.940,7	6.948,9	6.329,2	5.545,3	0,0	2.273,0
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm^2)	3,16E+06	2,52E+05	1,67E+04	1,49E+03	2,64E+02	7,00E+01	6,00E+00	0,00E+00	***WFR Ø (%)***	
DIN 10113-1 (KbE / cm^2)	3,16E+04	2,52E+03	1,67E+02	1,49E+01	2,64E+00	7,00E-01	6,00E-02	0,00E+00		
WFR (%)	40,67	22,50	32,81	15,94	51,16	47,30	21,43	0,00	33,12	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

4.1.2.2 Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris

Tabelle 4-6, Tabelle 4-7 und Tabelle 4-8 zeigen die Datensätze der Versuche mit *A. acidoterrestris*. Die Abbildung 4-11 zeigt die exponentielle Abnahme der Keimzahlen, die mit der DIN 10113-1 ermittelt wurden (gestrichelte Linien). Während die kultivierbaren Organismen beim Versuch *A. at. 2* deutlich geringer ausfielen, zeigte sich per Lumineszenz-Detektion ein eher geringer Unterschied zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Kontaminationssuspensionen. Exponentielles Verhalten kann für die Lumineszenz-Messungen (durchgehende Linien) von der ersten bis zur vierten Verdünnungsstufe der Kontaminationssuspension bestätigt werden. Danach nähern sich die Graphen asymptotisch dem Blank-Wert. Keimzahlen und Relative Lichteinheiten können aufgrund der Höhe der Werte sowie der logarithmischen Einteilung in einem Diagramm mit nur einer Y-Achse dargestellt werden. Anhand der roten gestrichelten Linie erkennt man die Abnahme der Keimzahl nach der Pasteurisation. Zu diesem Zeitpunkt ist anzunehmen, dass ein bedeutend größerer Anteil an Sporen vorhanden ist, als in der Voranreicherung. Die Biolumineszenz-Detektion des Pasteurisats liefert demnach auch die niedrigsten RLU-Werte. Die dennoch hohen Werte können dadurch zustande kommen, dass in der auf ca. 45°C herunter gekühlten Suspension nach erfolgter Pasteurisation wieder vegetative Zellen vorhanden waren, deren ATP-Gehalt bekanntlich höher ist. Außerdem ist ein Rest-ATP-Gehalt aus der Stufe *A. at. 1* vorhanden, der durch den Schritt der Erhitzung nicht wesentlich verändert wurde. Des Weiteren dient der Schritt der Erhitzung der Aktivierung von Sporen, die nachfolgend beginnen, auszukeimen. Diese Tatsache wird durch das erneute Wachstum verdeutlicht (grüne Linien). Die Inkubation von 3 weiteren Tagen lässt die Keimzahl in etwa wieder auf Höhe der Ausgangskeimzahl wachsen. Die Tatsache, dass die verminderte Zellzahl auch eine verminderte Lumineszenz hervorruft, bestätigt die These der Korrelation der vegetativen Zellzahl von *Alicyclobacillus acidoterrestris* mit der Höhe der relativen Lichteinheiten. Beide Methoden erzielten hier höhere Werte, sowohl die Keimzahl betreffend als auch RLU-Werte. Beim Versuch *A. at. 2* bleibt die Aussage zur Erfassung von Sporen ungewiss. In den untersuchten Lösungen befinden sich stets die vegetative sowie die Endosporenform, sodass hier keine genaue Aussage diesbezüglich getroffen werden kann. Eine mikroskopische Kontrolle ergab einen ungefähren Sporenanteil von ca. 95% (*A. at. 2*), die Voranreicherung hatte ca. 75-80 %, die Wachstumsstufe ca. 50-60 % Sporen. Je mehr Sporen vorhanden sind, desto niedriger scheinen die RLU-Werte zu sein.

Tabelle 4-6 Ergebnisse des Versuches *A. at. 1* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (Voranreicherung) auf Edelstahloberflächen

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***10^{-7}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / ml Suspension	5,32E+06	4,87E+05	3,37E+04	2,33E+03	3,55E+02	3,00E+01	0,00E+00	0,00E+00		
KbE / 0,4 ml Suspension	2,13E+06	1,95E+05	1,35E+04	9,33E+02	1,42E+02	1,20E+01	0,00E+00	0,00E+00		
RLU (n = 3)	3.577.971	3.009.394	440.529	56.303	15.990	7.291	7.471	5.779	0	2.350
	3.753.948	4.288.554	635.608	77.693	13.719	8.141	6.857	7.764	0	2.012
	5.059.607	4.564.972	692.925	78.326	14.900	7.727	5.416	5.059	0	1.736
Mittelwert	4.130.508,7	3.954.306,7	589.687,3	70.774,0	13.869,7	7.386,3	6.581,3	6.200,7	0	2.033
Standardabweichung	809.419,4	829.907,6	132.315,8	12.536,2	963,9	970,9	1.054,9	1.400,9	0	308
MIN	3.577.971	3.009.394	440.529	56.303	13.719	7.291	5.416	5.059	0	1.736
MAX	5.059.607	4.564.972	692.925	78.326	15.990	8.141	7.471	7.764	0	2.350
Streuung/Abstand	1.481.636	1.555.578	252.396	22.023	2.271	850	2.055	2.705	0	614
VarK (%)	19,60	20,99	22,44	17,71	7,64	5,51	16,03	22,59	-	15,15
Konfidenz ($\boldsymbol{\alpha = 0,05}$)	5.495.078,7	5.353.417,1	812.753,6	91.908,4	16.784,5	8.436,2	8.359,7	8.562,4	0,0	2.551,1
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm^2)	1,33E+06	1,49E+05	1,20E+04	7,27E+02	1,00E+02	8,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	WFR Ø (%)	
DIN 10113-1 (KbE / cm^2)	1,33E+04	1,49E+03	1,20E+02	7,27E+00	1,00E+00	8,00E-02	0,00E+00	0,00E+00		
WFR (%)	62,44	76,41	88,89	77,92	70,42	66,67	0,00	0,00	73,79	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Tabelle 4-7 Ergebnisse des Versuches *A. at. 2* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (nach Pasteurisation) auf Edelstahloberflächen

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***10^{-7}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / ml Suspension	1,17E+06	1,28E+05	1,53E+04	1,93E+03	1,80E+02	2,00E+01	0,00E+00	0,00E+00		
KbE / 0,4 ml Suspension	4,69E+05	5,13E+04	6,11E+03	7,71E+02	7,20E+01	8,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		
RLU (n = 3)	3.124.221	1.816.072	238.694	35.256	9.990	7.191	5.280	4.910	0	1.890
	2.415.201	1.818.410	296.606	32.175	10.902	6.493	4.637	3.570	0	2.561
	3.036.958	2.296.196	321.329	30.718	11.909	5.611	5.306	3.561	0	2.389
Mittelwert	2.858.793,3	1.976.892,7	285.543,0	32.716,3	10.933,7	6.431,7	5.074,3	4.013,7	0	2.280
Standardabweichung	386.632,0	276.527,3	42.413,8	2.316,9	959,9	791,8	379,0	776,3	0,0	348,5
MIN	2.415.201	1.816.072	238.694	30.718	9.990	5.611	4.637	3.561	0	1.890
MAX	3.124.221	2.296.196	321.329	35.256	11.909	7.191	5.306	4.910	0	2.561
Streuung/Abstand	709.020	480.124	82.635	4.538	1.919	1.580	669	1.349	0	671
VarK (%)	13,52	13,99	14,85	7,08	8,78	12,31	7,47	19,34	-	15,29
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	3.510.601,9	2.443.079,7	357.046,8	36.622,4	12.551,9	7.766,5	5.713,2	5.322,3	0,0	2.867,6
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm^2)	2,67E+05	2,38E+04	3,18E+03	4,00E+02	3,10E+01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	WFR Ø (%)	
DIN 10113-1 (KbE / cm^2)	2,67E+03	2,38E+02	3,18E+01	4,00E+00	3,10E-01	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00		
WFR (%)	56,93	46,39	52,05	51,88	43,06	0,00	0,00	0,00	50,06	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Tabelle 4-8 Ergebnisse des Versuches *A. at. 3* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (Inkubation 1) auf Edelstahloberflächen

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***10^{-7}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / ml Suspension	4,42E+06	4,45E+05	4,11E+04	3,52E+03	3,36E+02	3,00E+01	0,00E+00	0,00E+00		
KbE / 0,4 ml Suspension	1,77E+06	1,78E+05	1,64E+04	1,41E+03	1,35E+02	1,20E+01	0,00E+00	0,00E+00		
RLU (n = 3)	5.555.835	3.299.390	308.494	39.275	15.888	7.086	5.222	5.049	0	3.515
	5.758.741	2.867.599	395.554	37.342	12.340	6.271	6.126	4.966	0	3.594
	5.722.034	2.671.470	566.036	40.052	11.286	7.391	4.816	4.924	0	3.312
Mittelwert	5.678.870,0	2.946.153,0	423.361,3	38.889,7	13.171,3	6.916,0	5.388,0	4.979,7	0,0	3.473,7
Standardabweichung	108.120,6	321.245,9	131.003,5	1.395,5	2.411,0	579,0	670,6	63,6	0,0	145,5
MIN	5.555.835	2.671.470	308.494	37.342	11.286	6.271	4.816	4.924	0	3.312
MAX	5.758.741	3.299.390	566.036	40.052	15.888	7.391	6.126	5.049	0	3.594
Streuung/Abstand	202.906	627.920	257.542	2.710	4.602	1.120	1.310	125	0	282
VarK (%)	1,90	10,90	30,94	3,59	18,30	8,37	12,45	1,28		4,19
Konfidenz ($\alpha = 0,05$)	5.861.146,5	3.487.729,5	644.215,2	41.242,3	17.236,0	7.892,2	6.518,5	5.086,9	0,0	3.718,9
DIN 10113-1 (KbE / 100 cm²)	1,41E+06	1,44E+05	1,45E+04	1,09E+03	1,00E+02	9,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	WFR Ø (%)	
DIN 10113-1 (KbE / cm²)	1,41E+04	1,44E+03	1,45E+02	1,09E+01	1,00E+00	9,00E-02	0,00E+00	0,00E+00		
WFR (%)	79,66	80,90	88,41	77,30	74,07	75,00	0,00	0,00	79,22	

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Dies kann als ein schwacher Trend angesehen werden. ATP-Gehalte können auch durch vegetative Zellen vor der Pasteurisation eingetragen worden sein. Folglich lässt sich daraus schließen, dass Endosporen im Vergleich zu vegetativen Organismen weniger zum Zustandekommen hoher Lumineszenzwerte beitragen. Dadurch ergeben sich auch die laut Abbildung 4-11 nur unwesentlich geringeren Lumineszenzwerte. Fraglich ist auch, ob die Reagenzien des Befeuchtungsmediums in der Lage sind, Endosporen aufzuschließen. Das könnte ein weiterer Grund für niedrigere RLU-Werte des Versuches *A. at. 2* sein. Alles in Allem ist der Einfluss bei Variation des Sporenanteils eher gering. Dieser drückt sich dennoch in der Wiederfindungsrate aus. Die Tabelle 4-9 zeigt die durchschnittlichen Wiederfindungsraten der Versuche mit *Alicyclobacillus acidoterrestris* per Referenzmethode. Wie vermutet wurde, sind die Wiederfindungsraten beim Versuch *A. at. 2* am geringsten. Allein die Größe der jeweiligen Lebensform – Spore oder vegetative Form – könnte ausschlaggebend dafür sein. Es ist auch hier ein Trend zu erkennen. Je höher der Anteil vegetativer Keime ist, desto höher sind auch die Lumineszenzwerte.

Tabelle 4-9 Durchschnittliche Wiederfindungsraten der Versuche *A. at. 1* bis *A. at. 3*

Versuch – Nr.	***A. at. 1 Anreicherung (7 d)***	***A. at. 2 Pasteurisation (10 min, 80°C)***	***A. at. 3 erneutes Wachstum (3 d)***
Anteil Sporen*	ca. 70-80 %	ca. 95 %	ca. 50-60 %
Wiederfindungsrate (Ø in %)	73,79	50,06	79,22

* Anteil Sporen – Schätzung/Zählung per Mikroskop, 100 Zellen-Zählung (3-fach)

Ähnlich den vorangegangenen Versuchen zeigt sich im Kurvenverhalten der Datenreihen, dass sehr hohe und niedrige Werte nur einem schwachen exponentiellen Zusammenhang unterliegen. Deshalb wurden die gesamten Werte gesondert von denen des exponentiellen Bereiches betrachtet (Abbildung 4-8, Abbildung 4-9, Abbildung 4-10). Die Nachweisgrenzen liegen bei den Versuchen *A. at. 1* und *A. at. 3* bei ca. 100 Zellen, entsprechend 15.000 RLU (*A. at. 1*) bzw. 13.000 RLU (*A. at. 1*). Genauere Aussagen können also bei Zellzahlen über 100 getroffen werden. Etwa 400 Zellen der Pasteurisationsstufe (*A. at. 2*) bewirken einen RLU-Wert von ca. 11.000. Hier haben sich Stoffwechselvorgänge durch die Pasteurisation vermutlich reduziert. Eine Bakterien-Suspension mit einem überwiegenden Anteil an Sporen (ca. 95 %) hat um ca. ein Viertel niedrigere Lumineszenzwerte bewirkt. Werte außerhalb des Exponentialbereiches sind als unsicher einzustufen. Es ließen sich in allen drei Versuchen mit

Alicyclobacillus acidoterrestris exponentielle Zusammenhänge über 4 Zehnerpotenzen ermitteln.

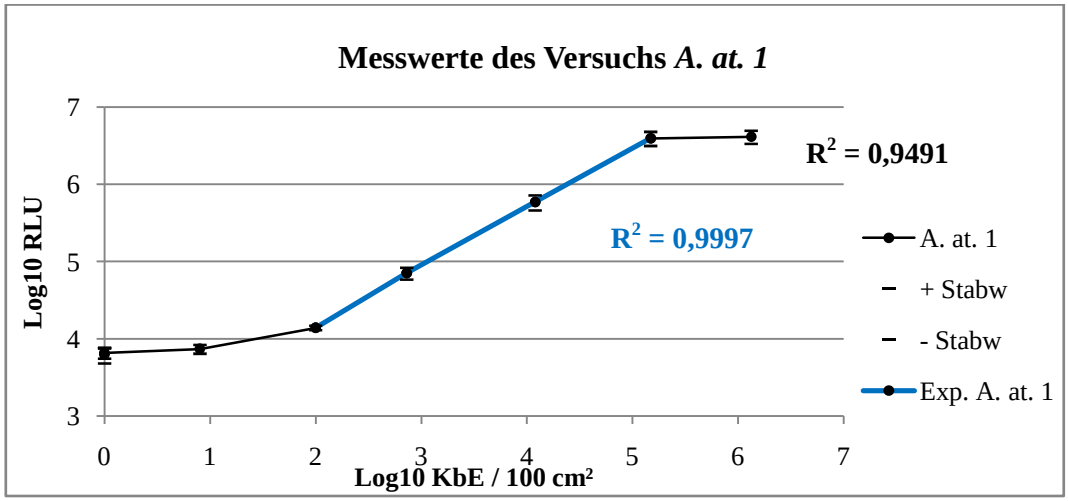


Abbildung 4-8 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 1*) (n = 3)

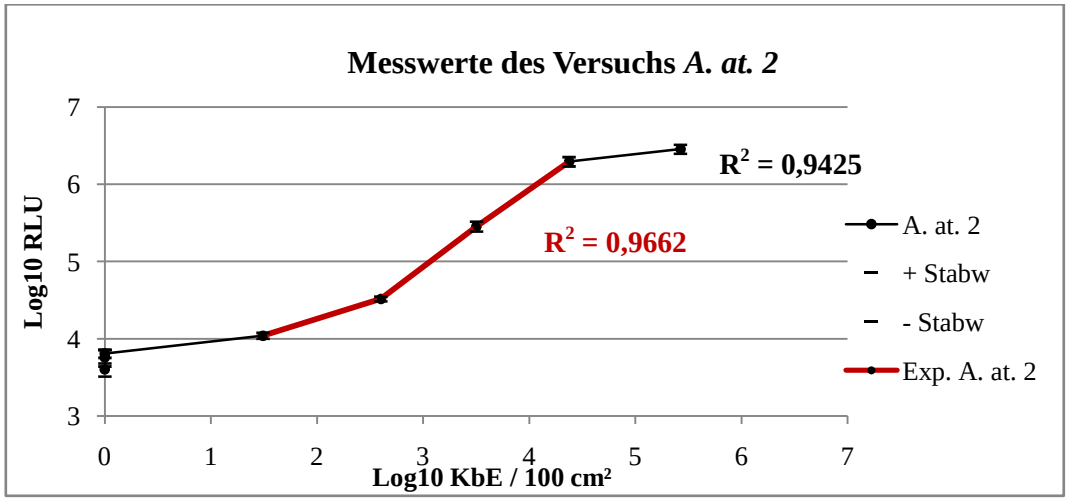


Abbildung 4-9 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 2*) (n = 3)

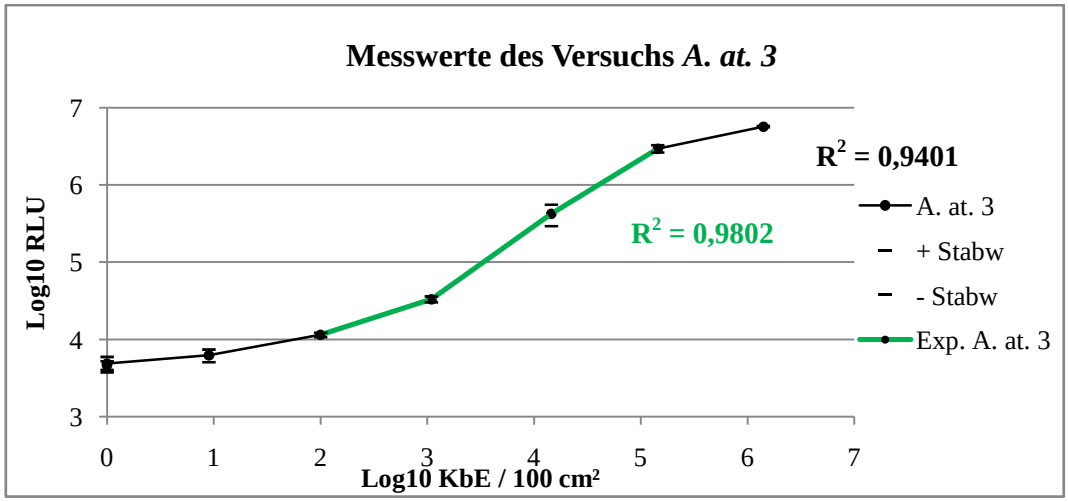
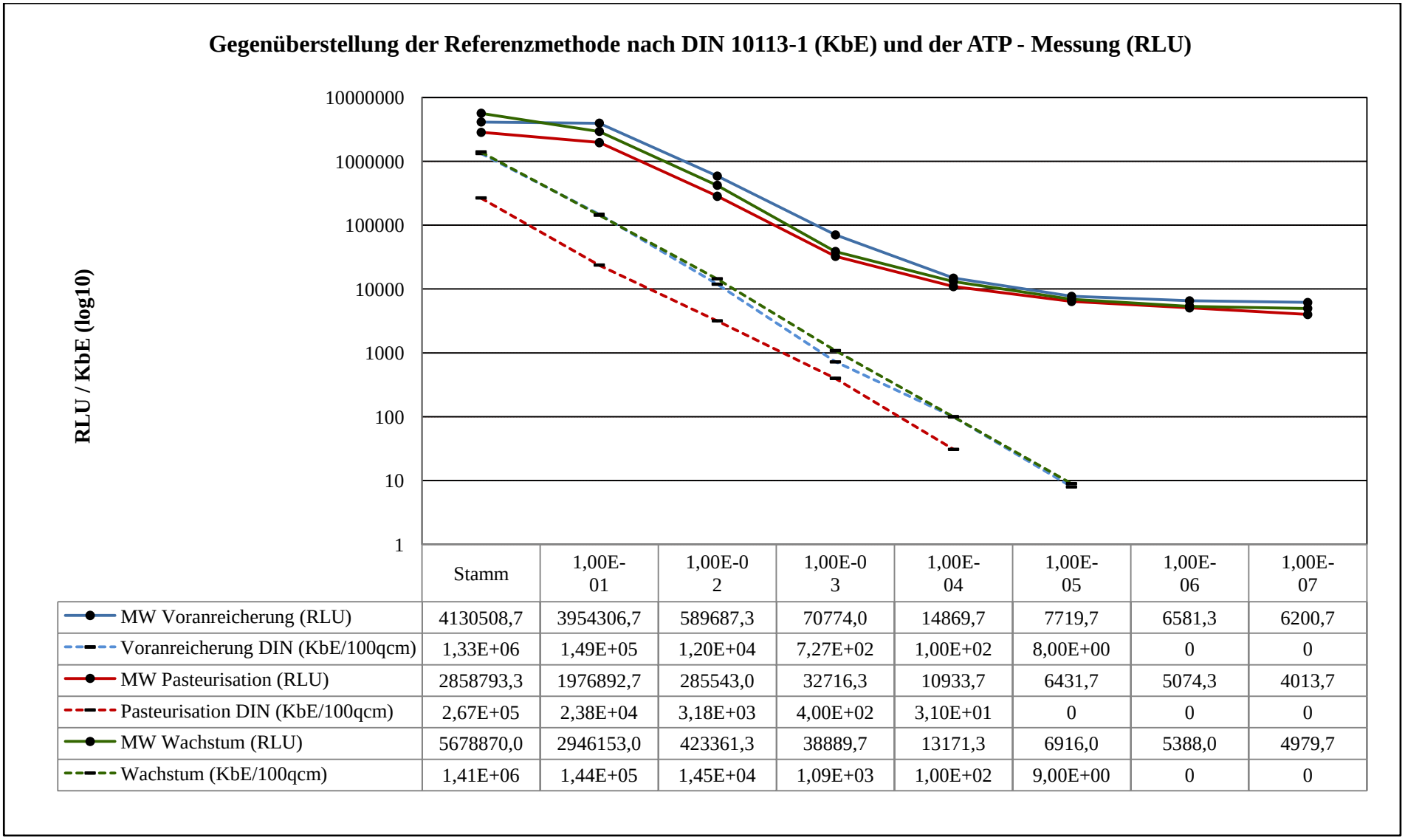


Abbildung 4-10 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 3*) (n = 3)



	Stamm	1,00E-01	1,00E-02	1,00E-03	1,00E-04	1,00E-05	1,00E-06	1,00E-07
MW Voranreicherung (RLU)	4130508,7	3954306,7	589687,3	70774,0	14869,7	7719,7	6581,3	6200,7
Voranreicherung DIN (KbE/100qcm)	1,33E+06	1,49E+05	1,20E+04	7,27E+02	1,00E+02	8,00E+00	0	0
MW Pasteurisation (RLU)	2858793,3	1976892,7	285543,0	32716,3	10933,7	6431,7	5074,3	4013,7
Pasteurisation DIN (KbE/100qcm)	2,67E+05	2,38E+04	3,18E+03	4,00E+02	3,10E+01	0	0	0
MW Wachstum (RLU)	5678870,0	2946153,0	423361,3	38889,7	13171,3	6916,0	5388,0	4979,7
Wachstum (KbE/100qcm)	1,41E+06	1,44E+05	1,45E+04	1,09E+03	1,00E+02	9,00E+00	0	0

Abbildung 4-11 Darstellung der Biolumineszenz- und Referenzmesswerte für *A. at.* je Verdünnungsstufe (nach Voranreicherung 7 d, Pasteurisation, erneutem Wachstum 3 d)

4.1.2.3 Detektion von Schimmelpilzen

Beide Schimmelpilze können mit Dip Slides (OGY-und Plate Count-Agar) bis zur 4. dekadischen Verdünnungsstufe nachgewiesen werden. Dazugehörige RLU-Messwerte liefern die in Abbildung 4-12 dargestellten Graphen sowie die Ergebnisse laut Tabelle 4-10 und Tabelle 4-11. *Aspergillus niger* konnte bei gleicher Verdünnungsstufe per Dip Slide nachgewiesen werden. Anders als bei *Penicillium spp.* zeigt die Funktion in diesem Bereich keine auffällige Änderung des Verlaufs. In das Diagramm ist die mikrobiologische Nachweisgrenze (je 2 KbE/10cm^2) der Organismen eingetragen. An dieser ist per Lumineszenz-Messwert allerdings kein deutlicher Unterschied (exponentieller Zusammenhang) zu erkennen.

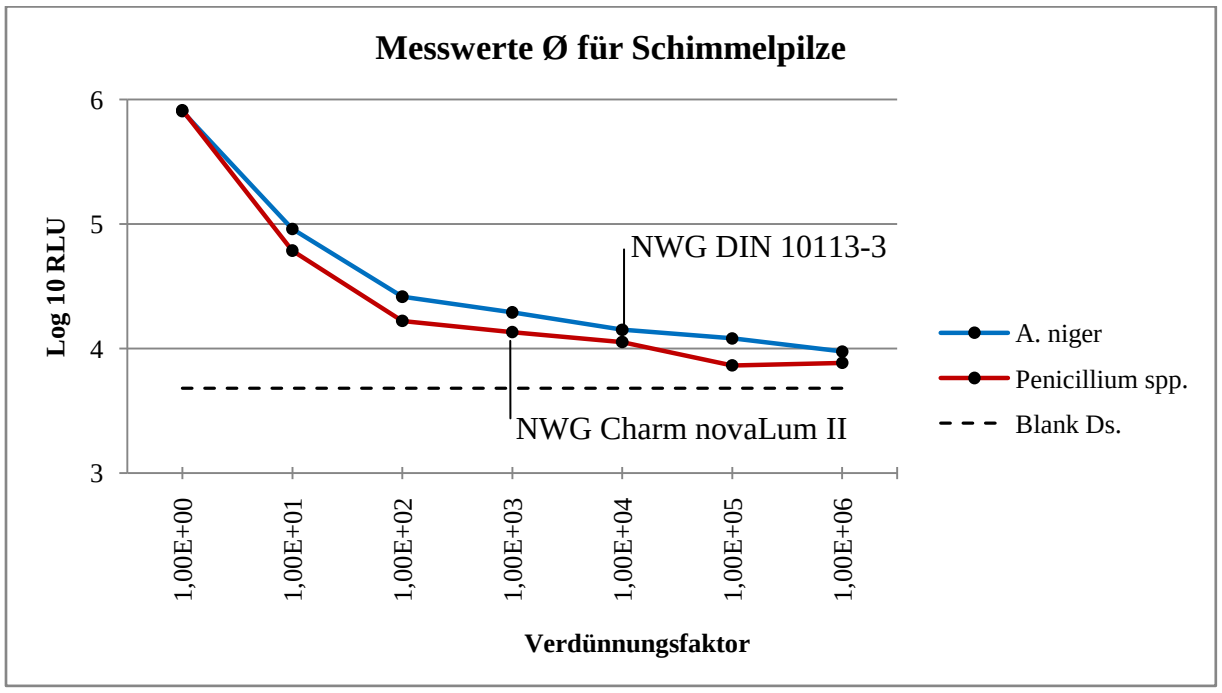


Abbildung 4-12 Detektion von *A. niger* (R^2 = 0,7786) und *Penicillium spp.* (R^2 = 0,7281)

Es ist zu vermuten, dass die ermittelten ATP-Gehalte (Tabelle 4-11) vor Allem durch die Anwesenheit des Pilzes bestimmt werden. Andererseits zeigten Verdünnungslösungen mit *Aspergillus niger* auch bei Abwesenheit des vegetativen Organismus erhöhte Werte. Dies kann durch ubiquitäres ATP aus vorherigen Verdünnungen hervorgerufen werden, welches durch Verschleppung diese Werte bedingt. Auch die Tatsache, dass es sich um eukaryontische Organsimen handelt, hat wahrscheinlich Auswirkungen auf diese Beobachtung. Weiterhin enthalten verdünnte Lösungen wahrscheinlich noch Rückstände des Nährmediums, deren Eintrag per Abschwemmung erfolgt sein kann. Diese können die Vitalität der Schimmelpilze beeinflussen. Alles in Allem dürfte der Einfluss jedoch gering sein, da mit autoklavierter Ringerlösung dekadisch verdünnt wurde.

Tabelle 4-10 Detektion von *Aspergillus niger* auf Edelstahloberflächen

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / 10 cm² OGY Agar	n. a.	n. a.	n. a.	12	2	0	0		
KbE / 10 cm² plate count Agar	n. a.	n. a.	n. a.	14	2	0	0		
RLU (n = 3)	892.263	96.590	27.672	20.335	14.736	15.130	10.312	0	5.840
	764.076	92.896	27.587	19.965	14.601	11.080	9.780	0	5.063
	763.385	84.924	23.153	18.464	13.214	10.100	8.375	0	4.336
Mittelwert	806.574,7	91.470,0	26.137,3	19.588,0	14.183,7	12.103,3	9.489,0	0,0	5.079,7
Standardabweichung	74.209,1	5.962,3	2.584,9	990,8	842,5	2.666,6	1.000,8	0,0	752,1
MIN	763.385	84.924	23.153	18.464	13.214	10.100	8.375	0	4.336
MAX	892.263	96.590	27.672	20.335	14.736	15.130	10.312	0	5.840
Streuung/Abstand	128.878	11.666	4.519	1.871	1.522	5.030	1.937	0	1.504
VarK (%)	9,20	6,52	9,89	5,06	5,94	22,03	10,55	-	14,81
Konfidenz ($1-\alpha=0,95$)	931.681,0	101.521,6	30.495,0	21.258,4	15.603,9	16.598,8	11.176,1	0,0	6.347,7

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Tabelle 4-11 Detektion von *Penicillium spp.* auf Edelstahloberfläche

Verdünnungsstufe	***Stammlösung***	***10^{-1}***	***10^{-2}***	***10^{-3}***	***10^{-4}***	***10^{-5}***	***10^{-6}***	***Reinigungs-Kontrolle***	***Blank-Ringerlösung***
KbE / 10 cm^2 OGY Agar	n. a.	n. a.	n. a.	7	2	0	0		
KbE / 10 cm^2 plate count Agar	n. a.	n. a.	n. a.	8	2	0	0		
RLU (n = 3)	995.686	63.377	17.305	14.281	12.711	8.720	8.995	0	4.250
	763.626	61.539	16.980	14.263	11.435	7.505	8.383	0	5.550
	704.568	58.478	15.690	12.051	9.660	5.739	5.649	0	4.369
Mittelwert	821.293,3	61.131,3	16.658,3	13.531,7	11.268,7	7.321,3	7.675,7	0,0	4.723,0
Standardabweichung	153.888,2	2.474,8	854,2	1.282,3	1.532,3	1.499,0	1.781,6	0,0	718,7
MIN	704.568	58.478	15.690	12.051	9.660	5.739	5.649	0	4.250
MAX	995.686	63.377	17.305	14.281	12.711	8.720	8.995	0	5.550
Streuung/Abstand	291.118	4.899	1.615	2.230	3.051	2.981	3.346	0	1.300
VarK (%)	18,74	4,05	5,13	9,48	13,60	20,47	23,21		15,22
Konfidenz ($1-\alpha=0,95$)	1.080.727,6	65.303,5	18.098,4	15.693,5	13.851,9	9.848,4	10.679,2	1.474,0	5.934,6

RLU = relative Lichteinheiten; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; WFR = Wiederfindungsrate; WFR Ø = durchschnittliche Wiederfindungsrate (nur positive Befunde); grau hinterlegt = richtig positiv; grün hinterlegt = falsch positiv, Reagenzien-Kontrolle 0 ± 0 RLU (n = 3)

Bei gleichen Wachstumsbedingungen und identischer experimenteller Vorgehensweise sind Unterschiede in der Detektion der zwei unterschiedlichen Arten/Gattungen von Schimmelpilzen per ATP-Messung zu erkennen. Es ist auffällig, dass der Schimmelpilz aus dem Produktionsumfeld in fast jeder untersuchten Lösung bzw. Verdünnungsstufe niedrigere Messwerte liefert, als *Aspergillus niger* Tabelle 4-12. Es ist bekannt, dass Letzterer ein verhältnismäßig schnelles Wachstum aufweist, was für höhere ATP-Gehalte verantwortlich sein kann. Eine unterschiedlich schnelle bzw. effektive Substratverwertung könnte vermutlich ebenso für die unterschiedlichen Graphen verantwortlich sein.

Tabelle 4-12 Mittelwerte und Spannweiten der RLU-Werte von *Aspergillus niger* und *Penecillium spp.*

Schimmelpilz	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Aspergillus niger	806574,7	91470,0	26137,3	19588,0	**14183,7**	12103,3	9489,0
Penicillium spp.	821293,3	61131,3	16658,3	13531,7	**11268,7**	7321,3	7675,7
Spannweite R	14718,7	30338,7	9479,0	6056,3	**2915,0**	4782,0	1813,3

Eine Detektion per ATP-Messung ist letztendlich in beiden Fällen möglich. Fraglich bleibt die Detektion in der Praxis bei latenter Kontamination, das heißt, dass Schimmelpilze über längere Zeiträume auch Perioden ohne entsprechendes Nährstoffangebot überleben ohne zu wachsen. Es kann sich aus schwachen Kontaminationen innerhalb verhältnismäßig kurzer Zeiten ein Gefährdungspotential durch Schimmel entwickeln. Weiter ist die Nachweisgrenze per Lumineszenz höher anzusetzen, als die mit dem Referenzverfahren ermittelte. Unterschiede in der Detektion zeigen sich zwischen der zweiten und dritten Verdünnungsstufe (Abbildung 4-12). Das entspricht einer Anzahl von Koloniebildenden Einheiten von mehr als 14 (*A. niger*) und bedeutend mehr als 8 KbE/10cm^2 (entspricht 16.658 RLU, n. a.) (*Penecillium spp.*). *Penicillium spp.* kann folglich nicht so deutlich erkannt werden, wie *Aspergillus niger* bezogen auf dieselbe Verdünnungslösung und in etwa der Anzahl koloniebildender Einheiten. Bezogen auf die Referenzmethode kann eine Detektion von Sporen als fraglich angesehen werden, denn es ist davon auszugehen, dass auch geringere Zellzahlen (> 14/8 KbE) dieser Organismen innerhalb einer relativ kurzen Zeit zu Schäden führen können. Die Detektion des Pilzes ist hier lediglich in Form seiner in Lösung gebrachten Konidien/Sporen erfolgt, die in der Praxis maßgeblich zur Verbreitung seiner Art beitragen und die auf fast allen Oberflächen und deren Peripheriebereichen im

Produktionsumfeld vorkommen. Die Untersuchung von Mycel-Bestandteilen per ATP-Messung ist aus praktischen Gründen nur schwer möglich. An Oberflächen haftende Myzel-Bestandteile, ähnlich Biofilmen, können aufgrund der erhöhten Stoffwechselaktivität mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Messgerät detektiert werden. Es bleibt zu sagen, dass Vermehrungsformen beider Schimmelpilze in höheren Konzentrationen erkannt werden können. Vor Allem aber in Bereichen stärkerer Verdünnungen wird das Risiko bezüglich einer wahrheitsgemäßen Aussage höher, da die einzelnen Datenreihen nicht deutlich voneinander differieren bzw. sich nicht exponentiell verhalten. Im Fall von Mycel-Untersuchungen wäre mit erheblich höheren ATP-Gehalten zu rechnen.

4.1.3 Zusammenfassung der Untersuchungen von Mikroorganismen

Ergebnisse der Untersuchungen mit Mikroorganismen sind in der Tabelle 4-13 zusammengefasst. Darin sind die jeweiligen Nachweisgrenzen vermerkt, die für den jeweiligen Mikroorganismus ermittelt wurden. Die Ergebnisse basieren auf Modellversuchen unter weitestgehend standardisierten Bedingungen. Eine Vergleichbarkeit zu Angaben anderer Studien kann mithilfe der Tabelle 2-6 (Zeile 1-3) erfolgen. Es wurden ähnlich hohe Bestimmtheitsmaße ermittelt, die die Korrelation der relativen Lichteinheiten, abhängig vom ATP-Gehalt, mit der Zellzahl bzw. KbE verschiedener Organismen belegen.

Tabelle 4-13 Korrelationen, Nachweisgrenzen und Sensitivität der Verfahren Charm novaLum II, DIN 10113-1, DIN 10113-3

Organismus	***OF***	***Korrelation (KbE - RLU)***	***NWG KbE/100cm²*** ***DIN 10113-1,-3***	***NWG RLU (entspr. KbE)***
S. cer.	ES	R = 0,9667	2	> 13144 (>27 KbE/100cm²)
	EM	R = 0,9455	2	> 8272 (>50 KbE/100cm²)
MSB	ES	R = 0,9455	6	> 7278 (>264 KbE/100cm²)
A. at. 1	ES	R = 0,9491	8	> 14869 (>100 KbE/100cm²)
A. at. 2	ES	R = 0,9425	31	> 10934 (>31 KbE/100cm²)
A. at. 3	ES	R = 0,9401	9	> 13171 (>100 KbE/100cm²)
A. niger	ES	*	2	> 19588 (>14 KbE/10cm²)
Penicillium spp.	ES	*	2	> 16658 (>>8 KbE/10cm² - n. a.)

* = Detektion per Dip Slides, höhere Kontaminationen nicht auszählbar; ES = Edelstahl; EM = Emaile; OF = Oberfläche; Korrelation = Bestimmtheitsmaß der linearen Regression

Unter den Versuchsbedingungen wurden, außer für Schimmelpilze, ähnlich hohe Korrelationen ermittelt, die meist bei $R^2 = 0{,}94$ liegen. Lediglich Die Detektion von *Saccharomyces cerevisiae* auf Edelstahl bewirkte eine Korrelation mit einem höheren Bestimmtheitsmaß. Für Schimmelpilze konnten aufgrund der Verwendung von Dip Slides als Referenz und der fehlenden Werte bei höheren KbE/RLU keine Bestimmtheitsmaße errechnet werden (Flächenwuchs, nicht auszählbar). Die Bestimmtheitsmaße in der Beschriftung der Abbildung 4-12 deuten auf eine schwächere Korrelation hin, als sie bei Bakterien und *S. cerevisiae* ermittelt werden konnte. Aussagen zum Vergleich der Sensitivität können der Tabelle 4-14 entnommen werden. Übereinstimmungen fanden sich nur im Fall des Versuches *A. at. 2*, in dem eine Suspension mit ca. 95 % Sporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris* verwendet wurde. Hier konnten in höheren Verdünnungsstufen weniger Organismen per DIN 10113-1 abgestrichen werden. Das liegt höchstwahrscheinlich an der geringen Größe der Sporen, die auf der rauen Edelstahloberfläche mehr Schlupf finden. Gleichzeitig ist auf der befeuchteten Oberfläche immer noch genügend ATP vorhanden, welches die Nachweisgrenze beider Verfahren in diesem speziellen Fall übereinstimmen lässt. Die Versuche *A. at. 1* und *A. at. 3* mit einem höheren Anteil an größeren, vegetativen Zellen, führen deshalb auch zu einer Sensitivität von 100,00 %. Saccharomyces cerevisiae konnte mit der mikrobiologischen Referenzmethode in jedem Fall zu 100,00 % nachgewiesen werden.

Tabelle 4-14 Sensitivität (%) der verschiedenen Verfahren

Organismus	***Charm novaLum II (%)*** ***S (%)***	***DIN 10113-1 (%)*** ***S (%)***	***DIN 10113-3 (%)*** ***S (%)***
***S. cer.* (ES)**	83,33	100,00	-
***S. cer.* (EM)**	83,33	100,00	-
MSB	58,33	87,50	-
A. at. 1	83,33	100,00	-
A. at. 2	83,33	83,33	-
A. at. 3	83,33	100,00	-
A. niger	*80,00*	-	*100,00 (Referenzwert)*
Penicillium spp.	*60,00*	-	*100,00 (Referenzwert)*

Schimmelpilze kursiv = Ergebnisse DipSlides als Bezugswert für Sensitivitätsberechnung

Als Fazit kann festgehalten werden, dass in diesem Fall mit abnehmender Zellgröße eine verringerte Sensitivität zu erwarten ist. Für Sensitivitäten der Schimmelpilzuntersuchungen

waren Ergebnisse der Dip Slides die entsprechende Referenz (100,00 %). Folglich bezieht sich die Sensitivität auf die Referenzmethode. Detektionen von Schimmelpilzsporen sind demnach vermutlich mit noch geringeren Sensitivitäten verbunden. Es ist auffallend, dass das Messsystem sensitiver auf *Aspergillus niger* reagiert. Bei gleichen Wachstumsbedingungen könnte hier ein unterschiedlicher Nährstoffanspruch oder eine unterschiedliche Nährstoffverwertung bestehen, der sich auch in den produzierten ATP-Mengen ausdrückt.

Im Vergleich ist im Bezug auf die Detektierbarkeit Fruchtsaft-relevanter Mikroorganismen eine geringere Sensitivität für Lumineszenz-Messungen feststellbar. Das Verfahren laut DIN 10113-1(-3) ist um ca. 20 % höher. Das liegt auch daran, dass Matrixeffekte die Korrelation zwischen Zellzahl und ATP-Gehalt verringern, was in der Praxis nicht zwangsläufig nachteilig ist. Die Detektion von Produktrückständen kann andernfalls als Vorteil angesehen werden, da sich aus diesen Rückständen mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Gefahrenpotential entwickelt.

Zusammenfassend geben die Modellversuche Aufschluss darüber, inwiefern sich einzelne Verschmutzungssituationen auf die Ausprägung von Lumineszenz-Messwerten verhalten. Weitere Einflussfaktoren wie die Art der Oberfläche, machen eine gesonderte Betrachtung vor Allem im Fall der Grenzwertfestlegung notwendig. Produktrückstände sind in der Praxis nicht genau von mikrobiellen Kontaminationen zu unterscheiden. Bezüglich einer Reinigungskontrolle spielt das allerdings nur eine untergeordnete Rolle.

4.2 Praxisbezogene Untersuchungen

4.2.1 Einfluss der Temperatur und Genauigkeit des Messsystems

Abbildung 4-13 zeigt den Einfluss der Temperatur auf das Messsystem. Anhand der Kurve erkennt man den Charakter dieser enzymatischen Reaktion.

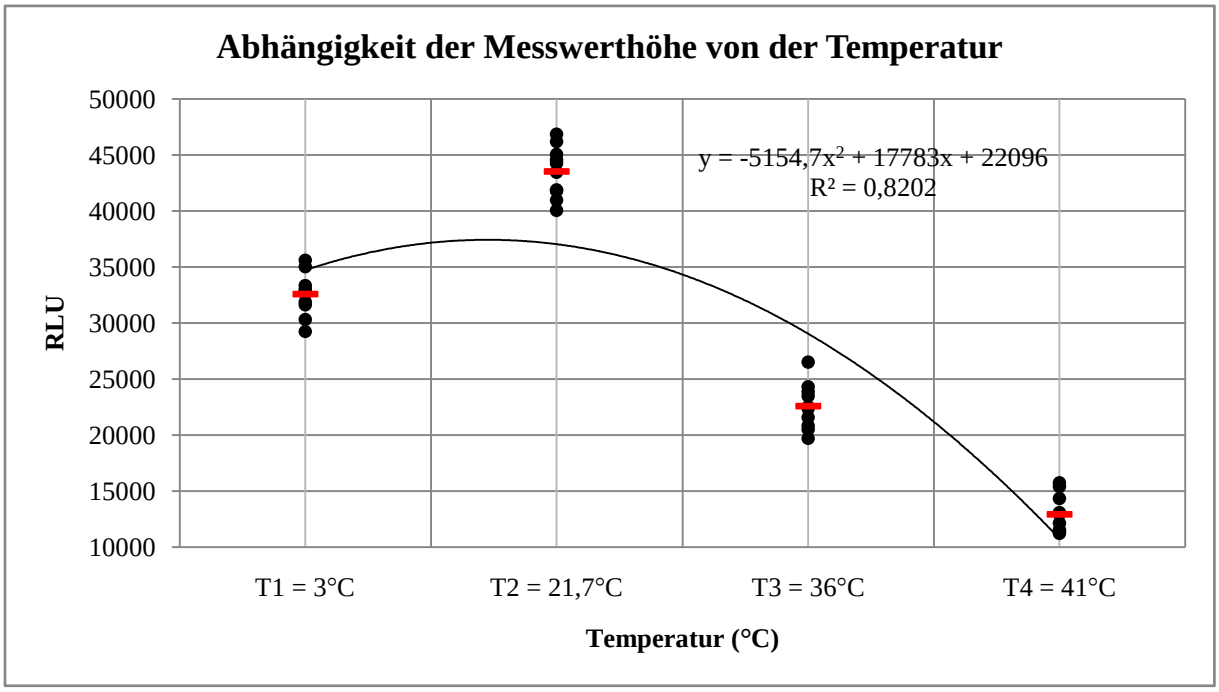


Abbildung 4-13 Darstellung der Einzelmesswerte, Mittelwerte in Abhängigkeit von der Temperatur

Das Temperaturoptimum liegt ca. zwischen 20 und 25°C. In Produktionsbereichen, die deutlich oberhalb dieser Temperaturen liegen, kann ein Erwärmen des Pocket Swabs und der darin enthaltenen Reagenzien zu Messminderungen führen. Das Enzym ist dann in seiner Aktivität limitiert und es entstünden Werte, die nicht den reellen Hygienestatus repräsentieren. Bei Verwendung des Gerätes und den Swabs ist demnach darauf zu achten, dass diese sich nicht zu sehr erwärmen bzw. nicht in solchen Produktionsumfeldern gelagert werden. Auch beim Transport der Swabs zu den Messstellen dürfen keine großen Temperaturänderungen auftreten.

Man erkennt die geringe Streuung aufgrund der Abweichung von der vom Hersteller gegebenen Methode (Turner, et al., 2010) (Abbildung 4-13). Es liegt ein Temperaturoptimum des Reaktionsgemisches innerhalb des Bereiches der Raumtemperatur (ca. 20-25°C) vor. Das

entspricht den Lagerbedingungen der Swab´s laut Hersteller. Anhand der geringen Spannweiten ist eine gute Reproduzierbarkeit des Messsystems zu erkennen. Diese kommt dadurch zustande, dass der Vorgang des Abstriches entfällt und Probenvolumina genau bemessen wurden. Der Erwartungswert wird sich mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit innerhalb des durch die Vertrauensgrenzen gebildeten Konfidenzintervalls befinden (Tabelle 4-16).

Anhand der Variationskoeffizienten (Tabelle 4-16) ist zu erkennen, dass die Messung eine gute Reproduzierbarkeit aufweist. Der geringste Koeffizient wird bei T2 (21,7°C) erreicht. Je höher die Temperatur ist desto weiter scheinen die Messwerte voneinander zu differieren. Die Reaktion läuft also nicht nur vermindert, sondern auch geringfügig ungleichmäßiger ab. Das belegt der Trend steigender Variationskoeffizienten mit Zunahme der Temperatur. Als Fazit lässt sich herausstellen, dass das Gerät in der Lage ist, reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Die folgenden Berechnungen belegen diese Tatsache. Es werden die Standardabweichungen der 4 Datenreihen verglichen bzw. die 4 Datenreihen auf Varianzhomogenität geprüft. Anlage 1 bis Anlage 4 zeigen die Einzelergebnisse der Berechnungen für die ermittelten Daten laut Tabelle 4-15.

Tabelle 4-15 Ergebnismatrix des Tests auf Varianzhomogenität

Datenreihe	***T1 = 3°C***	***T2 = 21,7°C***	***T3 = 36°C***	***T4 = 41°C***
Ausreißer (Grubbs)	keine	keine	keine	keine
normalverteilt (Anderson/Darling)	ja	ja	ja	ja
F-Test	***T1 = 3°C***	***T2 = 21,7°C***	***T3 = 36°C***	***T4 = 41°C***
T1 = 3°C	-	1	1	1
T2 = 21,7°C	1	-	1	1
T3 = 36°C	1	1	-	1
T4 = 41°C	1	1	1	-

1 = Verhältnis der Varianzen ist gleich 1; 0 = Verhältnis der Varianzen ist ≠ 1

Es sind in den Versuchsreihen keine Ausreißer ermittelt worden. Die Messwerte unterliegen einer Normalverteilung. Der F-Test belegt, dass zwischen den Messwertreihen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Streuungsparameter bestehen.

Tabelle 4-16 Ergebnisse der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen

Messung Nr. (n = 10)	***T_1 = 3–6°C (RLU)***	***T – Verlauf (°C)***	***T_2 = 21,7°C (RLU)***	***T – Verlauf (°C)***	***T_3 = 36°C (RLU)***	***T – Verlauf (°C)***	***T_4 = 41°C (RLU)***	***T – Verlauf (°C)***
1	31.617	4,2	41.886	21,7	19.691	36	14.330	41
2	29.241	4,4	45.077	21,7	21.576	36	15.725	41
3	32.894	4,8	46.222	21,6	20.847	35,9	12.137	40,9
4	30.311	5,3	40.967	21,6	20.512	35,9	11.412	40,9
5	35.035	5,9	40.071	21,6	22.366	35,9	11.354	40,9
6	31.888	4,3	46.876	21,6	22.551	35,8	12.937	40,8
7	32.669	4,7	44.594	21,6	23.493	35,8	11.541	40,8
8	35.617	4,9	44.264	21,6	26.510	35,8	13.085	40,8
9	33.361	5,2	41.816	21,6	24.306	35,8	11.208	40,8
10	33.011	5,7	43.458	21,6	23.876	35,8	15.400	40,8
Mittelwert MW	32.564,40	4,94	43.523,10	21,62	22.572,80	35,87	12.912,90	40,87
Standardabweichung	1.939,46		2.277,56		2.044,44		1.706,38	
MIN	29.241		40.071		19.691		11.208	
MAX	35.617		46.876		26.510		15.725	
Spannweite R	6.376		6.805		6.819		4.517	
VarK (%)	5,96		5,23		9,06		13,21	
Konfidenz 95%	33.951,7		45.152,3		24.035,2		14.133,5	

Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Diese Berechnungen sagen über das Messgerät aus, dass es wiederholt unter annähernd gleichen Bedingungen (exakt gleich große Aliquots, einheitliche Testsubstanz, gleicher Anwender) reproduzierbare Ergebnisse liefert. Lediglich die Temperatur wurde variiert (Tabelle 4-16), um gleichzeitig Informationen über die ablaufende Reaktion zu erhalten. Für die Praxis im Fruchtsaftbetrieb bedeutet eine Temperaturempfindlichkeit eine Limitierung des Anwendungsgebietes. Vor allem bei wechselnden Temperaturen und längeren Einwirkzeiten auf die Swabs sind isolierte Tragevorrichtungen zu empfehlen bzw. die Zeit abweichender Temperatureinwirkung zu minimieren. Weiterhin sind für Messpunkte abweichender Temperaturen Grenzwerte festzulegen und mit Referenzmessungen zu überprüfen.

4.2.2 Ermittlung von Toleranz- bzw. Richtwerten

Edelstahltanks. Der Maximalwert aller Messungen bezogen auf die Tankart kann als Richtwert gesehen werden, unterhalb dessen mikrobiologische Referenzmessungen als stets negativ ermittelt werden konnten. Alle in der Tabelle 4-17 aufgeführten Messwerte sind durch die Referenzmethode abgesichert.

Tabelle 4-17 Messwerte und Bestimmtheitsmaße zur Ermittlung von Grenzwerten für Tanks

Messung Nr.	***Edelstahltanks***			***Emailletanks***		
	ES 1	**ES 2**	**ES 3**	**EM 1**	**EM 2**	**EM 3**
1	4.115	3.155	5.990	29.670	12.327	8.966
2	306	1.931	2.068	16.664	17.990	9.975
3	3.015	4.709	5.474	20.958	28.860	14.774
4	2.135	1.965	3.734	34.265	10.599	19.634
5	657	391	4.471	16.234	2.208	5.193
6	75	0	3.147	8.791	36.477	7.203
7	2.569	1.711	3.643	39.383	13.428	35.056
8	10.384	5.053	10.824	14.454	8.776	3.767
9	5.333	105	0	15.539	31.860	30.047
10	9.550	4.011	887	14.360	1.457	13.069
Mittelwert	3.813,9	2.303,1	4.023,8	21.031,8	16.398,2	14.768,4
Standardabw.	3.647,3	1.867,5	3.041,7	9.979,9	12.210,1	10.531,3
MIN	75,0	0,0	0,0	8.791	1.457	3.767
MAX	***10.384,0***	***5.053,0***	***10.824,0***	39.383	36.477	35.056
Spannweite	10.309,0	5.053,0	10.824,0	30.592	35.020	31.289
VarK (%)	95,6	81,1	75,6	210,74	134,30	140,23
Konfidenz (99,9%)	***9.327,0***	***5.126,0***	***8.621,5***	36.117	34.855	30.687
			Sicherheitsbeiwert, Multiplikator		0,67	
			Warnwert		26.387	
			Konfidenz (korrigiert)	24.198	23.353	20.560

Grenzwerte = Konfidenzobergrenze (1 – α = 0,999); Warnwerte = Maximalwert n = 10; hellgrau hinterlegt = Richtwert; hellblau hinterlegt = 99,9 % Konfidenz; Reagenzien-Kontrolle 0 ± 0 RLU (n = 3)

Das Konfidenzintervall beschreibt mit einer Sicherheit von 99,9 % das Auftreten eines Erwartungswertes von maximal 9.327,0 RLU am Messpunkt ES 1 der Edelstahltanks mit validierter CIP-Reinigung. Damit sind für Edelstahltanks Werte zur Orientierung festgelegt. Da der Maximalwert per Referenzmethode als negativ befunden wurde (10.824 RLU), stellt dieser den Richtwert dar. Werte oberhalb dieses Messwertes konnten nicht gefunden und abgesichert werden. Es steht also fest, dass RLU-Werte von ca. 10.000 RLU in Anlagen mit automatischer CIP-Reinigung mit den vorherrschenden Parametereinstellungen als unbedenklich gelten. Weiterhin wurden bei diesen Versuchen nur kritische bzw. schwer zu reinigende Bereiche, wie Mannloch, Rohrmündungsbereiche oder das Innere der Probennahmehähne als potentielle Kontaminationsquelle betrachtet. Für Tankinnenwände sind deutlich niedrigere Werte zu erwarten. Schwankungen der RLU-Werte beziehen sich auf Werte von 0 bis ca. 10.000 RLU. Bei Werten über 10.000 RLU ist die biologische und/oder mikrobiologische Sicherheit im Fall von Edelstahltanks nicht belegt. Eine erneute Reinigung ist durchzuführen, die dann wiederum mit einer wiederholten Messung belegt wird. Bei Werten, die unwesentlich über dem ermittelten Richtwert liegen, empfiehlt sich eine gleichzeitige klassische Kontrolle. Das Ergebnis dieser Kontrollmessung sollte weiterhin in die dargestellte Betrachtung einfließen.

Emaille. Gemessene Werte auf Emaille sind, orientiert an den Höchstwerten, um ca. 75 % höher. Das liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an der manuellen Reinigungsart, die von innen per Mannloch ausgeführt wird. Bei den 10 Reinigungskontrollen laut Tabelle 4-17 ergaben sich keine mikrobiologischen Positivbefunde als Referenz zu RLU-Werten. Beispiele für Positivbefunde in Emailletanks zeigt die Tabelle 4-18. Durch den Einstieg in das Mannloch sowie die manuelle Reinigung von innen lässt sich bei dieser Tankart kein Reinigungserfolg von annähernd 100 % erreichen. Auch die hohen Variationskoeffizienten der 10 Messungen an drei Messpunkten beweisen eine hohe Streuung und eine schlechtere Reproduzierbarkeit bei der Messung gereinigter Emailletanks. Des Weiteren belegen die Untersuchungen laut Abschnitt 4.1.1.1 (Abbildung 4-3, Tabelle 4-2), dass Werte ab ca. 40.000 RLU mit einer wahrnehmbaren Produkt-Kontamination assoziiert werden können. In den gemessenen kritischen Bereichen ist der Reinigungserfolg am geringsten. Demnach können Werte von ca. 45.000 RLU (Tabelle 4-18) mit einer mikrobiologischen Kontamination assoziiert werden, während Werte von bis zu 39.000 (Tabelle 4-17) mit Negativbefunden hinterlegt werden konnten. Es besteht also eine Unsicherheit bezogen auf Produktrückstände. Ein Unterschied

von ca. 6.000 RLU ist für eine klare Abgrenzung unzureichend. Es resultiert hier ein zu hohes Risiko aufgrund nachgewiesener Schwankungen und Spannweiten.

Tabelle 4-18 Beispiele RLU-Werte mit mikrobiologischen Positivbefunden in Emailletanks

Anzahl, Nummer	***EM 1 (RLU)***	***EM 2 (RLU)***	***EM 3 (RLU)***
1	5.430.857	131.973	***87.360***
2	206.278	***59.451***	601.413
3	458.701	412.398	143.735
4	***76.109***	***45.460***	107.364
5	***53.469***	***67.058***	1.610.248

Fett, Kursiv – kritische Werte, Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Von insgesamt 45 Messungen sind 15 als mikrobiologische Positivbefunde herausgestellt worden. Das entspricht einem Anteil von ca. 33 %. Der Risikofaktor, der für Emaille-Tanks hinzugezogen werden sollte, beträgt demnach 67 % (0,67) des Höchstwertes. Bei dem Höchstwert von 39.383 RLU ergibt sich demnach ein Richtwert von 26.387 RLU. Werte von über 26.000 RLU und kleiner als 39.000 RLU sollten daher kritischer betrachtet werden. In diesem Bereich gilt eine prozentuale Unsicherheit von 33 %. Abschnitt 4.1.1.1. ist weiterhin zu entnehmen, dass zwischen der 2. und 3. Verdünnungsstufe die ungefähre Nachweisgrenze für Produktrückstände liegt. Eine zusätzliche mikrobiologische Kontrolle wäre sinnvoll, um das Risiko einzudämmen. Darüberhinaus ist es unbedingt notwendig, bei Tanks, die nach erfolgter Reinigung einige Tage oder Wochen stehen, vor Benutzung erneut Kontrollmessungen durchzuführen und gegebenenfalls nochmals zu reinigen, da aus schwachen Produktkontaminationen mit hoher Wahrscheinlichkeit mikrobiologische Risiken entstehen können.

4.2.3 Einfluss unterschiedlicher Anwender

Referenzmessungen. Tabelle 4-19 zeigt die im Zuge des Hygienemonitorings innerhalb dieser Arbeit ermittelten Daten, die als Referenzmessungen zur Ermittlung des Einflusses durch unterschiedliche Anwender dienen.

Tabelle 4-19 Referenzmessungen zu Messwerten unterschiedlicher Anwendern

	MP 1	***MP 2***	***MP 3***	***MP 4***	***MP 5***
Einzelmesswerte	2.275	3.513	72.158	8.137	6.817
	1.636	3.679	57.370	7.520	19.714
	244	9.114	1.289.123	4.778	5.576
	1.261	8.460	651.786	7.019	22.673
	3.197	0	84.868	3.047	10.643
	0	4.630	650.393	3.300	36.639
MW	1.435,5	4.899,3	467.616,3	5.633,5	17.010,3
Stabw	1.213,1	3.403,8	492.622,5	2.218,7	11.830,9
R	3.197	9.114	1.231.753	5.090	31.063
K (95 %)	2.708,3	8.470,6	984.474,9	7.961,4	29.423,3
VarK (%)	84,51	69,47	105,35	39,38	69,55
NVT	ja	ja	ja	ja	ja

grau hinterlegte Werte sind Ausreißer nach Grubbs; NVT = Normalverteilung (Anderson – Darling –Test);
Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Die Datenreihen folgen hier stets einer Normalverteilung nach dem Anderson-Darling-Test auf einem Signifikanzniveau von 95 %. Ausreißer nach Grubbs auf einem Signifikanzniveau von 95 % (α = 0,05) sind nicht vorhanden. Variationskoeffizienten sind bis auf M3 unter 100 %. Der Messpunkt MP3 (Gewindespalt an Stecksiebverschraubung) kann als am unbeständigsten klassifiziert werden. Die Werte streuen hier im 7-stelligen Bereich.

6 Anwender messen je einmal pro Messpunkt. Die Tabelle 4-20 zeigt, dass beim Messpunkt M1 bei Messung durch 6 unterschiedliche Anwender keine normalverteilten Daten entstehen. Gleichzeitig findet sich hier ein Ausreißer. Alle anderen Messpunkte sind normalverteilt und ohne Ausreißer. Die Streuung der Daten ist in M3 am höchsten, wie auch den Referenzmessungen laut Tabelle 4-19 zu entnehmen ist. Eine deutliche Aussage zum Verschmutzungsgrad wäre hier nicht möglich. Die aufgenommenen Werte belegen, dass sich das Gerät besser für Messungen unter konstanteren Bedingungen eignet. Ein weiterer Faktor

ist der Messpunkt an sich. M3 verursachte bei allen Messungen stets hohe Werte und Schwankungsbreiten. Das liegt hier vor Allem an der Fläche, die aufgrund baulicher Zustände nicht vereinheitlicht werden kann (Messung im Gewindespalt).

Tabelle 4-20 Ergebnisse der Messungen unterschiedlicher Anwender (ein Anwender, je ein Messpunkt)

	MP 1	***MP 2***	***MP 3***	***MP 4***	***MP 5***
MA 1	909	6.995	650.924	26.462	9.927
MA 2	364	3.184	354.045	9.056	3.117
MA 3	1.768	6.227	32.020	2.327	4.298
MA 4	251	1.368	199.622	11.874	1.671
MA 5	7.221	14.181	117.640	2.402	0
MA 6	1.492	0	25.957	2.419	734
MW	2.000,8	5.325,8	230.034,7	9.090,0	3.291,2
Stabw	2.626,7	5.111,3	239.558,5	9.428,8	3.607,6
R	6.970	14.181	624.967	24.135	9.927
K (95 %)	4.756,7	10.688,6	481.379,0	18.982,6	7.076,3
VarK (%)	131,28	95,97	104,14	103,73	109,61
NVT	nein	ja	ja	ja	ja

grau hinterlegte Werte sind Ausreißer nach Grubbs; NVT = Normalverteilung (Anderson-Darling-Test);
Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Weiterhin fällt auf, dass die Datenreihen ebenso hohe oder größere Standardabweichungen als dazugehörige Mittelwerte besitzen (VarK > 100%). Vergleicht man beide Untersuchungen (Tabelle 4-19, Tabelle 4-20) miteinander, lässt sich für den Messpunkt MP2 feststellen, dass dieser in der Höhe der Werte erheblich schwankt. Das liegt zum Einen am unstetigen Reinigungszustand des Messpunktes (produktführender, flexibler Schlauch mit Milchrohrverschraubung, Beprobung von innen). Einen Einfluss wechselnder Anwender kann daraus nicht geschlossen werden. Vergleicht man die Standardabweichungen der Tabelle 4-20 mit den in dieser Arbeit für dieselben Messstellen ermittelten Standardabweichungen, so ergeben sich die in Tabelle 4-21 gezeigten Abweichungen zwischen den Messwerten von sechs und einem Anwender. Bis auf den Messpunkt M3 (Gewindespalt) und M5 wiesen die durch mehrere Mitarbeiter ermittelten Messwerte im Durchschnitt höhere Standardabweichungen bzw. Schwankungsbreiten auf. Für M1, M2 und M4, deren Messungen generell niedrigere Werte ergaben, scheint die Methode durch einen Anwender zu

reproduzierbareren Ergebnissen zu führen. M5 bildet dabei eine Ausnahme. Der Vergleich des Messpunktes M3 lässt höchstens auf generelle Ungenauigkeiten bei sehr hohen Messwerten/Verschmutzungen schließen.

Tabelle 4-21 Vergleich der Standardabweichungen, 6 MA, eine Messung pro Messpunkt

Quelle	*M1*	*M2*	*M3*	*M4*	*M5*
Mitarbeiter (6)*	2.626,7	5.111,3	239.558,5	9.428,8	3.607,6
diese Arbeit (1)*	1.213,1	3.403,8	492.622,5	2.218,7	11.830,9
Abweichung	1.413,5	1.707,5	253.064,0	7.210,1	8.223,3

()* Anzahl der Anwender

Mit unterschiedlichen Anwendern nimmt die Streuung der Messwerte mit schwacher Tendenz zu. Diese Tatsache lässt vermuten, dass bei stetig wechselnden Anwendern die Reproduzierbarkeit von Messwerten sinkt. Diese Beobachtungen gelten für den Fall, dass 6 Mitarbeiter je ein mal 5 Messpunkte beproben. Auch die noch fehlende Routine kann zu diesen Ergebnissen beigetragen haben.

Jeder Anwender misst 6-fach einen Messpunkt. Tabelle 4-22 zeigt die Ergebnisse, die je ein Mitarbeiter für einen speziellen Messpunkt ermittelt hat. Beim Messpunkt 1 (MA 2) lässt sich anhand der Standardabweichung eine gute Reproduzierbarkeit erkennen. Der Variationskoeffizient hat aufgrund der Nullwerte keine Bedeutung. Als stets gereinigtes Dosiergefäß entspricht das Messgerät hier dem Einsatzzweck der Reinigungskontrolle. M4 und M5 (beide beheizte Vorlagebehälter für Schraubverschlüsse) sind Schwankungen unterworfen. Trotz Ausreißern sind die Ergebnisse im Vergleich zu Messungen des Punktes M2 (MA 4) nachvollziehbarer. Ferner sind Datenreihen, die eine oder mehrere Nullwerte beinhalten, durch den Variationskoeffizienten nur bedingt beschreibbar. Das beweisen Messungen des Punktes M1 (VarK = 202,52 %). Hier ist die Standardabweichung die bestimmende Größe, die den Messpunkt als reproduzierbar im Vergleich zu anderen Punkten charakterisiert. Unsicherheiten lassen sich durch eine schwer einzuschätzende Veränderung des jeweiligen Systemzustandes begründen. Im Vergleich mit der Tabelle 20 ergeben sich die Ergebnisse laut Tabelle 4-23. Hier sind die Standardabweichungen bei Beprobung eines Messpunktes durch einen Mitarbeiter ermittelt worden. Der scheinbar unterschiedliche Hygienestatus des Punktes M2 macht eine Auswertung unmöglich. Die Messpunkte M1 und M3 lieferten niedrigere Standardabweichungen zu den von den Mitarbeitern ermittelten Werten.

Tabelle 4-22 Ergebnisse der Messungen unterschiedlicher Anwender (nach Messpunkten, gleicher Anwender pro MP)

	MP 1, MA 2	***MP 2, MA 4***	***MP 3, MA 6***	***MP 4, MA 5***	***MP 5, MA 3***
Einzelmesswerte	0	4.202.944	45.791	455	17.045
	0	3.432.159	108.928	1.536	16.303
	1.825	3.952.871	17.540	2.296	21.541
	0	31.410	32.370	15.505	6.006
	0	3.670	83.383	1.118	38.445
	338	0	73.481	2.186	47.000
MW	360,5	1.937.175,7	60.248,8	3.849,3	24.390,0
Stabw	730,1	2.123.899,5	34.322,7	5.750,9	15.324,4
R	1.825	4.202.944	91.388	15.050	40.994
K (95 %)	1.126,5	4.165.567,0	96.260,2	9.883,2	40.468,4
VarK (%)	202,52	109,64	56,97	149,40	62,83
NVT	nein	nein	ja	nein	nein

grau hinterlegte Werte sind Ausreißer nach Grubbs; NVT = Normalverteilung nach Anderson-Darling-Test; Reagenzien-Kontrolle 0 $\pm$ 0 RLU (n = 3)

Hier sind keine einheitlichen Trends, verglichen mit Werten dieser Arbeit, zu erkennen. Im Vergleich zwischen **Tabelle 4-21** und **Tabelle 4-23** wird dennoch deutlich, dass wiederholte Messungen durch einen Anwender wie zu erwarten zu niedrigeren Schwankungen führen.

Tabelle 4-23 Vergleich der Standardabweichungen, 1 MA, 6 Messungen pro Messpunkt

Quelle	***M1, MA2***	***M2, MA4***	***M3, MA6***	***M4, MA5***	***M5, MA3***
Mitarbeiter	730,1	2.123.899,5	34.322,7	5.750,9	15.324,4
diese Arbeit	1.213,1	3.403,8	492.622,5	2.218,7	11.830,9
Abweichung	483,1	2.120.495,7	458.299,8	3.532,2	3.493,5

Letztendlich ist anhand der normalverteilten und Ausreißer-freien Referenzmessungen zu erkennen, dass die Reproduzierbarkeit durch mehrmaliges Messen bzw. Routine gesteigert wird. Bei fehlender Wiederholung kann es sein, dass sich wie in Tabelle 4-20 und Tabelle 4-22 dargestellt, keine NVT und Ausreißerfreiheit einstellt. Letztere Kriterien sind Voraussetzung für eine Reproduzierbarkeit der Messungen. Abweichungen der ermittelten Messungen unterliegen vielen Einflussfaktoren, die in Abschnitt 5 genauer beschrieben

werden. Vor Allem die Fläche spielt bei der Aufnahme organischen Materials eine wesentliche Rolle. Durch diesen sensiblen Faktor entstanden innerhalb dieser Messungen Datenreihen, die eine hohe Streuung besitzen. Beweise finden sich in Abschnitt 4.2.1, in dem der Unsicherheitsfaktor Fläche durch die Methode nach Turner et al. (2010) entfällt. Ein weiterer Faktor ist bezogen auf unterschiedliche Anwender die individuelle Abstrichweise, die im Fall der Anschaffung des Gerätes so weit wie möglich geschult und vereinheitlicht werden sollte.

4.2.4 Hygienestatus per ATP-Messungen an ausgewählten Stellen der Produktion

Die Ergebnisse (Tabelle 4-24, Tabelle 4-25) sollen Aufschluss über die Eignung des Messsystems für ein Hygienemonitoring geben. Es gibt wenig übergreifende Zusammenhänge zwischen Messpunkten bezüglich der Messwerthöhe (RLU) und der mikrobiologischen Kontrolle. Jeder Messpunkt ist separat zu betrachten, was unter Anderem bereits laut Abschnitt 4.2.1 aufgrund unterschiedlicher Temperaturen gezeigt wurde. Die Überschneidungen zwischen Positivbefunden und hohen oder niedrigen RLU-Werten zeigen, dass eine alleinige ATP-Messung nicht ausreicht, um den mikrobiologischen Status zu verdeutlichen. Beim Messpunkt F4 (Zwischenlager Produkt, Edelstahlfass) wird beispielsweise ein RLU-Wert von 4.940.958 erreicht. Ähnliche Werte konnten bisher nur bei mikrobiologischen Positivkontrollen festgestellt werden. Generell wurden nie höhere Werte als > 5.000.000 RLU (< 6.000.000 RLU) gemessen. Die Kontrolle per SSL-Anreicherung und OFS-Plattenguss fiel bei F4 hingegen negativ aus. Der Grund dafür sind zum Einen die hohen Temperaturen an dieser Stelle innerhalb der Flaschenproduktion. Die Tatsache, dass an dieser Stelle Kontaminationen erfolgen können, aber gleichzeitig die RLU-Werte derartig hoch sind, führt zu einer falsch positiven Aussage per ATP-Messung. Dennoch könnten Kontaminationen von thermoresistenten Organismen über einen Behälterspalt erfolgen, die hier ausschließlich durch mikrobiologische Methoden sichtbar werden. Die ATP-Messung genügt an dieser Stelle nicht als Sicherheitsmessung. Ähnlich verhält es sich bei beheizten Bauteilen wie Vorlagebehältern für Verschlusskappen (Messpunkte A6, A7). Es wurden Werte von bis zu 37.000 RLU erreicht. Deren mikrobiologische Kontrolle fiel stets negativ aus. Bei Wartungsklappen oberhalb von Verpackungsanlagen konnten Werte ab 27.000 RLU jedoch positiv auf Mikroorganismen getestet werden. Höhere RLU-Werte standen hier Positivbefunden gegenüber. Ein gemessener RLU-Wert lässt sich demnach nicht mit einer mikrobiellen Kontamination pauschalisieren. Eine gesonderte Betrachtung der Systembedingungen des jeweiligen Messpunktes ist zwingend erforderlich. Bei allen zuvor

gereinigten Bauteilen oder Gegenständen wie den Messstellen M2 und F5 (Dosierbehälter für Aromen; Flasche nach Laugenwäsche) sind die Messwerte nachvollziehbar. Die mikrobiologische Kontrollmessung an diesen Stellen fiel wie zu erwarten stets negativ aus. Diese Tatsache entspricht der ausgeschriebenen Funktion des Gerätes, der Reinigungskontrolle. Bezüglich des 50 %-Kriteriums der relativen Standardabweichung (VarK) lassen sich die Messpunkte (VarK-Werte in Fettdruck, vorletzte Spalte) bezüglich der relativen Streubreite ihrer Einzelmessungen für den vorgesehenen Zweck herausstellen (Tabelle 4-24). Betrachtet man die Einzelmesswerte dieser Datenreihen, wird deutlich, dass dabei – verglichen mit anderen Datenreihen – oftmals eine verhältnismäßig geringe Streuung vorliegt. Die Beurteilung per VarK eignet sich an dieser Stelle nicht für die Betrachtung der Datenreihen. Geringere Variationskoeffizienten entstanden bei den Datenreihen F1, E2 sowie A3 bis A7. Bei Messwerten unterhalb von 10.000 RLU ist der Variationskoeffizient aufgrund der unbedeutenden Schwankungen der Werte in diesem Bereich zu vernachlässigen (Messpunkte M1 bis M3, E1, A1). Weiterhin sind alle in der Praxis durchgeführten Messungen unter 10.000 RLU mit Referenzverfahren als mikrobiologische Negativbefunde herausgestellt worden. Abbildung 4-14 zeigt die 19 Messpunkte, die mit jeweils 6 Einzelmessungen in Form von Box Plots dargestellt sind. Viele Messungen weisen sehr hohe Schwankungen auf, beispielsweise Datenreihen der Messpunkte M4, F2, F3 oder F4.

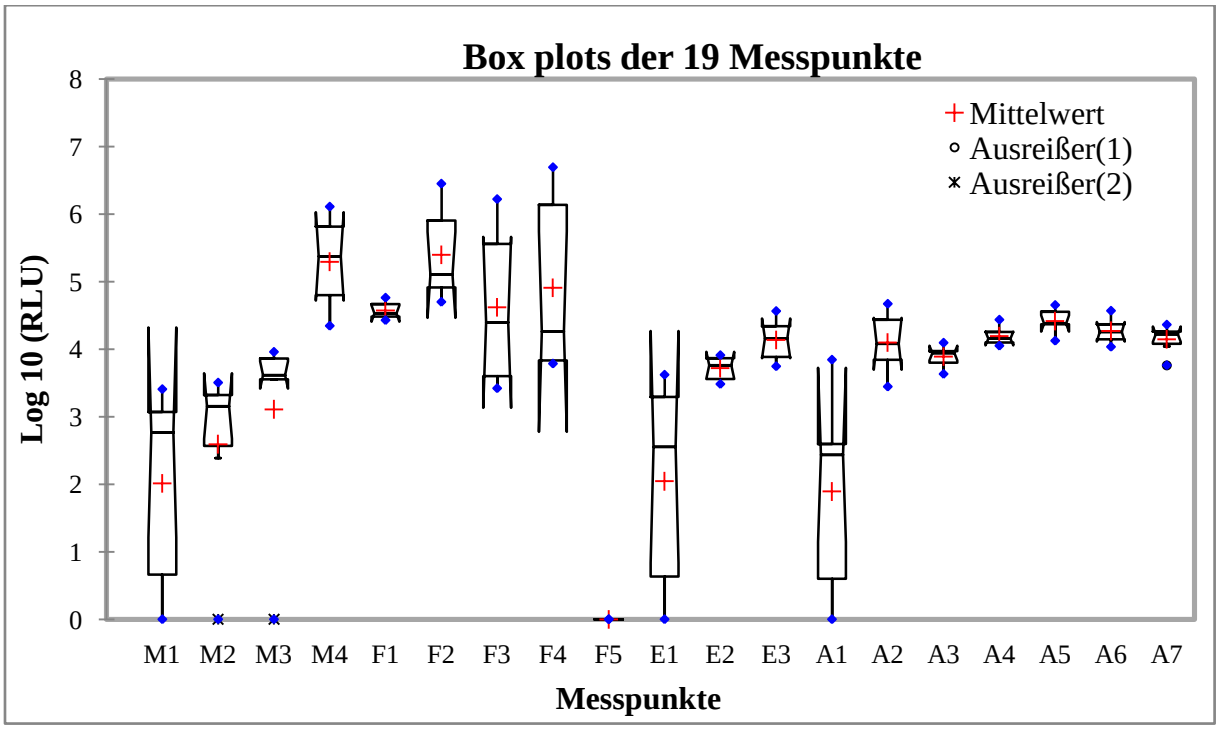


Abbildung 4-14 Darstellung der 19 Messreihen per Box Plot (45 % Perzentile, 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit)

Tabelle 4-24 Ergebnisse des Hygienemonitorings

MP	*Einzelmesswerte (n = 6) und mikrobiologische Kontrollmessung (positiv + / negativ -)*												*MW*	*Stabw*	*R*	*VarK (%)*	*K 99,9%*
M1	0	-	2.557	-	766	-	449	-	1.364	-	0	-	856,0	978,8	2.557	**114,35***	2.466,4
M2	2.275	-	1.636	-	244	-	1.261	-	3.197	-	0	-	1.435,5	1.213,1	3.197	**84,51***	3.431,4
M3	3.513	-	3.679	-	9.114	-	8.460	-	0	-	4.630	-	4.899,3	3.403,8	9.114	**69,47***	10.499,4
M4	72.158	+	57.370	+	1.289.123	+	651.786	+	84.868	+	650.393	+	467.616,3	492.622,5	1.231.753	**109,08**	1.283.551,4
F1	50.978	+	31.569	-	29.811	-	57.835	+	26.880	+	35.834	+	38.817,8	126.06,4	30.955	32,48	59.558,4
F2	71.524	-	50.126	-	126.978	+	1.487.091	+	2.824.031	+	125.618	-	780.894,7	1.146.066,6	2.773.905	**146,76**	2.666.450,0
F3	2.636	-	3.580	-	5.437	-	534.371	+	166.591.4	+	114.311	+	387.708,2	659.095,2	1.663.278	**170,00**	1.472.078,4
F4	7.909	-	6.113	-	6.491	-	4.940.958	-	4.351.450	-	41.543	-	1.559.077,3	2.398.571,2	4.934.845	**153,85**	5.505.304,0
F5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0,0	0,0	0	-	0,0
E1	4.181	-	3.452	-	347	-	370	-	0	-	0	-	1.391,7	1.899,2	4.181	**136,47***	4.516,2
E2	8.137	-	7.520	-	4.778	-	7.019	-	3.047	-	3.300	-	5.633,5	2.218,7	5.090	39,38*	9.283,8
E3	6.817	-	19.714	-	5.576	-	22.673	+	10.643	-	36.639	+	17.010,3	11.830,9	31.063	**69,55**	36.475,0
A1	440	-	293	-	6.978	-	0	-	0	-	254	-	1.327,5	2.773,6	6.978	**208,93***	5.890,7
A2	31.079	+	7.812	-	6.659	-	18.579	-	2.788	-	46.940	+	18.976,2	17.129,0	44.152	**90,27**	47.157,6
A3	4.290	-	9.548	-	12.450	-	8.510	-	8.958	-	5.738	-	8.249,0	2.894,3	8.160	35,09	13.010,9
A4	12.438	-	12.577	-	11.239	-	18.584	-	16.418	-	27.308	+	16.427,3	6.011,6	16.069	36,60	26.317,9
A5	24.160	-	13.324	-	40.679	+	45.009	+	23.044	-	23.635	-	28.308,5	12.027,0	31.685	42,49	48.095,7
A6	24.186	-	37.040	-	15.240	-	10.832	-	13.439	-	21.304	-	20.340,2	9.577,5	26.208	47,09	36.097,5
A7	15.812	-	5.771	-	11.014	-	18.313	-	23.077	-	17.450	-	15.239,5	6.059,6	17.306	39,76	25.209,0

* = Einzelwerte < 10.000 RLU = Praxismessungen stets mit negativen mikrobiologischen Referenzwerten (positiv +, negativ -) belegt; grau hinterlegt sind Messungen mit hoher Streuung, Werte in Fettdruck sind Vark > 50%, **M** = Ausmischung, **F** = Flaschenproduktion, **E** = Erhitzeranlage, **A** = Abfüllanlage; Reagenzien-Kontrolle 0 ± 0 RLU (n = 6)

Bis zu einer Grenze von 10.000 RLU lassen sich Schwankungen als unwesentlich charakterisieren. Werte darüber (M4, F2, F3, F4) weisen sehr hohe Schwankungen auf, wodurch es schwer ist, den Status der jeweiligen Oberfläche zu beschreiben. Eine mögliche Grenzwertvergabe wird durch die Tabelle 4-25 verdeutlicht.

Tabelle 4-25 Abgleich der RLU-Werte mit der Referenzmethode, Grenzwertbestimmung

MP	*höchste neg. Referenz (RLU-Wert)*	*niedrigste pos. Referenz (RLU-Wert)*	*Anzahl positiver Befunde*	*Überschneidung der Werte (pos./neg. mikrobiologsch)*	*Richtwerte*
M1	2.557	-	0/6	nein	2.557
M2	3.197	-	0/6	nein	3.197
M3	9.114	-	0/6	nein	9.114
M4	-	57.370	6/6	nein	<< 57.370
F1	31.569	26.880	4/6	ja ****	< 26.000
F2	125.618	126.978	3/6	nein*	< 125.618 **
F3	5.437	114.311	3/6	nein	5.437
F4	4.940.958	-	0/6	nein	- ***
F5	0	-	0/6	nein	0
E1	4.181	-	0/6	nein	4.516
E2	8.137	-	0/6	nein	9.283
E3	19.714	22.673	2/6	nein	< 19.000
A1	6.978	-	0/6	nein	6.978
A2	18.579	31.079	2/6	nein	18.579
A3	12.450	-	2/6	nein	12.450
A4	18.584	27.308	0/6	nein	18.584
A5	24.160	40.679	2/6	nein	24.160
A6	37.040	-	0/6	nein	37.040
A7	23.077	-	0/6	nein	23.077

* keine Überschneidung positiver und negativer Werte, aber hoher Unsicherheitsfaktor; ** Annahme, hohe Ungenauigkeit; *** Grenzwerteinführung nicht sinnvoll, Kapazitätsgrenze des Gerätes; **** Grenzwertvergabe unsicher aufgrund fehlender Informationen; GRÜN = Richtwerte; GRAU = hoher Unsicherheitsfaktor

Grün hinterlegte Werte eignen sich als Richtwerte für die jeweiligen Messpunkte. Bei den grau hinterlegten Werten ist der Unsicherheitsfaktor zu groß für eine genauere Festlegung. Dennoch dienen diese Werte als Anhaltspunkte. Für die meisten Messpunkte bzw. potentielle Kontaminationspunkte ist es möglich, einen Referenzwert zu finden, der mit negativen

mikrobiologischen Ergebnissen einhergeht (zum Beispiel M1 bis M3). Bei anderen Stellen wie dem Punkt E3 und F2 ist die Vergabe eines Grenzwertes mit höheren Risiken behaftet, da die RLU-Werte positiver Referenz nahe den Werten negativer Referenzen liegen. Der Punkt F1 kann aufgrund einer Überschneidung positiver und negativer Referenz nicht beurteilt werden. Der in der Tabelle angegebene Wert von < 26.000 RLU kann lediglich angenommen werden. Durch die Kontrolle (Referenzmessung) – Tupferabstrich und Inkubation in SSL-Bouillon sowie OFS-Ausstrich – können genauere Aussagen aus mikrobiologischer Sicht getroffen werden. Im Fall von durchgehend negativen Messungen eines Messpunktes ist die Vergabe eines Richtwertes als sicherer einzustufen. Unsicherheitsfaktoren liefern lediglich die Messpunkte M4, F1, F2 und F4, die nicht mit negativen Referenzen belegt werden konnten oder deren RLU-Werte trotz negativen Befunden so hoch waren, dass keine Beurteilung möglich ist.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass ein derartiges Monitoring möglich ist, sofern jeder Messpunkt mit einem separaten Grenzwert zur Orientierung versehen wird. Des Weiteren müssen die Messpunkte bzw. Probennahme genauer beschrieben werden, sodass auch bei wechselnden Anwendern verhältnismäßig reproduzierbare Ergebnisse zu erwarten sind. Es konnte wiederholt festgestellt werden, dass der Zweck der Reinigungskontrolle durch das Gerät Charm novaLum II erfüllt wird (M2, F5, E2, E3, A1). Je weiter die Untersuchungen davon abweichen, desto schwerer sind die Ergebnisse zu interpretieren.

5 Diskussion

Einfluss der Mikroorganismen auf die Messung. Es wurden Unterschiede in der Höhe der Messwerte bei verschiedenen Mikroorganismen festgestellt. *Saccharomyces cerevisiae* als gärkräftige Hefe hat bedeutend mehr ATP als Milchsäurebakterien bezogen auf eine Zelle. Auch die momentane Stoffwechselaktivität des Organismus hat entscheidende Auswirkungen auf den ATP-Gehalt bzw. die Höhe der Messwerte. Generell lässt sich sagen, dass je höher der intrazelluläre Stress durch äußere Einflüsse ist, desto niedriger ist der ATP-Gehalt (Shama, et al., 2013). Endosporen von *Alicyclobacillus acidoterrestris* können selbst Erhitzungsprozesse überstehen. Die Untersuchungen ergaben, dass bei einem überwiegenden Anteil an Endosporen (ca. 95 %, Versuch *A. at. 2)* RLU-Werte niedriger ausfallen. Gemessene ATP-Werte dürfen allerdings keinesfalls mit der Anzahl an Sporen in Verbindung gebracht werden. Sporen von Bakterien haben im Allgemeinen stets niedrigere ATP-Gehalte als ihre vegetative Form (Venkateswaran, et al., 2003) (Shama, et al., 2013). Niedrigere Messwerte innerhalb dieser Untersuchungen deuten hier lediglich darauf hin, dass Sporen deutlich schwerer zu detektieren sind. Erkenntnisse dazu stehen nach wie vor im Widerspruch zueinander (Trautsch, 2003) (Venkateswaran, et al., 2003). Tabelle 5-1 zeigt eine Beispielrechnung zu Zellgrößen, Volumina, ATP-Gehalten und Zellzahlen (Quelle: Back, 2000 und Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit) verschiedener Mikroorganismen. Hefezellen besitzen als eukaryontische Einzeller bedeutend mehr Volumen und somit mehr Stoffwechselstärke als Prokaryonten. Bakterien sind um ein Mehrfaches kleiner als eukaryontische Zellen, und ergeben im Sinne der Biolumineszenzmessungen verhältnismäßig niedrigere ATP-Gehalte. Im Vergleich der Zellzahlen und RLU-Werte dieser Arbeit erhält man rechnerisch für *Saccharomyces cerevisiae* pro Zelle 165-487 RLU, für Milchsäurebakterien 27 RLU und für Alicyclobacillus (vegetativ) 132 RLU. Die Werte (Tabelle 5-1) müssen stets unter Vorbehalt der Tatsache betrachtet werden, dass sich die Mikroorganismen in unterschiedlichen physiologischen Zuständen befanden und auch ATP-Gehalte sich dem anpassen. Untersuchte Milchsäurebakterien, berechnet auf eine KbE, haben den geringsten ATP-Gehalt.

Mikroorganismen können in verschiedenen physiologischen Stadien auftreten. „V*iable but non culturable*“ (VBNC) – lebend, aber nicht kultivierbare – Mikroorganismen können mit klassischen Verfahren nicht nachgewiesen werden. Laut Venkateswaran et al. (2003) werden per ATP-Detektion auch diese Organismen erfasst, was einen Vorteil der Methode darstellt (Venkateswaran, et al., 2003).

Weiterhin ist die Stoffwechselart entscheidend für das Vorkommen von ATP. Durch Milchsäuregärung wird lediglich ein Neunzehntel (38:2 mol ATP) der Energie eines Atmungsprozesses gewonnen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass niedrigere RLU-Werte auch darauf zurückzuführen sind. Bereits Fairbanks et al. (1984) fanden weiterhin heraus, dass der ATP-Gehalt bei Zellen von *Pseudomonas paucimobilis* um das 2,2-fache ansteigt, wenn ein trockeneres Medium einer Rückfeuchtung ausgesetzt wird (Fairbanks, et al., 1984).

Tabelle 5-1 Relation der Zellgröße zu ermittelten ATP-Gehalten und RLU-Werten

	Untersuchter Organismus	***Größe der Zelle (µm)***	***Zellvolumen (Ø in µm³)***	***Quelle s. Abschn. 4.1***	
				KbE/100 cm²	***RLU***
Eukaryonten	***Saccharomyces cerevisiae***	5-8 x 5-12 (Back, 2000)	65,5-523,6		
	auf Edelstahl			27	13.144
	auf Emaile			50	8.272
	***A. niger* (Konidien)**	ca. bis 5,0 (Back, 2000)	65,5	13*	19.588
	Penicillium spp.	ca. bis 5,0 (Back, 2000)	65,5	7-8*	13.531
Prokaryonten	***Alicyclobacillus at.***	Ø 1,0 x 2,5 (vegeativ) (Back, 2000)	Ø 1,96		
	A. at. 1 (ca. 80 %)			100	14.870
	A. at. 2 (ca. 95 %)			31	10.933
	A. at. 3 (ca. 50 - 60 %)			100	13.171
	Milchsäurebakterien				
	Streptococcus thermophilus	0,8-1,0 (Back, 2000)	0,26-0,52	264	7.278
	Lactobacillus spp.	0,5-1,0 (Back, 2000)	0,07-0,52		

* Werte für KbE / 10 cm^2

Die Zugabe von Glukose und Ammoniumsalzen ergab ebenfalls einen Anstieg der ATP-Gehalte um das 5,9- und 2,8-fache (Fairbanks, et al., 1984). Federighi et al. (1998) beschreiben den Effekt, dass die ATP-Konzentration im Fall von *Campylobacter jejuni* nach 12 Tagen ohne Nährstoffangebot um das 50-fache gesunken ist, bevor sie konstant blieb. Gengenbacher et al. (2010) beobachteten bei Nährstoffarmut für *Mycobacterium tuberculosis* eine Reduktion um das 5-fache (Gengenbacher, et al., 2010). Bakterien wie MRSA sind sogar

in der Lage, über 1000 Tage auf trockenen Plastikoberflächen zu überleben (Chaibenjawong, et al., 2011). Der Stoffwechsel wird demnach bei Nährstoffmangel heruntergefahren. Bei Kontaminationen im Fruchtsaftbetrieb können ebenfalls ähnliche Effekte auftreten. Die ATP-Detektion ist erschwert, da mehr Zellen des Organismus nötig wären, um mit im Wachstum befindlichen Organismen vergleichbare RLU-Werte zu erzielen (Federighi, et al., 1998). Auch Shama et al. (2013) erklären, dass der ATP-Gehalt einer Zelle von dem physiologischen Zustand abhängt (Shama, et al., 2013). Diese latente Gefahrenquelle lässt sich auch für Schimmelpilze herausstellen, deren Auftreten nicht zwangsläufig mit der Bildung eines Myzels zusammenhängen muss. Aspergillus niger kann auch in Form von Konidien/Sporen präsent sein. Im Fall der Myzel-Bildung wäre wahrscheinlich mit erheblich höheren ATP-Gehalten sowie meist sichtbaren Kontaminationen zu rechnen.

Viele der genannten Faktoren begründen die Unsicherheit einer alleinigen quantitativen ATP-Messung. Es lässt sich herausstellen, dass die spezifische Betrachtung und Grenzwertermittlung eines Messpunktes anzustreben und mit Referenzen zu belegen ist. Das Gefahrenpotential eines Messpunktes muss zuvor durch mikrobiologische Verfahren erkannt werden, um einen Grenzwert o. ä. zuzuordnen. Fruchtsaft-relevante Organismen konnten in Praxis-relevanten Konzentrationen mit dem Charm novaLum II detektiert werden.

Korrelation der RLU (Relative Lichteinheiten) mit der Lebendzellzahl. Es ist bekannt, dass das Charm novaLum II in der Praxis nicht direkt zwischen unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen unterscheiden kann. Es gibt verschiedene Studien, die den Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lichtintensität beschreiben (Tabelle 2-6).

Einige Studien schildern eher schwache Korrelationen bezüglich Lebendzellzahl und Relativen Lichteinheiten der ATP-Messung. Die Zellzahl sei den RLU keinesfalls gleichzusetzen (Căpriţă, et al., 2005). Abgesehen von Modellversuchen wäre bezüglich der Praxis nicht davon auszugehen, dass die Zellzahl stets mit den gemessenen Lichteinheiten korreliert (Căpriţă, et al., 2005). Costa et al. (2006) ermittelten die mesophile aerobe Gesamtkeimzahl sowie ATP-Gehalte von Oberflächen im Milch-verarbeitenden Umfeld. Dabei fanden die Autoren keine Übereinstimmung der Messwerte des Gerätes Biotrace Xcel mit Ergebnissen der mikrobiologischen Referenzmethode vor und nach entsprechender Reinigung. Die ATP-Methode zeigte, dass 100 % der untersuchten Flächen in einem inakzeptablen hygienischen Zustand waren, die Referenzmethode kam dabei auf 50 %. Bereits Poulis et al. (1993) vermerkten, dass ein Positivbefund per ATP-Messung nicht

zwangsläufig mit der Anwesenheit lebender Mikroorganismen zusammenhängt (Poulis, et al., 1993). Finger et al. (2001) und Ellerbroek et al. (2004) stellten ebenfalls schwächere Korrelationen fest. Sie untersuchten Kuheuter (R^2 = 0,64) sowie die Haut von geschlachteten Hühnern (R^2 = 0,72) auf Zusammenhänge zwischen Lebendzellzahl und ATP-Gehalt. Poulis et al. (1993) untersuchten Oberflächen in verschiedenen Lebensmittelbetrieben mit dem Messgerät Lumac Biocounter M 1500 P. Referenzmethode war das Contact Plating. Die Autoren kamen dabei auf die Ergebnisse laut Abbildung 5-1. Ein signifikanter Zusammenhang Zwischen Zellzahl und RLU ist nicht zu erkennen. Die These, dass hohe Zellzahlen auch deutlich mithilfe der Biolumineszenz detektiert werden können, ist hier nur schwach begründet (Poulis, et al., 1993).

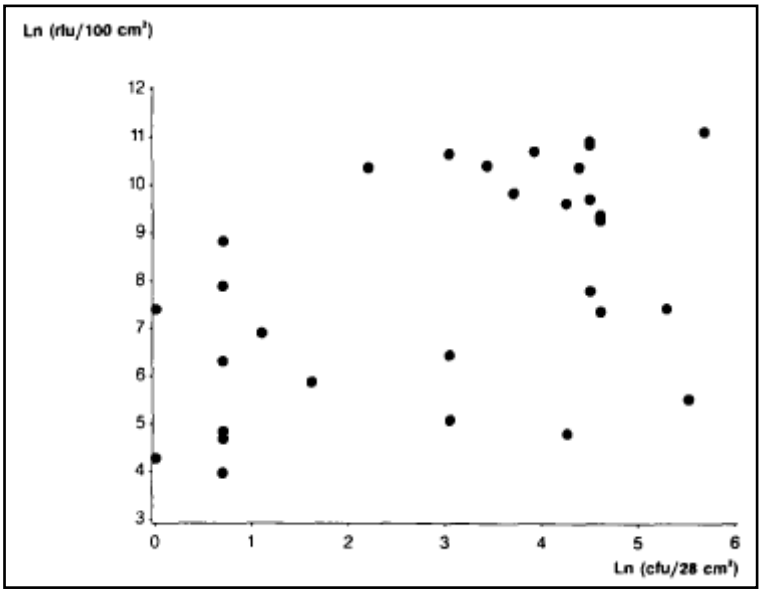


Abbildung 5-1 Zusammenhang: RLU- und KbE, Daten aufgenommen nach Reinigung und Desinfektion der Oberflächen am selben Ort, R < 0,4; n = 33 (Poulis, et al., 1993)

Alle in der Tabelle 4-13 (Abschnitt 4.1.3) angegebenen Bestimmtheitsmaße sind höher als die von Poulis et al. (1993) ermittelten (R < 0,4) Zusammenhänge, die eine sehr schwache Korrelation darstellen. Das beweist den großen Unterschied zwischen Messungen in der Praxis und Modelluntersuchungen. In Modellversuchen dieser Arbeit konnten hingegen für die untersuchten Mikroorganismen, ausgenommen Sporen von Schimmelpilzen, Korrelationen mit Bestimmtheitsmaßen von über 0,9 erreicht werden. Auch Wadhawan et al. (2010), Luo et al. (2009) und Turner et al. (2010) stellten in Ihren Modellversuchen ähnlich hohe Korrelationen fest (Vergleich Tabelle 2-6, Tabelle 5-2) (Wadhawan, et al., 2010) (Luo, et al., 2009) (Turner, et al., 2010). Letztere Arbeitsgruppe bestätigt eine starke Korrelation

zwischen Zellzahl und RLU (Tabelle 5-2). Allerdings wurde hier keine Fläche abgestrichen, sondern Teilmengen von Bakteriensuspensionen auf den Swab (ebenfalls Pocket Swab® Plus System, Charm Science Inc.) aliquotiert (20 µl) (Turner, et al., 2010). Nachweisgrenzen wurden mit 10^4 KbE für *E. coli* (Ultraschall-behandelt 10^3 KbE) und 10^2 KbE für *S. aureus* ermittelt.

Tabelle 5-2 Korrelation zwischen Zellzahl und RLU-Werten, Pocket Swab® Plus-System, Charm novaLum (Turner, et al., 2010)

Korrelation	***Escherichia coli***	***Staphylococcus aureus***
R^2	0,9993	0,9995
R^2 (Ultraschall-behandelt)	0,9983	0,9992

Versuche mit grampositiven Milchsäurebakterien zeigen innerhalb dieser Arbeit mit *S. aureus* (Turner, et al., 2010) vergleichbare Ergebnisse. Je standardisierter die Bedingungen, desto eher korrelieren die Messwerte folglich miteinander. Das Messsystem ist somit in der Lage, den stark korrelierenden Zusammenhang zwischen Lebendzellzahl und Relativen Lichteinheiten bei konstanten Bedingungen wiederzugeben. Alle graphisch ermittelten Zusammenhänge dieser Arbeit belegen die Tatsache, dass starke Korrelationen bei diesem Versuchsaufbau – Mikroorganismen in Reinform, mit ähnlichem Stoffwechsel bzw. Morphologie – bestehen. Zuvor genannte Arbeitsgruppen untersuchten Kontaminationen unter weniger konstanten Bedingungen.

In der Praxis weichen die Bedingungen und Parameter von denen einer modellhaften Untersuchung ab. Das beweisen die Untersuchungen von Ellerbroek et al. (2004) und Finger et al. (2001) sowie die zuvor Genannten. Die praxisrelevante Erkenntnis ist, dass verschiedene Oberflächen mit verschiedenen Verschmutzungsgraden stets eine gesonderte Betrachtung, zum Beispiel bei der Grenzwertvergabe, erfordern. Die Modelluntersuchungen beweisen, dass das Messgerät im Vergleich mit anderen Quellen in der Lage ist, mikrobiologische Gefahren mit ähnlicher Genauigkeit zu erkennen. Als Fazit für Messungen mit dem Charm novaLum II und dem Pocket® Swab Plus-System kann weiterhin die These bestätig werden, dass hohe Zellzahlen in jedem untersuchten Fall hohe RLU-Werte verursachen (siehe Modelluntersuchungen Abschnitt 4.1, Positivbefunde Emaille Abschnitt 4.2.2, Tabelle 4-18). Geringe Zellzahlen lassen sich in der Praxis oftmals nicht vermeiden, wobei hier der Begriff

der kommerziellen Sterilität geprägt wird. Reelle Gefahren gehen von Kontaminationen aus, die bedeutend höher sind.

Einfluss betriebsspezifischer Oberflächen. Die Beschaffenheit der Oberfläche spielt ebenfalls eine Rolle bezüglich der Menge an organischem Material oder Mikroorganismen, die per Swab aufgenommen wird (Shama, et al., 2013). In dieser Arbeit wurden die Wiederfindungsraten per DIN 10113-1 bestimmt. Es wurde für *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt, dass die WFR per Abstrich auf Emaille um ca. 31 % höher ist, als auf Edelstahl. Die rauere Oberfläche hält aufgrund ihrer Tiefe mehr Zellen zurück. Edelstähle wie V2A und V4A werden bevorzugt in der Lebensmitteltechnik eingesetzt. Entscheidend sind die Behandlung (z.B. Polierung) der jeweiligen Oberfläche und die damit einhergehende Oberflächenrauheit (R_a). Die in dieser Arbeit verwendete Oberfläche ist ein V2A-Stahl, dessen Oberfläche bedeutend rauer als Emaille eingeschätzt werden kann. Auch die bessere Reinigbarkeit glatter Oberflächen ist bekannt (Whitehead, et al., 2006) (Woodling, et al., 2005). Im Gegensatz dazu steht in der Praxis die Reinigungsmethode, die im Fall von Emaille-Tanks höhere RLU-Werte bedingt, da die Reinigung manuell und per Mannloch mit konventionellem Spülmittel erfolgt. Edelstahlflächen, auf denen wirksamere Reinigungsmittel (z.B. Peressigsäure, Natronlauge) verwendet werden sowie eine Cleaning-In-Place-Reinigung durchgeführt wird, lieferten stets niedrigere Messwerte.

Je besser die Reinigungsmethode ist, desto eher lässt sich dieses Messgerät für den ausgeschriebenen Zweck einsetzen. Es wurde für Emailletanks mit erschwerter Reinigungsmethode ein Sicherheitsbeiwert eingeführt, der die ineffektivere Reinigungsart, verglichen mit einer CIP-Reinigung, relativieren soll.

Richtwerte für Tankuntersuchungen. Die Ergebnisse der Tankuntersuchung lieferten Richtwerte und Vertrauensbereiche, die mit sensitiven mikrobiologischen Verfahren belegt werden konnten. Die gemessenen Werte sind hauptsächlich abhängig von den entsprechenden Reinigungsmethoden. Da in den durchgeführten Messungen nur kritische Bereiche betrachtet wurden, ist davon auszugehen, dass die belegbaren RLU-Werte für Richt- und Warnwerte ausreichend sind. Bei Emaille wurde aufgrund von Positivmessungen ein Korrekturwert als Multiplikator (0,67) eingeführt, was den Anteil der Negativbefunde widerspiegelt. Bei Überschreitung der korrigierten Werte sollte eine zusätzliche mikrobiologische Prüfung und bei deutlicher Überschreitung eine erneute Reinigung und Messung erfolgen. Das Gerät Charm novaLum II ist innerhalb festgelegter Grenzen für die Kontrolle von gereinigten

Tankinnenräumen geeignet. Bezüglich der Praxisrelevanz ist die Messung bzw. Reinigungskontrolle per Biolumineszenz seit Längerem ein Qualitätsparameter, anhand dessen der Zustand von Fruchtsafttankzügen beurteilt werden kann. Die VdF-Leitlinie über spezielle Qualitätsanforderungen für Fruchtsafttankzüge beschreibt bezüglich der Mindestanforderungen einen Richtwert von <150 RLU für gereinigte Tankinnenräume. Dieser Richtwert lässt sich innerhalb der Betrachtungen laut Abschnitt 3.2.2 für Edelstahl trotz CIP-Reinigung nicht einhalten. Das liegt wahrscheinlich an der Sensitivität des Charm novaLum II sowie der Verallgemeinerung aller Biolumineszenz-Methoden in einem Wert [VdF-Leitlinie, 2012]. Verantwortlich für die Signalsensitivität ist der Photomultiplier Tube, der aufgenommene Signale um ein Vielfaches verstärkt. Es ist wiederum notwendig, für alle neuen Messvorhaben neue Referenzmessungen durchzuführen und diese mit Kontrollmessungen wie mikrobiologische Methoden oder Tests auf organische Substanzen zu belegen. Bereits Orth et al. (1996) empfahlen, eigene Grenzwerte nach optimaler Reinigung festzulegen (Orth, et al., 1996), was auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Poggemann et al. (1996) legten darüber hinaus nahe, die Vergabe von Grenzwerten auch vom Oberflächenmaterial und der Reinigung bzw. der Reinigbarkeit abhängig zu machen (Poggemann, et al., 1996), was laut Abschnitt 4.2.2 auch innerhalb dieser Arbeit realisiert wurde.

Abhängigkeit der Lichtintensität von der Temperatur. Tisi et al. (2002) führten eine Studie durch, in der Sie eine Temperatur-resistente Luciferase synthetisierten. Vergleiche zur Form des Wildtyps wurden untersucht. Abbildung 5-2 verdeutlicht die Ausprägung der enzymatischen Reaktion in Abhängigkeit von der Temperatur. Es ist zu erkennen, dass die Reaktionsfunktion der Wildtyp-Luciferase (rLuc) einen ähnlichen Verlauf nimmt wie die in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 4.2.1, Abbildung 4-13) (Tisi, et al., 2002). Ungeachtet der ATP-Konzentration bestätigt sich die Annahme der temperaturabhängigen Messung. Die untere Funktion entspricht der herkömmlichen Leuchtkäfer-Luciferase. Tendenziell konnten ähnliche Beobachtungen bei Temperaturen um 40°C festgestellt werden. RLU-Werte verringerten sich um fast 70% bei einer Änderung der Temperatur von 21 auf 41 °C bei gleichen Bedingungen. Für die Praxis bedeutet dies einen Nachteil, sofern die Pocket Swab´s über längere Zeit auf höheren oder niedrigeren Temperaturen gehalten werden. Tanklager sind auf Temperaturen von ca. 6°C gekühlt. Versuche ergaben, dass bei diesen Temperaturen tendenziell niedrigere RLU zu erwarten sind, sofern die Pocket Swab´s diese Temperaturen annehmen.

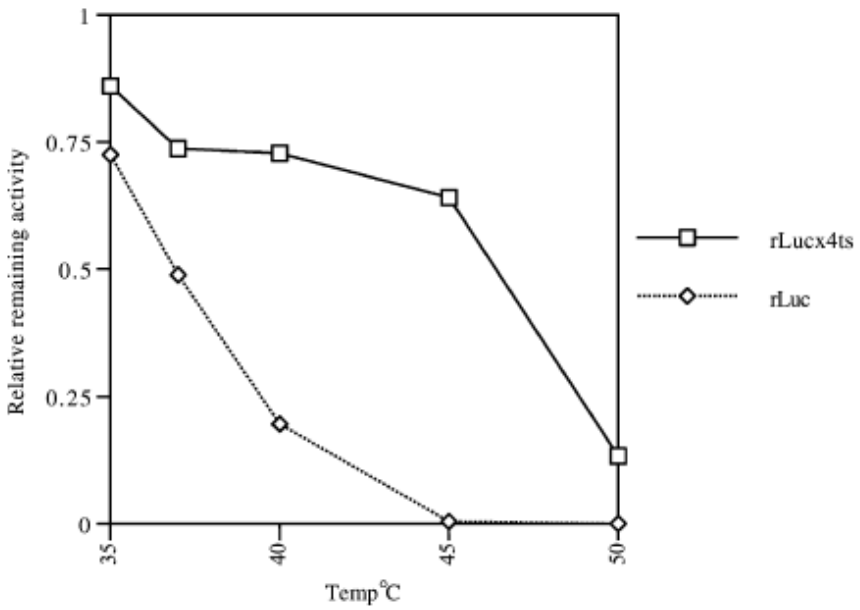


Abbildung 5-2 Abhängigkeit der Lichtintensität zweier Luciferasen von der Temperatur (Tisi, et al., 2002)

Gleiches gilt für höhere Temperaturen an und über Verpackungs- und Abfüllmaschinen bzw. deren potentiellen Kontaminationspunkten. In diesem Fall ist eine isolierte Tragevorrichtung empfehlenswert, sollte die Dauer vor oder bis zur Messung Änderungen der Temperatur des Swabs beinhalten.

Vergleich des Charm novaLum II mit weiteren kommerziell erhältlichen Systemen. Omidbakhsh et al. (2014) testeten 4 verschiedene ATP-Schnelltest-Messgeräte, darunter das Charm novaLum mit den Pocket Swab® Plus-System. Alle 4 Geräte bewiesen eine akzeptable Linearität und Reproduzierbarkeit bezüglich der Messergebnisse (Abbildung 5-3). Es ist erkennbar, dass das in dieser Arbeit verwendete Messgerät bei sehr niedrigen Werten immer noch hohe Messwerte anzeigt. Das spricht für die Sensitivität des Systems, während die Geräte von Hygiena und Kikkoman niedrigere Relative Lichteinheiten anzeigen. Grund dafür scheint der PMT (Photo Multiplier Tube) zu sein, der das Signal deutlicher verstärkt. Es ist beim Gerät Charm novaLum zu erkennen, dass eine ATP-Konzentration von 10^{-5} mol ATP die Sättigungsgrenze des Systems darstellt. Dieses Gerät misst generell die höchsten Werte (Omidbakhsh, et al., 2014). Weiter ist auch bei steigender ATP-Konzentration kein Abfallen der Werte zu beobachten, wie beim Gerät der Firma 3M zu erkennen ist. Es ist auch in dieser Arbeit eine Sättigungsgrenze festgestellt worden, wie in den Modellversuchen bezüglich der niedrigsten Verdünnungsstufe zu erkennen ist. Das kann mit der Lichtmengen-

Aufnahmekapazität des Photomultipliers begründet werden. Bezüglich der Korrelation von ATP-Menge und -Messwerte weist das Gerät mit einem Koeffizienten von 0,8230 den geringsten Zusammenhang auf (Hygiena 0,9827; 3M 0,9228; Kikkoman 0,9966) (Omidbakhsh, et al., 2014).

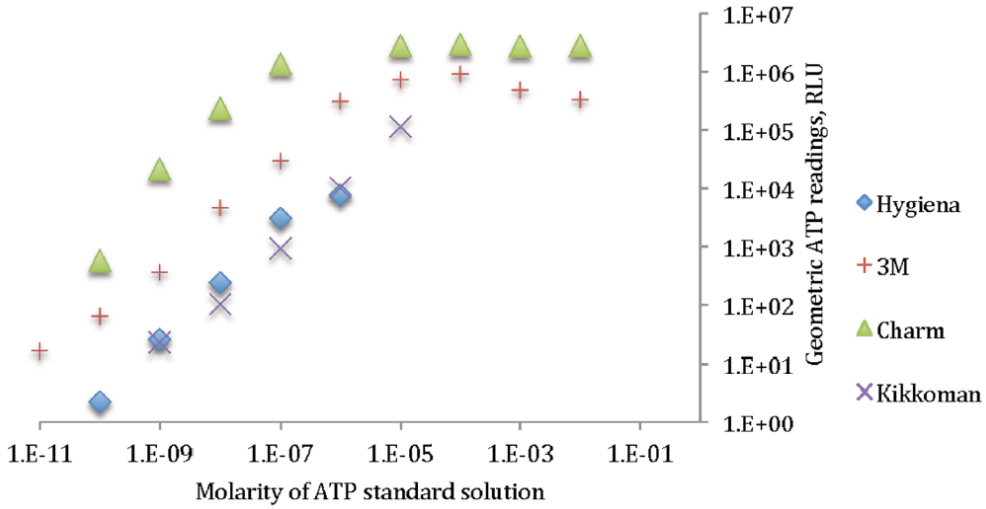


Abbildung 5-3 Linearität von ATP-Messwerten von 4 verschiedenen Lumineszenzsystemen anhand von ATP-Standards (Omidbakhsh, et al., 2014)

Allerdings basieren die Berechnungen auch auf einer unterschiedlichen Anzahl von Messpunkten. Bezüglich der Detektion von Mikroorganismen konnten trotz der Untersuchung eines anderen Organismus innerhalb dieser Arbeit deutlich geringere Zellzahlen mit dem Charm novaLum II detektiert werden. Werte für *Staphylococcus aureus* schwankten laut Omidbakhsh et al. (2014) zwischen $2{,}40*10^2$ (Hygiena) und $6{,}17*10^5$ (Charm) (Omidbakhsh, et al., 2014). In Modellversuchen dieser Arbeit wurden niedrigere Nachweisgrenzen erzielt, dabei handelte es sich zwar um andere Mikroorganismen, diese waren jedoch ebenfalls gram-positiv (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, Milchsäurebakterien: *Streptococcus*, *Lactobacillus* etc.).

Rentabilität. Geräte, Benutzungs- und Wartungskosten sind neben der Voraussetzung der Funktionsfähigkeit des Systems ein wesentlicher Bestandteil der Kaufentscheidung. Einen Vergleich des Charm novaLum II mit drei kommerziell erhältlichen Lumineszenz-Messgeräten zeigt die Tabelle 5-3. Mit fast 3.000 € ist das in dieser Arbeit verwendete Gerät deutlich teurer als die beiden nachfolgenden Alternativen.

Tabelle 5-3 Vergleich des Charm novaLum II mit drei kommerziell verfügbaren Messgeräten

Vergleichs-parameter	***Charm novaLum II (Charm Science)***	***Lumitester pd30 (Kikkoman)***	***Ensure (Hygiena)***	***Clean Trace NG Luminometer (3M)***
Preis des Gerätes	2995,00 €	1367,53 €	1195,20 €	3685,00 €
Swabs, Probennahme-System (für 100 Proben)	248,00 € (Pocket Swab® Plus)	310,89 € (LuciPac® Pen)	273,00 € (Ultra Snap®) 316,00 € (Super Snap®)	300,00 € (3M™ Clean Trace™ Surface ATP)
Lagerung Swabs	Raumtemperatur	2-8°C	2-7°C	2-7°C
(Spezial-)Swabs für Wasser-Untersuchung (für 100 Proben)	319,00 € (WaterGiene® Plus)	-	273,00 € (Aqua Snap® Total)	330,00 € (3M™ Clean Trace™ Water-Total ATP)
Lagerung	0-7°C	-	2-7°C	2-7°C
(Spezial-) Swabs für Allergen-Untersuchungen (für 100 Proben)	399,80 € AllerGiene® Plus	-	-	254,00 € (+ einmalig 796,00 € für Heizblock
Lagerung	0-7°C	-	-	2-7°C
Batteriewechsel-kosten	ca. 300,00 €	< 2,00 €	< 2,00 €	ca. 300,00 €
Quellen, Kundenbetreuung	MCS-Diagnostics, Swalmen, Niederlande	Luminultra, microbial monitoring, Brunswick, Kanada	Medogen Diagnostika, Altenmünster, Deutschland	I&L Biosystems GmbH, Königswinter, Deutschland
Informationsstand	09.09.2015	10.09.2015	08.09.2015	11.09.2015

Die aufgeführten Preise entsprechen dem angegebenen Datum und sind durch lokale Vertreter eingeholt worden.

Das Gerät der Firma Hygiena ist zwar günstiger, allerdings sind die Swab´s teurer. Mit der Zeit würden Verluste auftreten. Swabs von Kikkoman (für den Lumitester pd30) sind deutlich teurer, des Weiteren verfügt das Gerät nicht über die Zusatzfunktion der Wasser- und Allergenuntersuchung, die betriebsintern zukünftig von Bedeutung sein können. Gleiches gilt für Hygiena. Das System Clean Trace™ der Firma 3M ist sowohl bezogen auf Swab´s als

auch auf das Gerät preislich am höchsten angesiedelt. Es verfügt zwar über Allerge- und Wasseruntersuchungsfunktionen, ist dann aber mit erneuten Anschaffungskosten verbunden. Vorteilhaft ist bei den Pocket Swab´s von Charm Science, dass sie bei Raumtemperatur gelagert werden können. Andere ATP-Swabs müssen im Kühlschrank gelagert werden, was Kapazitäten reduziert und den Aufwand erhöht. Die Firma MCS-Diagnostics vertreibt darüberhinaus weitere Produkte an die Sonnländer Getränke GmbH, was zu einer besseren Kundenbetreuung sowie Rabatten führen kann.

Grenzen von Lumineszenz-Messungen und Praktikabilität. Ein Nachteil bei der Anwendung des Verfahrens besteht in der Unsicherheit bezüglich des Zustandekommens hoher Werte. Ohne eine mikrobiologische Referenz kann keine konkrete Aussage über die Ursache eines Verschmutzungszustands getroffen werden. Bezüglich des vom Hersteller ausgeschriebenen Einsatzzweckes ist das jedoch nicht notwendig. Grenzwerte für bestimmte Mikroorganismen festzulegen ist in der Praxis sinnlos, da die Aussage des Messsystems einen allein quantitativen Charakter bezogen auf den Gesamtgehalt an ATP hat. Fest steht, dass für jeden zu beprobenden Bereich innerhalb der Produktion ein Grenzwert für bestimmte Systemzustände festgelegt werden sollte, beispielsweise Tankinnenräume nach der Reinigung. Letztere wurden innerhalb des praktischen Teils dieser Arbeit mit mikrobiologischen Referenzkontrollen belegt. Weiter ist der Fakt der Produkterfassung wesentlich. Herkömmliche Abstrich- und Plate Count Methoden erfassen lediglich den mikrobiellen Zustand von Oberflächen, nicht aber Produktreste bzw. Rückstände, aus denen sich ein Gefährdungspotential ergibt (Griffiths, 1996). Andernfalls müssten zusätzliche Methoden zur Erfassung organischen Materials, wie zum Beispiel ein TTFC-Test (Poulis, et al., 1993), durchgeführt werden. ATP-basierte Messsysteme, wie das in dieser Arbeit verwendete Charm NovaLum II, unterscheiden nicht zwischen Mikroorganismen und Produktresten. Generell sind beide Arten der Kontamination unerwünscht und gefährden die Qualität.

Auch der Einfluss von Störfaktoren ist bei der Anschaffung eines solchen Messgerätes zu berücksichtigen. Bei einer Reinigungskontrolle könnten Reinigungs- und Desinfektionsmittel das Ergebnis verfälschen. Untersuchungen wurden durch Omidbakhsh et al. (2014) für die zuvor genannten 4 Messgeräte durchgeführt (Anlage 5). Es fällt dabei auf, dass das Gerät Charm novaLum II eine verhältnismäßig geringe Anfälligkeit bezüglich dieser Störsubstanzen aufweist.

Velazquez et al. (1997) untersuchten die Effekte verschiedener Extraktions-, Reinigungs- und Desinfektionsmittel auf Luciferin-Luciferase basierenden Biolumineszenz-Messwerten. Das Extraktionsmittel Cetylpyridinium-chlorid (0,0125 %) hatte keinen signifikanten Einfluss auf Lumineszenz-Messwerte (95% Konfidenz). Ein Konzentrations-abhängiger Übergang von Steigerung zu Minderung der Messwerte wurde für alkalischen Schaum, Säureschaum, Natriumhypochlorid, D-Limonen und Haushaltsbleichmittel festgestellt. Quaternäre Ammonium-Verbindungen hätten ebenfalls einen Steigerungseffekt, der allerdings nicht konzentrationsabhängig ist. Ein möglicher Nachteil ist, dass einige Reinigungsmittel oder deren Rückstände Auswirkungen auf die Luciferin-Luciferase-Reaktion haben können (Velazquez, et al., 1997). Für die Anwendung im Unternehmen wäre bei Veränderung der Reinigungsbedingungen eine neue Grenzwertuntersuchung durchzuführen, da die Art der Reinigung sowie die eingesetzten Mittel einen Einfluss auf die Ausprägung der Messwerte haben können. Diesen Unterschied erkennt man bei der Betrachtung von Messwerten in Edelstahl- (CIP-Reinigung) und Emailletanks (manuelle Reinigung).

Bei wechselnden Anwendern vergrößert sich der Unsicherheitsfaktor (Abschnitt 4.2.3). Vor der Benutzung wäre eine Schulung durchzuführen, die Parameter wie Messpunkte, Größe der abzustreichenden Fläche, Temperatur des Swab-Systems und das Messen mit dem Handphotometer berücksichtigt. Durch regelmäßiges Trainieren lässt sich die Sicherheit einer Aussage per ATP-Messung steigern.

Hygienemonitoring. Die Untersuchungen zum Hygienemonitoring zeigen, dass die Biolumineszenz-Methode für diesen Zweck Anhaltspunkte liefern kann. Alle Messpunkte, die stets als gereinigte Flächen beprobt werden sind geeignet (z.B. Messpunkt F5, Abschnitt 4.2.4). Andere, deren Zustand als schwankend bezogen auf den Kontaminationsstatus gilt, sind im Hinblick auf eine fehlende Aussagekraft einer alleinigen ATP-Messung sowie der großen Spannweiten bei wiederholten Messungen mit höheren Risiken einer wahrheitsgemäßen Aussage behaftet. Damit bestätigt sich teilweise die Aussage von Back (2000), der Biolumineszenz-Methoden im Hinblick auf ein Hygienemonitoring als unzureichend einstuft (Back, 2000). Generell kann die Methode des Monitorings in dieser Arbeit in fast 80 % der Messstellen angewendet werden. Dadurch lassen sich Trendaussagen zu verschiedenen Zuständen der Produktion treffen. Auch die Notwendigkeit einer Reinigung kann damit festgestellt werden. Im klassischen Sinne bedeutet das Montoring nach Back (2000) die Beschreibung des Hygienezustands aus mikrobioloischer Sicht. Durch die alleinige Messung des Gesamt-ATP-Gehaltes der Oberfläche werden zusätzlich organische

Komponenten erfasst. Allerdings bleibt die qualitative Beurteilung einer Kontamination verborgen. Hohe Schwankungen der Werte sind durch die Einflussnahme verschiedener Faktoren bedingt. Zum Einen können durch Rückstände von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln Abweichungen entstehen, die die Werte nur bedingt vergleichbar macht. Einige Reinigungsmittel in ATP-freien Lösungen können mit steigender Konzentration steigende RLU-Werte verursachen (Bräunig, et al., 1996) (Velazquez, et al., 1997). Selbst bei Verwendung ein- und desselben Gerätes seien die Werte nicht unmittelbar miteinander vergleichbar. Verantwortlich dafür sind weitere Faktoren wie unterschiedliche Bakterien- oder Mikroorganismen-Spezies sowie Temperatur und pH-Wert (Moje, 1995) (Moje, et al., 1995). Einige dieser Erkenntnisse konnten innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden (Mikroorganismen-Spezies: Abschnitt 4.1; Temperatur: Abschnitt 4.2.1). Auch die Oberflächenstruktur und Materialart beeinflusst den RLU-Wert ebenso wie unterschiedliche Anwender des Verfahrens (Moje, 1995) (Moje, et al., 1995). Ein Hygiene-Monitoring, beschrieben nach Back (2000), ist mit dieser Methode im Sinne von Stufenkontrollen sinnvoll, liefert jedoch keine qualitativen Aspekte. Das Messgerät eignet sich vorwiegend für die Reinigungskontrollen, die während des Betriebsalltags anfallen. Für weitere Messpunkte, die keiner täglichen oder wöchentlichen Reinigung unterliegen, ist die Messmethode zu sensitiv. Es ist weiterhin zu empfehlen, für alle Arten der Biolumineszenz-Messungen eine Dokumentation zu betreiben, die in die Betrachtungen in dieser Arbeit aufgenommener Werte einfließt.

6 Zusammenfassung

Die Modellversuche haben gezeigt, dass eine starke Korrelation zwischen vegetativer Zellzahl und Lumineszenz über 4 Zehnerpotenzen bei *Saccharomyces cerevisiae*, Milchsäurebakterien sowie *Alicyclobacillus acidoterrestris* besteht. Für Produkt- und Schimmelpilz-Detektionen erstreckte sich dieser Bereich über 3 Zehnerpotenzen. Vergleiche zur Literatur bezüglich dieser Korrelation ergaben Übereinstimmungen. Die Parallelität zum Referenzverfahren (DIN 10113-1, -3) konnte nachgewiesen werden. Sensitivitäten der Modelluntersuchungen sind im Durchschnitt um 20 % geringer als die der klassischen Verfahren im Bezug auf die Detektion von Mikroorganismen.

Um wichtige Entscheidungen wie die Freigabe gereinigter Fruchtsafttanks abzusichern, empfiehlt sich für Edelstahltanks ein Richtwert von 10.000 RLU, der durch Referenzverfahren abgesichert ist. Abweichende Reinigungsbedingungen bewirken auf Emaille Werte von maximal ca. 37.000 RLU, dessen Referenzverfahren ebenfalls negative Ergebnisse brachten. Aufgrund der Nähe zu positiven Referenzen wird hier ein Sicherheitsbeiwert von 0,67 als Multiplikator empfohlen, sodass ein Richtwert von ca. 26.000 RLU resultiert. Werte zwischen Höchst- und korrigiertem Richtwert sollten zusätzlich mikrobiologisch überprüft werden. Routinemäßig sollten weitere Messungen in diese Betrachtung einfließen. Der Einsatz dieses Messgerätes ist vor Allem bei starker Auslastung der Anlagen-, Lager- und Produktionskapazitäten sinnvoll.

Werte des Hygienemonitorings zeigen, dass es auf Basis von Lumineszenz-Messungen innerhalb festgelegter Grenzen möglich ist, Veränderungen des Hygienezustands festzustellen und daraus resultierend die Möglichkeit besteht, korrigierende Maßnahmen einzuleiten. In bestimmten Intervallen sind klassische Referenzmessungen zu empfehlen. Es konnten ca. 80 % der Messpunkte für den Zweck eines Monitorings als anwendbar herausgestellt werden.

Die Untersuchungen durch wechselnde Anwender beweisen einen Schulungsbedarf bezüglich Handhabung und Interpretation von Messwerten. Der erhebliche Zeitvorteil und die einfache Handhabung des Messgerätes sind die Hauptfaktoren für einen Einsatz im Fruchtsaftbetrieb. Im Vergleich zu drei Geräten anderer Hersteller lässt sich dieses Gerät im Fruchtsaft-produzierenden Unternehmen (Sonnländer Getränke GmbH) als am vorteilhaftesten herausstellen.

7 Literaturverzeichnis

Abarca, M. L., et al. 1994. Ochratoxin A Production by Strains of Aspergillus niger var. niger . *Applied and Environmental Microbiology 60 (7)* . 1994, S. 2650 - 2652.

Adams, J. B., et al. 1999. Bromophenol formation as a potential cause of disinfectant taint in foods. *Food Chemistry 64.* 1999, S. 377 - 381.

Al – Holy, M. A., et al. 2015. Discrimination between Bacillus and Alicyclobacillus Isolates in Apple Juice by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science 80 (2).* 2015, S. M399–M404.

Ali, S., et al. 2002. Production of citric acid by Aspergillus niger using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology 5 (3).* 2002, S. 258 - 271.

Allison, D. G. und Sutherland, I. W. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria . *J. Gen. Microbiol. (133).* 1987, S. 1319 - 1327.

Andersen, B., Smedsgaard, J. und Frisvad, J. C. 2004. Penicillium expansum: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and their Natural Occurrence in Fruit Products. *J. Agric. Food Chem. (52/4).* 2004, S. 2421 - 2428.

Autio, K. und Mattila-Sandholm, T. 1992. Detection of Active Yeast Cells (Saccharomyces cerevisiae) in Frozen Dough Sections. *Appl. Env. Microbiol. (58).* 1992, S. 2153 - 2157.

Back, W. 2008. *Mikrobiologie der Lebensmittel - Getränke. Kap. 4.2: Getränkeschädliche Hefen. 3. Auflage.* Hamburg : Behr's Verlag, 2008.

Back, W. 2000. *Farbatlas und Handbuch der Getränkeindustrie. Teil 2 - Fruchtsaft- und Limonadenbetriebe, Wasser, Betriebshygiene, Milch und Milchprodukte, Begleitorganismen der Getränkeindustrie.* Nürnberg : Fachverlag Hans Carl, 2000.

Baker, S. E. 2006. Aspergillus niger genomics: past, present, and into the future. *Medical Mycology 44.* 2006, S. 17 - 21.

Bakke, R., et al. 1984 . Activity of Pseudomonas aeruginosa in biofilms: steady state. *Biotechnol. Bioeng. (26).* 1984 , S. 1418 - 1424.

Baumgart, J. 1999. *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 4. Auflage.* Hamburg : Behr's Verlag, 1999.

Baumgart, J., Husemann, M. und Schmidt, C. 1997. Alicyclobacillus acidoterrestris. Occurrence, importance, and detection in beverages and raw materials for beverages. *Flüssiges Obst 64.* 1997, S. 178 - 180.

Bell, C. und Stallard, D. A. 1994. ATP Bioluminescence techniques for assessing the hygienic condition of milk transport tankers. *International Dairy Journal 4 (7).* 1994, S. 639.

Bell, C., et al. 1996. Development of a hygiene standard for raw milk based on the Lumac ATP-bioluminescence method. *Int. Dairy J. (6).* 1996, S. 709-713.

Blum, L. J. und Marquette, C. A. 2006. *Firefly Bioluminescence (Kapitel 2.2.1). in: Baldini, F.; Chester, A. N.; Homola, J.; Martellucci, S.; (Hrsg.): Optical Chemical Sensors.* NATO Science Series: II. Mathematics, Physics ans Chemistry – Vol. 224. Dordrecht : Springer-Verlag, 2006.

Borlinghaus, A. und Engel, R. 1997. Alicyclobacillus incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies — Method development and validation. *Fruit Processing 7 / 97.* 1997, S. 262 – 266.

Bräunig, I. und Trenner, P. 1996. Untersuchungen zur Grenzwertproblematik bei der Anwendung der Biolumineszenzmethode (Lightening®). *Fleischwirtschaft (76).* 1996, S. 1125 - 1130.

Brugnoni, L. I., Cubitto, M. A. und Lozano, J. E. 2011. Biofilm formation under laminar flow conditions of yeast isolated from an apple juice processing plant. *Journal of Food Process Engineering (34/1).* 2011, S. 49 - 66.

Brunner, B., Bülte, M. und Heitmann, M. 2000. „Desinfektionsmittelresistenz“ bei Bakterien aus dem Lebensmittelbereich. *41. Arbeitstagung Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen.* 2000, S. 330-335.

Căpriţă, A. und Căpriţă, R. 2005. Applications of biochemiluminescence in quality assurance of food products. *Scientifical Researches. Agroalimentary Processes and Technologies XI (1).* 2005, S. 161 – 172.

Chaibenjawong, P. und Foster, S. J. 2011. Desiccation tolerance in Staphylococcus aureus. *Arch. Microbiol. (193).* 2011, S. 125 - 135.

Chang, S. S. 2008. Guaiacol producing Alicyclobacillus spp. – Differentiation, Detection, and Control. A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of: Doctor of Philosophy, Washington State University, School of Food Science. 2008.

Chang, S. S., Park, S. H. und Kang, D. H. 2013. Developement of a novel agar media for isolating guaiacol producing Alicyclobacillus spp. *International Journal of Food Microbiology 164.* 2013, S. 1 – 6.

Chang, S. und Kang, D. H. 2005. Development of novel Alicyclobacillus spp. isolation medium. *Journal of Applied Microbiology 99.* 2005, S. 1051 - 1060.

Chang, Su-Sen, Kang und Dong-Hyun. 2004. Alicyclobacillus spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *In: Critical reviews in microbiology (30/2).* 2004, S. 55 – 74.

Charm Science, Inc. (o. V.). 03.11.2008. *Operator´s Manual: novaLUM – Firmware Vervion 1.0.4 V20. siehe Anlage CD.* s.l. : Charm Science, Inc., 659 Andover Street Lawrence, Massachusetts, MA 01843., 03.11.2008.

Charm Science, Inc. (o.V.). 2010. *Pocket Swab® Plus ATP Swabs for Hospitals Brochure. The Most Trusted Name in ATP Monitoring. siehe Anlage CD.* s.l. : Charm Science, Inc.659 Andover Street Lawrence, Massachusetts, MA 01843. http://www.charm.com/products/pocketswab-plus#documents. Abruf am 07.07.2015, 09:54, 2010.

Charm Science, Inc. , o.V. 2013. *Pocket Swab® Plus - sustainable and stable. siehe Anlage CD.* s.l. : Charm Science, Inc.659 Andover Street Lawrence, Massachusetts, MA 01843.http://www.charm.com/products/pocketswab-plus#documents.Abgerufen: 07.07.2015, 09:53 Uhr, 2013.

Charm Science, Inc., (o.V.). 2011. *novaLUM Brochure. siehe Anlage CD.* s.l. : Charm Science, Inc.659 Andover Street Lawrence, Massachusetts, MA 01843.http://www.charm.com/products/pocketswab-plus#documents., 2011. Abruf am 07.07.2015, 11:02 Uhr.

Chen, F. C. und Godwin, S. L. 2006. Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerators. *J. Food Prot. (69).* 2006, S. 2534 - 2538.

Costa, P. D., et al. 2006. ATP-Bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology 37.* 2006, S. 345 - 349.

Costerton, J. W., et al. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol. (41).* 1987, S. 435 - 464.

dos Anjos, M. M., et al. 2013. Resistance of Alicyclobacillus acidoterrestris spores and biofilm to industrial sanitizers. *J. Food. Prot. (76/8).* 2013, S. 1408 - 1413.

Doyle, M. P. 1991. Escherichia coli O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol. (12).* 1991, S. 289 - 302.

Doyle, M. P. und Padhye, V. V. 1988. *Escherichia coli. In: Doyle, M. P. (Hrsg.): Foodborne Bacterial Pathogens.* New York, USA : Marcel Dekker, 1988. S. 235 - 282.

Eckstein, P. P. 2013. *Repetitorium Statistik - Deskriptive Statistik - Stochastik - Induktive Statistik.* 8. Auflage. Wiesbaden : Springer Verlag, 2013.

Eguchi, S. Y., et al. 1999. Acidothermophilic sporeforming bacteria (ATSB) in orange juices: detection methods, ecology, and involvement in the deterioration of fruit juices. *Report of the research Project ABE citrus, Campinas (SP), Brazil, Rua Pedroso Alvarenga, 1284 2° andar, CEP 04531-913- Sao Paolo/SP Brasil.* 1999.

Ellerbroek, L. und Lox, C. 2004. Investigation on the use of neck skin for microbial process control of fresh poultry meat with the ATP Bioluminescence method. *Deutsch. Tierarzt. Wochensch (111).* 2004, S. 181-184.

Fairbanks, B., et al. 1984. Limitations of atp estimates of microbial biomass . *Journal of Soil Biology & Biochemistry 16/6.* 1984, S. 549 - 558.

Farber, J. M. und Peterkin, P. I. 1991. Listeria monocytogenes. A food borne pathogen. *Microbiol. Rev. (55).* 1991, S. 476 - 571.

Federighi, M., et al. 1998. Evidence of non-coccoid viable but non-culturable Campylobacter jejunii cells in microcosm water by direct viable count, CTC-DAPI double staining, and scanning electron microscopy. *Food Microbiol. (15).* 1998, S. 539 - 550.

Finger, R. und Sischo, W. M. 2001. Bioluminescence as a technique to evaluate udder preparation. *J. Dairy Sci. (84).* 2001, S. 818-823.

Firnhaber, J. 1999. *Alkoholfreie Erfrischungsgetränke - Fruchtsäfte und Fruchtsaftkonzentrate, Gemüsesäfte, natürliches Mineralwasser, Tafelwasser und Trinkwasser. in: Baumgart, J.: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. 4. Auflage.* Hamburg : Behr's Verlag, 1999.

Friedrich, L. M., et al. 2009. Mitigation of Alicyclobacillus spp. Spores on food contact surfaces with aqueous chlorine dioxide and hypochlorite. *Food Microbiology 26* . 2009, S. 936–941.

Fuchs, G., Eitinger, T. und Schlegel, H. G. 2007. *Allgemeine Mikrobiologie.* 8. Auflage. Stuttgart : Thieme Verlag, 2007.

Gális, I. und Jirásková, J. 1993. Effect of ATP concentration and temperature on firefly luciferase activity. *Biologia Plantarum 35 (1).* 1993, S. 147 – 150.

Ganesh Kumar, C. und Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology (42).* 1998, S. 9 - 27.

Gautam, A. K., et al. 2011. Diversity, pathogenicity and toxicology of A. niger: an important spoilage fungi. *Res J Microbiol 6.* 2011, S. 270 - 80.

Gengenbacher, M., et al. 2010. Nutrient-starved, nonreplicating Mycobacterium tuberculosis requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiol. (156).* 2010, S. 81-87.

Gissel, C. 1995. Qualitätssicherung und Betriebshygiene – Stand der Technik, Gesetzgebung, zeitgemäße Organisation. *Fleischwirtschaft (75).* 1995, S. 961 – 966.

Griffiths, M. W. 1996. The Role of ATP Bioluminescence in the Food Industry: New Light on Old Problems. *J. Food Technol. (31).* 1996, S. 60 - 72.

Guillou, S., et al. 2003. Viability of Saccharomyces cerevisiae cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. *Int. J. Food Microbiol. (88).* 2003, S. 85 - 89.

Hall, J. A., Webster, J. J. und Leach, F. R. 1989. *Purification and Characterization of Firefly Luciferase. in: Wood, E. J.: Practical Biochemistry for Colleges.* 1. Auflage. Kronberg : Pergamon Press, 1989.

Hammes, F., et al. 2010. Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments. *Water Res. (44).* 2010, S. 3915-3923.

Harwig, J., et al. 1973. Occurrence of Patulin and Patulin-producing Strains of Penicillium expansum in Natural Rots of Apple in Canada . *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal (6/1)* . 1973, S. 22 – 25.

Hauser, G. 2008. *Hygienische Produktion. Band 2: Hygienegerechte Apparate undAnlagen.* 2. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 2008.

Horton, R., et al. 2008. *Biochemie.* San Francisco : Pearson Studium, 2008.

Jay, J. M., Loessner, M. J. und Golden, D. A. 2005. *Modern Food Microbiology – Food Science Text Series. 7. Auflage.* . New York : Springer Verlag, 2005.

Jensen, N. 1999. Alicyclobacillus: a new challenge in the food industry. *Food Aust 51 (12).* 1999, S. 33 - 36.

Jensen, N. und Whitfield, F. B. 2003. Role of Alicyclobacillus acidoterrestris in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology 36.* 2003, S. 9 - 14.

Joosten, H. M., et al. 2001. Production of ochratoxin A by Aspergillus carbonarius on coffee cherries. *Int J Food Microbiol 65.* 2001, S. 39 - 44.

Keding, K. 1993. *Mikrobiologie der Lebensmittel - Getränke. Kap. 8: Haltbarmachung von Getränken.* [Hrsg.] H. H. Dittrich. 1. Auflage. Hamburg : Behr´s Verlag, 1993.

Klein, G. (Hrsg.) und Jähne, J. 2009. *Mikrothek – Kap. V: Mikroorganismen in Fruchtsaft. V.3 Hefen, Schimmelpilze und Laktobazillen.* Hamburg : Behr's Verlag, 2009.

Kumar, C. G. und Singh, R. S. 1994. Yersina enterocolitica, as an emerging foodborne pathogen - a review. *Indian J. Dairy Sci. (47).* 1994, S. 537 - 544.

Lagace, L., et al. 2002. 2002. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using ATP bioluminescence. *J. Food Sci. (67).* 2002, S. 1851-1854.

Lane, B.S., et al. 1988. ATP content of stored spores of Paecilomyces farinosus and the use of ATP as a criterion of spore viability. *Trans. Brit. Mycol. Soc. (90).* 1988, S. 109 - 111.

Lee, S. Y., Dougherty, R. H. und Kang, D. H. 2002. Inhibitory Effects of High Pressure and Heat on Alicyclobacillus acidoterrestris Spores in Apple Juice. *Applied and Environmental Microbiology.* 2002, S. 4158 - 4161.

Li, J., et al. 2003. Cold and carbon dioxide used as multi-hurdle preservation do not induce appearance of viable but non-culturable Listeria monocytogenes. *J. Appl. Microbiol. (94).* 2003, S. 48 - 53.

Lin, M., et al. 2005. Rapid discrimination of Alicyclobacillus strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology 105.* 2005, S. 369 - 376.

Lucchetta, G., et al. 2010. Occurence of black Aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy. *Toxins 2.* 2010, S. 840 - 55.

Luo, J., et al. 2009. Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count on food. *Anal. Biochem. (394).* 2009, S. 1 - 6.

Marques, S. M. und Esteves da Silva, J. C. G.:. 2008. Critical Review – Firefly Bioluminescence: A Mechanistic Approach of Luciferase Catalyzed Reactions. *IUBMB Life 61 (1).* 2008, S. 6 – 17.

Moje, M. 1995. Eignung eines Biolumineszenzverfahrens zur Überprüfung der Reinigung und Desinfektion im Fleischverarbeitungsbereich. *Tagungsunterlagen: Hygiene-Monitoring-Symposium, Fa. Merck, Darmstadt.* 1995.

Moje, M. und Hechelmann, H. 1995. Biolumineszenz-Schnellmethode: eine Möglichkeit zur Überprüfung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen. *Mitteilungsblätter der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach (34).* 1995, S. 193 - 198.

Müller, G. und Weber, H. 1996. *Mikrobiologie der Lebensmittel. 8. Auflage.* Hamburg : Behr`s Verlag, 1996.

Müller, H. - J. 2001. *PCR – Polymerase - Kettenreaktion.* 1. Auflage. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2001.

Müller, M. und Schulz-Schröder, G. 2002. Nachweis von acidophilen Sporenbildnern in Fruchtsaftgetränken. *Posterbeitrag zum Symposium Lebensmittel – Mittel zum Leben, gemeinsame Veranstaltung der GdCh und DVG, Münster.* 2002.

Omidbakhsh, N., Ahmadpour, F. und Kenny, N. 2014. How Reliable Are ATP Bioluminescence Meters in Assessing Decontamination of Environmental Surfaces in Healthcare Settings. *PLOS ONE (9/6).* 2014, S. 1 - 8.

Orth, R. und Steigert, M. 1996. Hygienekontrolle: Praxiserfahrung mit der ATP-Biolumineszenzmeßmethode zur Kontrolle des Hygienestatus nach der Reinigung in einem Fleischzerlegebetrieb. *Fleischwirtschaft 76.* 1996, S. 40 - 41.

Perrone, G., et al. 2007. Biodiversity of Aspergillus species in some important agricultural products. *Stud Mycol 59.* 2007, S. 53 - 66.

Pettipher, G. L., Osmundson, M. E. und Murphy, J. M.:. 1997. Methods for the detection and enumeration of Alicyclobacillus acidoterrestris and investigation of growth and

production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology 24.* 1997, S. 185 - 189.

Pinhatti, M., et al. 1997 . Detection of acidothermophilic bacilli in industrialized fruit juices. *Fruit Processing 9.* 1997 , S. 350-353.

Poggemann, H.-M. und Baumgart, J. 1996. Hygienemonitoring durch ATP-Bestimmung mit dem System HY-Lite®. *Fleischwirtschaft 76.* 1996, S. 132 - 133.

Poulis, J. A., et al. 1993. Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *International Journal of Food Microbiology.* 1993, 20, S. 109 - 116.

Previdi, M. P., et al. 1997. Heat Resistance of Alicyclobacillus spores in fruit juices. *Indust. Conserve 72.* 1997, S. 353 - 358.

Prevost, D., Angers, D. A. und Nadeau, P. 1991. Determination of ATP in soils by high performance liquid-chromatography. *Soil Sci Biochem 23.* 1991, S. 1143 – 1146.

Racker, E. 1974. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol. Cell. Biochem. 5/1-2.* 1974, S. 17 - 23.

Roda, A. 2011. *Chemiluminescence and Bioluminescence: Past, Present and Future.* ISBN: 978-1-84755-812-1. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2011.

Rooney, M. L. 1995. *CSIRO - Division of Food Science and Technology, Active Food Packaging. 1. Auflage.* London : Blackie Academic & Professional Verlag, 1995.

Ryder, J. M. 1985. Determination of Adenosine Triphosphate and Its Breakdown Products in Fish Muscle by High Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food. Chem. 33.* 1985, S. 676 – 680.

Savaş Bahçeci, K., Gökmen, V. und Acar, J. 2005. Formation of guaiacol from vanillin by Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice: a model study. *Eur Food Res Technol (220).* 2005, S. 196 – 199.

Schmidhofer, T. 1988. *Untersuchungsmethoden. in: Prändl, O; Fischer, A.; Schmidthofer, T.; Sinell, H.-J.: Fleisch: Technologie und Hygiene der Gewinnung. S. 679 – 735.* Stuttgart : Ulmer Verlag, 1988.

Schröder, W. 1998. *Reinigung und Desinfektion. in: Dittrich, H. H.: Mikrobiologie der Lebensmittel – Getränke. Auflage 1993, Nachdruck. .* Hamburg : Behr´s Verlag, 1998.

Schuster, E., et al. 2002. Aspergillus niger - a review. *Appl Microbiol Biotechnol 59.* 2002, S. 426 -35.

Sciortino, Jr. C. V., PhD, Xia, E. L. MD und Mozee, A. R. N. 2004. Assessment of a Novel Approach to Evaluate the Outcome of Endoscope Reprocessing. *Infection Control and Hospital Epidemiology (25/4).* 2004, S. 284-290.

Shama, G. und Malik, D. J. 2013. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal of Hygiene and Environmental Health 216 (2).* 2013, S. 115 – 125.

Siragusa, G. R., et al. 1995. Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J. Food Prot. (58).* 1995, S. 770 - 775.

Skiffington, R. (Charm Science, Inc.). 2000. *Photometer and test sample holder for use therein, method and system. siehe CD Anlage.* s.l. : Patent US 6055050 A 25.04.2000, 2000.

Smit, Y. 2009. Growth and Guaiacol production of species of Alicyclobacillus isolated from the South African fruit processing environment. *University of Stellenbosch, Masterthesis, Department of Food Science,.* 2009.

Snaidr, J., et al. 2008. *Vermikon AG. Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis getränkeschädlicher Mikroorganismen. EP1 664 351 B1* 80992 München (DE), 21. 05 2008.

Soares, C., Calado, T. und Venâncio, A. 2013. Mycotoxin production by Aspergillus niger aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Rev Iberoam Micol 30 (1).* 2013, S. 9 - 13.

Sommer, N. F., Buchanan, J. R. und Fortlage, R. J. 1974. Production of Patulin by Penicillium expansum. *Applied Microbiology (28/4).* 1974, S. 589 – 593.

Splittstoesser, D. F., Chury, J. J. und Lee, C. Y. 1994. Growth characteristics of aciduric spore forming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection 57 (12).* 1994, S. 1080-1083.

Stern, N. J. und Kazmi, S. U. 1989. *Campylobacter jejunii. In: Doyle, M. P. (HrsG.): Foodborne Bacterial Pathogens.* New York, USA : Marcel Dekker, 1989. S. 71 - 110.

Steyn, C. E., et al. Contamination of pear concentrate by Alicyclobacillus from recirculating flume water during fruit concentrate production. *World J Microbiol Biotechnol.* 27, S. 2449 – 2454, 2011.

Tevfik Dorak, M. 2006. *Real-Time PCR.* ISBN: 978-0-41537734-8. ASIN: B00DHPBCKC. . New York : Taylor and Francis – Verlag, 2006.

Tifft, E.C. und Spiegel, S.J. 1976. Use of adenosine triphosphate assay in disinfection control. *Env. Sci. Technol. (10).* 1976, S. 1268-1272.

Tisi, L. C., et al. 2002. Development of a thermostable firefly luciferase. *Analytica Chimica Acta 457.* 2002, S. 115 – 123.

Tournas, V. H., Heeres, J. und Burgess, L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology (23/7).* 2006, S. 684 - 688.

Trautsch, M. 2003. Eignung eines Schnelltests zur Prüfung der Oberflächenreinheit im Rahmen betrieblicher Eigenkontrollen in Lebensmittelbetrieben. *Inaugural-Dissertation zur*

Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. 2003.

Turner, D. E., et al. 2010. Efficacy and Limitations of an ATP-Based Monitoring System. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 49 (2).* 2010, S. 190 - 195.

Ueda, I., Shinoda, F. und Kamaya, H. 1994. Temperature-Dependent Effects of High Pressure on the Bioluminescence of Firefly Luciferase. *Biophysical Journal 66* . 1994, S. 2107 - 2110.

Ukuku, D. O., Sapers, G. M. und Fett, W. F. 2005. ATP bioluminescence assay for estimation of microbial populations of fresh-cut melon. *J. Food Prot. (68).* 2005, S. 2427 - 2432.

University of South Florida, SOP. 2003. Division of Comparative Medicine, Standard operating procedures (SOP) – Charm Science novaLum® Luminometer, SOP# 1139.4. siehe Anlage CD. s.l. : Online unter: http://www.research.usf.edu/cm/docs/sops/s1139_charm_sciences_novalum_luminometer.pdf . Abruf am 07.07.2015, 14:28 Uhr, 2003.

Velazquez, M. und Feirtag, J. M. 1997. Quenching and enhancement effects of ATP extractants , cleansers and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. *J. Food Prot. (60).* 1997, S. 799 - 803.

Venkateswaran, K., et al. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *J. Microbiol. Meth. (52).* 2003, S. 367 - 377.

Wadhawan, T., et al. 2010. Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in hydrogel beads. *Enz. Microbial Technol. (47).* 2010, S. 166 - 173.

Walker, M. und Phillips, C. A. 2008. Alicyclobacillus acidoterrestris: an increasing threat to the fruit juice industry? . *International Journal of Food Science and Technology 43.* 2008, S. 250 – 260.

Walls, I. und Chuyate, R. 1998. Alicyclobacillus – historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food and Environmental Sanitation 18.* 1998, S. 1 - 5.

Webster, W. R., Lee, J. Y. und Deininger, R.A. 2005. Rapid assessment of microbial hazards in metalworking fluids. *J. Occup. Env. Health (2).* 2005, S. 213 - 218.

Werlein, H.D. 2001. Comparison of destructively and rinsing gained samples to determine TVC of pig carcasses by bioluminescence. *Meat Sci. (59).* 2001, S. 165 - 168.

Whitehead, K. und Verran, J. 2006. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioprod. Proc. (84).* 2006, S. 253 - 259.

Wisotzkey, J. D., et al. 1992. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, and Bacillus cycloheptanicus and proposal

for creation of a new genus. Alicyclobacillus gen. nov. *International J System Bacteriol 42.* 1992, 42, S. 263 - 269.

Woodling, S. E. und Moraru, C. 2005. Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of Listeria innocua on stainless-steel surfaces. *J. Food. Sci. (70).* 2005, S. M345 - M351.

Yokota, A., Fujii, T. und Goto, K. 2008. *Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli.* 1. Auflage. Berlin : Springer-Verlag, 2008.

Zagon, J., et al. 2006. Nachweis von gentechnisch veränderten Futtermitteln – Eine Studie zur Anwendbarkeit von Verfahren aus der Lebensmittelanalytik. *Bundesinstitut für Risikobewertung. Berlin: BfR-Wissenschaft.* 2006.

Zhang, J., Yue, T. und Yuan, Y. 2013. Alicyclobacillus Contamination in the Production Line of Kiwi Products in China. *PLoS ONE 8 (7).* 2013, S. 1 – 13.

8 Rechtliche Vorschriften, Leitsätze und Normen

[§64 LFGB, L 00.00 131] Amtliche Sammlung von Untersuchunsverfahren Untersuchung von Lebensmitteln – Erfassung des Hygienestatus in Lebensmitteln durch ATP-Messung mittels Biolumineszenz (Übernahme der gleichnamigen Norm DIN 10124, Ausgabe Dezember 2009), September 2010

[BGL e. V. / TD – Leitlinie, 2012] Leitlinie für eine gute Hygienepraxis beim Lebensmitteltransport, 2. Auflage. gemäß LMHV (EG) Nr. 852/2004 vom 29.04.2004, amtlich anerkannt durch BMELV, 2012

[DIN 10113-1, 1997-07] Deutsches Institut für Normung e. V.: DIN 10113-1:1997-07 Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich: Teil 1: Quantitatives Tupferverfahren, 1997

[DIN 10113-2, 1997-07] Deutsches Institut für Normung e. V.: DIN 10113-2:1997-07 Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich: Teil 2: Semiquantitatives Tupferverfahren, 1997

[DIN 10113-3, 1997-07] Deutsches Institut für Normung e. V.: DIN 10113-3:1997-07 Bestimmung des Oberflächenkeimgehaltes auf Einrichtungs- und Bedarfsgegenständen im Lebensmittelbereich: Teil 3: Semiquantitatives Verfahren mit nährbodenbeschichteten Entnahmevorrichtungen (Abklatschverfahren), 1997

[DIN 10516, 2009-05] Deutsches Institut für Normung e. V.: DIN 10516:2009-05 Lebensmittelhygiene, Reinigung und Desinfektion, 2009

[DIN 10528:2009-06] Deutsches Institut für Normung e. V.: DIN 10528:2009-06 Lebensmittelhygiene - Anleitung für die Auswahl von Werkstoffen für den Kontakt mit Lebensmitteln - Allgemeine Grundsätze, 2009

[DIN EN 1672-2:2009-07] Deutsches Institut für Normung e. V.: Nahrungsmittelmaschinen – Allgemeine Gestaltungsleitsätze – Teil 2: Hygieneanforderungen; Deutsche Fassung EN 1672-2:2005, 2009

[DIN EN ISO 14159, 2008] Sicherheit von Maschinen – Hygieneanforderungen an die Gestaltung von Maschinen (ISO 14159:2002); Deutsche Fassung EN ISO 14159:2008 Deutsches Institut für Normung e. V. Beuth Verlag, Berlin, Deutschland, 2008

[DIN EN ISO 21469, 2006-05] Sicherheit von Maschinen – Schmierstoffe mit nicht vorhersehbarem Produktkontakt – Hygieneanforderungen, 2006

[EHEDG Doc. 8, 2004] EHEDG (European Hygienic Engineering & Design Group) GUIDELINES DOC. 8 (2004) erarbeitet von: HAUSER, G.; CURIEL, G. J.; BELLIN, H.-W.; CNOSSEN, H. J.; HOFMANN, J.; KASTELEIN, J.; PARTINGTON, E.; PELTIER, Y.; TIMPERLEY, A. W.: Hygienic equipment design criteria second edition, April 2004 CCFRA Technology Ltd., Chipping Campden, UK, 2. Auflage, 2004

[ENFIT-Leitlinie, 2011] ENFIT – Europäischer Verband zur Förderung innovativer Technologien für Reinigung, Logistikmanagement und Service für Transport- und Lagerbehälter e. V.: Leitlinie – Guideline Food: Tankinnenreinigung von

Lebensmitteltransportbehältern – Best practices mit HQCC, Herausgegeben: 18.03.2008; Stand 05.2011

[FrSaftErfrischGetrV, 2004] Verordnung über Fruchtsaft, einige ähnliche Erzeugnisse, Fruchtnektar und koffeinhaltige Erfrischungsgetränke (Fruchtsaft und Erfrischungsgetränkeverordnung), Ausfertigungsdatum: 24.05.2004, zuletzt geändert 30.07.2015

[IFU Methode Nr. 12, 2004] International Federation of Fruit Juice Producers (IFU): Method on thedetection of taint producing *Alicyclobacillus* in Fruit Juice, 2004

[Leitsätze für Fruchtsäfte, 2003] Neufassung vom 27. November 2002 (BAnz. Nr. 46b vom 7. März 2003, GMBl 2003 S. 151), (BAnz. AT vom 27.01.2015 B1, GMBl 2015 S. 113), geändert durch die Bekanntmachung vom 07. Januar 2015

[LFGB, 2005] Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch – LFGB), 05.12.2014

[LMHV, 2007] Verordnung über die Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln (Lebensmittelhygiene-Verordnung - LMHV), Stand: 14.07.2010

[Richtlinie 2006/42/EG] (Maschinenrichtlinie) des europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Mai 2006 über Maschinen und zur Änderung der Richtlinie 95/16/EG (Neufassung). Anhang I, Punkt 2: Nahrungsmittelmaschinen und Maschinen für kosmetische oder pharmazeutische Erzeugnisse. 2006

[Richtlinie 98/83/EG] des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch, Amtsblatt nr. L 330 vom 05/12/1998 S. 0032 - 0054

[TrinkwV 2001] Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - Ausfertigungsdatum: 21.05.2001, Fassung vom 2. August 2013 (BGBl. I S. 2977)

[VdF-Leitlinie, 2012] Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V. (VdF): Spezielle Qualitätsanforderungen an Transporte (fest/flüssig) in Tankzügen für dieFruchtsaftindustrie, Stand: 24.09.2013

[VO (EG) Nr. 178/2002] Verordnung (EG) Nr. 178/2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit.

[VO (EG) Nr. 1881/2006] Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommissionvom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Levbensmitteln, Stand: 2010

[VO (EG) Nr. 852/2004] Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates über Lebensmittelhygiene, 29.04.2004

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Struktur eines Adenosintriphosphat-Moleküls (Căpriță, et al., 2005) 15

Abbildung 2-2 ATP-Gehalte von Mikroorganismen (Venkateswaran, et al., 2003) 17

Abbildung 3-1 Pocket Swab® Plus und Charm novaLUM II (Links: Swab ohne Reaktionsgehäuse; Mitte: Swab mit Reaktionsgehäuse; Rechts: Charm novaLUM II, Charm Science Inc.) 25

Abbildung 3-2 Maße der Schablone und Abstrichschema 27

Abbildung 3-3 Dip Slide-Abgleich für Schimmelpilze (VWR International GmbH) 27

Abbildung 4-1 Abhängigkeit der Messergebnisse von der Oberflächenbeschaffenheit bei Produktkontamination (R = Bestimmtheitsmaß) 36

Abbildung 4-2 Darstellung der RLU-Werte pro Verdünnung (Produktkontamination auf Edelstahl; Mittelwerte +/- Standardabweichungen) 38

Abbildung 4-3 Darstellung der RLU-Werte pro Verdünnungsstufe (Produktkontamination auf Emaille; Mittelwerte +/- Standardabweichungen) 38

Abbildung 4-4 Darstellung der Messwerte, *Saccharomyces cerevisiae* auf Emaille (EM) und Edelstahl (ES) 40

Abbildung 4-5 Exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte auf Edelstahl (n = 3) 44

Abbildung 4-6 Exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte auf Emaille (n = 3) 44

Abbildung 4-7 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen der Messwerte mit Milchsäurebakterien (n = 3) 45

Abbildung 4-8 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 1*) (n = 3) 53

Abbildung 4-9 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 2*) (n = 3) 53

Abbildung 4-10 Gesamter und exponentieller Bereich des Graphen, Versuch *A. at. 3*) (n = 3) 53

Abbildung 4-11 Darstellung der Biolumineszenz- und Referenzmesswerte für *A. at.* je Verdünnungsstufe (nach Voranreicherung 7 d, Pasteurisation, erneutem Wachstum 3 d) 54

Abbildung 4-12 Detektion von *A. niger* (R^2 = 0,7786) und *Penicillium spp*. (R^2 = 0,7281) ... 55

Abbildung 4-13 Darstellung der Einzelmesswerte, Mittelwerte in Abhängigkeit von der Temperatur 62

Abbildung 4-14 Darstellung der 19 Messreihen per Box Plot (45 % Perzentile, 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit)..... 74

Abbildung 5-1 Zusammenhang: RLU- und KbE, Daten aufgenommen nach Reinigung und Desinfektion der Oberflächen am selben Ort, R < 0,4; n = 33 (Poulis, et al., 1993) 81

Abbildung 5-2 Abhängigkeit der Lichtintensität zweier Luciferasen von der Temperatur (Tisi, et al., 2002)..... 85

Abbildung 5-3 Linearität von ATP-Messwerten von 4 verschiedenen Lumineszenzsystemen anhand von ATP-Standards (Omidbakhsh, et al., 2014)..... 86

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Einteilung und Beispiele verschiedener Hefen nach Back (2000) 3

Tabelle 2-2 D- und z-Werte von *Alicyclobacillus acidoterrestris* 5

Tabelle 2-3 Kontaminationsrisiken durch *Alicyclobacillus spp.* 6

Tabelle 2-4 Typische Verschmutzungen in der Getränkeindustrie (Schröder, 1998) 8

Tabelle 2-5 Beispiele von Mikroorganismen und ermittelte ATP-Gehalte laut Literatur 16

Tabelle 2-6 Korrelationen zwischen KbE und ATP-Messergebnissen verschiedener Studien 18

Tabelle 3-1 Reinigungsschritte der Edelstahl-Testoberfläche 22

Tabelle 3-2 Versuchsaufbau, Begründung der Testreihen 23

Tabelle 3-3 Durchführung der Messungen für *A. acidoterrestris* auf Edelstahl 24

Tabelle 3-4 Festlegung betriebstypischer Umgebungstemperaturen 29

Tabelle 3-5 Festgelegte Messpunkte und Art der Reinigung 31

Tabelle 3-6 Bezeichnung und Beschreibung der Messpunkte 32

Tabelle 3-7 Bezeichnung und Erläuterung festgelegter Messpunkte 33

Tabelle 4-1 Messergebnisse zu Produktkontamination auf Edelstahloberfläche 37

Tabelle 4-2 Messergebnisse zu Produktkontamination auf einer Emaille-Oberfläche 39

Tabelle 4-3 Messergebnisse *Saccharomyces cerevisiae* auf Edelstahl 42

Tabelle 4-4 Messergebnisse Saccharomyces cerevisiae auf Emaille 43

Tabelle 4-5 Detektion von Milchsäurebakterien auf Edelstahloberflächen 47

Tabelle 4-6 Ergebnisse des Versuches *A. at. 1* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (Voranreicherung) auf Edelstahloberflächen 49

Tabelle 4-7 Ergebnisse des Versuches *A. at. 2* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (nach Pasteurisation) auf Edelstahloberflächen 50

Tabelle 4-8 Ergebnisse des Versuches *A. at. 3* – Detektion von Alicyclobacillus acidoterrestris (Inkubation 1) auf Edelstahloberflächen 51

Tabelle 4-9 Durchschnittliche Wiederfindungsraten der Versuche *A. at. 1* bis *A. at. 3* 52

Tabelle 4-10 Detektion von *Aspergillus niger* auf Edelstahloberflächen 56

Tabelle 4-11 Detektion von *Penicillium spp.* auf Edelstahloberfläche 57

Tabelle 4-12 Mittelwerte und Spannweiten der RLU-Werte von *Aspergillus niger* und *Penecillium spp.* 58

Tabelle 4-13 Korrelationen, Nachweisgrenzen und Sensitivität der Verfahren Charm novaLum II, DIN 10113-1, DIN 10113-3 59

Tabelle 4-14 Sensitivität (%) der verschiedenen Verfahren 60

Tabelle 4-15 Ergebnismatrix des Tests auf Varianzhomogenität 63

Tabelle 4-16 Ergebnisse der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen 64

Tabelle 4-17 Messwerte und Bestimmtheitsmaße zur Ermittlung von Grenzwerten für Tanks 66

Tabelle 4-18 Beispiele RLU-Werte mit mikrobiologischen Positivbefunden in Emailletanks 68

Tabelle 4-19 Referenzmessungen zu Messwerten unterschiedlicher Anwendern 69

Tabelle 4-20 Ergebnisse der Messungen unterschiedlicher Anwender (ein Anwender, je ein Messpunkt) 70

Tabelle 4-21 Vergleich der Standardabweichungen, 6 MA, eine Messung pro Messpunkt 71

Tabelle 4-22 Ergebnisse der Messungen unterschiedlicher Anwender (nach Messpunkten, gleicher Anwender pro MP) 72

Tabelle 4-23 Vergleich der Standardabweichungen, 1 MA, 6 Messungen pro Messpunkt 72

Tabelle 4-24 Ergebnisse des Hygienemonitorings 75

Tabelle 4-25 Abgleich der RLU-Werte mit der Referenzmethode, Grenzwertbestimmung ... 76

Tabelle 5-1 Relation der Zellgröße zu ermittelten ATP-Gehalten und RLU-Werten 79

Tabelle 5-2 Korrelation zwischen Zellzahl und RLU-Werten, Pocket Swab® Plus-System, Charm novaLum (Turner, et al., 2010) 82

Tabelle 5-3 Vergleich des Charm novaLum II mit drei kommerziell verfügbaren Messgeräten 87

11 Gleichungsverzeichnis

Gl. 2-1 Gl. 2-2 Gl. 2-3	Gleichungen zur Beschreibung der Luciferin – Luciferase – Reaktion……15
Gl. 3-1	Gleichung zur Berechnung des Konfidenzintervalls……....33
Gl. 3-2	Gleichung zur Berechnung der Sensitivität……..33
Gl. 3-3	Gleichung zur Berechnung des Variationskoeffizienten……..34

Erklärung über die eigenständige Anfertigung dieser Arbeit

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Studienarbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Rostock, 15.10.2015 _____

Arne Gerhardt

Anlagenverzeichnis – Anlagen

Anlage 1 Berechnungen zur Varianzhomogenität auf Grundlage der Daten laut Abschnitt 4.1.1 - Voraussetzung 1 – Ausreißertest nach Grubbs II

Anlage 2 Berechnungen zur Varianzhomogenität auf Grundlage der Daten laut Abschnitt 4.1.1 - Voraussetzung 1 – Test auf Normalverteilung (Anderson – Darling) III

Anlage 3 Deskriptive Statistiken zur Berechnung des F-Wertes für Fishers F-Test (Abschnitt 4.2.1) IV

Anlage 4 Teststatistiken und Interpretation zu Fischers F-Test (Abschnitt 4.2.1) V

Anlage 5 Einfluss von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln auf ATP-Messergebnisse 4 verschiedener Hersteller laut Omidbakhsh et al. (2014) VI

Anlage 6 CD: Masterthesis im pdf-Format, Literaturnachweise zu Abschnitt 3.1.4 VII

Anlage 1 Berechnungen zur Varianzhomogenität auf Grundlage der Daten laut Abschnitt 4.1.1 - Voraussetzung 1 – Ausreißertest nach Grubbs

Deskriptive Statistiken:

Variable	***Minimum***	***Maximum***	***Mittelwert***	***Standardabweichung***
T1 = 3°C	29241,000	35617,000	32564,400	1939,465
T2 = 21,7°C	40071,000	46876,000	43523,100	2277,560
T3 = 36°C	19691,000	26510,000	22572,800	2044,438
T4 = 41°C	11208,000	15725,000	12912,900	1706,381

Teststatistik Grubbs:

Messreihe	***T1 = 3°C***	***T2 = 21,7°C***	***T3 = 36°C***	***T4 = 41°C***
G (beobachteter Wert)	1,714	1,516	1,926	1,648
G (kritischer Wert)	2,290	2,290	2,290	2,290
p-Wert (zweiseitig)	0,655	0,870	0,316	0,794
alpha	0,05	0,05	0,05	0,05
99% Konfidenzintervall um p-Wert	[0,654; 0,656]	[0,869; 0,871]	[0,315; 0,318]	[0,793; 0,795]

Testinterpretation:

Nullhypothese H0: Es gibt keine Ausreißer in den Daten.

Alternativhypothese Ha: Der minimale oder maximale Wert ist ein Ausreißer.

Ergebnis	
T1 = 3°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 65,50%.
T2 = 21,7°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 87,00%.
T3 = 36°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 31,65%.
T4 = 41°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 79,42%.

Anlage 2 Berechnungen zur Varianzhomogenität auf Grundlage der Daten laut Abschnitt 4.1.1 - Voraussetzung 1 – Test auf Normalverteilung (Anderson – Darling)

Deskriptive Statistiken:

Variable	***Minimum***	***Maximum***	***Mittelwert***	***Standardabweichung***
T1 = 3°C	29241,000	35617,000	32564,400	1939,465
T2 = 21,7°C	40071,000	46876,000	43523,100	2277,560
T3 = 36°C	19691,000	26510,000	22572,800	2044,438
T4 = 41°C	11208,000	15725,000	12912,900	1706,381

Anderson – Darling –Teststatistik:

Messreihe	***T1 = 3°C***	***T2 = 21,7°C***	***T3 = 36°C***	***T4 = 41°C***
A^2	0,203	0,204	0,159	0,532
p-Wert	0,828	0,825	0,926	0,129
alpha	0,05	0,05	0,05	0,05

Testinterpretation:

Nullhypothese H0: Die Variable, von der die Stichprobe stammt, folgt einer NVT.

Alternativhypothese Ha: Die Variable, von der die Stichprobe stammt, folgt keiner NVT.

Ergebnis	
T1 = 3°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 82,77%.
T2 = 21,7°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 82,49%.
T3 = 36°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 92,57%.
T4 = 41°C	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 12,87%.

Anlage 3 Deskriptive Statistiken zur Berechnung des F-Wertes für Fishers F-Test (Abschnitt 4.2.1)

Deskriptive Statistiken (n = 10):

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T1 = 3°C	29241,000	35617,000	32564,400	1939,465
T2 = 21,7°C	40071,000	46876,000	43523,100	2277,560

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T1 = 3°C	29241,000	35617,000	32564,400	1939,465
T3 = 36°C	19691,000	26510,000	22572,800	2044,438

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T1 = 3°C	29241,000	35617,000	32564,400	1939,465
T4 = 41°C	11208,000	15725,000	12912,900	1706,381

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T2 = 21,7°C	40071,000	46876,000	43523,100	2277,560
T3 = 36°C	19691,000	26510,000	22572,800	2044,438

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T2 = 21,7°C	40071,000	46876,000	43523,100	2277,560
T4 = 41°C	11208,000	15725,000	12912,900	1706,381

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
T3 = 36°C	19691,000	26510,000	22572,800	2044,438
T4 = 41°C	11208,000	15725,000	12912,900	1706,381

Anlage 4 Teststatistiken und Interpretation zu Fischers F-Test (Abschnitt **4.2.1)**

Teststatistik:

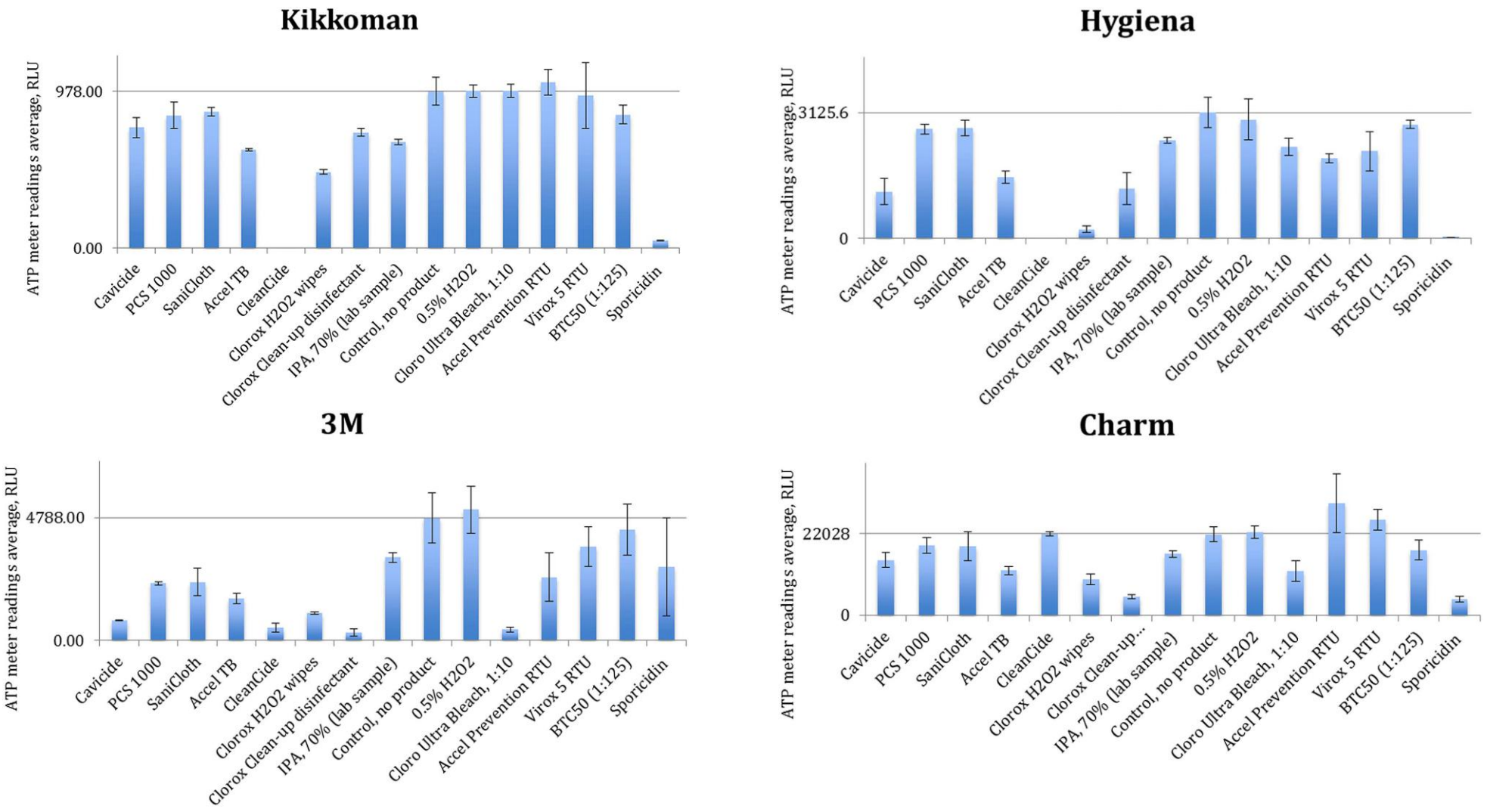
Messreihe	***T1 – T2***	***T1 – T3***	***T1 – T4***	***T2 – T3***	***T2 – T4***	***T3 – T4***
Verhältnis	0,725	0,900	1,292	1,241	1,782	1,435
F (beobachteter Wert)	0,725	0,900	1,292	1,241	1,782	1,435
F (kritischer Wert)	4,026	4,026	4,026	4,026	4,026	4,026
FG_1 (f = n – 1 = 9)	9	9	9	9	9	9
FG_2 (f = n – 1 = 9)	9	9	9	9	9	9
p-Wert (zweiseitig)	0,640	0,878	0,709	0,753	0,403	0,599
alpha	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
95 % Konf.-Intervall bzgl. des Varianzverhältnisses	[0,180; 2,919]	[0,224; 3,623]	[0,321; 5,201]	[0,308; 4,996]	[0,443; 7,172]	[0,357; 5,779]

Testinterpretation:

Messreihen	Nullhypothese H0: Das Verhältnis zwischen den Varianzen ist gleich 1. Alternativhypothese Ha: Das Verhältnis zwischen den Varianzen ist verschieden von 1.
T1 – T2	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 63,98%.
T1 – T3	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 87,78%.
T1 – T4	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 70,91%.
T2 – T3	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 75,29%.
T2 – T4	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 40,26%.
T3 – T4	Da der berechnete p-Wert größer als das Signifikanz-Niveau alpha=0,05 ist, kann die **Null-Hypothese H0 bestätigt** werden. Das Risiko die Null-Hypothese H0 zurückzuweisen, obwohl sie wahr ist, beträgt 59,89%.

Der F-Test belegt demnach die Varianzhomogenität der 4 temperaturabhängigen Datenreihen, was generell für die Reproduzierbarkeit des Gerätes bezüglich gleicher ATP-Gehalte spricht. Lediglich die Faktoren Fläche und Temperatur wirken messwertbestimmend (Höhe der Messwerte).

Anlage 5 Einfluss von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln auf ATP-Messergebnisse 4 verschiedener Hersteller laut Omidbakhsh et al. (2014)



Anlage 6 CD: Masterthesis im pdf-Format, Literaturnachweise zu Abschnitt 3.1.4