



**QS-Wissenschaftsfonds 2017**

„Optimierung von Hygienemaßnahmen zur Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in Fleisch erzeugenden Betrieben“

**Abschlussbericht Projektzeitraum: 01.02.2018 bis 31.01.2020**

**Angaben zum Antragsteller mit Kontaktdaten:**

Hochschule Fulda, Leipziger Straße 123, 36037 Fulda

**Vizepräsident für Forschung und Entwicklung:** Prof. Dr. Steven Lambeck, Tel. 0661-9640-1030,  
Email: steven.lambeck@et.hs-fulda.de

**Projektleitung:** Prof. Dr. Rohtraud Pichner, Professur für Mikrobiologie und Lebensmittelhygiene,  
Fachbereich Oecotrophologie, Hochschule Fulda, Tel.: 0661-9640 372,  
Email: rohtraud.pichner@oe.hs-fulda.de

**Unterauftrag:** „Optimierung von Hygienemaßnahmen zur Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in Fleisch erzeugenden Betrieben - Nachweis von „viable but non culturable“ (VBNC) Stadien von *L. monocytogenes*“

Laufzeit: 01.09.2018 – 30.11.2019

Max Rubner-Institut (MRI)

Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel

Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie

Dr. Christina Böhnlein, Dr. Diana Habermann, Dr. Jan Kabisch, Prof. Dr. Charles M.A.P. Franz

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Aufgabenstellung/Zielsetzung; Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde</b>	<b>3</b>
1.1	Hintergrund	3
1.2	Problemstellung und Stand der Forschung	3
1.2.1	Kombipräparate	3
1.2.2	Einsatz von innovativen Reinigungsmitteln – Probiotische Präparate	4
1.2.3	Stressantwort von <i>L. monocytogenes</i> auf die Behandlung mit Kombipräparaten bzw. probiotischen Reinigern	4
<b>2</b>	<b>Ziele des Vorhabens</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Vorgehensweise und Methodik</b>	<b>5</b>
3.1	Überprüfung von Kombipräparaten	5
3.2	Überprüfung der Eignung von probiotischen Reinigungsmitteln	8
3.3	Einfluss von Kombipräparaten/probiotischer Reinigungsmittel auf das VBNC-Stadien von <i>L. monocytogenes</i> in Biofilmen	15
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>18</b>
4.1	Überprüfung von Kombipräparaten	18
4.2	Überprüfung der Eignung von probiotischen Reinigungsmitteln	23
4.3	Einfluss von Kombipräparaten/probiotischer Reinigungsmittel auf das VBNC-Stadien von <i>L. monocytogenes</i> in Biofilmen	28
<b>5</b>	<b>Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen</b>	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Voraussichtlicher Nutzen (insbesondere wissenschaftliche und wirtschaftliche Verwertbarkeit der Forschungsergebnisse sowie Verwertungsstrategie)</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Bisher erfolgte/ geplante Veröffentlichungen</b>	<b>33</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>35</b>

# **1. Aufgabenstellung/Zielsetzung; Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

## **1.1 Hintergrund**

Das Vorkommen von *L. monocytogenes*-Ausbruchsstämmen in einem bayerischen Betrieb mit nachfolgender Rückrufaktion und Betriebsschließung (Messelhäußer et al., 2017) zeigt, dass diese Zoonoseerreger über einen größeren Zeitraum in einem Betrieb immer wieder zu einer Kontamination der Produkte auf unterschiedlichen Linien führen können. Auch andere Studien belegen ebenfalls eine mehrjährige Persistenz von *L. monocytogenes* in Lebensmittelbetrieben (Leon et al., 2017). Somit scheint dieser Zoonoseerreger herkömmliche Reinigungs- und Desinfektionsverfahren überstehen zu können. *Listeria* spp. können sich in Biofilmen organisieren und in solchen Biofilmmatrices 100- bis 1000-fach resistenter gegenüber Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen als planktonische Bakterienzellen sein (Gilbert et al., 2002). Problematisch hierbei ist, dass die Effektivität der meisten zugelassenen Reinigungs- und Desinfektionsmittel für die Lebensmittelindustrie an planktonischen Zellen getestet wurde (Coughlan et al., 2016).

## **1.2 Problemstellung und Stand der Forschung**

### **1.2.1 Kombipräparate**

Die sachgemäße Reinigung und Desinfektion der mit Lebensmitteln in Kontakt gekommenen Materialien und Oberflächen am Ende einer Schicht/eines Tages ist unumgänglich, um auch weiterhin sichere Lebensmittel zu produzieren. Dabei erstellen Lebensmittelunternehmen Reinigungs- und Desinfektionspläne meist mit Hilfe von Firmen, die diese Produkte herstellen oder vertreiben (Lücke et al., 2017). Die Hersteller von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln stehen dabei vor der Aufgabe, alle gestellten Anforderungen zu erfüllen: so z.B. Gewährleistung der Wirksamkeit ohne Rückstände zu hinterlassen, einer guten Verträglichkeit mit verschiedenen Materialien sowie des Personal- und Gewässerschutzes (vgl. DIN 10516:2009-05, Verordnung (EG) Nr. 852/2004).

Die bakterizide Wirkung von für die Lebensmittelproduktion zugelassenen Desinfektionsmitteln wird dabei durch den Industrieverband Hygiene und Oberflächenschutz (IHO) anhand von DIN EN 1276:2010-01 (Suspensionsversuch für Anwendungsintensiv cleaning-in-place-Reinigung) und DIN EN 13697:2015-06 (Oberflächenversuch für Anwendungsintensiv Oberflächendesinfektion) überprüft. Allerdings sind weder Listerien als Prüfkeime vorgesehen, noch wird auf den Aspekt der Biofilmbildung und der damit einhergehenden erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen Desinfektionsmittel eingegangen.

Einige in der Liste der IHO (2019) genannten Desinfektionsmittel werden durch die Hersteller als Kombipräparate deklariert und versprechen eine Erleichterung und Zeitersparnis durch das Ersetzen des Reinigens und Desinfizierens in zwei Schritten mit einem Vorgang in nur einem Schritt (Quinn und Henneberger, 2015). Auch in Fleisch verarbeitenden Betrieben werden diese Kombipräparate verwendet. Problematisch sind hierbei die unterschiedlichen Angaben der Hersteller zu Zeit- und Temperaturbedingungen jeweils für den Einsatz als Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittel. Für die Verwendung der Mittel als Kombipräparate, also für Reinigung und Desinfektion in einem Schritt geben die Hersteller keine Hinweise zu den dafür nötigen Zeit-/Temperaturkombinationen.

Auch stimmen die Aussagen der Hersteller und die Grundlage, auf denen diese Mittel untersucht wurden, nicht immer überein. Nach einer Recherche von Wartner (2017) zeigte sich, dass drei nach IHO (2017) gelistete Desinfektionsmittel auf Basis von Alkylamin, zwar durch den Hersteller als Kombipräparat ausgelobt wurden, die Testung nach DIN-Norm 10516:2009-05 jedoch nur bei einer geringen Eiweißbelastung stattfand, die eine bereits stark vorgereinigte Fläche simulierte.

Somit besteht zu der Verwendung von Kombipräparaten in fleischverarbeitenden Betrieben weiterer Forschungsbedarf vor allem für die praktische Anwendung. Hier stellte sich die Frage, ob bzw. bei welcher Zeit-/Konzentrationskombination die häufig in fleischverarbeitenden Betrieben eingesetzten Kombipräparate eine ausreichende Wirksamkeit gegenüber *L. monocytogenes*-Biofilmen besitzen.

### **1.2.2 Einsatz von innovativen Reinigungsmitteln – Probiotische Präparate**

Gerade vor dem Hintergrund einer möglichen Resistenzentwicklung und Stressantwort von Infektionserregern, die in Biofilmen organisiert sind (Gilbert et al., 2002), werden derzeit alternative Verfahren zur Eliminierung dieser Keime aus der Lebensmittelkette diskutiert. Coughlan et al. (2016) empfehlen als beste Strategie zur Bekämpfung von bakteriellen Biofilmen in Lebensmittelbetrieben die Vermeidung der Anheftung der Bakterien an Oberflächen und damit die Entstehung von reifen Biofilmen. In aktuellen Studien wurde hierfür der Einsatz von probiotischen Stämmen zur Bekämpfung von Biofilmen überprüft. Woo und Ahn (2014) diskutierten eine kompetitive Wirkung von probiotischen Stämmen gegenüber einer Biofilmbildung von *L. monocytogenes* und *Salmonella* Typhimurium. Auch Gomez et al. (2016) testeten einen alternativen Ansatz zur Bekämpfung von unerwünschten Biofilmen mittels probiotischer, biofilmbildender Milchsäurebakterienstämmen. Diese verhinderten durch die eigene Biofilmbildung eine Ansiedlung von *Listeria monocytogenes*.

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns befanden sich schon einige als probiotisch, ökologisch und lebensmitteltauglich ausgelobte Reinigungsmittel im Handel. Unklar war, wie effizient die kommerziellen Produkte eine Biofilmbildung von *Listeria monocytogenes* verhindern können.

### **1.2.3 Stressantwort von *L. monocytogenes* auf die Behandlung mit Kombipräparaten bzw. probiotischen Reinigern**

Bakterien sind in der Lebensmittelverarbeitung und -herstellung einer Reihe von Stressfaktoren, wie z. B. Nährstoffmangel, Extremtemperaturen, Salz, niedriger Wasseraktivität oder Bioziden ausgesetzt (Carpentier und Cerf, 2011; Melo et al., 2015; Thévenot et al., 2006). Diese Stressoren können das Vorkommen von auf klassischen Kultivierungsmedien nicht vermehrungsfähigen, aber dennoch lebens- und unter Umständen infektionsfähigen Zellen begünstigen (Besnard et al., 2002). Dieser Zellstatus wurde als **viable but non culturable** (VBNC) beschrieben (Oliver, 2005). Auch in lebensmittelverarbeitenden Betrieben wurden nach Reinigungs- und Desinfektions-Maßnahmen solche VBNC-Zellen nachgewiesen (Khamisse et al., 2012; Overney et al., 2017). Für *L. monocytogenes* wurde eine durch Nährstoff- oder Wassermangel induzierte Bildung von VBNC-Stadien dokumentiert (Besnard et al., 2000; Dreux et al., 2007). Mit klassischen kulturellen Methoden sind die Bakterienzellen dann nicht bzw. nur nach Revitalisierung wieder nachweisbar.

Dies würde zu falsch negativen Resultaten bei Routinekontrollen der Effizienz von Reinigungs-/ Desinfektionsverfahren mit mikrobiologischen Verfahren (z.B. Abklatsch mit Rodacplatten) oder Monitoringuntersuchungen auf *L. monocytogenes* führen.

Mithilfe kulturunabhängiger Verfahren, wie einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) nach Vorbehandlung mit Propidiummonoazid (PMA) (z.B. PMAqPCR nach Overney et al., 2017) bzw. Lebend/Tot-Färbungen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Besnard et al., 2000) könnte hier nach der Behandlung der Flächen mit den unter 1.2.1 und 1.2.2 beschriebenen Präparaten Aufschluss über die erliebene Zahl aller Listerienzellen und somit über die tatsächliche Effizienz der Reinigungs- und Desinfektionsverfahren erhalten werden.

## **2. Ziele des Vorhabens**

Gesamtziel des Vorhabens war die Optimierung von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zur Bekämpfung von *Listeria monocytogenes*-Biofilmen in fleischverarbeitenden Betrieben.

Teilziele zur Erreichung dieses Gesamtziels waren die Überprüfung

- der Wirkung der am häufigsten in Fleisch verarbeitenden Betrieben eingesetzten Kombipräparate gegen Biofilme von *Listeria monocytogenes*,
- der Eignung von probiotischen Reinigungsmitteln zur Bekämpfung der Persistenz von *L. monocytogenes*
- der Wirkung von Kombipräparaten und probiotischen Reinigungsmitteln auf den VBNC-Status von *L. monocytogenes*-Zellen.

## **3. Vorgehensweise und Methodik**

Zur Erreichung dieser Ziele wurden für das Projekt über einen Zeitraum von 24 Monaten folgende 3 Arbeitsbereiche bearbeitet. Die Methoden werden dabei zusammengefasst dargestellt.

### **3.1 Überprüfung von Kombipräparaten (HS Fulda, Ederer 2018)**

Auf Grundlage der Arbeit von Wartner (2017) wurde die Wirksamkeit eines zugelassenen häufig in Fleisch verarbeitenden Betrieben eingesetzten Mittels (Tolo 330, Fa. Büfa) auf Biofilme von *L. monocytogenes* überprüft. Tolo 330 enthält neben tertiärem Alkylamin als Desinfektionswirkstoff, ionische und nichtionische Tenside sowie Komplexbildner. Es wurde vom Hersteller als „kombiniertes Reinigungs- und Desinfektionsmittel" oder als „Reinigungsmittel bei gleichzeitiger Desinfektion" angeboten. Dies suggerierte den Anwendern, die üblicherweise aufeinander folgenden Schritte Reinigung und Desinfektion in einem Schritt zusammenzufassen und so Zeit und Material zu sparen. Der Hersteller machte jedoch keine Angaben, welche Konzentration eingesetzt werden müsste bzw. wie lange das Mittel bei einer kombinierten Anwendung einwirken müsste. Auch ist die Wirkung eines Desinfektionsmittels unter anderem vom Verschmutzungsgrad der betroffenen Fläche abhängig, so dass in den meisten Fällen eine Vorreinigung und Reinigung notwendig ist (Casella und Schmidt-Lorenz 1989; Coates 1996; Gram et al. 2007).

Die DIN EN 14885 fordert bei der Wirksamkeitsprüfung von Produkten zur Anwendung als kombiniertes Reinigungs- und Desinfektionsmittel u.a. die Simulierung einer Verschmutzung durch Lebensmittelrückstände anhand einer Anreicherung der Bakteriensuspension mit Rinderserumalbumin BSA (3,0 g/l). Im Zuge des Zulassungsverfahrens von Tolo 330 wurde allerdings mit einem Zehntel des

nötigen Gehalts an BSA gearbeitet, der einer stark vorgereinigten Oberfläche entsprechen würde. In diesem Vorhaben wurden daher Bedingungen simuliert, die einer kombinierten Anwendung von Reinigung und Desinfektion in einem fleischverarbeitenden Betrieb entsprechen würden.

Für die Versuche wurden vier verschiedene *L. monocytogenes*-Stämme aus unterschiedlichen Habitaten ausgewählt, u.a. auch der bayerische Ausbruchsstamm von 2016 (vgl. Tab. 1). Die Überprüfung der Biofilmbildung erfolgte in Mikrotiterplatten-Assays und auf Edelstahlplättchen wurden mit allen 4 Stämmen. Hierfür wurden in Vorversuchen die geeigneten Bedingungen etabliert. Da eine Persistenz Ausbruchsstamms LisM6 über mehrere Jahre in einem fleischverarbeitenden Betrieb dokumentiert war (Messelhäusser et al., 2017) wurde bei den nachfolgenden Dekontaminationsversuchen mit diesem Ausbruchsstamm sowie zum Vergleich mit dem international hinterlegten Referenzstamm LisM5 gearbeitet.

**Tabelle 1:** Verwendete *L. monocytogenes*-Teststämme

Stammnr. HS Fulda	Serovar	Depositor	Herkunft
LisM3	1/2a	MRI Li 250*	Umweltisolat (Staub) BfR 2006
LisM4	1/2c	MRI Li 261*	Schweinehackfleisch BfR 2007
LisM5	4b ATCC19115/ NCTC10527	MRI Li 23*	Klinisches Isolat (Liquor) E. Weise, Berlin
LisM6	1/2a PFGE-Cluster: 13a/54 NGS-Cluster: CT1248	LgL Bayern	Wacholderwammer Metzgerei Sieber

\*Bezeichnung der Stammsammlung, aus der die Isolate bezogen wurden

### 3.1.1 Wachstumsanalysen

Um für die späteren Versuche definierte Kulturen zur Biofilmerzeugung zu erhalten, wurden Wachstumsanalysen mit den Teststämmen in einem Bioreaktor (BioSan RTS-IC) unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden für jeden Stamm durch Aufzeichnung der optischen Dichte in regelmäßigen Zeitabständen drei Wachstumskurven erstellt, damit für die Hauptversuche definierte Kulturen zu Beginn der stationären Phase gearbeitet eingesetzt werden konnten.

In weiteren Vorversuchen wurde außerdem das Wachstumsverhalten bei 37°C, 30°C und 20°C mit Bakterienkolonien von 48 h auf festem Medium inkubierten Arbeitskulturlplatten bzw. bei 30°C und 20°C mit Bakterienkolonien einer 24 h-Kultur auf Agar ermittelt.

### 3.1.2 Untersuchungen zum Biofilmbildungsvermögen

#### 3.1.2.1 Mikrotiterplatten-Biofilmassay

In Anlehnung an den allgemeinen Mikrotiterplatten-Biofilmassay von O'Toole (2011) sowie den spezifischen *L. monocytogenes*-Mikrotiterplatten-Biofilmassay nach Manios und Skandamis (2014), Borucki et al. (2003) und Doijad et al. (2015) wurde das Biofilmbildungsvermögen der vier verschiedenen Versuchsstämme getestet.

Dies erfolgte in nährstoffreichem Medium (BHI-Boullion), nährstoffarmen Medium (1/10-BHI-Boullion), sowie bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (20°C und 30°C) und -zeiten (24 h, 48 h, 72 h, 7 Tage).

Für jeden Stamm wurden auf zwei Platten im 8-fach-Ansatz befüllt, als Negativkontrolle diente jeweils unbeimpftes Nährmedium. Für den Vergleich der Biofilmbildung bei nährstoffarmen und nährstoffreichem Nährmedium wurden die Platten 3 bzw. 7 Tage inkubiert. Für die Überprüfung von verschiedenen Inkubationszeiten für die Biofilmbildung erfolgten die Versuche ausschließlich in nährstoffreichem Nährmedium. In zwei Durchgängen wurden hierbei Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden und in drei Durchgängen Zeiten von 3 bzw. 7 Tagen berücksichtigt. Nach der Inkubation wurde zunächst das generelle Bakterienwachstum in der Mikrotiterplatte untersucht und diese auch hinsichtlich eventueller Kontamination überprüft. Hierzu wurde die optische Dichte in den Kavitäten der Microtiterplatte bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch mithilfe eines Microplate-Readers (Epoch™2) bestimmt.

Anschließend wurden die Überstände in den Mikrotiterplatten entfernt und der in den Kavitäten vorhandene Biofilm nach Hitzefixierung mit Kristallviolett angefärbt. Nach mehrmaligem Waschen zur Entfernung der überflüssigen Färbelösung, Trocknung der Platten mit anschließender Behandlung mit Essigsäure zur Lösung des Kristallvioletts aus den Zellen erfolgte eine erneute Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.

### **3.1.2.2 Biofilmbildung auf Edelstahlplättchen**

Um die Listerien-Biofilmbildung auf Edelstahl zu optimieren, wurden Versuche zum Biofilmbildungsvermögen modifiziert nach Ban und Kang (2016) und Somers und Lee Wong (2004) durchgeführt. Hierfür wurden entfettete Edelstahlplättchen (4,0 cm x 2,0 cm) und gereinigte Glasperlen sterilisiert. Wie in den vorhergehenden Versuchen wurde für alle 4 Listerien-Stämme vorab je eine Arbeitskulturen und anschließend je eine Übernachtskultur hergestellt sowie deren Keimzahl bestimmt, um standardisierte Anzuchtbedingungen für die Hauptversuche zu schaffen.

Anschließend wurden Bakteriensuspensionen der Stämme mit BHI-Boullion mit einer Keimzahl von ca. 7 log KbE/ml hergestellt. In diese Suspensionen wurde ein steriles Metallplättchen gegeben. Für jeden Stamm wurden so 4 Röhrchen mit Plättchen angelegt und je 2 Röhrchen bei 30°C bzw. 20°C statisch inkubiert. In mehreren Versuchsreihen wurden dabei verschiedene Inkubationszeiten (24 h, 48 h, 72 h und 7 Tage) überprüft. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Edelstahlplättchen entnommen, die planktonischen Zellen durch zweimaliges Waschen mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung entfernt. Für die Quantifizierung des auf den Plättchen gebildeten Biofilms wurde dieser von den Plättchen durch Vortexen in einem Zentrifugenröhrchen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung und 3 g Glasperlen auf höchster Stufe entfernt. Die Keimzahl der so entstandenen Bakteriensuspension wurde mit Hilfe des Tropfplattenverfahrens auf Palcam-Agar bestimmt. Die Versuche für die Inkubationszeiten 24 h und 48 h wurden jeweils in zwei unabhängigen Ansätzen und für die Inkubationszeiten 72 h und 7 Tagen jeweils in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

### 3.1.2.3 Dekontamination von Listerien-Biofilmen auf Edelstahl

Aufbauend auf den Versuchen zur Biofilmbildung auf Edelstahlplättchen erfolgten, modifiziert nach Ban und Kang (2016), Somers und Lee Wang (2004) und Nguyen und Yuk (2013), Versuche zur Dekontamination des *L. monocytogenes*-Biofilms. Mit diesen sollte die Wirkung einer kombinierten Reinigung und Desinfektion durch TOLO330 auf einen bereits gebildeten *L. monocytogenes*-Biofilm überprüft werden. Hierfür wurde eine Verschmutzung mit Lebensmittelrückständen durch eine sterile wässrige Lösung von Rinderserumalbumin mit einer Konzentration von 3 g/l (DIN EN 13697:2015-06) und eine grobe Vorreinigung mit warmem Trinkwasser vor dem eigentlichen Reinigungsvorgang simuliert. Als Teststämme dienten hier LisM5 und LisM6 (vgl. Tab. 1).

Für jeden Stamm wurde im Doppelansatz eine definierte Übernachtskultur erzeugt. Die beiden Übernachtskulturen je Stamm wurden in einer Schraubdeckelflasche zusammengeführt. Auf diese Weise wurde versucht, individuelle Unterschiede der Bakterien in den Reinkulturen zu minimieren. Die Stämme wurden in Röhrchen mit BHI-Bouillon auf eine Keimzahl von 7 log KbE/ml eingestellt und sterile Edelstahlplättchen zugegeben. Anschließend erfolgte zur Biofilmbildung eine statische Inkubation für 6 Tage bei 20°C. Danach wurden die Edelstahlplättchen zunächst zwei Mal mit je 10 ml steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung zur Entfernung planktonischer Zellen gewaschen und nach Überführen der Plättchen in Zentrifugenröhrchen mit 25 ml BSA-Lösung (3 g/l) für weitere 18 h bei 20°C inkubiert. Insgesamt ergab sich hierbei eine Inkubationszeit von etwa 7 Tagen für die Erzeugung der Listerien-Biofilme auf Edelstahlplättchen.

Danach erfolgte eine Reinigung der Plättchen durch zweimaliges Waschen mit 42 bis 48 °C warmen, sterilem Trinkwasser zur Simulation einer Vorreinigung in Lebensmittelbetrieben. Dann wurden die Edelstahlplättchen zur Desinfektion für 5 min bei Raumtemperatur in Zentrifugenröhrchen mit 25 ml frisch hergestelltem 1,5 %igen TOLO 330 gegeben. Für die Negativkontrolle wurden 25 ml steriles Trinkwasser und für die Positivkontrolle 70 %iger Ethanol statt TOLO 330 zugegeben. Nach Neutralisation der Desinfektion bei Raumtemperatur mit Dey-Engley-Bouillon wurden die Edelstahlplättchen erneut zwei Mal mit je 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zum Quantifizieren des Biofilms wurden die Edelstahlplättchen in Zentrifugenröhrchen mit 25 ml BHI-Bouillon und 3 g Glasperlen überführt, durch Schütteln die Bakterien abgelöst und die Keimzahlen auf Palcam-Agar im Tropfplattenverfahren bestimmt. Die Versuche zur Dekontamination von *L. monocytogenes*-Biofilm auf Edelstahlplättchen wurden in 3 voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen jeweils im Dreifachansatz durchgeführt.

### 3.2 Überprüfung der Eignung von probiotischen Reinigungsmitteln (HS Fulda, Unger 2018)

Analog zu 3.1 wurden in diesem Arbeitspaket in einem ersten Schritt die derzeit kommerziell erhältlichen und für den Lebensmittelbereich zugelassenen Präparate inklusive eines möglicherweise schon erfolgten Einsatzes in Fleisch verarbeitenden Betrieben recherchiert. Anschließend wurde die Wirkung der für fleischverarbeitende Betriebe am ehesten in Frage kommenden Präparate auf Biofilme von *Listeria monocytogenes* wie in 3.1 auf Edelstahl in Anlehnung an Overney et al. (2016) mit unterschiedlichen Zeit- / Temperaturkombinationen ermittelt.



### **3.2.1 Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers gegen Mono-Spezies Biofilme von *Listeria monocytogenes***

#### **3.2.1.2 Verwendetes Reinigungspräparat**

Aus der für diese Arbeit recherchierten Datenlage zeigte sich, dass noch keine „probiotischen“ Reiniger in Lebensmittelbetrieben eingesetzt wurden. Es ließ sich aber eine potentielle Wirksamkeit von probiotischen Reinigungsmitteln gegen pathogene Keime vermuten. Allerdings lagen keine Studien über die Wirksamkeit im Lebensmittelbereich oder gegen Biofilme von *L. monocytogenes* vor. Aufgrund der Literaturrecherche wurde für die vorliegende Arbeit ein Reiniger gewählt, der laut Herstellerangaben Milchsäurebakterien enthielt und als geeignet für den Einsatz in Küchen beschrieben wurde.

Für die Untersuchung wurde der eMC® Kraftreiniger der österreichischen Firma Multikraft Produktions- und Handels GmbH gewählt. Der Hersteller vertreibt verschiedene Produkte mit ähnlichen Mischungen Effektiver Mikroorganismen (EM). Das Sortiment reicht von Anwendungen für das Pflanzenwachstum, für Tierhygiene, für Teiche und Gewässer, über Reinigung und Anwendungen im Haushalt bis hin zu Kosmetika (Multikraft 2017b). Die Wirkungsweise wird deshalb recht universell formuliert und nicht ausschließlich auf die Reinigungsleistung bezogen. Die Vorteile werden auf der Internetseite des Herstellers folgendermaßen beschrieben: „Durch EM entsteht ein positiver Einfluss auf das mikrobielle Umfeld, es zeigt sich somit eine langfristige Wirkung der probiotischen Produkte durch Verdrängung pathogener Mikroorganismen. Die Produkte können vielfältig zum Einsatz kommen und durch EM kommt es zur schnelleren Umsetzung von organischem Material, womit Fäulnis verhindert wird“ (Multikraft 2016). EM gehen zurück auf den japanischen Professor Dr. Higa, der 1982 die Mischung der Effektiven Mikroorganismen zuerst im Zusammenhang mit seinen landwirtschaftlichen Forschungen entwickelt hatte (EMRO 2016a). Heute vergibt die japanische Firma EM Research Organization (EMRO) mit Sitz in Okinawa anderen Firmen Lizenzen für die Produktion ihrer Stammlösung der Effektiven Mikroorganismen (EM 1TM) (EMRO 2016b). Nach Spök und Klade (2009) gehörte die Firma Multikraft zumindest im Jahr 2009 zu den Lizenznehmern von EMRO.

Alle EM-Reiniger von Multikraft werden als „lebensmittelhygienisch vorteilhaft“ vermarktet. Es wird auf einen Test hingewiesen, in dem die probiotischen Reiniger gegenüber chemischen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln Vorteile zeigten (Multikraft 2017a). Weiterhin wird in der Produktbroschüre ebenfalls auf ein Gutachten hingewiesen, das bestätigt, dass „die untersuchten eMC® Reiniger [...] aufgrund der Untersuchungen aus lebensmittelhygienischer Sicht vorteilhaft anzuwenden [sind].“ (Multikraft 2017a).

Auf der Verpackung des eMC® Kraftreinigers und der Internetseite des Herstellers werden folgende Inhaltsstoffe angegeben: Effektive Mikroorganismen und Fett bzw. Cellulose spaltende Kulturen, < 5% nichtionisches Tensid (Alkohol), Zitronenessenz, Zitronensäure, Melasse, natürliche ätherische Öle, Limonene und Linalool (Multikraft o.J.). Als EM wird eine Mischkultur aus Milchsäurebakterien, Photosynthesebakterien und Hefen bezeichnet (Multikraft 2016).

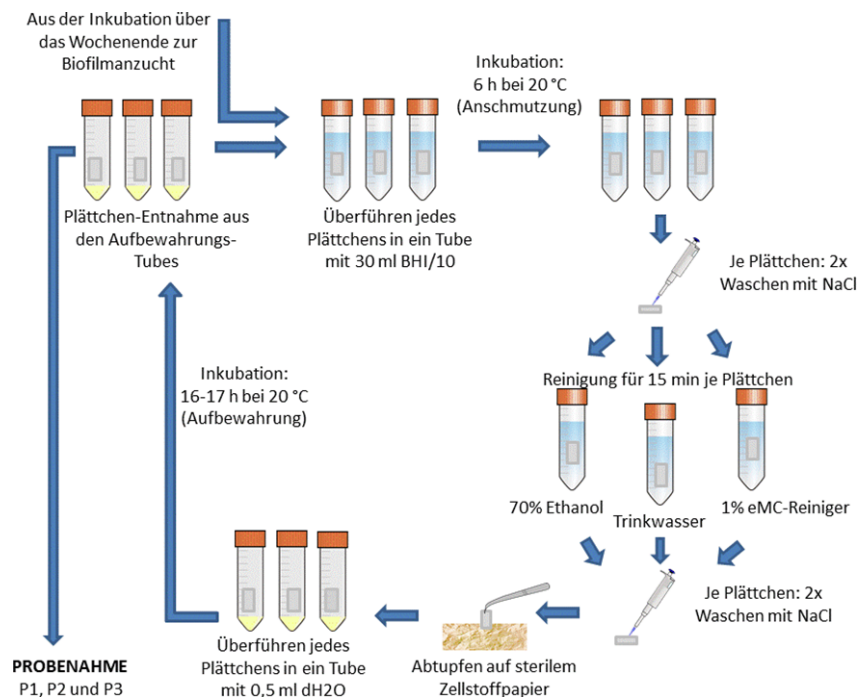
In der Produktbroschüre wird die Dosierung mit 10 ml pro 1 Liter Wasser zum Sprühen oder auch 10 ml pro 10 Liter Wasser im Putzeimer angegeben (Multikraft 2017a). Auf Nachfrage per E-Mail wurde die Dosierung auf 10 ml pro 1 Liter Wasser konkretisiert. Es wurden keine weiteren Anweisungen gegeben, ob eine Einwirkzeit oder eine andere Dosierung in Bereichen, in denen Fleisch verarbeitet wird, nötig sind.

Zur Anwendung wurde beschrieben, dass die Verdünnung aufgesprüht, kurz einwirken und dann abgewischt werden soll. Es wurde auf den eMC® Küchenreiniger hingewiesen, der zudem noch als fettlösend beworben wurde (vgl. beiliegendes Material auf der CD).

Im Sicherheitsdatenblatt (vgl. Anhang VII) wird der eMC® Kraftreiniger zur Verwendung als probiotischer Reiniger eingestuft, weiterhin werden die zu verwendenden Verdünnungen (1:100 oder 1:1000) als ungefährlich bewertet. Die Sicherheitshinweise beziehen sich vor allem auf die drei namentlich genannten Bestandteile Dipenten, Zitronengrasöl und Pinenöl. Es wird angegeben, dass es sich um eine gelbliche, ätherisch riechende wässrige Lösung mit nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen handelt. Weitere Informationen zu den verwendeten Mikroorganismen sind nicht enthalten. Der pH-Wert soll laut Herstellerangaben zwischen 2,3 und 2,9 liegen (Multikraft 2015).

### 3.2.1.2 Biofilmbildung von *L. monocytogenes* auf Edelstahlplättchen

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurde die Wirksamkeit dieses als probiotisches Reinigungsmittel ausgelobten Präparates gegen einen bereits gebildeten Biofilm von *L. monocytogenes* (Isolat aus Wacholderwammerl, LisM6 vgl. Tab. 1) untersucht. Die Biofilme wurden, wie unter 3.1. beschrieben, in BHI auf Edelstahlplättchen angezüchtet und anschließend ein 8-tägiger Reinigungs-Zyklus in Anlehnung an Pan et al. (2006) durchgeführt. Hierfür wurde täglich durch 6-stündige Inkubation in BHI/10 eine Anschmutzung simuliert. Danach erfolgte eine Behandlung mit dem probiotischen Reinigungsmittel oder 70 % Ethanol (Positivkontrolle) bzw. sterilem Trinkwasser (Negativkontrolle), sowie eine trockene 16-17-stündige Aufbewahrung. Diese Vorgehensweise wurde bis zum Tag 8 wiederholt (vgl. Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der täglichen Anschmutzungs-, Reinigungs- und Aufbewahrungsschritte zur Überprüfung der Wirksamkeit des probiotischen eMC® Kraftreinigers auf Biofilme von *L. monocytogenes*.

An den Tagen 2, 4 und 8 des Zyklus wurden Proben genommen. Die Probennahme fand im Dreifachansatz statt: Hierzu wurden am Morgen vor der Anschmutzung neun Plättchen entnommen, je drei der Positiv- und der Negativkontrolle und drei der täglich mit dem probiotischen Reiniger behandelten Plättchen. In Anlehnung an Wartner (2017) wurden zur Neutralisierung der Tensid-Komponente des Reinigers zuerst alle Plättchen für je 5 Minuten in ein separates Tube mit 30 ml Dey Engley getaucht. Die Plättchen wurden steril entnommen und mit sterilem NaCl zweimal auf jeder Seite gewaschen.

Die Bestimmung der Keimzahl auf den Edelstahlplättchen erfolgte anschließend nach Ban und Kang (2016). Die Plättchen wurden in Tubes mit je 30 ml NaCl-Lösung und ca. 3 g sterilen Glaskügelchen gegeben. Jedes Tube wurde 1 Minute auf Maximalgeschwindigkeit auf dem Reagenzglasschüttler gemischt, sodass die Biofilmzellen von den Plättchen gelöst wurden. 1 ml der Zellsuspension wurde entnommen und eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Die Keimzahlbestimmung wurde kulturell auf Palcam-Agar durchgeführt. Hierfür wurde das Tropfplattenverfahren in Doppelbestimmung angewendet. Die Platten wurden bei 37 °C für 48 Stunden aerob inkubiert und anschließend die Keimzahl pro Quadratzentimeter ermittelt.

Bei der Positivkontrolle mit Ethanol wurden jeweils 100 µl der Stammlösung auf eine Hälfte einer Palcam-Platte getropft und ebenfalls bei 37 °C für 48 Stunden aerob inkubiert. Gleichzeitig wurde 1 ml der Stammlösung in 9 ml BPW für 48 Stunden bei 37 °C angereichert und ein Aliquot dieser Anreicherung auf Palcam ausplattiert, sofern nach 48 Stunden auf den vor der Anreicherung angelegten Platten keine Keime nachweisbar waren.

### **3.2.1.3 Charakterisierung des probiotischen Reinigers**

Zur qualitativen und quantitativen mikrobiologischen Untersuchung des in der Arbeit verwendeten eMC® Kraftreiniger wurden verschiedene, zum Teil selektive Nährmedien mit unterschiedlichen Verdünnungen des Reinigers in steriler, physiologischer Kochsalzlösung beimpft. Die Inkubationsbedingungen wurden an die jeweils nachzuweisende Mikroorganismengruppe angepasst. Daneben wurde auch der pH-Wert des Reiniger-Konzentrats und der angewendeten Verdünnungen bestimmt (Unger, 2018).

Weiterhin wurden pasteurisierte Proben des Reiniger-Konzentrates zum Nachweis von aeroben, mesophilen Sporenbildner mikrobiologisch durch Ausplattieren von Verdünnungsstufen auf Standard I-STI) und Malz-Extrakt-Agerplatten (MEA) und MEA-Agarplatten untersucht (Unger, 2018).

Das Reinigerkonzentrat wurde zusätzlich lichtmikroskopisch bei 100-facher und 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrast untersucht. Zudem erfolgte eine Konzentrierung der Mikroorganismen des Reinigers mittels Zentrifugation. Hierfür wurden 1,5 ml des eMC® Reinigers in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und anschließend bei 10.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl steriler, physiologischer Kochsalz-Lösung resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde ein weiteres mikroskopisches Präparat angefertigt und untersucht.

Außerdem wurden auch mikroskopische Präparate von sieben, auf STD I-Agar morphologisch unterschiedlichen Kolonien angefertigt und bei denselben Vergrößerungen mit Phasenkontrast untersucht. Die Verdünnungen zur Beimpfung der STD I-Platten waren in NaCl-Pep hergestellt worden. Anschließend waren die Platten für 24 Stunden bei 30 °C und für weitere 50 Stunden bei Raumtemperatur aerob bebrütet worden. Vor der Untersuchung erfolgte eine Lagerung im Kühlschrank bei 7,5 °C für weitere 24 Stunden.

### 3.2.2 Wirksamkeit eines mikrobiologisch-basierenden Reinigungsproduktes (MBCP) auf *Listeria monocytogenes* Mono-Species und Dual-Species Biofilme (mit *Pseudomonas fragi*) unter fleischverarbeitenden Betrieben angelehnten Bedingungen

In dieser Arbeit wurden auf Basis der Erkenntnisse von Unger (2018) etwas andere Bedingungen überprüft. Untersucht wurden hierbei Biofilme von 2 *Listeria monocytogenes*-Isolaten aus Fleischerzeugnissen (LisM4 und LisM6, vgl. Tabelle 1). Der Stamm LisM4 wurde wegen seines durch Unger (2018) dokumentierten Biofilmbildungsvermögens und der Stamm LisM6 wegen des aktuellen Ausbruchsgeschehens in Bayern 2016 und dessen dabei nachgewiesener Persistenz in einem fleischverarbeitenden Betrieb (Messelhäuser et al. 2017) ausgewählt. Diese beiden Stämme wurden für den Mono-Species Biofilm Assay eingesetzt. Für die Dual-Spezies-Biofilme wurden das Ausbruchsisolat LisM6 zusammen *Pseudomonas fragi* – Stämmen getestet. Die Pseudomonadenstämme waren zuvor im August 2018 aus Fleischtropfsaft von Schweinelachs eines lokalen fleischverarbeitenden Betriebes isoliert. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden diese Stämme als *Pseudomonas fragi* and *Pseudomonas weihenstephanensis* identifiziert (Werum, 2019).

Im Juni 2018 wurden vier verschiedene Produzenten von kommerziell erhältlichen „probiotischen“ Reinigungspräparaten kontaktiert und mögliche Produkte mit einem in Tabelle 2 genannten Anforderungsprofil nachgefragt.

**Tabelle 2:** Anforderungsprofil für eine Anwendung von MBCP in fleischverarbeitenden Betrieben

<b>Sektor</b>	Fleischwirtschaft
<b>Bereich</b>	Produktion
<b>Anwendung</b>	Reinigung von schwer zugänglichen Bereichen (Nischen) z.B.: - Transportbänder - Maschinenteile - Abflussrinnen
<b>Art der Verschmutzung</b>	Fleischsaft
<b>Erwartete Keimzahl/cm<sup>2</sup></b>	Ca. 9 log
<b>Oberflächen</b>	Rostfreier Stahl
<b>Durchschnittliche Temp.</b>	15 °C
<b>Reinigungsintervalle</b>	Einmal/Tag, 5 x die Woche
<b>Art der Reinigung</b>	Nicht mechanische Reinigung
<b>Ziel der Behandlung</b>	- Verhinderung einer Biofilmbildung - Reduktion der Keime in Biofilmen
<b>Lebensmittelkontakt</b>	möglich

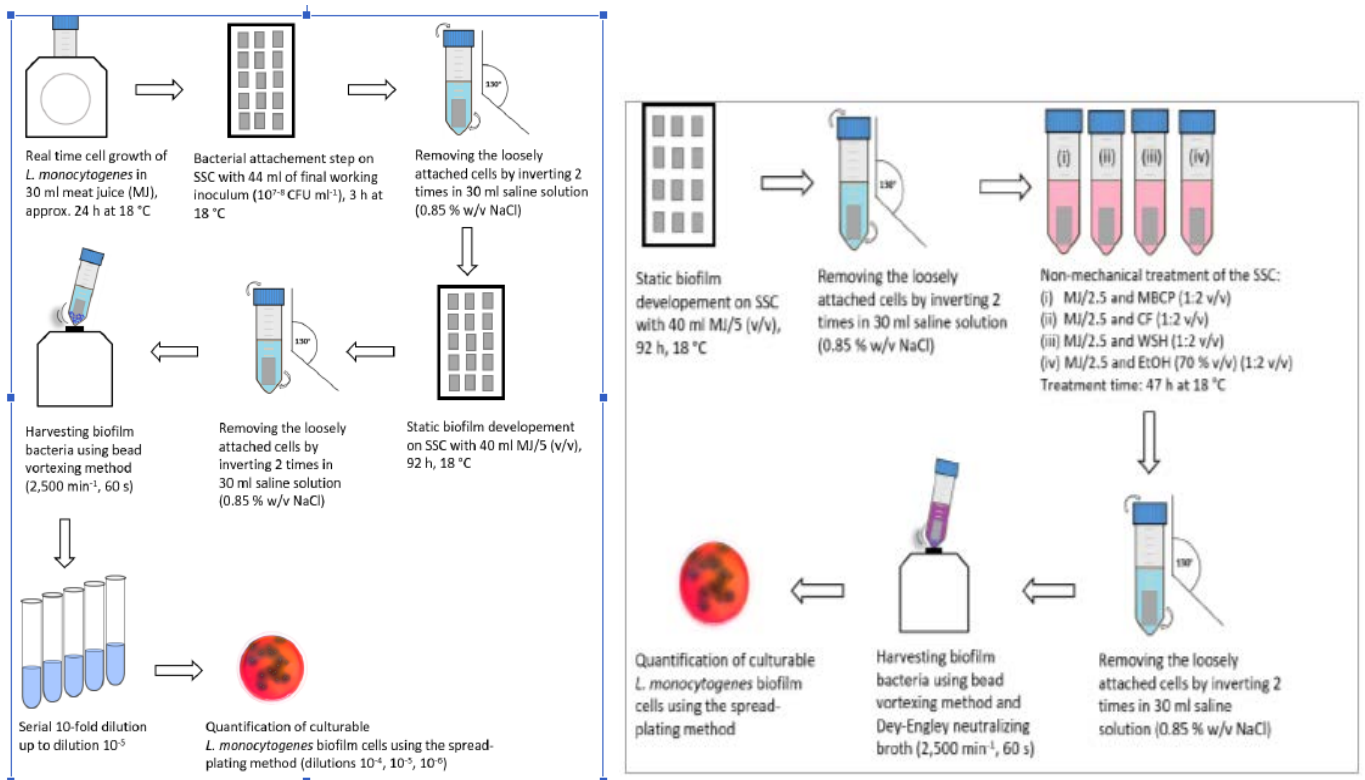
Das Produkt-Portfolio der Hersteller beinhaltet keine Anwendung für die Lebensmittelindustrie außer einem Erzeugnis, das für die Reinigung von Fettabscheidern in der Gastronomie eingesetzt wurde. Zwei Hersteller bekundeten Interesse an einer Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten in Lebensmittelbetrieben und sendeten jeweils eine Produktprobe zu. Ein Reiniger war als mikrobiologischer Mülltonnenreiniger (awiwa) und der andere als lipolytischer Reiniger für Fettabscheider spezifiziert worden (vgl. Tabelle 3)

**Tabelle 3: Produktdetails der zwei zugesendeten MPCP**

<b>Hersteller</b>	Awiwa e. K., Burbach	ABiTEP GmbH, Berlin
<b>Produktname</b>	awiwa® biopuro – mikrobiologischer Mülltonnenreiniger	Lipolyt® FAP
<b>Spezifikation</b>	Mülltonnenreiniger	Reiniger für Fettabscheider Grease separator Ablaufleitungen
<b>Chargennummer</b>	20180424	20180606 84 1.01
<b>Aufgeführte Inhaltsstoffe</b>	Wässrige Lösung von Mikroorganismen der Risikogruppe 1, sekundärer Alkohol* ( <i>nicht flüchtige organische Bestandteile, VOC</i> ), Duftstoffe, anionische und nicht ionische Tenside (<1%), Geruchsbinder. Enthält kleine Mengen von anorganischen Salzen	Spezielle Kombination von enzymatischen und biologischen Agenzien, Duftstoffen, anionischen und nicht ionischen Tensiden (<5%)
<b>Anzahl der Mikroorganismen in der Rezeptur</b>	Nicht deklariert Ca. 8 log KbE/ml (mündliche Mitteilung des Herstellers)	nicht deklariert
<b>Mikroorganismen</b>	<i>Bacillus spp.</i> (mündliche Mitteilung des Herstellers)	unbekannt
<b>Aussehen</b>	Milchig trüb	Milchig trüb

\* mündliche Mitteilung Hersteller: 1,2-Propanediol

In Abbildung 2 sind schematisch die Herstellung der Listerien-mono species-Biofilme auf den Edelstahlplättchen (links) sowie die nicht mechanische Behandlung mit dem mikrobiologischen Reiniger, durch Erhitzung inaktiviertem mikrobiologischen Reiniger (Negativkontrolle) bzw. 70%igem Ethanol (Positivkontrolle) dargestellt. Die Dekontaminationsversuche erfolgten in Anlehnung an die DIN EN 13697:2015-06.



**Abbildung 2: Links:** Schema der Erzeugung von *L. monocytogenes* mono-species Biofilmen auf rostfreien Stahlplättchen und Ermittlung der Anzahl vermehrungsfähiger Bakterienzellen nach 92 h

**Rechts:** Schema der nicht mechanischen Behandlung der mono-species Biofilme: Nach der Entwicklung der mono-species Biofilme auf rostfreiem Stahl und einem Spülschritt (im Dreifachansatz) wurden die Plättchen in die Reinigungslösungen eingetaucht und statisch für 67h bei 18°C inkubiert. Nach einem weiteren Spülschritt wurde der Biofilm durch Vortexen mit Glasperlen entfernt und die Anzahl vermehrungsfähiger *L. monocytogenes* Biofilm-Zellen ermittelt.

Der „dual-species“ Biofilmassay wurde in der gleichen Weise durchgeführt. Hierbei sollte eine mögliche Interaktion einer in Fleischbetrieben vorhandenen Hintergrundmikrobiota (*Pseudomonas fragi*) mit *Listeria monocytogenes* auf die Biofilmentwicklung sowie auf die Effizienz einer nachfolgenden nicht mechanischen Reinigung überprüft werden. Dies erfolgte in Anlehnung an die von Kostaki et al. (2012), Giaouris et al. (2013) and Leriche and Carpentier (2000) beschriebenen Verfahren. Zwei *P. fragi* Stämme (PseFr2 and PseFr3) ein *L. monocytogenes* Isolat (LisM6) wurden in einem Mischbiofilm auf rostfreien Edelstahlplättchen angezogen, mit der Reinigungslösung für 15 Minuten benetzt und dann anschließend für 46 bis 48 h in einer feuchten Kammer bei 18 °C aufbewahrt.

Alle Versuche zur Biofilmbildung wurden mit mechanisch entkeimten Fleischtropfsaft von Schweinelachs aus einem lokalen fleischverarbeitenden Betrieb durchgeführt.

### 3.2.2.3 Identifizierung der enthaltenen Mikroorganismen (Schmitz, 2019)

Im Nachgang zu den Arbeiten von Unger (2019) und Werum (2019) wurde überprüft, unter welchen Bedingungen die in dem von Werum (2019) untersuchten „probiotischen“ Reiniger („awiwa“ Bio- und Mülltonnenreiniger) enthaltenen *Bacillus* spp. auskeimen und einen Biofilm bilden können. Hierfür wurden biochemische Verfahren zur Identifizierung der Bakterien durchgeführt.

Dabei wurden der Abbau von Arabinose, Glucose, Mannit und Xylose, sowie eine Nitratreduktion getestet und ein Fermentationstest durchgeführt. Neben den biochemischen Verfahren erfolgte auch eine mikroskopische und makroskopische Untersuchung der Bakterien incl. deren Sporen.

Die Überprüfung der Biofilmbildung wurde in Anlehnung an das Verfahren von Papaioannou et al. (2018) und Kostaki et al. (2012) durchgeführt. Nach der Herstellung von Gebrauchskulturen wurden die Bakterien 48 h bei 20 °C auf STD I Nährmedium angezüchtet und daraufhin als Übernackkultur im RTS-Bioreaktor bei 20 °C bebrütet. Es folgten Waschschrirte der hergestellten Zellsuspension mit einer Zentrifugation von 4.000 rpm und einer Resuspension erst mit physiologischer Kochsalzlösung und danach STD I Nährbouillon. 30 ml der Suspension wurden in die gereinigten Wannen mit Edelstahlplättchen 1h adaptiert. Danach wurden die Plättchen in neue Wannen gegeben, mit je 0,5 ml STD I Nährbouillon bedeckt und bei 24 h und 72 h bei 20 °C bebrütet. Dies diente der Feststellung der Inkubationsdauer bei der eine optimale Biofilmbildung stattfindet. Nach Vortexen der Platten in physiologischer Kochsalzlösung erfolgte die Quantifizierung der vermehrungsfähigen Zellen im Biofilm auf STD I-Agar für 48 h bei 20 °C.

### **3.3 Einfluss von Kombipräparaten/probiotischer Reinigungsmittel auf das Vorliegen von VBNC-Stadien von *L. monocytogenes* in Biofilmen**

Dieses Arbeitspaket wurde als Unterauftrag an das Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts am Standort Kiel vergeben. Für diese Fragestellung wurde ein Nachweissystem für VBNC Zellen von *L. monocytogenes* mittels PMAqPCR in Anlehnung an Overney et al. (2017) etabliert. Anschließend wurden *L. monocytogenes*-Biofilme vor und nach Behandlung mit Kombipräparaten bzw. probiotischen Reinigern auf das Vorliegen mit dieser Methode untersucht. Zusätzlich wurde durch die Anwendung von Lebend/Tot-Färbemethoden der Einfluss von Kombipräparaten auf die Vitalität der Zellen in *L. monocytogenes*-Biofilmen unter praxisrelevanten Bedingungen evaluiert.

#### **3.3.1 Etablierung eines Nachweissystems für VBNC Zellen von *L. monocytogenes* mittels PMA-qPCR**

Zunächst wurden Wachstumsversuche mit zwei *L. monocytogenes* Isolaten (Stamm Li-218: aus Wurst Serovar 4b/4e; Li-234: aus Wacholderwammerl, Serovar 1/2a) durchgeführt, da für die Validierung der PMA-qPCR Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase benötigt wurden. Mit den Wachstumsversuchen wurde der Zeitpunkt des Übergangs der Teststämme in die exponentielle Phase bestimmt. Dazu wurden Wachstumskurven der Teststämme BHI-Bouillon bei 30°C in einen Growth-Analyzer aufgezeichnet. Im Anschluss an die Wachstumsanalysen wurde das quantitative PCR-System nach Overney et al. (2017) getestet und angepasst. Dazu wurde die Sonden-basierte qPCR mit dem Ziel-Gen hlyA validiert.

Im weiteren Verlauf wurde die PMA-PCR etabliert. Hierbei wurden Zellen von *L. monocytogenes* vor der eigentlichen DNA-Extraktion mit dem DNA interkalierenden Farbstoff PMA (Propidiummonoazid) inkubiert, um so eine Differenzierung lebender und toter Zellen zu ermöglichen. Das Prinzip dabei ist, dass vorhandene freie DNA, die von toten Bakterien stammt, durch die lichtinduzierte kovalente Interkalierung von PMA in der anschließenden real-time PCR nicht amplifiziert werden kann.

Diese PMA-Vorbehandlung führt dann in der real-time PCR zur Signalreduktion, wobei ausschließlich die DNA von lebenden Bakterien amplifiziert werden kann. Durch den Vergleich der Cq-Werte mit und ohne PMA-Behandlung können nach der qPCR Rückschlüsse auf die Anteile der vorhandenen toten und lebenden Zellen geschlossen werden.

In den Versuchen wurden Zellen von *L. monocytogenes* mit dem Farbstoff PMAxx™ entsprechend der Angaben des Herstellers (Biotium) inkubiert und so eine Differenzierung lebender und toter Zellen ermöglicht. Als Lebendzell-Kontrolle wurde eine frische Übernachtskultur (OD 600 bei 1) des Zielstamms *L. monocytogenes* L2-234 verwendet. Als Totzell-Kontrolle wurde ein Teil der Lebendzell-Kontrolle bei 95°C für 5 min inkubiert, um alle Zellen abzutöten. Von beiden Kontrollen wurde parallel die Lebendkeimzahl auf Plate Count-Agar überprüft. Anschließend wurden diese beiden Proben mit dem Farbstoff PMAxx™ inkubiert und danach die DNA-Extraktion mit dem „Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit“ von Zymo Research durchgeführt. Mit den aufgereinigten Proben wurde die qPCR im Doppelansatz durchgeführt.

In einem weiteren Versuchsansatz konnten erfolgreich *L. monocytogenes* Zellen im VBNC-Stadium mit Hilfe des PMA-qPCR-Systems nachgewiesen werden. Dazu wurden künstlich hergestellte VBNC-Zellen von *L. monocytogenes* L2-234 nach Besnard et al. (2002) hergestellt. Die Verifizierung der VBNC Stadien erfolgte mittels Lebendkeimzahlbestimmung sowie Lebend/Tot Bestimmung mit Hilfe des Durchflusszytometers (BD FACSCalibur). Es hat sich dabei gezeigt, dass die bisher verwendete DNA Extraktionsmethode („Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit“ von Zymo Research) für niedrige Zellzahlen nicht geeignet ist. Deshalb erfolgte die Etablierung einer weiteren DNA-Extraktionsmethode (Biotecon Diagnostics; foodproof® Star-Prep Two Kit) zum Nachweis geringerer Zellzahlen (<6 log Zellen/ml).

Für die Biofilm- und Reinigungsversuche zur Detektion von VBNC-Stadien von *L. monocytogenes* diente Fleischtropfsaft als Matrix, welcher PCR inhibitorische Substanzen sowie im Fall von nativem Fleischsaft auch weitere Mikroorganismen enthält. Um den Einfluss der Matrix „Fleischtropfsaft“ auf die Effizienz der PCR zu testen, wurden je 10 ml nativer und steriler Fleischtropfsaft mit 100 µl einer Übernachtskultur von *L. monocytogenes* L2-234 beimpft und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine DNA Präparation der Proben durchgeführt und die PMA-qPCR wie oben beschrieben durchgeführt.

Weiterhin wurde getestet, welchen Einfluss die PMA Inkubationsprozedur auf die Messwerte der qPCR hatte. Dazu wurden Standardkurven der Verdünnungsreihen von *L. monocytogenes* L2-234 mit und ohne PMA Inkubation verglichen. Die DNA-Extraktionen erfolgten dabei mit dem foodproof® Star-Prep Two Kit von Biotecon Diagnostics. Dabei zeigten sich sehr ähnliche PCR-Effizienzen (101,4% und 101,5%) und Standardgeraden, so dass ein negativer Einfluss ausgeschlossen werden konnte. Die Proben der Standardgeraden ohne PMA Inkubation wurden im Folgenden für die Biofilm-Messungen verwendet.



### **3.3.2 Nachweis von VBNC-Stadien von *L. monocytogenes* in Biofilmen**

#### **3.3.2.1 Versuchsaufbau der Biofilmexperimente**

Die Untersuchungen der HS Fulda zur Überprüfung der Eignung von zwei unterschiedlichen probiotischen Reinigungsmitteln haben ergeben, dass deren Einsatz in einem fleischverarbeitenden Betrieb nicht sinnvoll zu sein scheint. Aus diesem Grund wurden Dekontaminationsversuche mit dem sowohl als Reinigungs- als auch als Desinfektionsmittel angebotenen „Kombipräparat“ TOLO 330 durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss von TOLO 330 auf Multi-Spezies-Biofilme von *L. monocytogenes* unter praxisrelevanten Bedingungen bei 12 °C getestet. In separaten Versuchsansätzen wurden hierfür zwei *L. monocytogenes* Stämme verwendet, die aus Lebensmitteln im Rahmen eines Ausbruchsgeschehens (L2-234 Serotyp 1/2a, Herkunft: Wacholderwammerl, LGL Bayern) bzw. in einem fleischverarbeitenden Betrieb (L2-255 Serotyp 1/2a, Herkunft: Tupferprobe) isoliert wurden. Zur Bildung eines Multispezies-Biofilms auf einer Edelstahloberfläche wurden diese in einem Ansatz von 7 log KbE/ml Inokula von kälte-adaptierten *L. monocytogenes* mit nativem Fleischtropfsaft bei 12 °C für 92 Stunden kultiviert. Dadurch sollte ein bereits vorhandener, persistierender Biofilm simuliert werden, wie er sich in einem Betrieb an einer für die mechanische Reinigung schwer zugänglichen Stelle etablieren könnte.

Der eingesetzte Pool aus nativem Fleischtropfsaft vom Schwein wurde mikrobiologisch charakterisiert. In Anschluss an die Bildung des Multispezies-Biofilms erfolgte eine Testanschmutzung mit nativem Fleischtropfsaft, was eine Verschmutzung in der täglichen Produktion bei der Fleischverarbeitung simulieren sollte. Danach erfolgte die Reinigung und Desinfektion der Edelstahlplättchen mit TOLO 330. Die Auswahl der Konzentration und Einwirkdauer erfolgten entsprechend den Herstellerangaben. Nach einem weiteren Zyklus von Testanschmutzung und anschließender Reinigung und Desinfektion der Edelstahlplättchen mit TOLO 330 wurden die Experimente nach 8 Tagen beendet. Als Kontrollansätze wurden 70% Ethanol (Positivkontrolle, +K) und standardisiertes Wasser (Negativkontrolle, -K) anstelle von TOLO 330 mitgeführt. Der am Edelstahlcoupon gebildete Multispezies-Biofilm wurde am Tag 5, 6 und 8 untersucht. Die Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen im Doppelansatz durchgeführt.

#### **3.3.2.2 Kultureller Nachweis von *L. monocytogenes***

Für die Analysen wurde der Biofilm durch die Behandlung mit Glasperlen unter Vortexen abgelöst. Diese Methode erwies sich beim Vergleich zur Behandlung mit Ultraschall und zum Abkratzen des Biofilms mittels Skalpell als die effizienteste zur Biofilmquantifizierung. Nach 96 Stunden erreichten beide *L. monocytogenes* Stämme im gebildeten Multispezies-Biofilm am Tag 5 Keimzahlen von ca. 4,5 log KbE/cm<sup>2</sup>. Die Entwicklung der *L. monocytogenes* Population wurde im weiteren Verlauf in der Negativkontrolle, der mit standardisiertem Wasser behandelten Probe, verfolgt.

Die Biofilmeliminierungstests wurden mit dem Kombipräparat (Reinigungs- und Desinfektionsmittel) TOLO 330 bei der vom Hersteller angegebenen Konzentration von 1% und einer Einwirkzeit von 10 Minuten durchgeführt.

### 3.3.2.3 Kulturunabhängiger Nachweis von *L. monocytogenes*

Neben den kulturabhängigen Verfahren wurden kulturunabhängige Methoden zum Nachweis von lebenden Bakterien eingesetzt. Zur Lebend/Tot-Bestimmung wurde die Gesamtheit der vorhandenen Bakterien im Multispezies-Biofilm mit den Fluoreszenzfarbstoffen Syto 13 und Propidiumjodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Prinzip dieser Markierungsmethode beruht auf der Membranintegrität von Bakterien. Der lipophile Nukleinsäure-Fluoreszenzfarbstoff Syto 13 ist in der Lage die Zellmembran von Bakterien zu passieren und somit auch an der DNA von lebenden Bakterien zu binden. Hingegen wird vorhandene DNA von toten Bakterien aufgrund der defekten Zellmembran für den DNA-bindenden, fluoreszierenden Farbstoff PI zugänglich, so dass nach der Bindung die Fluoreszenz von Syto 13 unterdrückt wird und diese Zellen als rote Fluoreszenzsignale detektiert werden. Die durch Syto 13-markierten, lebenden Zellen erscheinen dann grün.

Als weitere kulturunabhängige Methode zum Nachweis von lebenden Bakterien kam die zuvor wie oben beschrieben etablierte PMA-qPCR zur Detektion von *L. monocytogenes* zum Einsatz.

### 3.3.2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik am MRI Karlsruhe wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt und die Beschaffenheit der Multispezies-Biofilme auf Edelstahloberflächen visualisiert.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Überprüfung von Kombipräparaten (HS Fulda, Ederer, 2018)

In einer Abschlussarbeit für den Studiengang Lebensmittelchemie (FAU Erlangen) wurden an der Hochschule Fulda in den ersten beiden Quartalen der Projektlaufzeit Arbeiten zum Biofilmbildungsvermögen des *Listeria monocytogenes*-Ausbruchsstamm von 2016 (aus Produkt „Wacholderwammerl“) sowie zur Wirkung eines häufig in Fleisch erzeugenden Betrieben eingesetzten Kombipräparates (Tolo 330) auf Biofilme von *Listeria monocytogenes* durchgeführt.

#### Wachstumsanalysen

Alle in dieser Phase getesteten *L. monocytogenes*-Stämme erreichten nach 15 bis 17,2 h bei 30 °C im Bioreaktor (RTS-Biosan) die stationäre Phase, wenn die Suspensionen aus 24 h Arbeitskulturen von Palcam-Agar erzeugt wurden. Somit wurden diese Bedingungen für die Herstellung der Übernachtskulturen für die darauffolgenden Versuche zur Biofilmbildung und -dekontamination ausgewählt.

## Untersuchungen zum Biofilmbildungsvermögen

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung von *Listeria monocytogenes* ist stammspezifisch und kann nicht anhand des Serotyps eingeschätzt werden (Borucki et al. 2003; Doijad et al. 2015). Außerdem werden in der Literatur viele verschiedene Einflussfaktoren auf die Biofilmbildung genannt. Aus diesem Grund wurden Versuche zum Biofilmbildungsvermögen durchgeführt, um die Bedingungen der Biofilmbildung für die vier ausgewählten Teststämme zu optimieren und dann mit möglichst starken Biofilmen die Desinfektionswirkung von TOLO 330 untersuchen zu können.

Generell stehen für Untersuchungen mit *Listeria monocytogenes* viele verschiedene Nährmedien zur Verfügung. Um die Bedingungen in fleischverarbeitenden Betrieben möglichst praxisnah zu simulieren, wurde für die Versuche zum Biofilmbildungsvermögen Brain-Heart-Infusion-Bouillon verwendet (Lee et al. 2017; Reis-Teixeira et al. 2017; Zaika et al. 1997).

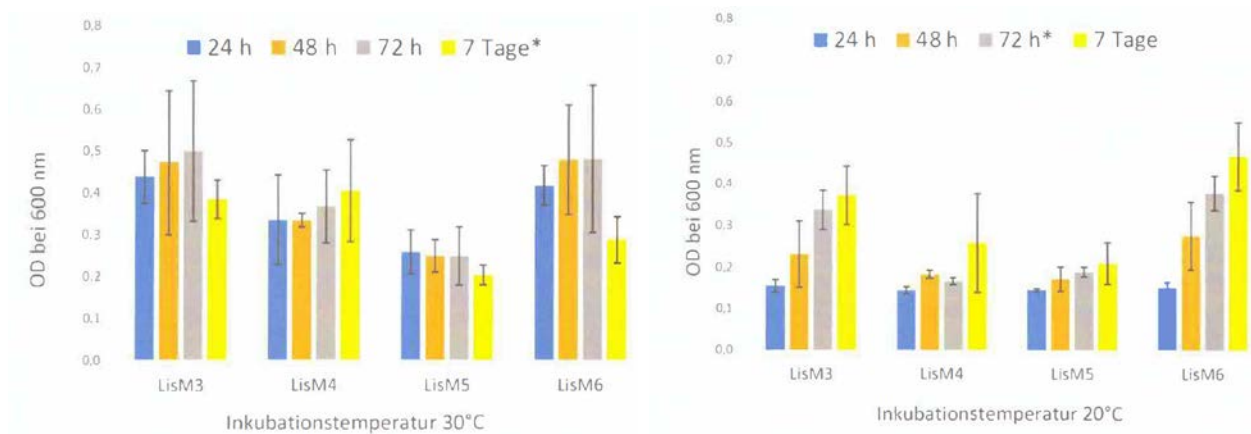
Ein entscheidender Faktor auf die Biofilmbildung ist das Nährstoffangebot. In lebensmittelverarbeitenden Betrieben wird in der Regel in regelmäßigen Abständen gereinigt, sodass wohl grundsätzlich wenig Nährstoffe für die Bakterien zur Verfügung stehen. Ausnahmen können z.B. schwer zugängliche Stellen oder ungünstig angelegte Rinnen oder Behälter sein, in denen sich das Ablaufwasser sammeln kann. Nach Stepanovic et al. (2003) scheinen *L. monocytogenes* in BHI am effektivsten Biofilm zu bilden. Cherifi et al. (2017) stellten für *L. monocytogenes* in dynamischen Versuchssystemen in 1/10-BHI ein höheres Biofilmwachstum fest. In statischen Systemen war die Biofilmbildung in normal konzentrierter BHI-Bouillon stärker.

Bei den eigenen Versuchen ergaben sich bei den Stämmen LisM3 und LisM6 besonders bei 20°C in BHI deutlich höhere Werte, als in 1/10-BHI bei gleicher Temperatur. Die Ergebnisse der Microtiterplattenassays in BHI bzw. 1/10-BHI erbrachten in dem nährstoffreicheren Medium eine stärkere Biofilmbildung von *L. monocytogenes*. Allerdings wurden diese Versuche aufgrund von Materiallieferschwierigkeiten nur in einem Durchgang durchgeführt. Für genauere Aussagen zu diesem Effekt müssten diese Versuche nochmals wiederholt werden. Da die Versuche in 1/10-BHI nur eine sehr geringe Biofilmbildung der Teststämme zur Folge hatte, wurden die weiterführenden Versuche mit nährstoffreicher, unverdünnter BHI-Bouillon durchgeführt.

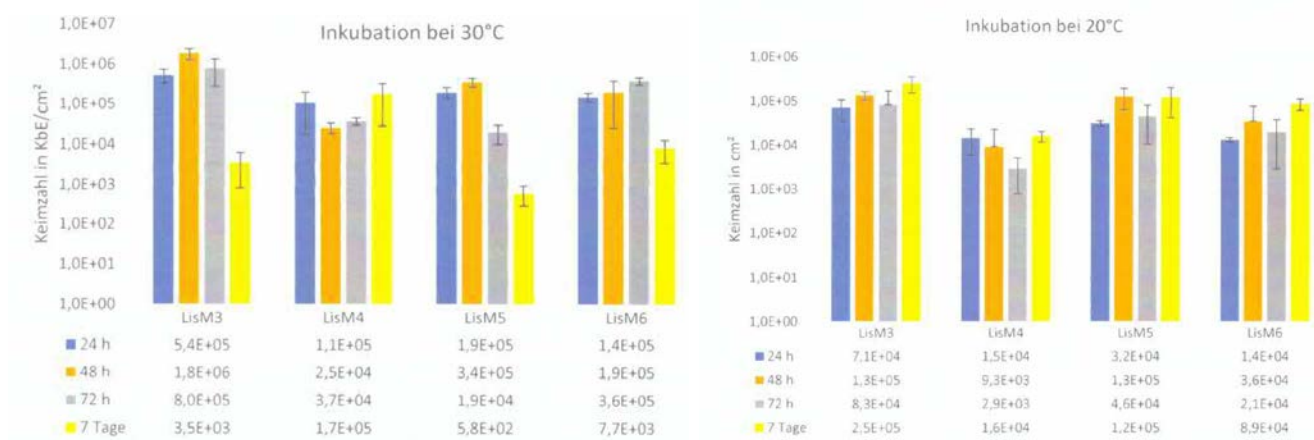
Laut Stepanovic et al. (2003) hat auch die anfangs eingesetzte Keimkonzentration einen starken Einfluss auf die Biofilmbildung. Hier ergab die Literaturrecherche unterschiedliche Empfehlungen für die Anfangskonzentrationen zwischen 4 bis 6 log KbE/ml (Manios und Skandamis, 2014; Somers und Lee Wong, 2004) und 8 bis 9 log KbE/ml (Norwood und Gilmour, 2000; Lee et al., 2017). Aus diesem Grund wurde für die Arbeit von Ederer (2018) eine mittlere Anfangskonzentration von 7 log KbE/ml gewählt.

Ein weiterer sehr wichtiger Parameter der Biofilmbildung ist die Temperatur. Mai und Conner (2007) untersuchten die erste Phase der Biofilmbildung auf Edelstahloberflächen bei Temperaturen von 4°C bis 42°C. Mit zunehmender Temperatur (außer bei 42°C) wurde dabei auch eine verstärkte Anlagerung an die Oberfläche beobachtet. Norwood und Gilmour (2000) dokumentierten eine optimale Anlagerungstemperatur bei 18°C. Daher wurden bei den eigenen Versuchen zwei Temperaturen (30°C und 20°C) bei den Mikrotiterplattenassays und bei den Biofilmbildungsversuchen auf Edelstahlplättchen berücksichtigt.

Hierbei zeigte sich, dass die Biofilmbildung bei den hier gewählten Teststämmen bei 30°C ausgeprägter war: Es wurden höhere Zelldichten (OD-Werte) bei 30°C in den Microtiterplattenassays (vgl. Abb. 3) als auch höhere Keimzahlen bei der Untersuchung der Biofilmbildung auf Metalloberflächen erfasst (vgl. Abb. 4).



**Abbildung 3:** Biofilmbildung der *L. monocytogenes*-Stämme LisM3, LisM4, LisM5 und LisM6 in **Microtiterplatten** nach 24h, 48 h 72h und 7 Tagen bei 30°C (links) bzw. bei 20 °C (rechts) in BHI-Boullion anhand der bei 600 nm gemessenen OD-Werte nach Kristallviolettffärbung, Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei bzw. drei Versuchsdurchgängen mit Standardabweichung.



**Abbildung 4:** Biofilmbildung der *L. monocytogenes*-Stämme LisM3, LisM4, LisMS und LisM6 in BHI-Boullion auf **Edelstahlplättchen** nach 24 h, 48 h 72 h und 7 Tagen bei 30°C (links) bzw. 20 °C (rechts) in BHI-Boullion. Die mittels Tropfplattenverfahren auf Palcam-Agar ermittelten Keimzahlen in KbE/ml wurden auf KbE/cm<sup>2</sup> Edelstahlplättchenoberfläche umgerechnet. Dargestellt wurden die Mittelwerte von zwei (für 24 h und 48 h) bzw. drei (für 72 h und 7 Tage) Versuchsdurchgängen mit Standardabweichung.

In fleischverarbeitenden Betrieben könnten solche Temperaturen durch Abwärme in der Nähe von Erhitzungsprozessen oder Problemen mit dem Kühlsystem bei heißen Außentemperaturen vorkommen. Dies wären dann besonders gefährdete Nischen für eine Biofilmbildung von *L. monocytogenes*.

Außerhalb der Kühlbereiche bei der Lebensmittelproduktion werden überwiegend Temperaturen zwischen 17°C und 26°C vorliegen, entsprechende Temperaturen werden in der Technischen Regel für Arbeitsstätten - Raumtemperatur ASR 3.5 (BAuA, 2010) für ein gesundes Arbeitsumfeld für Mitarbeiter empfohlen. Daher wurde für die anschließenden Dekontaminationsversuche mit TOLO 330 die Biofilme bei 20 °C kultiviert.

Niedrigere Inkubationstemperaturen hätten eine wesentlich geringere Keimzahl in den Biofilmen zur Folge gehabt bzw. wesentlich längere Inkubationszeiten erforderlich gemacht (Somers und Lee Wong 2004). Diese wurde bei den Biofilmbildungsversuchen ebenfalls in verschiedenen Varianten untersucht.

Bei 30°C blieben die Werte der Microtiterplattenassays und der Quantifizierungsversuche auf Edelstahl bei den Stämmen LisM3, LisM5 und LisM6 innerhalb der ersten 72 h ungefähr gleich bzw. stiegen leicht an, um dann nach 7 Tagen relativ stark abzusinken. Bei Stamm LisM4 zeigte sich ein leicht ansteigender Verlauf. Eine Inkubation bei 20°C führte bei allen vier Stämmen und bei beiden Methoden zu ungefähr konstant bleibenden Werten mit einer leicht steigenden Tendenz (vgl. Abb. 3 und 4). Insgesamt zeigte sich, dass der *Listeria monocytogenes*-Ausbruchsstamm von 2016 (LisM6) sowohl bei 20 °C als auch bei 30 °C stabile Biofilme bilden kann. Somit scheint nach den Ergebnissen der Mikrotiterplattenassays dieser Ausbruchsstamm sehr gut bzw. z.T. besser als das Umweltisolat LisM3 oder das Hackfleischisolat LisM4 an Umgebungsbedingungen adaptiert zu sein.

Da Lee und Frank (1991) nachweisen konnten, dass 8 Tage alter *L. monocytogenes*-Biofilm sich zwar von seiner Quantität kaum von 4 Stunden alten Biofilmen unterschied, jedoch eine bis zu 100-fach höhere Resistenz gegen Hydrochlorit aufwies, wurde der Biofilm in den eigenen Versuchen vor der Desinfektion 7 Tage kultiviert.

#### Dekontamination des Biofilms mit TOLO 330

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden Dekontaminationsversuche mit dem sowohl als Reinigungs- als auch als Desinfektionsmittel angebotenen „Kombipräparat“ TOLO 330 mit Biofilmen des *Listeria monocytogenes*-Ausbruchsstamm durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein *L. monocytogenes* Biofilm auf einer Edelstahloberfläche bei 20 °C für 6 Tage kultiviert. Dadurch sollte ein bereits vorhandener, persistierender Biofilm simuliert werden, wie er sich in einem Betrieb an einer für die mechanische Reinigung schwer zugänglichen Stelle etablieren könnte. Danach erfolgte in Anlehnung an die DIN EN 13679:2015-06 und DIN EN 1276:2010-01 eine Testanschmutzung mit sterilem bovinem Serumalbumin. Dies sollte eine Verschmutzung in der täglichen Produktion bei der Fleischverarbeitung simulieren. Nach 18 Stunden Einwirkzeit (Simulation eines täglichen Zwei-Schicht-Betriebs mit nächtlicher Reinigung) erfolgte die Reinigung und Desinfektion der Edelstahlplättchen mit TOLO 330. Die Auswahl der Konzentration und Einwirkdauer erfolgten entsprechend den Herstellerangaben.

Am Ende des Versuchsablaufes wurden die Keimzahlen der Biofilmsuspensionen kulturell auf Palcam-Agar bestimmt und die BHI-enthaltenden Suspensionen angereichert. Die Anreicherungen wurden qualitativ auf Listerien untersucht. In Tabelle 4 wurden diese Ergebnisse dargestellt, wobei Ergebnisse, die auf eine erfolgreiche Abtötung der Listerien hindeuten, grün hinterlegt wurden. Bei Bakterienwachstum trotz Desinfektion, wie Trübung der Anreicherung und positive Ergebnisse auf Palcam, wurden die entsprechenden Werte rot hinterlegt. Hinweise auf eine erfolgreiche Abtötung der *L. monocytogenes*-Biofilmzellen konnten nur für Stamm LisM5, aber nicht für Stamm LisM6 festgestellt werden. Außerdem war die Anzahl der überlebenden Listerienzellen bei Stamm LisM6 tendenziell etwas höher.

Dabei wurde die Keimzahl der Biofilme des *Listeria monocytogenes*-Teststamms um maximal 3 log-Stufen Kolonie bildender Einheiten (KbE)/cm<sup>2</sup> reduziert (vgl. Tab. 4).

**Tabelle 4:** Ergebnisse der quantitativen Keimzahlbestimmungen der mit 1,5 %igen TOLO 330 und Trinkwasser (TW) behandelten Biofilme, sowie Ergebnisse nach Anreicherung für 48h in BHI-Bouillon bei 37°C und Subkultivierung auf Palcam. Gelistet sind die Werte der Dreifachbestimmungen je Versuchsdurchgang (a, b, c). Positive Ergebnisse nach der Anreicherung werden mit „+“ und negative Ergebnisse mit „-“ bzw. „<1“ angegeben.

Durchgang		Nr. 1		Nr. 2		Nr. 3	
Stamm		LisM5	LisM6	LisM5	LisM6	LisM5	LisM6
TW a	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	4,2E+03	4,8E+03	2,3E+03	1,2E+03	1,4E+03	1,0E+03
TW b	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	2,0E+03	1,4E+03	1,7E+03	1,6E+03	9,1E+02	1,2E+03
TW c	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	n.b	1,7E+03	3,0E+03	1,2E+03	1,6E+03	1,7E+03
Mittelwert TW 3-fach-Best	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	3,1E+03	2,7E+03	2,3E+03	1,3E+03	1,3E+03	1,3E+03
Tolo a	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	4,7E+00	3,1E+00	2,8E+01	4,7E+00	< 1	< 1
	Reduktion der Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	3,1E+03	2,7E+03	2,3E+03	1,3E+03	mind: 1,3E+03	max: 1,3E+03
Tolo b	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	3,9E+01	< 1	< 1	7,0E+01	< 1	< 1
	Reduktion der Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	3,1E+03	max: 2,7E+03	mind: 2,3E+03	1,2E+03	max: 1,3E+03	max: 1,3E+03
Tolo c	Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	< 1	9,4E+01	< 1	< 1	< 1	< 1
	Reduktion der Keimzahl (KbE/cm <sup>2</sup> )	max: 3,1E+03	2,6E+03	mind: 2,3E+03	max: 1,3E+03	max: 1,3E+03	max: 1,3E+03

Durch das Waschen der Edelstahlplättchen mit warmem sterilem Trinkwasser wurde eine grobe Vorreinigung vor dem kombinierten Reinigungs- und Desinfektionsschritt simuliert. Die Konzentration und die Einwirkdauer wurden den Angaben des Herstellers entnommen.

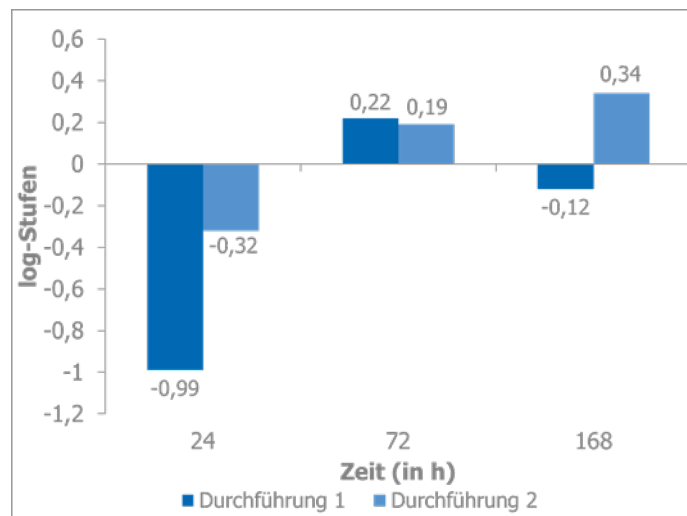
DIN EN 1276:2010-01; DIN EN 13697:2015-06 fordert für die Bestätigung einer ausreichenden bakteriziden Wirkung zur Zulassung als Oberflächendesinfektionsmittel bei einer Einwirkzeit von mindestens 5 min bei Raumtemperatur eine Reduktion der Keimzahl um mindestens 4 log KbE/cm<sup>2</sup>. Da in den vorliegenden Versuchen aber nur eine Reduktion von 3 log KbE/cm<sup>2</sup> erreicht wurden, würde das Reinigungsmittel TOLO 330 für die gewählten Bedingungen die Vorgaben für eine erfolgreiche Desinfektionswirkung nicht erfüllen. Außerdem ist fraglich, ob die in den gesetzlichen Normen festgelegten Anforderungen zur Zulassung von Desinfektionsmitteln den aktuellen realen Herausforderungen durch Biofilme gerecht werden.

Somit hat nach den vorliegenden Ergebnissen das als Reinigungs- und Desinfektionsmittel gelistete Präparat TOLO 330 auf Biofilme des untersuchten *Listeria monocytogenes*-Ausbruchstamm unter den in dieser Arbeit geprüften Bedingungen keine ausreichend desinfizierende Wirkung.

## 4.2. Überprüfung der Eignung von probiotischen Reinigungsmitteln (HS Fulda)

### 4.2.1 Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers gegen Mono-Spezies Biofilme von *Listeria monocytogenes* (Unger, 2018)

Es wurde versucht, die experimentellen Bedingungen weitestgehend denjenigen in fleischverarbeitenden Betrieben anzupassen. An den Wochenenden fand keine Reinigung oder Anschmutzung statt, was die Bedingungen in kleineren Verarbeitungsbetrieben nachstellen sollte. Nach 24 Stunden und einmaliger Reinigung wurde eine Reduktion der Biofilm-Keimzahl im Vergleich zu den Negativkontrollen um etwa eine log-Stufe nachgewiesen. Bei den Positivkontrollen waren keine Listerien mehr nachweisbar (Dekontamination mit 70%igem Ethanol). Im weiteren Verlauf wurden nach weiteren Behandlungen keine Unterschiede in den Keimzahlen der mit probiotischem Reiniger behandelten Proben und der Negativkontrollen (Behandlung mit sterilem Wasser) festgestellt (vgl. Abb. 5).



**Abbildung 5:** Wirkung des probiotischen Reinigers auf *L. monocytogenes*-Biofilme auf Edelstahl nach einmaliger (24h), zweimaliger (72h) und fünfmaliger (168h) Anwendung.

Daher kann nur von einer geringen keimhemmenden Wirkung des probiotischen Reinigungsmittels gegen den hier verwendeten *L. monocytogenes*-Stamm und dies auch nur nach einmaliger Anwendung ausgegangen werden. Dieser Unterschied erreicht bei weitem nicht die in der DIN EN 13697 bzw. DIN EN 1276 für Desinfektionsmittel geforderte 4 bzw. 5 log-Stufen-Reduktion. Trotzdem wirbt der Hersteller damit, dass die Wirkung seiner probiotischen Reiniger nur „geringfügig“ von der Wirkung von Desinfektionsmitteln übertroffen würde (Multikraft 2017a).

Auffällig war bei den Versuchen, dass die Zellzahl der mit Wasser behandelten Negativkontrollen im zeitlichen Verlauf der Hauptversuche um ca. 1,5 bis knapp 2 log-Stufen KbE/cm<sup>2</sup> abfielen. Die Proben wurden über Nacht trocken aufbewahrt, um den Abtrocknungsschritt zwischen den Reinigungsintervallen zu simulieren. Trocknung in Kombination mit anderen Methoden ist eine wichtige Maßnahme in der Lebensmittelhygiene gegen die Vermehrung pathogener Keime (Burgess et al. 2016). Die eigenen Ergebnisse zeigen nochmals, wie wichtig dieser Schritt für die Bekämpfung von *L. monocytogenes* in Lebensmittelbetrieben ist.

Der Hersteller des eMC-Kraftreinigers gab an, dass in dem Reinigungsmittel Milchsäurebakterien vorhanden sein sollten. Allerdings ergaben weder eine Kultivierung des Reinigers auf entsprechenden Nährmedien noch die mikroskopische Untersuchung Hinweise auf das Vorkommen von Milchsäurebakterien in diesem Reiniger. Daher ist zu vermuten, dass die anfänglich beobachtete Keimreduktion durch den „probiotischen“ Reiniger eher durch die Inhaltsstoffe des Reinigers als durch die durch den Hersteller ausgelobten effektiven Mikroorganismen bedingt war. Der pH-Wert des eMC® Kraftreinigers lag bei 5,00 in der 1 %-igen Gebrauchslösung. Dieser niedrige pH-Wert, in diesem Produkt wohl durch die laut Herstellerangaben enthaltene organischen Säure bedingt, als auch der Zusatz von ätherischen Ölen können durchaus eine keimhemmende Wirkung erzielen (Wemmenhove et al., 2016). In dem Reiniger waren Zitronensäure und ätherische Öle vorhanden, allerdings wurden keine Konzentrationsangaben zu diesen gemacht.

Der Reiniger wurde auch mikroskopisch untersucht. Dabei fanden sich Hinweise auf verschiedene aerobe Sporenbildner und Hefen. Auch die Koloniemorphologie auf den entsprechenden Nährmedien unterstützte diese Vermutung. Die laut Herstellerangaben enthaltenen Hefen (Multikraft o.J.), die sich im Direktpräparat auch unter dem Mikroskop im Konzentrat des Reinigers darstellen ließen (Unger, 2018), waren nicht auf YGC Agar nachweisbar. Entweder waren sie mit den von Unger (2018) verwendeten Verfahren nicht kultivierbar oder nur in so geringen Mengen enthalten, dass sie unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze lagen.

In einer weiterführenden Studie wurden die aeroben Sporenbildner aus dem probiotischen eMC Kraftreiniger und einem weiteren Präparat (Werum, 2019) isoliert und weiter charakterisiert. Dabei wurden aus dem eMC Kraftreiniger insgesamt 18 Isolate und aus dem anderen Präparat 3 Isolate gewonnen. Diese wurden am MBT/MRI in Kiel sequenziert. Alle Stämme gehörten Subspezies von *Bacillus* an. Auf dem Markt für probiotische Reiniger finden sich meist Reiniger, die auf verschiedenen *Bacillus* spp. und deren Sporen basieren (Spök und Klade 2009), so zum Beispiel die PiP Reiniger von Chrisal (Chrisal NV 2013). Selbst wenn in dem Reiniger *Lactobacillus* spp. enthalten wären, ist zu bezweifeln, dass diese sich auf einer Oberfläche anlagern, dort wachsen und in Folge dessen andere Mikroorganismen an deren Wachstum hindern können. Milchsäurebakterien benötigen meist einen erhöhten Kohlendioxidanteil in der Atmosphäre für die Vermehrung. Ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich im Reiniger nicht um Milchsäurebakterien handelt, sind die bei fast allen untersuchten Kolonien nachgewiesenen Sporen. Denn Milchsäurebakterien bilden mit Ausnahme von *Sporolactobacillus* keine Endosporen (Krämer und Prange 2017).

Es stellt sich aber trotzdem die Frage, warum die Deklaration des Herstellers nur bedingt mit den im Rahmen der Arbeit kultivierbaren Mikroorganismen übereinstimmt und die potentiell enthaltenen *Bacillus* spp. nicht deklariert werden. Es wäre möglich, dass die untersuchte Charge bei der Produktion des Reinigers durch aerobe Sporenbildner kontaminiert wurde, und diese möglicherweise die EM verdrängt hatten. Weiterhin ist auch denkbar, dass die Deklaration der verwendeten Mikroorganismen durch den Hersteller nicht korrekt erfolgte.



Es konnten jedenfalls auf der Internetseite von Multikraft keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die Firma heute immer noch mit EMRO, dem japanischen Lizenzgeber für EM, zusammenarbeitet. Für validere Aussagen hierzu müsste eine erneute und intensivere Untersuchung von weiteren Chargen des eMC® Kraftreinigers erfolgen.

Da mit den hier verwendeten Verfahren keine Milchsäurebakterien detektiert wurden, konnte nicht bestätigt werden, dass *Lactobacillus* spp. als probiotischer Bestandteil des untersuchten eMC® Kraftreinigers gegen *L. monocytogenes* wirksam war. Weiterhin war im Rahmen dieser Arbeit keine anhaltende keimreduzierende Wirkung des Reinigers in der angebotenen Form feststellbar (vgl. Abbildung 5).

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass der probiotische Reiniger bei einem bereits gebildeten Biofilm eines vorher schon in einem fleischverarbeitenden Betrieb persistierenden *L. monocytogenes*-Stammes (Messelhäußer et al. 2017) auf längere Sicht nicht zu einer Keimzahlverringerung beitragen konnte. Die Desinfektionsmethode mit 70 % Ethanol dagegen zeigte auch nach der Anreicherung keine nachweisbaren Keime mehr. Übertragen auf die Praxis eines fleischverarbeitenden Betriebes, in der jeden Tag neue *Listeria* spp. zu den bestehenden Biofilmen hinzukommen könnten (Giaouris et al. 2014), dürfte also eine noch schlechtere Wirksamkeit des emC-Kraftreinigers zu erwarten sein.

Trotzdem wirbt der Hersteller damit, dass alle eMC® Reiniger „lebensmittelhygienisch vorteilhaft“ seien, was durch einen Verweis auf ein externes Gutachten belegt wird (Multikraft 2017a). Allerdings ist dieses Gutachten auf der Internetseite von Multikraft nicht einsehbar. Die Aussage, dass die EM Reiniger „im Vergleich zu den getesteten chemischen Reinigungsmitteln deutliche Vorteile in der Beherrschung mikrobiologischer Verunreinigungen“ bieten (Multikraft 2017a), könnte auf den Test Dornig und Kneifel (2014) bezogen sein. Dieser ist auf der Internetseite auch im Detail zugänglich und vergleicht die Wirkung des eMC® Küchenreinigers und eMC® Kraftreinigers gegenüber herkömmlichen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen. Verglichen wurden die Keimzahlen verschiedener Mikroorganismen auf verschiedenen Oberflächen einer Lehrküche (Domig und Kneifel 2014). Auffällig ist, dass dort teilweise stark unterschiedlich angeschmutzte Probenflächen für den konventionellen Reiniger und die probiotischen Präparate verwendet wurden. Ein Vergleich der Keimzahlen nach der Reinigung erscheint deshalb nicht sehr aussagekräftig.

So werden gezielt Kunden im Lebensmittelbereich angesprochen, die auf der Suche nach alternativen und umweltfreundlicheren Reinigungsmethoden sind. Die eben genannten Aussagen und das gesamte Marketingkonzept der Firma Multikraft tragen hierzu bei.

Es kann ohne Kenntnis der in solchen Reinigern verwendeten Arten von Mikroorganismen keine ausreichende Risikoeinschätzung für die Anwendung solcher Präparate in lebensmittelverarbeitenden Betrieben stattfinden. Zudem fehlen weitere Studien, die diese Reinigungsmittel auch in der Praxis testen und keimreduzierende Wirkungen dokumentieren. Weiterhin ist unklar, welche Folgen die längerfristige Exposition des Reinigungspersonals mit den in den Reinigern enthaltenen Mikroorganismen hat; genauso sind auch die Folgen für die Umwelt noch nicht ausreichend untersucht (Spök et al. 2017). Außerdem muss die Frage diskutiert werden, ob ein Einsatz von lebenden Mikroorganismen in lebensmittelverarbeitenden Betrieben grundsätzlich sinnvoll ist. Denn unter anderem ließen sich nicht nur keimzahlreduzierende Effekte von Milchsäurebakterien auf *L. monocytogenes* nachweisen (van der Veen und Abee 2011).

Carpentier und Cerf (2011) weisen auch darauf hin, dass *L. monocytogenes* in gemischten Biofilmen besser in fleischverarbeitenden Betrieben überleben können. Wenn also nicht detailliert bekannt ist, welche Mikroorganismen in den Reinigern eingesetzt werden, könnte dies ebenfalls zu einer vermehrten Resistenzbildung beitragen, statt diese zu verhindern.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist es also fraglich, ob solche Mittel selbst bei nachgewiesener Wirksamkeit und korrekter Art-spezifischer Deklaration der Mikroorganismen durch den Hersteller für den Einsatz in Lebensmittelbetrieben empfohlen werden können. Durch probiotische Reiniger könnte eine negative Beeinflussung der Mikrobiota im Betrieb erfolgen, deren Folgen schwer abzuschätzen sind. In manchen Bereichen, wie beispielsweise bei der Herstellung fermentierter Produkte, wäre es weniger problematisch, weil dort Schutz- oder Starterkulturen im Lebensmittel eingesetzt werden. Hier wäre eine Anwendung von Milchsäurebakterien, v.a. *Lactobacillus* spp. möglicherweise gut handhabbar. In anderen Bereichen, wie der Verpackung von verzehrfertigen rohen, nicht fermentierten oder erhitzten Erzeugnissen, ist dagegen keimarmes Arbeiten unerlässlich für die Haltbarkeit und gesundheitliche Unbedenklichkeit des Produktes.

#### **4.2.2 Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers gegen Mono-Spezies and Dual-Spezies Biofilme von *Listeria monocytogenes* bzw. *L. monocytogenes* und *Pseudomonas* spp. (Werum, 2019)**

Im Rahmen der Masterarbeit von Werum (2019) sollte aufbauend auf den Ergebnissen von Unger (2018) eine mögliche kurative/antagonistische Wirkung eines weiteren kommerziell erhältlichen, mikrobiologischen Reinigungsmittels (mR) auf *L. monocytogenes* Mono- bzw. Mischbiofilme (mit *Pseudomonas fragi*) untersucht werden. Der Reiniger war für die Anwendung bei Komposttonnen beworben worden und sollte laut Herstellerangaben *Bacillus* spp. enthalten. Der Hersteller bekundete Interesse an einer Überprüfung der Anwendungsmöglichkeiten im Lebensmittelbereich und stellte eine Probe des Reinigungsmittels zur Verfügung.

Bei den Versuchen wurden *in-vitro* Bedingungen simuliert, wie sie in kleineren oder mittelständischen Fleischverarbeitungsbetrieben vorkommen können. Hierfür wurden Biofilme von *Listeria monocytogenes* (LisM4, Serotyp 1/2c Schweinehack, BfR Berlin LisM6 – Serotyp 1/2a, Herkunft: Wacholderwammerl, LGL Bayern; vgl. Tab. 1) auf biotischen, mit sterilem Fleischsaft behafteten Edelstahlplättchen bei 18 °C über 92 h bzw. für 135 Stunden Mischbiofilme von *L. monocytogenes* und *P. fragi* (isoliert aus Fleischtropfsaft von Schweinelachs) erzeugt. Anschließend erfolgte eine jeweils 46 bis 48 stündige Behandlung mit dem biologischen Reiniger (1:2 v/v mit sterilem Fleischsaft). Als Positivkontrolle wurden Plättchen mit den entsprechenden Biofilmen mit 70%igem Ethanol behandelt. Als Negativkontrolle dienten Plättchen mit den entsprechenden Biofilmen, die mit standardisiertem Wasser bzw. mit hitze-inaktiviertem Reiniger behandelt wurden.

Sowohl im Monobiofilm als auch im Mischbiofilm zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der log-Reduktion der Keimzahlen auf den Plättchen, die mit hitze-inaktivierten bzw. nativen biologischem Reiniger behandelt wurden.

Es wurden signifikante Unterschiede ( $p_{\text{calc.}} < 0,05$ ) bei den Keimzahlreduktionen zwischen den Bakterienspezies festgestellt: Die anfänglichen Keimzahlen von *L. monocytogenes* und *P. fragi* im Mischbiofilm ( $7.37 \pm 0.15$  bzw.  $7.41 \pm 0.17$  log CFU cm<sup>-2</sup>) sanken bei *L. monocytogenes* um 1.07 bzw. bei *P. fragi* um 0.27 log Stufen nach der Behandlung mit dem biologischen Reiniger.

Da sich im Verlauf dieser Arbeit und auf der Grundlage der zuvor durchgeführten Bachelorarbeit (Unger, 2018) die Frage stellte, ob die in den Reinigern vorhandenen *Bacillus* spp. in der Lage sind, unter praxisähnlichen Bedingungen auszukeimen, wurden weitere Arbeiten hierzu durchgeführt. In diesen Versuchen wurde die Germination der in dem Reiniger vorhandenen *Bacillus* spp. überprüft. Bei 18 °C auf Standard I Agar wurde ein Keimwachstum festgestellt.

Bei anschließend in einem kleineren Projekt durchgeführten weiteren Wachstumsversuchen durch eine studentische Hilfskraft waren in Fleischsaft nach 48 Stunden bei 18 °C keine vegetativen Bakterienzellen nachweisbar. Erst nach mindestens 70 Stunden gingen die *Bacillus*-Sporen wieder in die vegetative Bakterienform über.

Daher scheint nach den vorliegenden Ergebnissen auch der Einsatz des zweiten getesteten biologischen Reinigers in einem fleischverarbeitenden Betrieb nicht sinnvoll zu sein. Die beobachteten Keimzahlreduktionen sind vermutlich wie unter 4.2.2.1 (Unger, 2019) beschrieben, auf andere Bestandteile im Reiniger (z. B. Tenside, ätherische Öle, 1,2-Propandiol) zurückzuführen.

Identifizierung der in dem Reiniger enthaltenen Bakterien (Schmitz, 2019): Nach Rücksprache mit dem Unternehmen „awiwa“ sollte es sich bei allen drei zugesetzten Bakterienarten um *Bacillus* spp. handeln. Mit Hilfe der biochemischen Verfahren, konnte nur eine relative ungenaue Charakterisierung vorgenommen werden. Im späteren Verlauf des Projektes wurden aus dem Awiwa-Reiniger isolierten Kolonien nach Sequenzierung am MBT/MRI in Kiel der Gattung *Bacillus subtilis* zugeordnet

Nach der Identifizierung wurde die Biofilmbildung kontrolliert. Schon in den Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass alle drei *Bacillus* spp.-Isolate aus dem Reiniger in der Lage waren, bei 30 °C Biofilme zu bilden. In weiteren Versuchen wurde eine Biofilmbildung der drei Isolate auch bei 20 °C beobachtet. Im Verlauf der Versuche ergaben sich Hinweise auf eine Unterdrückung der anderen beiden *Bacillus*-Stämme durch eines der drei Isolate. Worauf diese beruht, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Zudem sollten weitere Untersuchungen über die Germination der Sporen aus dem mikrobiologischen Reiniger durchgeführt werden, um eine Aussage zur Wirksamkeit des Reinigers treffen bzw. gezieltere Anwendungshinweise geben zu können. Des Weiteren wären weitere Studien sinnvoll, die Wechselwirkungen des gebildeten Biofilms durch die in dem Reiniger enthaltenen *Bacillus* spp. gegen andere Mikroorganismen überprüfen.

### **4.3 Einfluss von Kombipräparaten/probiotischer Reinigungsmittel auf das Vorliegen von VBNC-Stadien von *L. monocytogenes* in Biofilmen (MBT/MRI Kiel)**

Im Folgenden wird hier eine Zusammenfassung der vom MRI erzielten Ergebnisse gegeben, welchen im Rahmen des Unterauftrags erarbeitet wurden

#### **4.3.1 Etablierung eines Nachweissystems für VBNC Zellen von *L. monocytogenes* mittels PMA-qPCR**

Für den indirekten Nachweis von „viable but non culturable“ (VBNC) Zellstadien von *Listeria monocytogenes* wurde ein Nachweissystem mittels Propidium Monoazid (PMA) und quantitativer PCR mit dem Hämolysin-Gen *hlyA* etabliert. Dabei konnte eine PCR-Effizienz zwischen 90,7% und 92,3% festgestellt werden.

Die Anwendung dieses Systems war beim Einsatz von unterschiedlichen *L. monocytogenes* Isolaten als Reinkulturen sowohl in Nährbouillon als auch im Komplexmedium „Fleischtropfsaft“ erfolgreich. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl in nativem als auch sterilem Fleischtropfsaft keine inhibierenden Faktoren vorhanden waren, die die Signale der qPCR beeinflussen.

#### **4.3.2 Nachweis von VBNC-Stadien von *L. monocytogenes* in Biofilmen**

Der eingesetzte Pool aus nativem Fleischtropfsaft vom Schwein wurde mikrobiologisch charakterisiert. Dabei wurden Keimgehalte zur Gesamtkeimzahl von  $6,1 \pm 0,17$  log KbE/ml, für Milchsäurebakterien von  $5,45 \pm 0,13$  log KbE/ml, für Pseudomonaden von  $5,55 \pm 0,2$  log KbE/ml, für *Enterobacteriaceae* von  $3,56 \pm 0,24$  log KbE/ml und für Hefen und Schimmelpilze von  $4,18 \pm 0,15$  KbE/ml sowie eine Proteinkonzentration von  $104 \pm 3,6$  mg/ml nachgewiesen. Der qualitative Nachweis von *L. monocytogenes* sowie die Detektion von *L. monocytogenes* spezifischen Bakteriophagen im Fleischtropfsaft waren negativ.

##### Kultureller Nachweis

Nach 96 Stunden erreichten beide *L. monocytogenes* Stämme im gebildeten Multispezies-Biofilm am Tag 5 Keimzahlen von ca.  $4,5$  log KbE/cm<sup>2</sup>. Die Entwicklung der *L. monocytogenes* Population wurde im weiteren Verlauf in der Negativkontrolle, der mit standardisiertem Wasser behandelten Probe, verfolgt. Dabei wurde am Tag 6 eine Reduktion der Keimzahlen auf ca.  $2,8$  log KbE/cm<sup>2</sup> detektiert, wobei am Tag 8 ein Anstieg auf  $3,2$  KbE/cm<sup>2</sup> für L2-234 und  $3,8$  log KbE/cm<sup>2</sup> für L2-255 zu verzeichnen war. Das Verhalten der beiden *L. monocytogenes* Stämme im Multispezies-Biofilm war also ähnlich, wobei die Keimzahlen von L2-255 im Vergleich zu L2-234 bei den Analysen tendenziell höher waren. Die Keimzahl der autochtonen Fleischtropfsaftmikrobiota reduzierte sich im Laufe der Beprobung von ca.  $6$  log KbE/cm<sup>2</sup> um ca.  $0,5$  log am Tag 6 und erreichte am Tag 8 wieder ca.  $6$  log KbE/cm<sup>2</sup>. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass *L. monocytogenes* im Multispezies-Biofilm durch die vorhandene, kompetitive Mikrobiota des Fleischtropfsafts zunächst verdrängt wurde, sich aber dennoch im weiteren experimentellen Verlauf in der komplexen Biofilmmatrix etablieren konnte.

Die Biofilmeliminierungstests wurden mit dem Kombipräparat (Reinigungs- und Desinfektionsmittel) TOLO 330 bei der vom Hersteller angegebenen Konzentration von 1% und einer Einwirkzeit von 10 Minuten durchgeführt. TOLO 330 erwies sich als effizient durch ein vollständiges Abtöten des gebildeten Biofilms (ca. 6 log KbE/cm<sup>2</sup>) auf allen Edelstahlplättchen, so dass keine Bakterien kulturell nachweisbar waren.

In weiterführenden Experimenten sollten durch längere Inkubationszeiten über mehrere Wochen das Wachstumsverhalten und die Durchsetzungsfähigkeit von *L. monocytogenes* im Multispezies-Biofilm weiterverfolgt werden, um so weitere Erkenntnisse zur Persistenz von *L. monocytogenes* zu erlangen.

#### Kulturunabhängiger Nachweis von *L. monocytogenes*

Dabei waren bei den Analysen des Multispezies-Biofilms in den Negativkontrollen die ermittelten Lebendkeimzahlen per Fluoreszenzfärbung am Tag 5 von  $6,00 \pm 0,37$  log KbE/cm<sup>2</sup>, am Tag 6 von  $5,60 \pm 0,26$  log KbE/cm<sup>2</sup> und am Tag 8 von  $6,00 \pm 0,35$  log KbE/cm<sup>2</sup> mit den resultierenden kulturellen Ergebnissen zur Gesamtkeimzahl vergleichbar. Analog zu den kulturellen Ergebnissen waren im Biofilmeliminierungstests nach der Behandlung mit TOLO 330 keine lebenden Zellen mehr nachweisbar. Beim Vergleich der detektierten Fluoreszenzsignale für die Gesamtheit der vorhandenen Zellen wird deutlich, nach der Behandlung der Edelstahloberflächen mit 70%igen Ethanol signifikant weniger Zellen detektiert wurden als nach dem Einsatz von TOLO 330 ( $5,1 \pm 0,4$  log KbE/cm<sup>2</sup> vs.  $3,5 \pm 0,5$  log KbE/cm<sup>2</sup>). Dies deutete darauf hin, dass 70%iger Ethanol eine fixierende Wirkung auf den vorhandenen Multispezies-Biofilm hatte, so dass bei der Probenaufarbeitung mittels der Glasperlen-Methode geringere Mengen abgelöst werden konnten.

Als weitere kulturunabhängige Methode zum Nachweis von lebenden Bakterien kam die etablierte PMA-qPCR zur Detektion von *L. monocytogenes* zum Einsatz. Dabei zeigte sich ein ähnliches Absinken der Zellzahlen von L2-234 bzw. L2-255 von Tag 5 auf Tag 6, wie beim kulturellen Nachweis bereits erwähnt wurde. Jedoch sanken die Zellzahlen von Tag 6 auf Tag 8 weiter ab. Weiterhin konnten sowohl bei der Negativkontrolle, als auch bei der TOLO 330 gereinigten Probe nach PMA Inkubation noch in geringem Maße lebende Zellen nachgewiesen werden. In Vorversuchen wurde bereits festgestellt, dass auch bei der hitzeinaktivierten Totzelleprobe nach PMA Behandlung noch Signale gemessen werden konnten. Diese Ergebnisse stimmten folglich nicht mit den durchflusszytometrischen Daten überein, bei welchen in der Lebend/Tot-Bestimmung mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Syto 13 und Propidiumjodid nach Tolo 330 Reinigung und auch bei der Negativkontrolle (mit Ethanol gereinigt) keine lebenden Zellen nachgewiesen wurden. Aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Farbstoffe ist zwar kein direkter Vergleich der Daten möglich, dennoch lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass ein gewisser Anteil an falsch positiven Signalen mittels PMA- qPCR detektiert wurde. Zudem wurde der Einsatz von PMA bereits in mehreren Publikationen kritisch diskutiert, da die Methode sehr davon abhängig ist, wie gut PMA in tote Zellen eindringen kann und ob die Licht-induzierte kovalente Verbindung mit der DNA stattfindet (Løvdal et al. 2011; Nocker et al. 2007, Pan and Breidt 2007).

Ein Vergleich der kulturell bestimmten Zellzahlen mit den mit Hilfe der PMA-qPCR bestimmten Daten zeigte ebenso Unterschiede. Dabei liegen die per qPCR bestimmten Zellzahlen meist unter den kulturell ermittelten Keimzahlen, insbesondere nach PMA Inkubation, was auf einen methodischen Fehler bei der PMA-qPCR Bestimmung hindeuten könnte, der dadurch zu einer Unterschätzung der Zellzahlen führt.

Ebenso könnte die Quantifizierung im Multispezies-Biofilm durch die Anwesenheit von DNA, die von der Fleischtropfsaftmikrobiota stammt, negativ beeinflusst worden sein. Allerdings konnten falschpositive Ergebnisse durch andere *Listeria*-Spezies im nativen Fleischsaft sowie der inhibitorische Einfluss des sterilen Fleischsaftes in Vorversuchen ausgeschlossen werden.

Die Robustheit und Zuverlässigkeit der Methode, PMA-qPCR in Kombination mit dem verwendeten DNA-Extraktionskit, sollte daher in der komplexen Matrix Fleischtropfsaft durch weitere Versuche noch optimiert werden.

### Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Dabei waren bei der Analyse des adhätierenden Biofilms auf Edelstahlcoupons im Testansatz mit nativem Fleischtropfsaft netzartige, dreidimensionale Strukturen erkennbar. Bei dem mit *L. monocytogenes* beimpften nativen Fleischtropfsaft war die Diversität von verschiedenen, morphologisch unterschiedlichen Bakterien innerhalb der Biofilmmatrix zu sehen. Außerdem waren die Biofilm-typischen extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) sichtbar.

Bei den Ansätzen zur Biofilmmeliminierung war die oberflächenaktive Wirkung der Testsubstanz TOLO 330 erkennbar: die Strukturen des Multispezies-Biofilms wurden durch die detergenten Eigenschaften aufgelöst. Allerdings wurde der Biofilm nicht komplett beseitigt, so dass sowohl Reste von Biofilmstrukturen als auch bakterielle Zellen vorhanden waren. Im Gegensatz dazu sind nach der Behandlung mit 70%igen Ethanol die Strukturen des Biofilms noch weitestgehend existent, was auf eine fixierende Wirkung des Ethanols schließen lässt. Vorhandene Überreste von Biofilmmaterial, welche nach der Reinigung und Desinfektion nicht beseitigt wurden, können die nachfolgende Anlagerung von Bakterien und Bildung von neuen Biofilmen erleichtern.

## **5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Die Anwendung von „probiotischen Reinigern“ für den Lebensmittelbereich wird zunehmend kritisch diskutiert. Da sie gerne als umweltfreundliche Alternative zu chemischen Reinigern beworben werden, wäre eigentlich eine Anwendung in Bio-Betrieben denkbar. Allerdings dürfen mit dem EU Biosiegel gekennzeichnete Produkte nicht für Oberflächen verwendet werden, die in Kontakt mit Lebensmitteln kommen und sollen auch nicht als Spray aufgetragen werden. Weiterhin ist eine Auslobung von antimikrobiellen oder desinfizierenden Effekten verboten (European Commission 2017). Einige Hersteller bewerben ihre Produkte für den Einsatz in kleinen und kommerziellen Küchen. Sie treffen Aussagen wie „vorteilhaft für die Lebensmittelhygiene“ und „einfache Anwendung mittels Sprühflaschen“ (Multikraft o.J.). Allerdings tragen die so beworbenen Präparate kein EU-Biosiegel. Nach dem Übersichtsartikel von Spök et al. (2018) machen einige Hersteller Angaben zu ihren Produkten, die auch als potentielle biozide Effekte interpretiert werden könnten.

Auch am Institut für Angewandte Biowissenschaften des KIT, Karlsruhe werden seit 2018 probiotische Reiniger untersucht. Die Idee, dass man Bakterien auf einer Oberfläche versprühen könne und diese dadurch sauber werde, hält dabei Professor Johannes Gescher vom Institut für Angewandte Biowissenschaften des KIT indes für wenig überzeugend.

Zwar seien Mikroorganismen in der Lage, organischen Kohlenstoff zu verstoffwechseln, wie es zum Beispiel in Klärwerken alltäglich geschehe, wo Bakterien eingesetzt werden, um Abwasser zu reinigen. Dennoch würden sie nach Gescher neue Biomasse erzeugen. Somit könnte man dann nicht von Sauberkeit sprechen. Auch Gescher vermutet, dass die in den probiotischen Reinigern enthaltenen Zusatzstoffe wohl eher die Reinigungsleistung als die darin enthaltenen Mikroorganismen erbringen (KIT, 2019).

## **6. Voraussichtlicher Nutzen (insbesondere wissenschaftliche und wirtschaftliche Verwertbarkeit der Forschungsergebnisse sowie Verwertungsstrategie)**

### Wirkung von „Kombipräparaten“

Entsprechend der Normen DIN EN 1276:2010-01 sowie DIN EN 13697:2015-06 wird für die Bestätigung einer ausreichenden bakteriziden Wirkung zur Zulassung als Oberflächendesinfektionsmittel bei einer Einwirkzeit von mindestens 5 min bei Raumtemperatur eine Reduktion der Keimzahl um mindestens 4 log KbE/cm<sup>2</sup> gefordert. Allerdings werden diese Mittel hierfür nicht routinemäßig auf ihre Wirkung gegen *Listeria monocytogenes* geprüft. In den vorliegenden Versuchen wurde bei *Listeria monocytogenes*-Biofilmen an der HS Fulda nur eine Reduktion von 3 log-Stufen erreicht. Somit hatte das überprüfte Reinigungsmittel TOLO 330 für die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit 5 min bei 18°C) keine bakterizide Wirkung auf diesen für die Fleischwirtschaft sehr relevanten Zoonoseerreger. In den Versuchen am MBT/MRI in Kiel wurde eine desinfizierende Wirkung nach 10-minütiger Einwirkungszeit bei 12 °C festgestellt. Da der Hersteller widersprüchliche Angaben zu den Einwirkzeiten macht (Wartner, 2017) ist es für die Anwender nur schwer nachvollziehbar, welche Einwirkzeiten für den jeweiligen Bereich in ihrem Betrieb anzuwenden sind. Deutlich wird die sehr differierende Wirkung bei unterschiedlichen Temperaturen und Anwendungszeiten.

Die widersprüchlichen Ergebnisse belegen, dass eine kombinierte Anwendung von Reinigern mit biozider Wirkung als Ersatz für einen Reinigungsschritt keinesfalls anzuraten ist. Eine optimale Reinigung ist unerlässlich für die Bekämpfung von unerwünschten Keimen in den Betrieben.

Weiterhin dokumentieren die Ergebnisse auch die Bedeutung der Abtrocknung der Oberflächen für die Bekämpfung von *Listeria monocytogenes* in den Betrieben. Schon dadurch lassen sich Keimzahlreduktionen erreichen, da eine Vermehrung von Listerien sehr stark von einer Wasserverfügbarkeit abhängt. Hier gilt es, zuverlässig „Nischen“ für diese Keime zu identifizieren und soweit möglich zu reduzieren.

Erheblicher Forschungsbedarf wird hierbei auch noch hinsichtlich des „hygienic design“ von Oberflächen von Geräten und des Arbeitsumfeldes in den Betrieben gesehen.

### Anwendungsmöglichkeiten biologischer Reiniger mit Mikroorganismen

Da weder Milchsäurebakterien im emC-Kraftreiniger nachgewiesen (obwohl vom Hersteller als EM angegeben), noch eine anhaltende Reinigungswirkung bei den beiden getesteten probiotischen Reinigern über beobachtet werden konnte, wird die Anwendung dieses Reinigers in lebensmittelverarbeitenden Betrieben sehr kritisch gesehen. Zudem stimmen die Herstellerangaben bei dem emC-Kraftreiniger nicht mit den in diesem Produkt nachgewiesenen Mikroorganismen überein. Für ein effektives Risikomanagement im Betrieb und um den sicheren Einsatz in der Produktion zu gewährleisten, fehlen weiterhin detaillierte Hersteller-Informationen zu den im Produkt enthaltenen Mikroorganismen.

Nach den Ergebnissen dieses Projektes ist es fraglich, ob solche Mittel selbst bei nachgewiesener Wirksamkeit und korrekter spezifischer Deklaration der Mikroorganismen durch den Hersteller für den Einsatz in Lebensmittelbetrieben empfohlen werden können. Durch probiotische Reiniger könnte eine negative Beeinflussung der Mikrobiota im Betrieb erfolgen, deren Folgen schwer abzuschätzen sind. In manchen Bereichen, wie beispielsweise bei der Herstellung fermentierter Produkte, wäre eine Anwendung von Milchsäurebakterien, v.a. *Lactobacillus* spp. möglicherweise gut handhabbar. In anderen Bereichen, wie der Verpackung von verzehrfertigen Erzeugnissen, ist dagegen keimarmes Arbeiten unerlässlich für die Haltbarkeit und gesundheitliche Unbedenklichkeit des Produktes.

Fraglich ist auch, ob die nach Herstellerangaben in den Präparaten enthaltenen Mikroorganismen unter praxisüblichen Bedingungen in einen vegetativen Stoffwechsel übergehen und damit eine kompetitive Wirkung auf unerwünschte Keime haben können.

### Überlebensfähigkeit von *Listeria monocytogenes* in Mischbiofilmen

Die kulturell ermittelten Keimzahlen von *L. monocytogenes* in den Versuchen des MBT/MRI Kiel lassen darauf schließen, dass *L. monocytogenes* im Multispezies-Biofilm durch die vorhandene, kompetitive Mikrobiota des Fleischtropfsafts zunächst verdrängt wurde, sich aber dennoch im weiteren experimentellen Verlauf in der komplexen Biofilmmatrix etablieren konnte. Die Biofilmmeliminierungstests durch das Kombipräparat (Reinigungs- und Desinfektionsmittel) TOLO 330 erwiesen sich als effizient durch ein vollständiges Abtöten der Bakterien auf allen Edelstahlplättchen. Jedoch zeigten die rasterelektronenmikroskopischen Bilder, dass noch Überreste von Biofilmmaterial auf den Edelstahloberflächen nach der Reinigung und Desinfektion vorhanden waren. Diese Rückstände könnten die nachfolgende Anlagerung von Bakterien und Bildung von neuen Biofilmen erleichtern.



## 7. Bisher erfolgte Veröffentlichungen

Insgesamt wurden im Rahmen dieses Projektes eine Abschlussarbeit im Rahmen des Studiums Lebensmittelchemie (Ederer, FAU Erlangen), drei Bachelorarbeiten (Unger, Schmitz, HS Fulda; Zagoruyko, MRI Kiel) sowie eine Masterarbeit (Werum, HS Fulda) angefertigt. Weiterhin wurden Ergebnisse dieses Projektes auf dem 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie 2019 in Kiel und auf der 58. Dreiländertagung der DVG 2019 in Garmisch vorgestellt,

Weitere Veröffentlichungen (Werum et al., Böhnlein et al.) in einem internationalem peer reviewten Journal befinden sich in Vorbereitung. Geplant ist für das Jahr 2020 auch ein Übersichtsbeitrag für dieses Projekt in deutscher Sprache für die Zeitschrift „Fleischwirtschaft“.

Die Masterarbeit von Frau Victoria Werum wurde am 24.07.2020 durch die Heinrich-Stockmeyer-Stiftung mit dem Stockmeyer-Nachwuchspreis 2020 ausgezeichnet.

Im Nachgang zu diesem Projekt soll eine weitere Bachelorarbeit angefertigt werden, die sich mit biologischen Reinigungsverfahren unter ökologischen Gesichtspunkten in Lebensmittelbetrieben beschäftigen wird.

### 7.1 Angefertigte Qualifikationsarbeiten

#### 2018

**Ederer, Regina (2018):** Bekämpfung von Biofilmen von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben – Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Studiengang Lebensmittelchemie, FAU Erlangen, angefertigt am Fachbereich Oecotrophologie HS Fulda 04.12.2017 bis 23.06.2018

Unger, Kerstin: Untersuchung der Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers gegen Biofilme von *Listeria monocytogenes*. Bachelorarbeit Fachbereich Oecotrophologie HS Fulda, 18.05.2018

#### 2019

**Schmitz, Sandra (2019).** Überprüfung der Biofilmbildung und Charakterisierung der *Bacillus* spp. aus einem mikrobiologischen Reinigungsmittel Bachelorarbeit für den Bachelor of Science Oecotrophologie HS Fulda, 24.07.2019

**Werum, Victoria (2019):** Influence of a microbial-based cleaning product on *Listeria monocytogenes* mono-species and dual-species biofilm (with *Pseudomonas fragi*) under simulated meat processing conditions. Masterarbeit für den Master of Science Food Processing HS Fulda, 26.04.2019

**Zagoruyko, Marina (2019).** Growth and inactivation of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm under simulated meat processing environments. Bachelor Thesis. Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, CAU Kiel.

### 7.2 Eingereichte/ veröffentlichte oder geplante Fachpublikationen

Böhnlein, Christina; Habermann, Diana; Gieschler, Stefanie; Low, Hui Zhi; Kabisch, Jan; Hetzer, Birgit; Pichner, Rohtraud; Franz, Charles M.A.P. (2020). Multi-species biofilms of *Listeria monocytogenes* and native meat juice microbiota. In preparation

Werum, V.; Böhnlein, C.; Kabisch, J.; Habermann, D.; Pichner, R.; Schildbach, S. (2020): Planktonic and sessile cell growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* in a meat juice model substrate under simulated meat processing conditions. In preparation

### **7.3 Fachbeiträge (Vortrag, Poster u.a.) auf Fachkonferenzen**

Habermann, Diana; Gieschler, Stefanie; Pichner, Rohtraud; Kabisch, Jan; Franz, Charles M.A.P.; Böhnlein, Christina. 2019. Nicht-kultivierbare *Listeria monocytogenes*: Ein Problem für die Lebensmittelindustrie? 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, 07.10. - 09.10.2019, Kiel.

Unger, Kerstin, Pichner Rohtraud. 2019: Untersuchung der Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers auf Biofilme von *Listeria monocytogenes*. Poster 58. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG. Dreiländertagung. 2019.

Werum, Victoria, Böhnlein, Christina, Kabisch, Jan, Habermann, Diana, Pichner, Rohtraud. 2019. A microbial-based cleaning product (MBCP) as a novel approach for *Listeria monocytogenes* biofilm control in the meat industry? 18. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, 07.10. - 09.10.2019, Kiel.

Fulda, den 17.04.2020

## 8 Literaturverzeichnis

- Ban, G.-H.; Kang, D.-H., 2016. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food microbiology* 55, S. 47–54.
- BAuA (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin), 2010. Technische Regeln für Arbeitsstätten, ASR A3.5 Raumtemperatur, vom zuletzt geändert GMBI 2018, S. 474.
- Besnard, V., Federighi, M., Cappelletti, J., 2000. Evidence of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiol.* 17, 697–704.
- Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Cappelletti J.M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet. Res.* 33, 359–370.
- Borucki, M. K.; Peppin, J. D.; White, D.; Loge, F.; Call, D. R., 2003. Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (12), S. 7336-7342.
- Burgess, C. M.; Gianotti, A.; Gruzdev, N.; Holah, J.; Knøchel, S.; Lehner, A. et al., 2016. The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International journal of food microbiology* 221, S. 37– 53.
- Carpentier B., Cerf, O., 2011. Review - persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 1–8.
- Casella, M. L.; Schmidt-Lorenz, W., 1989. Disinfection with gaseous formaldehyde. Fifth Part. Influence of albumin, mucin and blood on the bactericidal and sporicidal effectiveness. *International journal of hygiene and environmental medicine* 189 (1), S. 37-49.
- Cherifi, T.; Jacques, M.; Quessy, S.; Fravallo, P., 2017. Impact of Nutrient Restriction on the Structure of *Listeria monocytogenes* Biofilm Grown in a Microfluidic System. *Frontiers in microbiology* 8, S. 864.
- Coates, D., 1996. Sporicidal activity of sodium dichloroisocyanurate, peroxygen and glutaraldehyde disinfectants against *Bacillus subtilis*. *Journal of Hospital Infection* 32 (4), S. 283-294.
- Coughlan, L.M., Cotter P.D., Hill C., Alvarez-Ordóñez A., 2016. New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. *Frontiers in Microbiol.*, Online veröffentlicht. 18. Oktober 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01641
- DIN EN 1276:2010-01: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). DIN EN 14885
- DIN-Norm 10516:2009-05: Lebensmittelhygiene – Reinigung und Desinfektion
- DIN EN 13697:2015-06: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Oberflächenversuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2).
- Dojjad, Swapnil P.; Barbudhe, Sukhadeo B.; Garg, Sandeep; Poharkar, Krupali V.; Kalorey, Dewanand R.; Kurkure, Nitin V. et al. (2015): Biofilm-Forming Abilities of *Listeria monocytogenes* Serotypes Isolated from Different Sources. *PloS one* 10 (9), e0137046. DOI: 10.1371/journal.pone.0137046.
- Domig, K. J.; Kneifel, W., 2014. Analysenbericht. Universität für Bodenkultur. Wien., [https://www.multikraft.com/fileadmin/user\\_upload/Multikraftbericht-03-12-2014.pdf](https://www.multikraft.com/fileadmin/user_upload/Multikraftbericht-03-12-2014.pdf).
- Dreux N., Albagnac C., Federighi M., Carlin F., Morris C., Nguyen-the C., 2007. Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1272–1281.
- Ederer, R., 2018. Bekämpfung von Biofilmen von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittel verarbeitenden Betrieben – Wissenschaftliche Abschlussarbeit im Studiengang Lebensmittelchemie, FAU Erlangen, angefertigt am Fachbereich Oecotrophologie HS Fulda.
- EMRO (Hg.) (2016a): Dr. Teruo Higa. Online verfügbar unter <https://emrojapan.com/dr-higa/>, zuletzt geprüft am 14.05.2018.
- EMRO (Hg.) (2016b): EM Products. Online verfügbar unter <https://emrojapan.com/products/>, zuletzt geprüft am 14.05.2018. Giaouris et al. 2013.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Mørtrø, T. et al., 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments. Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat science* 97 (3), S. 298–309.
- Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J., 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* 92, 98S–110S.

- Gomez et al. 2016. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Front Microbiol.* 2016; 7: 863. doi: 10.3389/fmicb.2016.00863.
- Gram, Lone; Bagge-Ravn, Dorthe; Ng, Yoke Yin; Gyomoese, Pernille; Vogel, Birte Fonnesbech, 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18 (10), pp. 1165–1171.
- IHO (2019). Desinfektionsmittelliste: Lebensmittelherstellung. <https://lebensmittel.desinfektionsmittelliste.de/php/ihompdf.php?url=https%3a%2f%2flebensmittel.desinfektionsmittelliste.de%2fHome%2fProduktliste%2f1%3fsortierung%3dProduktname>. Abgerufen am 19.12.2019.
- Khamisse, E., Firmesse, O., Christieans, S., Chassaing, D., Carpentier, B., 2012. Impact of cleaning and disinfection on the non-culturable and culturable bacterial loads of food-contact surfaces at a beef processing plant. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 163–168.
- Kostaki, M.; Chorianopoulos, N.; Braxou, E.; Nychas, G.-J.; Giaouris, E., 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (8), pp. 2586–2595.
- Krämer, J., Prange, A., 2017. *Lebensmittel-Mikrobiologie. 7., vollständig überarbeitete Auflage.* Stuttgart: Ulmer (UTB, 1421).
- KIT (Karlsruher Institut für Technologie), 2019. Johannes Gescher: Putzen mit Bakterien. Pressemeldung online vom 03.04.2019. [https://www.sek.kit.edu/kit\\_express\\_4428.php](https://www.sek.kit.edu/kit_express_4428.php). Abgerufen am 15.04.2020.
- Lee, S.-H.; Frank, J. F., 1991. Inactivation of Surface-adherent *Listeria monocytogenes* by hypochlorite and Heat. *Journal of Food Protection* 54 (1), S. 4-6.
- Lee, B.-H., Hébraud, M.; Bernardi, T., 2017. Increased Adhesion of *Listeria monocytogenes* Strains to Abiotic Surfaces under Cold Stress. In *Frontiers in microbiology* 8, p. 2221. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02221
- Lerliche, V.; Carpentier, B., 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J Appl Microbiol* 88 (4), pp. 594–605.
- Leong, Dr., Nicaogain, K., Luque-Sastre, L., McManamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., Scollard, J. Schmalenberger, A., Fanning, S., O'Byrne, C., Jordan, K., 2017. A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food business in Ireland. *International Journal of Food Microbiology* 249, 18-26.
- Løvdal, T., Befring Hovda, M., Björkblom, B., Møller, S. G., 2011. Propidium monoazide combined with real-time PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J. Microbiol. Meth.*, 85, 164-169
- Lücke, F.-K., Weber, A., Pichner, R., Leopold, J., 2017. Umweltfreundliche Reinigung und Desinfektion in der ökologischen Lebensmittelverarbeitung - Ergebnisse einer Befragung. Poster. 58. Tagung der Arbeitsgruppe Lebensmittelhygiene der DVG in Garmisch-Partenkirchen 25.- 30.09.2017
- Mai, T.L.; Conner, D.E., 2007. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International journal of food microbiology* 120 (3), S. 282-286.
- Manias, S.G.; Skandamis, P.N., (2014: Control of *Listeria monocytogenes* in the processing environment by understanding biofilm formation and resistance to sanitizers. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1157, S. 251-261.
- Melo, J., Andrew, P.W., Faleiro, M.L., 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. *Foodserv. Res. Int.* 67, 75–90.
- Messelhäußer U., Rampp, A., Zechel, P., Schönberger, K., Hörmansdorfer, S., Busch, U., Wallner, P., 2017. *Listeria monocytogenes* entlang der Lebensmittelkette: Relevanz in fleischverarbeitenden Betrieben. *J Consum Prot Food Saf.* 12 (Suppl 1):S37–S40. DOI 10.1007/s00003-016-1088-3
- Multikraft (Hg.) (2015): EG-Sicherheitsdatenblatt. eMC Kraftreiniger, zuletzt geprüft am 17.03.2018.
- Multikraft (Hg.) (2016): Funktion & Wirkung von Effektiven Mikroorganismen. Online verfügbar unter <https://www.multikraft.com/de/effektive-mikroorganismen/funktion-wirkung/>, zuletzt aktualisiert am 22.09.2016, zuletzt geprüft am 14.05.2018.
- Multikraft (Hg.) (2017a): Produktbroschüre. Reinigung & Wohnklima, zuletzt geprüft am 17.03.2018.
- Multikraft (Hg.) (2017b): Produkte und Anwendungen. Online verfügbar unter <https://www.multikraft.com/de/>, zuletzt aktualisiert am 10.04.2017, zuletzt geprüft am 14.05.2018. Nguyen, Yuk, 2013
- Nocker, A., Sossa, K. E., Camper, A. K., 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J. Microbiol. Meth.* 70, 252-260
- Norwood, D. E.; Gilmour, A., 2001. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett Appl Microbiol* 33 (4), pp. 320–324.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100.

- O'Toole, G.A., 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments* 47(47). DOI: 10.3791/2437
- Overney, A., Jacques-André-Coquin J., Ng P., Carpentier B, Guillier L., Firmesse O., 2017. Impact of environmental factors on the culturability and viability of *Listeria monocytogenes* under conditions encountered in food processing plants. *Int. J. Food Micro.* 244, 74–81.
- Pan, Y.; Breidt, F.; Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and environmental microbiology* 72 (12), S. 7711–7717.
- Pan, Y. and Breidt F. Jr., 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl. Env. Microbiol.* Vol. 73, 8028-8031
- Papaioannou, E.; Giaouris, E. D.; Berillis, P.; Boziaris, I. S., 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International journal of food microbiology* 267, pp. 9–19.
- Quinn, M.M. und Henneberger, P.K., 2015.: Cleaning and disinfecting environmental surfaces in health care: Toward an integrated framework for infection and occupational illness prevention. *American Journal of Infection Control* 43: 424-434
- Reis-Teixeira, F.B.Dos; Alves, V. Farias; Martinis, E. C. Pereira de, 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian journal of microbiology* 48 (3), pp. 587–591.
- Schmitz, S., 2019. Überprüfung der Biofilmbildung und Charakterisierung der *Bacillus* spp. aus einem mikrobiologischen Reinigungsmittel Bachelorarbeit für den Bachelor of Science Oecotrophologie HS Fulda, 24.07.2019.
- Somers, E.; Lee, W., 2004. Efficacy of Two Cleaning and Sanitizing Combinations on *Listeria monocytogenes* Biofilms Formed at Low Temperature on a Variety of Materials in the Presence. *Journal of Food Protection* (67), S. 2218–2229.
- Spök, A., Klade, M., 2009. Ökologische, gesundheitliche und rechtliche Aspekte von Reinigungsmitteln mit Mikroorganismen als Wirkprinzip. Endbericht. Hg. v. IFZ - Interuniversitäres Forschungszentrum für Technik, Arbeit und Kultur. [https://www.bmnt.gv.at/dam/jcr:c11feccb-6d0c-48b9-8e23-20afb2f65f70/Endbericht\\_Mikrorein\\_out.pdf](https://www.bmnt.gv.at/dam/jcr:c11feccb-6d0c-48b9-8e23-20afb2f65f70/Endbericht_Mikrorein_out.pdf).
- Stepanovic, S.; Djukic, N.; Opavski, N.; Djukic, S., 2003. Significance of inoculum size in biofilm formation by staphylococci. *The new microbiologico* 26 (1), S. 129-132.
- Thévenot, D., Dernburg, A., Vernozy-Rozand, C., 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J. Appl. Microbiol.* 101, 7–17.
- Unger, K. 2018. Untersuchung der Wirksamkeit eines probiotischen Reinigers gegen Biofilme von *Listeria monocytogenes*. Bachelorarbeit Fachbereich Oecotrophologie HS Fulda, 18.05.2018
- van der Veen, S., Abee, Tj., 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International journal of food microbiology* 144 (3), S. 421–431.
- Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des europäischen Parlaments und des Rates. Lebensmittelhygiene. Online abrufbar unter: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:de:PDF>. Zuletzt aufgerufen am: 12.09.2017.
- Wartner, J., 2017. Untersuchung der Wirksamkeit eines Kombipräparates auf den Biofilm von *Bacillus subtilis* auf Edelstahlplättchen. Bachelorarbeit Hochschule Fulda, Fachbereich Oecotrophologie.
- Wemmenhove, E., van Valenberg, H. J. F., Zwietering, M. H.; van Hooijdonk, T. C. M.; Wells-Bennik, M. H. J. 2016. Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese. *Food microbiology* 58, S. 63–67.
- Werum, V., 2019. Influence of a microbial-based cleaning product on *Listeria monocytogenes* mono-species and dual-species biofilm (with *Pseudomonas fragi*) under simulated meat processing conditions. Masterarbeit für den Master of Science Food Processing HS Fulda, 26.04.2019.
- Woo, J., and Ahn, J., 2013. Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 56, 307–313. doi:10.1111/lam.12051
- Zaika, L.L.; SCULLEN, O. J.; FANELLI, J.S., 1997. Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Sodium Polyphosphate as Affected by Polyvalent Metal Ions. *J Food Science* 62 (4), S. 867-872.
- Zagoruyko, M., 2019. Growth and inactivation of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm under simulated meat processing environments. Bachelor Thesis. Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, CAU Kiel.