

Der prophylaktische Einsatz von Bakteriophagen gegen
Listerien im Produkt Zwiebelmettwurst

Bachelorarbeit

09.05.2011

Fakultät Life Sciences

Studiengang Ökotoxikologie

Vorgelegt von: Esther Pia David

Betreuende Prüfer: Prof. Dr. Helmut Laberenz, Dr. med. vet. Thomas Wilke

Vorwort

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die diese Bachelorarbeit ermöglicht und mich bei ihrer Entstehung unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an meinen fachlichen Betreuer Dr. A. Hartmann. Ich danke ihm für die vielseitige Unterstützung und sein außerordentliches Engagement.

Des Weiteren möchte ich bei B + C Tönnies Fleischwerke GmbH & Co. KG, insbesondere bei Josef Tillmann, für die Bereitstellung der Versuchsmaterialien bedanken. Ein herzlicher Dank geht an das niederländische Unternehmen EBI Food Safety, welches das Produkt Listex P100 zur Verfügung gestellt hat.

Zudem möchte ich mich bei meinem Betreuern Prof. Dr. Helmut Labrenz und Dr. med. vet. T. Wilke bedanken, die trotz großen Zeitdrucks es auf sich genommen haben, die Arbeit zu betreuen.

Abstract

„Der prophylaktische Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien im Produkt Zwiebelmettwurst“

In Europa ist die Zahl der Lebensmittelinfektionen durch Listerien trotz steigender Hygieneanforderungen der Lebensmittelindustrie stetig gestiegen. Menschen mit einem intakten Immunsystem erkranken in der Regel nur selten bzw. nur mit leichten grippeartigen Symptomen. Besonders gefährdet an einer Listeriose zu erkranken sind die Risikogruppen: Kinder, Senioren, abwehrgeschwächte Menschen und Schwangere. Bei 30% der Infizierten endet eine Listeriose mit dem Tod. Da Listerien ubiquitär in der Umwelt vorkommen, kann auch durch die Anwendung einer guten hygienischen Praxis eine Kontamination von Lebensmitteln nicht zu 100% ausgeschlossen werden. Eine sichere Methode zur Abtötung von Listerien, ist die Erhitzung von Lebensmitteln. Ist dies nicht möglich, wie zum Beispiel bei dem deutschen Rohwurst-Produkt Zwiebelmettwurst, so muss nach anderen Lösungen gesucht werden. Das niederländische Unternehmen EBI Food Safety bietet mit ihrem Produkt Listex P100 eine neue Möglichkeit für die Lebensmittelindustrie sich vor Listerien in ihren Produkten zu schützen. Zum Einsatz bei der Bekämpfung von Listerien kommen hierbei Bakteriophagen. Der Phage P100 infiziert spezifisch *Listeria spp.* und tötet somit die Bakterien auf eine natürliche Art und Weise ab, ohne andere für die menschliche Verdauung nützliche Bakterien zu beeinflussen.

In der Literatur konnten bereits erste erfolgreiche Anwendungen im Bereich Rotschmierkäse und bei der Lachsherstellung verzeichnet werden. Die vorliegende Bachelorarbeit untersucht, inwiefern die prophylaktische Behandlung mit Bakteriophagen beim Produkt Zwiebelmettwurst eingesetzt werden kann. Daneben wird ebenfalls der Einsatz von der Schutzkultur Holdback 261 im Produkt Zwiebelmettwurst getestet. Desweiteren erfolgen der Versuch einer rechtlichen Einordnung des Produktes Listex P100 bezüglich der Deklaration, sowie eine Betrachtung des ethischen Aspekts von den Einsatz von Bakteriophagen (Viren) in Lebensmitteln.

Untersucht wird die technologische Wirkungsweise der Bakteriophagen bei der Behandlung des Rohstoffes Schweinefleisch. Bei den Laborversuchen wird zunächst das Rohmaterial mit Listerien beimpft und anschließend mit einer definierten Menge des Produktes Listex P100 behandelt. In der ersten Versuchsreihe werden verschiedene Konzentrationen des Produktes Listex P100 getestet. Folgende Ergebnisse wurden verzeichnet:

Im ersten Versuch konnte aufgrund einer zu geringen Einwirkzeit von zehn Minuten, kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Proben hinsichtlich der Listerienkeimzahl festgestellt werden. Im zweiten Versuch wurden dementsprechend längere Einwirkzeiten gewählt. Hier konnte bei der Verwendung von $2,6 \times 10^8$ PbE/cm² und einer Einwirkzeit von einer Stunde bereits eine Abnahme um ca. 50% der ursprünglichen Listerien erkannt werden. Eine weitere Erhöhung der Einwirkzeiten und des Phagentiters zog eine Erhöhung der Abtötungsrate nach sich. Bei einer natürlich vorkommenden Belastung von bis zu 200 KbE/g Schweinefleisch, würde eine Behandlung bei diesem Versuchsaufbau eine Reduzierung auf 100 KbE/g bringen. Damit würde sich der Wert innerhalb des vorgeschriebenen gesetzlichen Grenzwertes von 100 KbE/g Listerien für Zwiebelmettwurst befinden (VO EG 2073/2005). Hersteller von Zwiebelmettwürsten können, unter den Bedingungen von einer Stunde Einwirkzeit und einer Phagendichte von $2,6 \times 10^8$ PbE/cm², das Produkt Listex P100 benutzen, um die Anzahl der vorkommenden Listerien zu verringern. Die Schutzkultur hatte wahrscheinlich aufgrund der geringen Reifetemperatur der Zwiebelmettwurst nur einen sehr geringen Einfluss auf die Listerienpopulation und ist somit ungeeignet zur Eliminierung von *Listeria monocytogenes* im Produkt Zwiebelmettwurst.

Die Arbeit zeigt, dass unter Einhaltung der genannten Parameter, die Behandlung des Rohmaterials beim Produkt Zwiebelmettwurst einer Verringerung der Listerienpopulation hervorrufen kann.

Abstract

“The Prophylactical Application Of Bacteriophage P100 To Control *Listeria* In Zwiebelmettwurst”

In Europe, the number of foodborne infections by *Listeria monocytogenes*, despite increasing health standards of the food industry, has increased steadily. Healthy people normally don't develop disease symptoms or show only mild flu-like symptoms. Particularly at risk of developing listeriosis are children, the elderly, immunocompromised people and pregnant women. 30% of the listeriose-cases show a fatal outcome. Because *Listeria* germs are ubiquitous in the environment, a contamination of food products can't be excluded for sure even by the application of good hygienic practice. A safe way to inactivate *Listeria* would be a heat treatment of the food products. However, in products like the German “Zwiebelmettwurst” (a spreadable, cured, slightly fermented sausage), a heat treatment would alter the typical characteristics of the product. The Dutch company EBI Food Safety offers with LISTEX P100 a new appliance for the food industry to protect food products against *Listeria*. Listex is a suspension of the broad range Bacteriophage P100, which specifically infects *Listeria spp.* and thus kills the bacteria in a natural way, without affecting other bacteria beneficial to human digestion. First successful applications in soft cheese and salmon processing have already been reported in the literature.

In this bachelor thesis, the prophylactic treatment with bacteriophage in the product Zwiebelmettwurst will be analyzed. In addition, the use of the protective culture Hold Back 261 is tested as an alternative. Furthermore, the attempt to place legal classification of the product Listex P100 with respect to the declaration, as well as an chapter about the ethical aspect of the use of bacteriophage (viruses) in food. The technological effectiveness of bacteriophage in the treatment of the raw pork is investigated.

In the laboratory experiments, the raw material is first inoculated with *Listeria monocytogenes* and then treated with a defined amount of product LISTEX P100. In the first experiment, different concentrations of the product Listex P100 have been tested. In this trial, the contact time between P100 and the artificially contaminated pork before processing was limited to ten minutes. In the consequence, no differences between treated and untreated samples could be observed regarding the survival of *Listeria monocytogenes*. In the second trial, the optimal contact time as well as phage concentration was determined. Using a phage concentration of 2.6×10^8 pfu/cm² and a contact time of 60

minutes, a decrease of about 50% of the initial *Listeria* population could be observed. A further increase in exposure time and phage concentration was accompanied with a further reduction of the *Listeria* population. The protective culture Holdback 261 showed, probably due to the low fermentation temperature during ripening, only a very small effect on the *Listeria* population.

Considering a naturally occurring contamination level of up to 200 cfu/g of pork, a Listex treatment would result in a reduction of *Listeria* below 100 cfu/g. This would match the prescribed legal limit of 100 cfu/g for *Listeria monocytogenes* in Zwiebelmettwurst (Regulation EC 2073/2005). Manufacturers of Zwiebelmettwurst can use under the conditions of one hour exposure and a density of 2.6×10^8 pfu/cm², the product Listex P100 to reduce the number of contaminating *Listeria spp.* The work shows that in accordance with the parameters above, the handling of raw materials in the Zwiebelmettwurst within a reduction in *Listeria* populations is possible.

I. Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
1 Einleitung.....	10
2 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.1 Eigenschaften von Listerien.....	12
2.2 Krankheitsbild: Listeriose	13
2.3 Problematik von Listerien in der Lebensmittelindustrie	14
2.4 Problematik von Listerien in Rohwurstprodukten	15
3 Die prophylaktischen Vorgehensweise gegen Listerien mit Hilfe von Bakteriophagen ...	17
3.1 Eigenschaften von Bakteriophagen.....	17
3.2 Listex P100 der Firma EBI Food Safety.....	19
3.3 Methodenbeschreibung: Einsatz von Phagen gegen pathogene Bakterien	20
3.4 Problematik der Anwendung von Listex P100 im Produkt Zwiebelmettwurst	21
3.5 Alternative Methode: Schutzkultur Holdback 261 der Firma Danisco.....	22
3.6 Ethischer Aspekt des Einsatzes von Bakteriophagen gegen Listerien.....	23
3.7 Rechtliche Problematik / Deklaration Listex P100.....	24
4 Vorbereitende Untersuchungen	27
4.1 Auswahl von Listerienstämmen durch Feintypisierung.....	27
4.1.1 Identifizierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	27
4.1.2 Feintypisierung mittels REP – PCR und Gelelektrophorese.....	28
4.1.3 Ergebnisse der Feintypisierung	29
4.1.4 Diskussion der Ergebnisse der Feintypisierung.....	30
4.2 Titer Bestimmung des Produktes Listex P100 und Empfindlichkeitstest	31
4.2.1 Durchführung: Empfindlichkeitstest und Titer Bestimmung	31
4.2.2 Ergebnisse: Empfindlichkeitstest und Titer Bestimmung	33
4.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Empfindlichkeitstest	33
5 Hauptuntersuchungen	35

5.1	Vorbereitung: Beimpfen des Rohmaterials	35
5.2	Nachweis von Bakteriophagen im Enderzeugnis	38
5.2.1	Versuchsaufbau: Nachweis von Bakteriophagen	38
5.2.2	Ergebnisse: Nachweis von Bakteriophagen	39
5.2.3	Diskussion der Ergebnisse: Nachweis von Bakteriophagen	40
5.3	Erste Versuchsreihe	42
5.3.1	Versuchsaufbau der ersten Versuchsreihe	42
5.3.2	Ergebnisse der ersten Versuchsreihe	43
5.3.3	Diskussion der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe	46
5.4	Zweite Versuchsreihe	47
5.4.1	Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe	47
5.4.2	Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe	49
5.4.3	Diskussion der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe	52
6	Fazit: Prognose für den Einsatz von Bakteriophagen	54
	III. Literaturverzeichnis	56
	IV. Eidesstattliche Erklärung	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pfeile markieren das kontraktile Schwanzstück vom Bakteriophagen, Typ P100.....	18
Abbildung 2: Gelelektrophorese: Feintypisierung der <i>Listeria monocytogenes</i> Isolate.....	29
Abbildung 3: Auftragschema der verschiedenen Verdünnungsstufen des Listex P100.....	32
Abbildung 4: Phagen Titer Bestimmung beim Listerienstamm IDE 68	33
Abbildung 5: Phagen Titer Bestimmung beim Listerienstamm IDE 67	34
Abbildung 7: Bestimmung der Bakterienanzahl, Verdünnungsstufe 4	36
Abbildung 8: Bestimmung der Bakterienanzahl, Verdünnungsstufe 5	36
Abbildung 9: Visuelle Darstellung der Ergebnisse des zweiten Versuchs.....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweis von Phagen im Enderzeugnis	39
Tabelle 2: Ergebnisse des ersten Hauptversuches: pH Wert	44
Tabelle 3: Ergebnisse des quantitativen Listeriennachweises: erster Hauptversuch.....	45
Tabelle 4: Ergebnisse des zweiten Hauptversuches: pH Wert	50
Tabelle 5: Ergebnisse des quantitativen Listeriennachweises: zweiter Hauptversuch.....	51

1 Einleitung

2010 wurden dem Robert-Koch Institut durch die Gesundheitsämter 389 Listeriose Fälle in Deutschland gemeldet, wobei die Dunkelziffer um ein Vielfaches höher liegen dürfte. Die Zahl der Listeriose Erkrankungen ist trotz höherer Hygieneanforderungen von 2001 bis 2010 stetig gestiegen (Robert-Koch-Institut 2010).

Bei schweren Verläufen von Listeriose kann es zu Blutvergiftungen, Gehirn- und Gehirnhautentzündungen kommen, bei denen 30% der Infizierten sterben (Krämer 2007, 83). Neben den fatalen gesundheitlichen Schäden einer Listeriose kommen wirtschaftliche Schäden durch den Verwurf von Produkten oder durch Imageschäden hinzu. Eine sichere Methode zur Abtötung von Listerien in Lebensmitteln, welche nicht durch Erhitzung von Listerien befreit werden können, wäre somit von großem Nutzen. Nicht nur für die Lebensmittelproduzenten, die sich vor Kontaminationen mit Listerien und den verbundenen Schäden schützen könnten, sondern auch für die allgemeine Sicherheit von Lebensmitteln, wäre eine sichere Methode zur Abtötung von Listerien in Lebensmitteln, welche nicht durch Erhitzung von Listerien befreit werden können wünschenswert.

Eine Lösung dieser Problematik verspricht das Produkt Listex P100 der niederländischen Firma EBI Food Safety. Das Produkt besteht aus einer Bakteriophagensuspension, welche gezielt zur Abtötung von Listerien eingesetzt werden soll. Dies ist ein vielversprechender Ansatz, der Potenzial haben könnte, zu einem industriellen Standard zu werden. Lebensmittelproduzenten könnten sich mit relativ geringem Aufwand gegen Listerien-Kontaminationen in ihrem Produkt auf natürliche Weise schützen. Die neue prophylaktische Methode wird bereits europaweit mit großem Interesse betrachtet. Das BIOHAZ-Gremium der EFSA hat die Empfehlung ausgesprochen, die Erforschung der Wirkung von verschiedenen Phagen in Kombination mit unterschiedlichen Lebensmitteln zu fördern (EFSA 2009, 20).

Der Fachliteratur nach, wurden und werden bereits erste erfolgreiche Versuche für den Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien bei den Produktgruppen Schmierkäse und Fisch durchgeführt (Carlton, et al. 2005, 13-40).

Für die folgenden Untersuchungen hat sich die Autorin für das Risikoprodukt Zwiebelmettwurst (Rohwurst) entschieden, da noch keine Erfahrungen hinsichtlich der Behandlung

mit Listex P100 bei diesem Produkt vorliegen. Das Produkt ist speziell für Deutschland relevant, da Zwiebelmettwurst europaweit fast ausschließlich in Deutschland verzehrt wird. Zwiebelmettwurst ist eine Rohwurst, d.h. das Rohmaterial kann nicht erhitzt werden, um eine Listerienkontamination zu beseitigen. Somit zählt Zwiebelmettwurst zu den potenziellen Risikolebensmitteln, die mit Listerien kontaminiert sein könnten. Der Einsatz von Listex P100 um Kontaminationen mit Listerien im Nachhinein zu eliminieren, ist damit für das Produkt Zwiebelmettwurst besonders interessant. Neben dem Einsatz von Bakteriophagen wird ebenfalls die Schutzkultur Holdback 261 der Firma Danisco auf ihre Wirksamkeit beim Produkt Zwiebelmettwurst untersucht.

Im Laufe der Arbeit wird vorab die Problematik von Listerien genauer betrachtet, um anschließend näher auf die Methode der prophylaktischen Behandlung mit Bakteriophagen eingehen zu können. Unter diesem Punkt werden auch eine ethische Betrachtung der Verwendung von Bakteriophagen in Lebensmittel, sowie ein Versuch der rechtlichen Einordnung des Produktes Listex P100 aufgeführt.

In den Hauptuntersuchungen wird analysiert, ob und unter welchen technologischen Umständen das Produkt Listex P100 und die Schutzkultur Holdback 261 für den Einsatz bei Zwiebelmettwürsten geeignet ist. Dazu werden Zwiebelmettwürste aus mit Listerien beimpftem Schweinefleisch hergestellt. Diese werden zum einen mit dem Produkt Listex P100 mit verschiedenen Konzentrationen und Einwirkzeiten behandelt und zum anderen mit der Schutzkultur Holdback 261. Anhand der Versuchsergebnisse schließt die Arbeit mit einer Prognose für den Einsatz von Bakteriophagen im Produkt Zwiebelmettwurst für die Lebensmittelindustrie in Deutschland ab.

2 *Listeria monocytogenes*

2.1 Eigenschaften von Listerien

Listerien sind grampositive Stäbchenbakterien, die ubiquitär in der Umwelt vorkommen. Zurzeit sind acht Spezies von *Listeria* bekannt: *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* (Bülte 2008, 13), *L. rocoutiae* (Leclercq, et al. 2006, 2210) und *L. marthii* (Graves, et al. 2010). Von diesen Spezies sind nur *L. monocytogenes* und Stämme von *L. ivanovii* für Mensch und Tier pathogen (Baumgart, et al. 2004, 179). Diese pathogenen Stammformen besitzen alle ein bestimmtes Hämoloysin, das Listeriolysin O, ein Exotoxin das rote Blutkörperchen zerstört. Stämme ohne Hämoloysin sind generell nicht humanpathogen (Sinell 2004, 52). Die Art *L. ivanovii* tritt äußerst selten als Krankheitserreger beim Menschen auf (Bülte 2008, 14). Die humanpathogene Species *L. monocytogenes* ist hingegen wesentlich bedeutender. Es existieren mindestens elf Serotypen, von denen zwei etwa 90% der klinischen Infektionen verursachen (Kunz 1994, 168). Verantwortlich für die meisten Listeriose-Erkrankungen beim Menschen sind die Serotypen 1/2a und 4b (Krämer 2007, 82). Bei schwerwiegenden Ausbrüchen konnte häufig der Serotyp 4b als Verursacher festgestellt werden (Bülte 2008, 43).

Listerien können fakultativ anaerob wachsen, d.h. sie können auch bei sauerstoffarmen Bedingungen gedeihen, sind durch eine Begeißelung beweglich und bilden keine Sporen (Krämer 2007, 81). Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 30° C und 37° C. Jedoch können sie sich auch bereits bei niedrigen Temperaturen (-0,4°C) vermehren (Bartel und Malzcan 2003, 133). Listerien können relativ niedrige a_w – Werte ($a_w > 0,8$) und niedrige pH Werte (pH > 4,5) tolerieren. Durch eine Temperaturbehandlung von oberhalb 72° C, können Listerien abgetötet werden (Krämer 2007, 81). Das Tiefgefrieren von Lebensmitteln hingegen können Listerien problemlos überleben (BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung 2008, 2). Aufgrund dieser Eigenschaften gelten folgende Lebensmittel als besonders risikoreich: Milchprodukte, besonders Rohmilchprodukte, sowie Fleisch und geräucherter oder fermentierter Fisch. Konserven oder verarbeitete Lebensmittel, die eine Hitze- oder Säurebehandlung während der Produktion erfahren, können von Listerien lediglich durch eine Sekundärinfektion als Überträger in Frage kommen. Dies sollte allerdings durch eine „gute Herstellpraxis“ vermieden werden können (Pichardt 1998, 187).

Die Primärinfektion der Lebensmittel kann während des Herstellungsprozesses durch Erreger im Stuhl des Schlachttieres erfolgen. Sekundärinfektionen können durch die Umgebung (zum Beispiel Maschinenanlagen, Förderbänder etc.) oder verwendetes Waschwasser geschehen. Eine Kontamination des Fleisches ist auf diesem Wege möglich (Krämer 2007, 82).

2.2 Krankheitsbild: Listeriose

Eine Kontamination von Listerien im Lebensmittel kann man weder am Geruch noch am Aussehen von Produkten erkennen, da Listerien nicht zum allgemeinen Verderb von Lebensmitteln führen. Da die Infektionsdosis bei einer Listeriose recht hoch ist, erkranken in der Regel gesunde Menschen nicht oder nur leicht. Das Ausmaß der Erkrankung ist abhängig von der aufgenommenen Anzahl der Erreger (BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung 2008, 1). Besonders gefährdet sind folgende Risikogruppen: Kinder, Senioren, abwehrgeschwächte Menschen und Schwangere. Bei Schwangeren kann eine Listeriose zu Fehl- oder Frühgeburten führen (Keweloh 2009, 216). Zudem kann von der infizierten Mutter in der Schwangerschaft oder während der Geburt der Erreger auf das Ungeborene übertragen werden. Diese Übertragung hat fatale Folgen: Infizierte Neugeborene sterben häufig nach ihrer Geburt oder tragen geistige Behinderungen davon (BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung 2008, 1).

Bei einer Infektion gelangen die Bakterien am häufigsten über kontaminierte Lebensmittel in den Gastrointestinaltrakt. Aufgrund der Säureempfindlichkeit sterben bereits im Magen ein großer Teil der pathogenen Bakterien ab. Bei ausreichend hoher Keimzahl verursachen sie durch das Eindringen in die Epithelzellen des Dünndarms entzündliche Prozesse. Durch die Blutbahn breitet sich der Infekt im gesamten Körper aus. Dies ist mit einem Anstieg an Leukozyten verbunden, welcher wiederum mit entzündlichen Prozessen einhergeht (Krämer 2007, 85). Unterschiedliche Symptome sind die Folge, bei denen 30% der Infizierten sterben (Baumgart, et al. 2004, 180). Typische Krankheitssymptome einer Listeriose sind Fieber, Erbrechen, Durchfall und Muskelschmerzen. Da die Krankheitssymptome recht ähnlich sind, kann eine Listeriose- Erkrankung leicht mit einer Grippe verwechselt werden.

Um irreversible Schäden der Gehirnzellen zu vermeiden, sollte die Therapie so schnell wie möglich erfolgen. Zurzeit wird vorwiegend Ampicillin verwendet. Bei einer Penicillin-Unverträglichkeit kann auf folgende Antibiotika ausgewichen werden: Tetracycline oder Chloramphenicol (Krämer 2007, 86).

Laut dem Robert-Koch Institut sind zwischen den Jahren 2001 und 2009, 3092 Listeriose Fälle in Deutschland bekannt geworden. Bei lediglich 194 dieser Fälle sind Informationen bezüglich der Serotypen vorhanden. Bei der Mehrzahl der Infektionen handelt es sich um die Serotypen 4b (53%) und 1/2a (45%), die übrigen 2% der Infektionen gingen mit dem Serotypen 1/2b einher (Robert-Koch-Institut 2010, 344).

Seit 2001 ist in Deutschland ein ansteigender Trend der Listeriose Fälle zu verzeichnen. Die meisten Fälle sind in den Jahren 2005 und 2006 zu beobachten. Die Zunahme ist nicht auf schwangerschaftsassozierte Ausbrüche zurückzuführen. Vielmehr handelt es sich bei der Hälfte der Fälle um ältere Personen (70 Jahre oder älter). Zu dieser Zeit ist auch ein Anstieg der Listerieninfektionen in anderen Ländern (zum Beispiel: Finnland, Dänemark, Niederlande) zu erkennen. Als Ursachen können zum einen der demografische Wandel, aber auch die Zunahme des Verzehrs von Risiko-Lebensmitteln, Fertigprodukten oder einer suboptimalen Lagerung von Lebensmitteln angesehen werden. Auch die verlängerten Haltbarkeitszeiten von Lebensmitteln können zu einer Anreicherung von Listerien beitragen (Robert-Koch-Institut 2010, 345).

2.3 Problematik von Listerien in der Lebensmittelindustrie

Listerien verursachen in der Lebensmittelindustrie enorme wirtschaftliche Schäden unter anderem durch Rückrufaktionen von Waren und dem Verwurf von kontaminierten Rohstoffen. Zudem erfährt das Unternehmen oder die Branche einen erheblichen Imageschaden, der ebenfalls wirtschaftliche Schäden nach sich zieht.

Für Hersteller von Nahrungsmitteln wäre daher ein wirksamer prophylaktischer Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien eine interessante Option. „Sie können sich mit vergleichsweise geringem Aufwand gegen die immensen Folgen einer Listerienkontamination ihrer Produkte absichern“ (Sossna 2005, 993).

Um Listeriose Erkrankungen weitgehend zu verhindern, ist die Lebensmittelindustrie durch die europäische Verordnung 2073/2005 zur Einhaltung folgender Lebensmittelsicherheitskriterien verpflichtet:

In verzehrfertigen Lebensmitteln, die für Säuglinge oder für besondere medizinische Zwecke bestimmt sind, darf *Listeria monocytogenes* während der Haltbarkeitsdauer in 25g nicht nachweisbar sein. Bei allen übrigen verzehrfertigen Lebensmittel, die die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* begünstigen können, darf *Listeria monocytogenes* bevor das Lebensmittel die unmittelbare Kontrolle des Lebensmittelunternehmers verlassen hat, ebenfalls in 25g nicht nachweisbar sein. Während der Haltbarkeitsdauer gilt der Grenzwert von 100 KbE/g. Lebensmittel, die die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* nicht begünstigen können, dürfen ebenfalls den Grenzwert von 100 KbE/g während der Haltbarkeit nicht überschreiten (VO EG 2073/2005, Kapitel 1, S.15).

Voruntersuchungen von Dr. rer. nat. H. Andreas Hartmann aus dem Institut Dr. Erdmann haben ergeben, dass *Listeria monocytogenes* nicht in der Lage ist, sich während der Haltbarkeitsdauer von zwei Wochen bei 8°C im Produkt Zwiebelmettwurst zu vermehren. Das Produkt Zwiebelmettwurst begünstigt die Vermehrung von *Listeria monocytogenes* nicht. Der Grenzwert von 100 KbE/g muss während der Haltbarkeitsdauer der Zwiebelmettwurst eingehalten werden. Vorausgesetzt die prophylaktische Behandlung von Lebensmitteln mit Bakteriophagen gegen Listerien, würde eine Reduktion von unter 100 KbE/g im Lebensmittel verursachen, könnten die gesetzlichen Regelungen eingehalten werden. Folgend wird die theoretische Funktionsweise der neuen Methode vorgestellt. Dafür wird zunächst auf die allgemeinen Eigenschaften von Bakteriophagen eingegangen und erläutert, wie diese für den gezielten Einsatz gegen Listerien genutzt werden können.

2.4 Problematik von Listerien in Rohwurstprodukten

Bei dem Produkt Zwiebelmettwurst handelt es sich um ein Rohwurstprodukt, welche nicht durch Erhitzung von Listerien befreit werden kann. Es muss daher nach anderen Methoden gesucht werden, um diese Produktkategorie vor Listerien zu schützen.

Die Lösung, Lebensmittel mittels Gamma-, UV- oder ionisierender Bestrahlung von unerwünschten Mikroorganismen zu befreien, ist in Deutschland nach § 8 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch verboten. Erlaubt sind bisher lediglich die Bestrahlung von getrockneten Gewürzen und Kräutern. Daher scheidet die Bestrahlung von Zwiebelmettwürsten aus, um Listerien zu eliminieren. Zudem müssen diese als bestrahlt gekennzeichnet werden (BVL- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2006).

Des Weiteren wird zurzeit im Bereich des Einsatzes von einer Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln zur Abtötung von pathogenen Bakterien geforscht (Demazeau und Rivalain 2011, 1365-2672). In flüssigen Lebensmitteln konnte bereits 2008 eine Reduktion von *L. innocua* verzeichnet werden (Mosqueda-Melgar, et al. 2008). In McIlvaine Puffer konnte *Listeria monocytogenes* besonders bei niedrigen pH Werten von 3,5 reduziert werden (Saldana, et al. 2010). Inwieweit eine Übertragung dieser Methode auf das Produkt Zwiebelmettwurst möglich ist, bleibt bisher unerforscht.

Eine weitere mögliche Vorgehensweise ist die Verwendung von Schutzkulturen, wie sie in der Käseherstellung üblich ist (Max Rubner-Institut 2011). Schutzkulturen bestehen i.d.R. aus Milchsäurebakterien, welche das Wachstum unerwünschter Keime im Produkt durch verschiedene Mechanismen hemmen. Diese Hemmung erfolgt einerseits kompetitiv (durch Besetzung der Nischen) und andererseits durch die Produktion von Milchsäure, welche das Wachstum von Listerien hemmt (Geisen, Lücke und Kröckerl 1990, 94). Spezielle antilisterielle Schutzkulturen enthalten zudem Bakterien, welche Listerien durch die Produktion von Bakteriocinen abtöten. Die verwendete Kultur Holdback 261 enthält einen Stamm des *Lactobacillus plantarum*, welcher das Bakteriocin Pediocin PA-1 produziert (Ennahar, et al. 1996, 4381–4387). Im Unterschied zur Salami wird Zwiebelmettwurst allerdings i.d.R. kalt fermentiert. Dies könnte das Wachstum der Laktobazillen und somit die Wirksamkeit der Schutzkultur beeinträchtigen. Die Schutzkultur Holdback 261 der Firma Danisco wird in dieser Arbeit im Produkt Zwiebelmettwurst getestet. Laktobazillen sind unter anderem ein Bestandteil der Holdback 261 Schutzkultur.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wird in der Untersuchung des prophylaktischen Einsatzes von Bakteriophagen gegen Listerien liegen. Diese Methode wird in dem nachstehenden Kapitel 3 genauer betrachtet.

3 Die prophylaktischen Vorgehensweise gegen Listerien mit Hilfe von Bakteriophagen

3.1 Eigenschaften von Bakteriophagen

Das Wort Bakteriophagen stammt aus dem Griechischen und bedeutet „Bakterien Esser“ Diese Bezeichnung ist treffend, da Bakteriophagen Bakterien nutzen, um sich in ihnen zu vermehren. Bei diesem Prozess stirbt das Bakterium (Wirtszelle) ab, d.h. die Bakteriophagen „verzehren“ Bakterien. Bakteriophagen (auch einfach als „Phagen“ bezeichnet) gezielt gegen Listerien einzusetzen ist demzufolge, vom Namensursprung ausgehend, schon recht naheliegend. Phagen sind ubiquitär verbreitet und Schätzungen zufolge existieren auf der Erde 10^{31} Bakteriophagen. Bakteriophagen haben keinen eigenen Stoffwechsel, sondern sind vollständig von zellulärem Stoffwechsel ihrer Wirtszelle abhängig. Demzufolge können sie sich auch nur mit Hilfe einer geeigneten Wirtszelle vermehren. Da Bakteriophagen sich nicht aktiv fortbewegen können, sind sie auf Diffusion, Aerosole oder Vektoren angewiesen (Graw und Henning 2006, 115).

Treffen eine geeignete Wirtszelle und ein Bakteriophage aufeinander, so erkennt der Phage spezifische Rezeptorstrukturen der Zelle, und es kommt zu einer spezifischen Bindung an die Zelloberfläche (Adsorption). Mit der Bindung geht die Freisetzung der Bakteriophagen-DNA aus dem Phagenkopf und der Injektion in die Bakterienzelle einher. Nach der Injektion wird folgender Prozess eingeleitet: „Replikation der Phagen DNA, Transkription und Translation der Phagengene, self- assembly der Kopf- und Schwanzstrukturen und Verpackung der DNA, Auflösung der Wirtszellwand (Lyse) und Freisetzung der Nachkommensphagen“ (Tochterphagen) (Heller, Fieseler and Loessner 2011, 10). Die Verpackung der DNA geschieht durch die Bildung von Kapsiden, in welche die DNA eingebaut wird. Eine spezielle Form der Infektion zeigen die temperenten Phagen, welche ihre Phagen – DNA zunächst in das Genom der Wirtszelle einbauen.

Die meisten Bakteriophagen zeigen eine hohe Wirtsspezifität, d.h. sie können nur bestimmte Bakterien-Gattungen oder -Arten infizieren. Das Wirtsspektrum ist begrenzt, da Bakterien artfremde DNA durch Restriktions- und Modifikationssysteme erkennen können und durch Hydrolyse zerstören. Bakterien können auch, ähnlich wie bei dem Einsatz von Antibiotika, Resistenzen zum Beispiel durch die Veränderung des Rezeptors entwickeln. Ein ständiges Wechselspiel zwischen der Veränderung des Bakteriums und einer

entsprechenden Anpassung des Bakteriophagen ist in der Evolution zu beobachten. Aufgrund der hohen Wirtsspezifität, ist beim Einsatz von Bakteriophagen in Lebensmitteln eine Beeinflussung der körpereigenen Bakterien, die für die menschliche Verdauung nötig sind, nicht zu erwarten (Heller, Fieseler and Loessner 2011, 11-60).

Bei dem Produkt Listex P100 handelt es sich um den virulenten Phagen P100, der spezifisch *Listeria spp.* infiziert und somit abtötet. Der Phage P100 soll ca. 95% der natürlich vorkommenden *L. monocytogenes* Isolate infizieren. Resistenzen gegenüber des Phagens sind bislang noch nicht beobachtet worden (Klump, et al. 2008, 5755). Der Phage P100 lässt sich der Familie *Caudovirales* zuordnen. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine doppelsträngige DNA, ein ikosaedrisches Kapsid und ein Schwanzteil aus. Da der Phage P100 ein langes kontraktiles Schwanzstück besitzt, kann man ihn der Gattung *Myoviridae* zuteilen (Klump, et al. 2008, 5755). Auf der nachfolgenden Abbildung sind zwei Bakteriophagen vom Typ P100 zu erkennen:

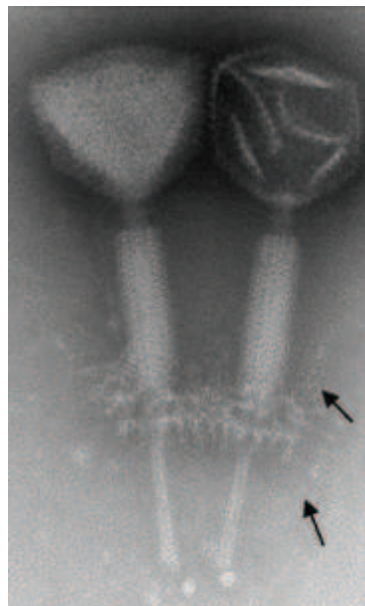


Abbildung 1: Pfeile markieren das kontraktile Schwanzstück vom Bakteriophagen, Typ P100

Quelle: (Klump, et al. 2008, 5756)

Der linke, hellere P100 Bakteriophage hat in seinem Kapsid noch verpackte DNA, der rechte Bakteriophage hingegen hat durch Injektion bereits seine DNA in einer Wirtszelle

freigelassen und erscheint daher dunkler. Bei Untersuchungen aus dem Jahr 2008 konnten morphologisch kaum Unterschiede zwischen den Phagen P100 und A511 gefunden werden. Untersuchungen des Genoms aus dem Jahr 2008 haben ergeben, dass alle tRNA Gene des A511 Phagens auch im P100 Phagen identifiziert werden können. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass diese Phagen genetisch nah miteinander verwandt sind (Klump, et al. 2008, 5755).

3.2 Listex P100 der Firma EBI Food Safety

Die private, niederländische Firma EBI Food Safety stellt Bakteriophagen für die Lebensmittelindustrie her. Die Bakteriophagen sollen die Lebensmittelsicherheit steigern, indem sie spezifisch pathogene Bakterien unschädlich machen (De Meester and Offenhaus 2011). Auf der Unternehmenswebseite bewirbt das Unternehmen ihr Produkt Listex P100 unter anderen mit folgenden Slogans:

“Bacteriophages...

- control pathogens such as *L. monocytogenes*
- are bacteria's natural enemy
- are easy to apply
- are organic
- do not affect treated food
- are species-specific
- are Generally Recognized As Safe (GRAS).” (De Meester and Offenhaus 2011)

Die zu untersuchende Bakteriophagensuspension, welche spezifisch Listerien abtöten soll, nennt sich Listex P100. Der Phagentiter der Lösung beträgt laut Herstellerangaben 1×10^{12} PbE/ml. Der enthaltene Phage hat ein besonders breites Wirkspektrum gegen Listerien (Heller, Fieseler and Loessner 2011, 85). Ein Produkt, welches all diese Anforderungen erfüllt, könnte für die Lebensmittelindustrie von großer Bedeutung sein. Das Zitat von Napoleon I. Bonaparte (1769 – 1821) zeigt, welcher grundlegender Gedanke dieser Methode zugrunde liegt: „Der Feind meines Feindes ist mein Freund“. Diesen

Grundgedanken will man sich in der Mikrobiologie durch Bakteriophagen zu Nutzen machen. Bakteriophagen sind die natürlichen Feinde von Bakterien.

Die amerikanische FDA (Food and Drug Administration) Organisation hat den Bakteriophagen P100 als allgemein sicher anerkannt (De Meester and Offenhaus 2011). Besonders interessant für die folgenden Untersuchungen ist der Bereich der Wirksamkeit des Produkts gegen Listerien. Eine zuverlässige Wirkungsweise der Produkte ist für die Industrie unverzichtbar. Auch die beworbene einfache Handhabbarkeit des Produktes soll näher beleuchtet werden.

Laut Unternehmensbroschüre (2010) wurde das Produkt Listex P100 bereits mit dem FIE Gold Award „The Best Innovation in Food Ingredients 2007“ ausgezeichnet. Die Auszeichnung wird als eine Bestätigung von der Industrie angesehen, dass der Einsatz von Bakteriophagen in Zukunft zu einem industriellen Standard werden könnte.

3.3 Methodenbeschreibung: Einsatz von Phagen gegen pathogene Bakterien

Die Abtötung von Listerien mittels Bakteriophagen ist eine neue, relativ unerforschte Methode. Der von EBI Food Safety verwendete Bakteriophage P100 infiziert spezifisch *Listeria spp.* Durch die Injektion von Phagen DNA in die Wirtszellen (Listerien), werden diese in Folge abgetötet.

Es wurden bereits Versuche während der Reifung von Rotschmierkäse durchgeführt. Eine Reduktion der pathogenen Listerien in Abhängigkeit von Phagendosis und der Anwendungsintervalle bis hin zu einer vollständigen Abtötung konnte verzeichnet werden (Carlton, et al. 2005, 312). Bei diesen Untersuchungen ist zu beachten, dass einer der Autoren des Artikel, Dirk De Meester, der Director of Business Development der Herstellerfirma des Produktes Listex P100 EBI Food Safety ist. Eine weitere Untersuchung von A. Holck und J. Berg hat bei der Verwendung von virulenten Phagen in Kombination mit Schutzkulturen im Produkt Kochschinken eine Reduktion des Listerienvorkommens aufzeigen können. Darüber hinaus sind Veröffentlichungen über mögliche Anwendungsgebiete des Produktes Listex P100 noch recht begrenzt. Zum einen liegt dies an der Aktualität des Forschungsgegenstandes, zum anderen werden vermutlich nicht alle Forschungsergebnisse publiziert. Das Interesse und der Forschungsbedarf sind daher sehr

groß. Dies wird ebenfalls deutlich, da bereits auf Verlangen des Generaldirektors für Gesundheit und Verbraucher der Europäischen Kommission 2009 ein wissenschaftliches Gutachten zum Thema „Die Verwendung und Wirkungsweise von Bakteriophagen in der Lebensmittelerzeugung“ von der EFSA (European Food Safety Authority) erstellt wurde. Als Hauptergebnis konnte lediglich folgender Zusammenhang festgestellt werden: „Die Verringerung der Bakterienpopulation ist umso größer, je höher das Verhältnis von Bakteriophagen zur Wirtszelle ist“.

Das Gremium für Biologische Gefahren empfiehlt die Erstellung eines Leitliniendokuments, in dem Daten zur Entfernung von Oberflächenkontaminationen von Lebensmitteln tierischer Herkunft mittels Bakteriophagenbehandlung gesammelt und evaluiert werden können (EFSA 2009, 2-26). Anhand dieser Empfehlungen ist zu erkennen, dass die neue prophylaktische Methode zur Bekämpfung von Listerien nicht nur für die Lebensmittelindustrie, sondern auch für öffentliche Einrichtungen von großem Interesse ist.

Eine weitere denkbare Anwendung von virulenten Bakteriophagen, wäre der Einsatz zur Dekontamination von Industriemaschinen (Guenther, et al. 2009, 99).

3.4 Problematik der Anwendung von Listex P100 im Produkt Zwiebelmettwurst

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert, gibt es bisher relativ wenige Publikationen über den Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien bei unterschiedlichen Lebensmitteln. Hinzu kommt, dass der rechtliche Rahmen der Verwendung von Bakteriophagen in Lebensmitteln noch nicht ausreichend in allen Ländern geklärt ist. Im Kapitel „3.6 Rechtliche Problematik / Deklaration Listex P100“ wird genauer auf diese Problematik in Deutschland eingegangen. Auf Grund dieser Fakten ist es auch nicht ersichtlich, inwiefern Phagen in der Lebensmittelindustrie in Deutschland bereits verwendet werden.

Lediglich in der Tageszeitung der „Tagesanzeiger“ konnte man eine Einschätzung bezüglich der aktuellen Verwendung von Bakteriophagen in der Lebensmittelindustrie finden. In dem „Tagesanzeiger“ wurde bereits 2008 berichtet, dass Fischverarbeiter Bakteriophagen in das Waschwasser geben, mit dem die Fische nach dem Entgräten gesäubert werden. Auch Weichkäsehersteller würden laut Tagesanzeiger bereits die neue

Methode verwenden (Fosgreen 2008). Nach Steven Hagens (Chief Scientific Officer von EBI Food Safety) sind die Hauptanwendungsgebiete ihres Produktes, wie der Tagesanzeiger veröffentlichte, geschmierter Käse und Lachs. Mit der Behandlung von Produkten aus rohem Schweinefleisch hingegen hat EBI Food Safety selbst noch keine Erfahrungen gemacht. Dies liegt daran, dass nur in Deutschland rohes Schweinefleisch in Form von Zwiebelmettwurst verzehrt wird. In anderen europäischen Ländern ist dies traditionell nicht der Fall.

Der Einsatz von Bakteriophagen im Produkt Zwiebelmettwurst stellt insofern eine Herausforderung dar, als dass es sich um ein festes Produkt handelt. Bakteriophagen können sich nicht aktiv bewegen, so dass sie direkt mit den Listerien in Kontakt gebracht werden müssen (Heller, Fieseler and Loessner 2011, 11). Bei dem Produkt Schweinefleisch, ist gewöhnlich lediglich die Oberfläche des Rohmaterials mit Listerien kontaminiert, so dass die Behandlung der Oberfläche des Rohstoffes zu einer signifikanten Abnahme der Listerienpopulation führen sollte. Würde man die Phagen direkt in das fertige Brät geben, ist selbst bei höchsten Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass die Phagen auf Listerien treffen. Daher wird in den folgenden Untersuchungen die Oberfläche des Schweinefleisches behandelt.

3.5 Alternative Methode: Schutzkultur Holdback 261 der Firma Danisco

Neben dem prophylaktischen Einsatz von Bakteriophagen zur Eliminierung von Listerien, wird ebenfalls die Schutzkultur Holdback 261 auf ihre Wirksamkeit hin untersucht. Die Schutzkultur Holdback 261 besteht aus folgenden Mikroorganismen: *Staphylococcus xylosum*, *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantum*. *Staphylococcus xylosum* dient hauptsächlich der Reifung und Aromabildung. *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantum* wirken unterdrückend auf unerwünschten Mikroorganismen. *Lactococcus lactis* erzeugt durch kompetitive Hemmung eine Konkurrenzflora für pathogene Bakterien, d.h. diese werden durch Verdrängung unterdrückt. *Lactobacillus plantum* produziert neben Milchsäure ein Bacteriocin (Pediocin PA-1), welches ebenfalls zur Abtötung von Listerien beitragen kann. Als Trägerstoff dient Dextrose.

Nach Herman Sloom (Sales Manager von Danisco Holland) wird die Schutzkultur bereits erfolgreich bei anderen Rohwurstprodukten wie Salami verwendet. Diese Rohwurstprodukte werden im Gegensatz zur Zwiebelmettwurst warm fermentiert. In den Untersuchungen soll herausgefunden werden, ob trotz der niedrigen Temperaturen der Einsatz der Schutzkultur zur Abtötung von Listerien möglich ist. Die oben stehenden Informationen, beziehen sich auf die Aussagen von dem Sales Manager der Firma Danisco Herman Sloom, bzw. sind der Produktbeschreibung im Anhang auf S.20 zu entnehmen.

3.6 Ethischer Aspekt des Einsatzes von Bakteriophagen gegen Listerien

Bei einem positiven Ergebnis der folgenden Untersuchungen würde der Einsatz von Bakteriophagen zu einer erheblichen Steigerung der Lebensmittelsicherheit führen. Die Verwendung der prophylaktischen Methode wäre dann von Nutzen für die Gesellschaft. Demgegenüber steht, dass Bakteriophagen von der Klassifikation her zu den Viren zählen. Denn Bakteriophagen sind Viren, die Prokaryoten als Wirtszellen benutzen. Viren können eine Vielzahl von Krankheiten beim Menschen auslösen. Jedoch sind nicht alle Viren humanpathogen. In der Gesellschaft wird das Wort Virus, dessen ungeachtet fast zwangsläufig mit etwas Negativen assoziiert, etwas was Krankheiten auslösen kann. Eine Verwendung von Viren in Lebensmitteln stellt für den unaufgeklärten Konsumenten eine große Herausforderung dar. Es müsste eine Menge Aufklärungsarbeit geleistet werden, bevor der Konsument eine Aufführung von Bakteriophagen in der Zutatenliste von Lebensmitteln akzeptieren oder vielleicht sogar begrüßen würde.

Die Deklaration von Bakteriophagen in Deutschland befindet sich rechtlich noch in einer Grauzone. Sollte es zu dem Entschluss kommen, dass man gesetzlich den Einsatz von Bakteriophagen im Produkt nicht kennzeichnen muss, so würde der Konsument unwissend bleiben. Die betreffenden Bakteriophagen stellen zwar keine gesundheitliche Gefahr dar, jedoch ist ein Verschweigen des Einsatzes nicht im Sinne des mündigen Verbrauchers. Wird hingegen der Einsatz sichtbar auf dem Produkt deklariert, kann man die Reaktionen des Verbrauchers nur wage abschätzen. Trotz gesundheitlicher Unbedenklichkeit und eventuellem Nutzen bei der Verwendung von Phagen, muss davon ausgegangen werden, dass es Konsumenten geben wird, die die Verwendung von Bakteriophagen in Lebensmittel kritisch betrachten. Mögliche Gründe sind vielfältig.

Der Kauf von Lebensmitteln geschieht oftmals spontan und aus emotionalen Gründen. Eine Verpackung auf der Viren deklariert sind, wird vermutlich gegenüber herkömmlichen Produkten eher schlechter verkauft.

3.7 Rechtliche Problematik / Deklaration Listex P100

In Deutschland sind bisher noch keine speziellen gesetzlichen Regelungen für den Einsatz von Bakteriophagen getroffen worden. Festzuhalten ist, dass die Sicherheit, der in den Verkehr gebrachten Lebensmitteln besonders wichtig ist. Dieser zentrale Grundsatz ist im Artikel 14 der VO EG 178/2002 vorgeschrieben. Lebensmittel müssen demnach auf jeden Fall für den Verbraucher sicher und bekömmlich sein.

Beim Einsatz von Bakteriophagen würde dieser Grundsatz ebenso gelten und zwar unabhängig von dem konkreten technologischen Einsatz der Bakteriophagen. Dies bedeutet, dass eine Einstufung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Bakteriophagen für die Verwendung nötig ist. Diese Einstufung muss von der Wissenschaft geliefert werden. Die VO EG 178/2002 enthält zur Einstufung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit keine weiteren Anforderungen. „Es genügt der wissenschaftlich-fachliche Beleg für die Sicherheit des Lebensmittels, dessen Validität im Streitfall von Behörden und Gerichten zu überprüfen ist“ (Dr. Teufer and Dr. Jagow 2007, 33).

Man kann davon ausgehen, dass von Bakteriophagen keine gesundheitliche Gefährdung für den Menschen ausgeht. Die amerikanische FDA Organisation hat das Produkt Listex P100 als gesundheitlich unbedenklich eingestuft („Generally Recognized As Safe – GRAS“). Die Verwendung des Produktes ist in Amerika rechtlich abgesichert (De Meester and Offenhaus 2011).

In Deutschland ist hinsichtlich der Verwendung von Bakteriophagen zur Dekontamination von Lebensmitteloberflächen neben der Einstufung zur gesundheitlichen Unbedenklichkeit desweiteren eine Zuordnung in eine lebensmittelrechtliche Kategorie für die rechtliche Beurteilung nötig. Besonders interessant ist dies im Hinblick auf die Deklarationspflicht. Offensichtlich ist, dass Bakteriophagen nicht als gewöhnliche Zutat im Sinne des LFGB eingeteilt werden können. Die Zuordnung zwischen Zusatzstoff und Verarbeitungshilfs-

stoff ist indessen rechtlich nicht ganz so offensichtlich. Laut LFGB sind Zusatzstoffe wie folgt definiert:

„Lebensmittel-Zusatzstoffe sind Stoffe mit oder ohne Nährwert, die in der Regel weder selbst als Lebensmittel verzehrt noch als charakteristische Zutat eines Lebensmittels verwendet werden und die einem Lebensmittel aus technologischen Gründen beim Herstellen oder Behandeln zugesetzt werden, wodurch sie selbst oder ihre Abbau- oder Reaktionsprodukte mittelbar oder unmittelbar zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden oder werden können“ (LFGB 2005, 4).

Bei Bakteriophagen besteht der technologische Grund in der Dekontamination der Rohstoffe. Während der Verwendung können Bakteriophagen als Zusatzstoff mittelbar oder unmittelbar zu einem Bestandteil des Lebensmittels werden, was bei der tatsächlichen Verwendung auch geschieht. Bei der rechtlichen Einordnung von Bakteriophagen als Zusatzstoff würde dies für die Deklaration eine verpflichtende E-Nummer auf der Zutatenliste bedeuten, welche allgemein beim Konsumenten nicht positiv wahrgenommen wird. Ein „Clean Labeling“ ohne E-Nummern wäre für Produkte, welche mit Bakteriophagen behandelt worden sind unter diesen Umständen nicht mehr möglich.

Die Zusatzstoffrahmenrichtlinie 89/107/EWG nach Artikel 1 Abs. 3a gilt allerdings nicht für Verarbeitungshilfsstoffe bzw. nach § 2 Abs. 3 Nr. 1 LFGB gelten Verarbeitungshilfsstoffe nicht als Zusatzstoffe. (Dr. Teufer and Dr. Jagow 2007, 15). Verarbeitungshilfsstoffe sind Im LFGB folgend definiert:

„Stoffe, die nicht selbst als Zutat eines Lebensmittels verzehrt werden, jedoch aus technologischen Gründen während der Be- oder Verarbeitung von Lebensmitteln verwendet werden und unbeabsichtigte, technisch unvermeidbare Rückstände oder Abbau- oder Reaktionsprodukte von Rückständen in gesundheitlich unbedenklichen Anteilen im für die Verbraucherin oder den Verbraucher bestimmten Lebensmittel hinterlassen können, die sich technologisch nicht auf dieses Lebensmittel auswirken“(LFGB 2005, 4).

Je nach Bakteriophagen-typ, Dosierung und Anwendung können unvermeidbare Rückstände von Bakteriophagen im Endprodukt enthalten sein, was der Definition von Verarbeitungshilfsstoffen nahe käme. Desweiteren muss die gesundheitliche Unbedenklichkeit geklärt werden. Die Voraussetzung, dass die Bakteriophagen sich nicht technologisch auf das Enderzeugnis auswirken dürfen, ist hingegen kritisch zu betrachten. Es ist

wahrscheinlich nicht auszuschließen, dass ein Teil der Bakteriophagen im Enderzeugnis als aktive Form noch vorliegt. Diese Überdosierung wird von der Industrie sogar eingefordert werden, um die Wirksamkeit der Bakteriophagen zu sichern. Möglicherweise können Bakteriophagen auch vor einer erneuten Kontamination vor pathogenen Bakterien schützen. Eine wünschenswerte Eigenschaft, die damit allerdings die Bakteriophagen von den Verarbeitungshilfsstoffen ausschließen würden, da sie sich dann technologisch im Endprodukt auswirken würden.

Solange wissenschaftlich belegt werden kann, dass Bakteriophagen keine technologische Wirkung im Endprodukt haben, muss man Bakteriophagen als Verarbeitungshilfsmittel einordnen. Um zu prüfen, ob eine Zuteilung zu den Verarbeitungshilfsstoffen möglich ist, wurde im Kapitel 5.3.1 eine Untersuchung zum Nachweis von aktiven Bakteriophagen im Enderzeugnis durchgeführt.

Scheidet die Einordnung zu den Verarbeitungshilfsstoffen aus, so ist die naheliegende Zuordnung die der Zusatzstoffe (Dr. Teufer and Dr. Jagow 2007, 23). Zusatzstoffe dürfen nur nach vorheriger Zulassung im Produkt mit entsprechender Kennzeichnung verwendet werden. „Nach deutschem Recht (§ 6Abs. 2 LFGB) findet das in § 6Abs. 1 Nr. 1 a LFGB enthaltene Verbot für nicht zugelassene Zusatzstoffe keine Anwendung auf Enzyme und Mikroorganismuskulturen“ (Dr. Teufer and Dr. Jagow 2007, 20). Da Bakteriophagen biologisch betrachtet zu der Welt der Mikroorganismen gehören, könnte man soweit gehen und sie als Mikroorganismenkultur betrachten. Damit würden sie von der Zulassungspflicht befreit sein. Anknüpfend wären Bakteriophagen somit ein Zusatzstoff, der nicht zugelassen werden muss.

Wie man deutlich erkennen kann ist die Zuordnung von Bakteriophagen in den rechtlichen Rahmen recht schwierig. Der Einsatz von Bakteriophagen befindet sich zurzeit in einer rechtlichen Grauzone. Sicherlich werden in Zukunft Entscheidungen getroffen, die die gesetzliche Problematik beim Einsatz dieser neuen technologischen Methode klären werden.

4 Vorbereitende Untersuchungen

4.1 Auswahl von Listerienstämmen durch Feintypisierung

4.1.1 Identifizierung von *Listeria monocytogenes*

Für die Untersuchungen wurden Listerien verwendet, die während Analyseuntersuchungen im Institut Dr. Erdmann isoliert wurden. Um möglichst Listerien zu erhalten, welche typischerweise in Zwiebelmettwurst auftreten können, wurde darauf geachtet, dass die Proben aus Schweinefleisch oder Hackfleisch stammen. Damit nach Abschluss dieser Arbeit ein Zugriff auf die betreffenden Listerienstämme möglich ist, wurden die *Listeria monocytogenes* Isolate in die Stammsammlung des Instituts Dr. Erdmann übernommen. Die biochemische Identifikation der Bakterien wurde mittels API Listeria Streifen durchgeführt. Die Eigenschaften des Listerienisolates können durch Farbumschläge in den Kammern beobachtet werden. Mittels der Farbumschläge wird die Reaktion des Isolates als positiv oder negativ ausgewertet. Anhand der Kombination der Reaktionsergebnisse kann mittels einer Datenbank von Biomerieux die Species erkannt werden. Mit einer statistischen Sicherheit von 98,6% handelt es sich bei dem Listerienisolat ED 760 um die Spezies *Listeria monocytogenes*. Im Anhang auf den Seiten 1-2 ist beispielhaft das Ergebnis des API Listeria Streifens des Listerienisolates ED 760 zu finden, sowie die Betriebsanleitung des verwendeten API Systems.

Mit Hilfe dieser Methode wurden vierzehn Listerienisolate als *Listeria monocytogenes* identifiziert. Elf der Isolate stammen aus Schweinefleisch und drei aus Hackfleisch. Alle vierzehn Listerienisolate gehören der Spezies *Listeria monocytogenes* an, da *Listeria monocytogenes* die „lebensmittelhygienisch bedeutendste Spezies darstellt“ und die Spezies *L. ivannovii* äußerst selten als Krankheitserreger des Menschen in Erscheinung tritt (Bülte 2008, 14).

Da verschiedene Isolate von *L. monocytogenes* sich untereinander in ihren Eigenschaften unterscheiden können, werden für die Hauptuntersuchung möglichst viele verschiedene *L. monocytogenes* Stämme verwendet. Die Feintypisierung der *L. monocytogenes* Isolate wurde anschließend mittels einer PCR basierten Methode durchgeführt.

4.1.2 Feintypisierung mittels REP - PCR und Gelelektrophorese

Um die verschiedenen Isolate von *L monocytogenes* weiter zu differenzieren, wurde zunächst die DNA der Bakterien isoliert. Die Methodenvorschrift zur manuellen Isolation genomischer DNA aus Bakterien des Dr. Erdmann Instituts liegt im Anhang auf Seite 4 vor. Es gab keine Abweichung von der Methodenvorschrift.

Bei der REP - PCR (repetitive element PCR fingerprinting) wird ein Primer verwendet, der an repetitive DNA Elemente der Bakterien bindet. Auf diese Weise können verschiedene Isolate anhand ihres Bandenmusters unterschieden werden (Versalovic, Koeuth und Lupski 1991, 6824). Mittels solcher REP - PCR wurden spezifischen DNA Fragmente der Listerien Isolate vervielfältigt, um diese später durch eine Gelelektrophorese auftrennen zu können. Die REP-PCR erfolgte in einem Volumen von 25µl und folgenden Reaktionsbedingungen: 12,5 mM Tricine; 42,5 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 20pmol Primer; 6% Dextran 5µl DNA; 1,2 U Crimson Taq Polymerase (NEB BioLabs) bei einem pH- Wert von 8,5.

Um eine gute Differenzierung zu erhalten, wurden zwei unterschiedliche Primer verwendet, welche bei Eurofins MWG Operon bezogen wurden:

- Box-A1R (5'-ctacggcaaggcgacgctgacg-3')
- GTG- 5 (5'-gtggtggtggtggtg-3')

Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in den ThermalCycler C100 der Firma BioRad vorschriftsmäßig eingelegt. Bei folgendem Temperaturzyklus wurde die isolierte DNA vervielfältigt: zwei Minuten bei 95°C, danach 35 Zyklen jeweils 10 Sekunden bei 95°C, 40 Sekunden bei 40°, 120 Sekunden bei 68°C und nach diesen 35 Zyklen wurden die Proben nochmals 5 Minuten auf 68°C gehalten und zum Abkühlen fünf Minuten bei 5°C. Die erhaltenen Proben wurden nach dieser Behandlung direkt in die Geltaschen des Elektrophorese Gels pepitiert.

Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in einem Agarose Gel (1,5 % Agarose in TAE Puffer: 1mM EDTA, 50mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan- Acetat und 0,25µM Ethidiumbromid) in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer. 10µl der Proben wurden in nachstehender Reihenfolge in die Geltaschen pepitiert, und bei einer Feldstärke von 5V/cm wurden die DNA Fragmente aufgetrennt:

Ref., IDE 46, IDE 47, IDE 16, IDE 38, IDE 48, IDE 49, IDE 50,

IDE 53, IDE 65, IDE 66, IDE 67, IDE 68, IDE 71, ED 760.

Bei Proben mit folgender Nummer: IDE 46, IDE 47 und ED 760, handelt es sich um *Listeria monocytogenes* Stämme, die aus Hackfleisch gewonnen wurden. Die übrigen Proben stammen aus Schweinefleisch.

4.1.3 Ergebnisse der Feintypisierung

Nachfolgend ist ein Foto der durchgeführten Gelelektrophorese von einem Geldokumentationssystem der Firma BIORAD abgebildet.

BOX

GTG

Ref 46 47 16 38 48 49 50 53 65 66 67 68 71 760 Ref 46 47 16 38 48 49 50 53 65 66 67 68 71 760

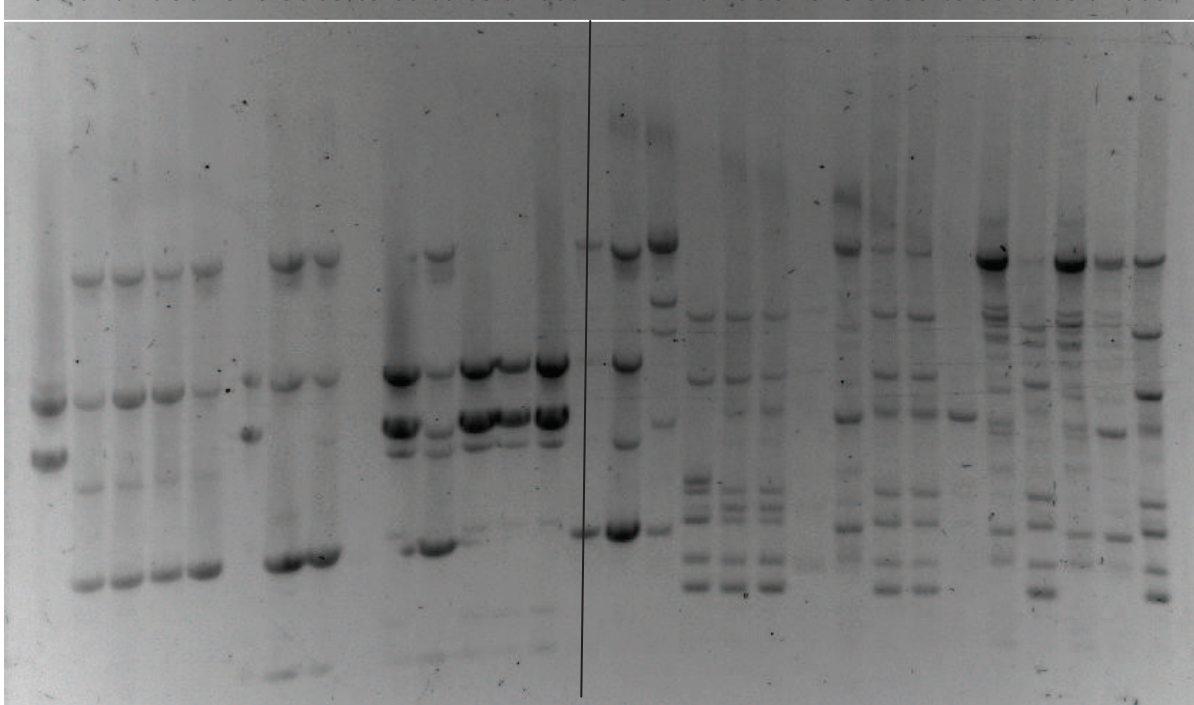


Abbildung 2: Gelelektrophorese: Feintypisierung der *Listeria monocytogenes* Isolate

Zu erkennen sind die Bandenmuster von jeweils fünfzehn *Listeria monocytogenes* Isolat. Links wurde die PCR mit dem Primer Box-A1R und rechts mit dem Primer (GTG)₅ durchgeführt.

4.1.4 Diskussion der Ergebnisse der Feintypisierung

Genetisch ähnliche bzw. identische *L. monocytogenes* Stämme sind durch gleiche Bandenmuster zu erkennen. Die Validität der Ergebnisse wird noch erhöht, sobald bei zwei Listerienisolate, bei beiden Primern ein ähnliches Bandenmuster zu erkennen ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um identische *L. monocytogenes* Stämme handelt, ist dann besonders groß. Im Hauptversuch sollen viele verschiedene Listerienstämme eingesetzt werden, um ein für Zwiebelmettwurst repräsentatives Inokulum zu erhalten. Anhand der Bandenmuster werden fünf verschiedene *Listeria monocytogenes* Stämme: IDE 49, IDE 67, IDE 16, IDE 68 und der Referenzstamm DSM20600 ausgewählt.

Die Bandenmuster der Stämme IDE 49 und IDE 50 sind bei den Box-Primer identisch und bei dem GTG Primer ähnlich. Der Stamm IDE 49 wurde für die weiteren Versuche ausgewählt. Desweiteren wurde der Listerienstamm IDE 67 aufgenommen, da dieser bei dem Durchlauf mit den Box-Primer identische Bandenmuster mit den IDE 65, 71 und 68 aufweist. Bei dem Listerienstämmen IDE 16, 38, 46 und 47 sind die Bandenmuster bei den Box Primern identisch. Daher wurde sich für einen Listerienstamm dieser Gruppe entschieden: IDE 16. Als letzten Listerienstamm wurde die IDE 68 in den Auswahlpool aufgenommen, da dieser beim GTG Primer Durchlauf mit der IDE 66 identisch ist und auch beim Box Primer identische Bandenmuster mit mehreren Listerienstämmen aufweist (IDE 67, 65 und 71).

4.2 Titer Bestimmung des Produktes Listex P100 und Empfindlichkeitstest

4.2.1 Durchführung: Empfindlichkeitstest und Titer Bestimmung

Parallel zu den Untersuchungen für die Auswahl von Listerienstämmen wurde ein Empfindlichkeitstest mit dem zu untersuchendem Produkt Listex P100 gemacht. Ziel des Tests war es herauszufinden, inwieweit die Listerienstämmen sensitiv gegenüber den Phagen P100 sind und eventuelle resistente Listerienstämmen zu identifizieren. Da bei dem Produkt Listex P100, welches für die Untersuchungen verwendet werden soll, das Mindesthaltbarkeitsdatum um acht Wochen überschritten war, wurde ebenfalls der Phagentiter der Suspension bestimmt. Nach Ablauf der Mindesthaltbarkeit ist eine Reduktion des Phagentiters zu erwarten. Laut EBI Food Safety kann mit dem vorliegenden Produkt gearbeitet werden, wenn der Phagentiter noch hoch genug ist. Dazu wird die Anzahl der Phagen ermittelt, die Bakterienzellen infizieren, sich in diesen vermehren und somit Plaques ausbilden (PbE). Die Firma EBI Food Safety stellte freundlicherweise auf Nachfrage eine Arbeitsanweisung zur Verfügung. Diese ist im Anhang auf Seite 3 zu finden.

Zudem wurde im Empfindlichkeitstest alle Listerienisolate auf mögliche Resistenzen untersucht. Vorab wurden die empfohlenen Nährböden hergestellt: Soft-Agar Nährböden, feste Agar Nährböden und flüssige Nährmedien. Für den Soft Agar Nährboden wurde ein ½ starker BHI empfohlen, der insgesamt 5 g/l Natriumchlorid und 0.4% Agar enthält, und der feste Nährboden enthält 1,2% Agar. Diese wurden nach den Herstellerangaben zubereitet und autoklaviert. Außerdem wurden Übernachtskulturen der *L. monocytogenes* Stämme angelegt, bei denen die Empfindlichkeit gegenüber dem Phagen P100 auf Nährböden getestet werden sollte.

Folgend wurden vierzehn Röhrchen mit 5ml des zuvor erwärmten flüssigen soft Agar gefüllt und 200µl der Übernachtskulturen hinzu pepitiert. Anschließend wurden feste ½ BHI Agar-Nährböden mit der Bakteriensuspension beimpft. Auf die beimpften Nährböden wurden anschließend 10µl verschiedener Verdünnungen von Listex P100 aufgebracht. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Als Puffer diente SM-Puffer (100mM NaCl, 10mM MgSO₄, 50mM Tris-HCL, pH-Wert: 7,5).

Folgende neun Verdünnungen wurden auf Nährböden mit der Menge von 10µl aufgetragen:

- | | | | |
|----|--------------------|----|--------------------|
| 1. | pur | 6. | 1:10 ⁷ |
| 2. | 1: 100 | 7. | 1:10 ⁸ |
| 3. | 1: 10 ⁴ | 8. | 1:10 ⁹ |
| 4. | 1: 10 ⁵ | 9. | 1:10 ¹⁰ |
| 5. | 1:10 ⁶ | | |

Die Positionierung der verschiedenen Phagen Konzentrationen auf den Nährböden, erfolgte nach dem Schema, welches auf der unteren Grafik zu erkennen ist.

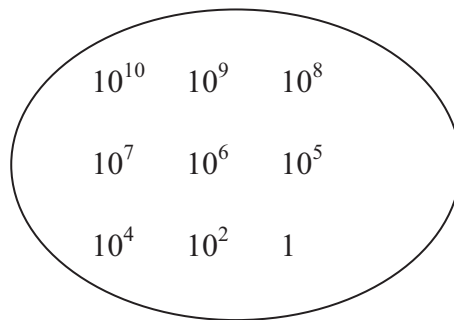


Abbildung 3: Auftragschema der verschiedenen Verdünnungsstufen des Listex P100

4.2.2 Ergebnisse: Empfindlichkeitstest und Titer Bestimmung

Nach der Bebrütungszeit von einem Tag bei 25°C konnten folgende Ergebnisse verzeichnet werden: Der Listerienstamm IDE 13 reagiert am sensitivsten auf die Phagenbehandlung. Bei der Verdünnung von 1:10⁸ konnten acht Plaques gezählt werden. Der Phagentiter beträgt demnach 8x10¹⁰ PbE/ml. Das folgende Foto zeigt den Listerienstamm IDE 68:

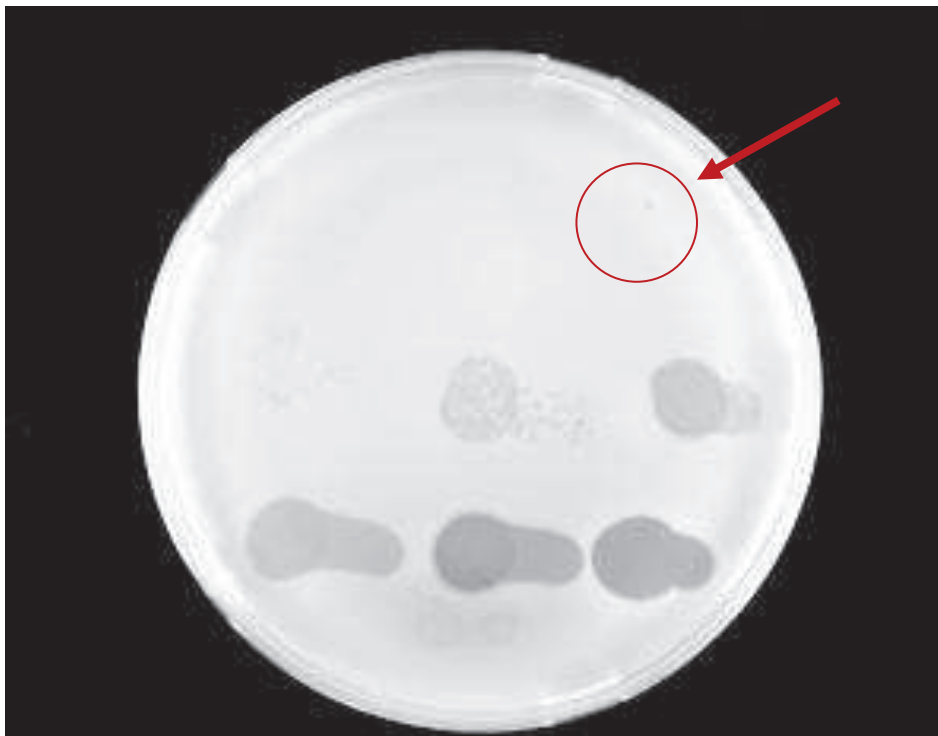


Abbildung 4: Phagen Titer Bestimmung beim Listerienstamm IDE 68

Die ovalen Formen der Lysishöfe sind entstanden, da die Nährböden bereits in den Brutschrank transportiert wurden, als die Phagenlösung noch nicht komplett eingetrocknet war.

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Empfindlichkeitstest

Der Empfindlichkeitstest zeigt, dass bei allen Listerienstämmen mindestens bei der unverdünnten Phagenlösung eine Plauebildung zu erkennen ist. Demzufolge ist keiner der untersuchten Listerienstämme resistent gegenüber des Phagens P100. Bei der unverdünnten Suspension ist stets eine konfluente Lyse zu erkennen. Dies liegt an der sehr

hohen Phagenkonzentration von 8×10^{10} PbE/ml (Titer der Bakteriophagenlösung). Dieser hohe Wert steht der Anzahl der Bakterien gegenüber. Erfahrungsgemäß hat eine ausgewachsene Kolonie Kultur 1×10^9 Bakterienzellen pro ml. Da 200 μ l Kultur 5ml Softagar inokuliert wurden, sind auf dem Nährboden 2×10^8 KbE (Kolonie bildende Einheit). Pro lysierte Fläche (ca. 1 cm^2 , entspricht in etwa der Fläche der aufgetragenen Phagensuspension) entspricht dies 4×10^6 KbE/ cm^2 . Dem gegenüber stehen auf dieser Fläche bei der höchsten Konzentration 8×10^8 PbE/ cm^2 Phagen (Phagentiter: 8×10^{10} PbE/ml = 8×10^8 PbE/10 μ l).

Dies bedeutet, dass bei der höchsten Konzentration 200 Phagen auf eine Bakterienzelle kommen, so dass man davon ausgehen kann, dass jede Bakterienzelle einen Phagen trifft. Nimmt die Konzentration der Phagen allerdings ab, so ist zu erkennen, dass nicht alle Listerien klare Hemmhöfe bilden. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass die Phagen zwar die betreffenden Zellen infizieren und abtöten, aber nicht in der Lage sind, sich zu vermehren. In der Folge entsteht nur eine trübe Lysiszone, auf dem noch Listerien vorhanden sind und sich vermehren können, sobald alle Phagen „aufgebraucht“ sind. Beispielweise ist auf dem folgenden Foto die Reaktion des Listerienstammes IDE Nummer 67 mit dem Phagen P100 zu erkennen.

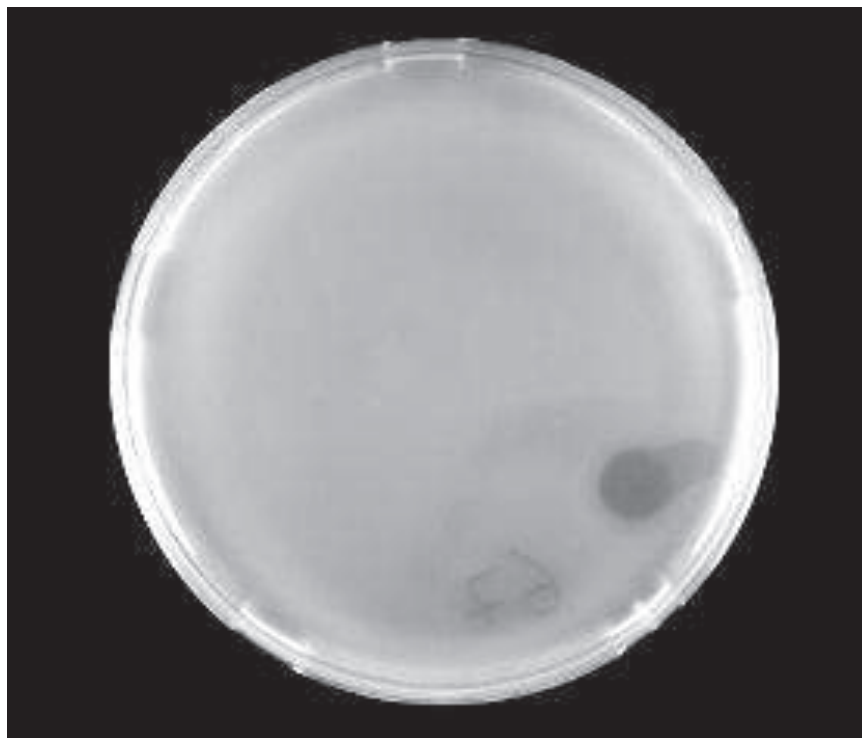


Abbildung 5: Phagen Titer Bestimmung beim Listerienstamm IDE 67

Bei der höchsten Konzentration kann man eine deutliche Lyse erkennen. Bei der 1:100 Konzentration ist nur noch eine sehr schwache, trübe Lysezone sichtbar. Bei dem Listerienstamm IDE 67 hingegen ist bis zum Verhältnis 1:1000 eine klare Plauebildung zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Vermehrung der Phagen innerhalb der Bakterienzelle schließen lässt.

5 Hauptuntersuchungen

5.1 Vorbereitung: Beimpfen des Rohmaterials

Vorbereitend für die Hauptversuche wurde die Oberfläche des Fleisches mit einer Suspension kontaminiert, welche vier repräsentative *L. monocytogenes* Stämme aus Schweinefleisch enthält. Diese Stämme konnten durch die Feintypisierung mittels PCR ausgewählt werden (IDE 49, IDE 16, IDE 67, IDE 68). Zu den vier aus Schweinefleisch isolierten Stämmen, wurde zusätzlich der Referenzstamm DSM 20600 eingesetzt. Über Nacht wurden diese Stämme bei Raumtemperatur in $\frac{1}{2}$ BHI angereichert. Für die Anlegung der Inokulationssuspension wurden jeweils 1ml der fünf angelegten Übernachtskulturen in ein 50ml Gefäß pepitiert und dann auf 50ml mit Ringer Lösung aufgefüllt. Um die Bakterienanzahl exakt einstellen zu können, wurde die Anzahl der Bakterien in der Bakterienlösung untersucht. Dazu wurde wie folgt eine Verdünnungsreihe angelegt. 1000 μ l Bakteriensuspension wurde in 9 ml Ringerlösung pepitiert, um eine 1:10 Verdünnung zu erreichen. Die Verdünnungsreihe wurde bis zum Verdünnungsfaktor 5 hergestellt, wobei zwischen jeder Stufe eine 1:10 Verdünnung vorgenommen wurde. Von der vierten und fünften Verdünnungsstufe wurde daraufhin 100 μ l auf PC Platten spiralisiert und bei 37°C bebrütet.

Die manuelle Auszählung der fünften Verdünnungsstufe ergab 250 Kolonien. Demnach sind in dieser Verdünnungsstufe noch $2,5 \times 10^3$ KbE/ml. In der Stammlösung müssten folglich $2,5 \times 10^8$ KbE/ml enthalten sein. Die Auszählung der vierten Verdünnungsstufe erfolgte mittels eines Countermats und ergab $2,3 \times 10^4$ KbE/ml. Die Ergebnisse liegen recht nah beieinander. Da die manuelle Auszählung der niedrigeren Konzentration genauer ist, wurde sich an diesem Wert orientiert. Nachfolgend sind Fotos der bebrüteten PC Platten zu sehen:

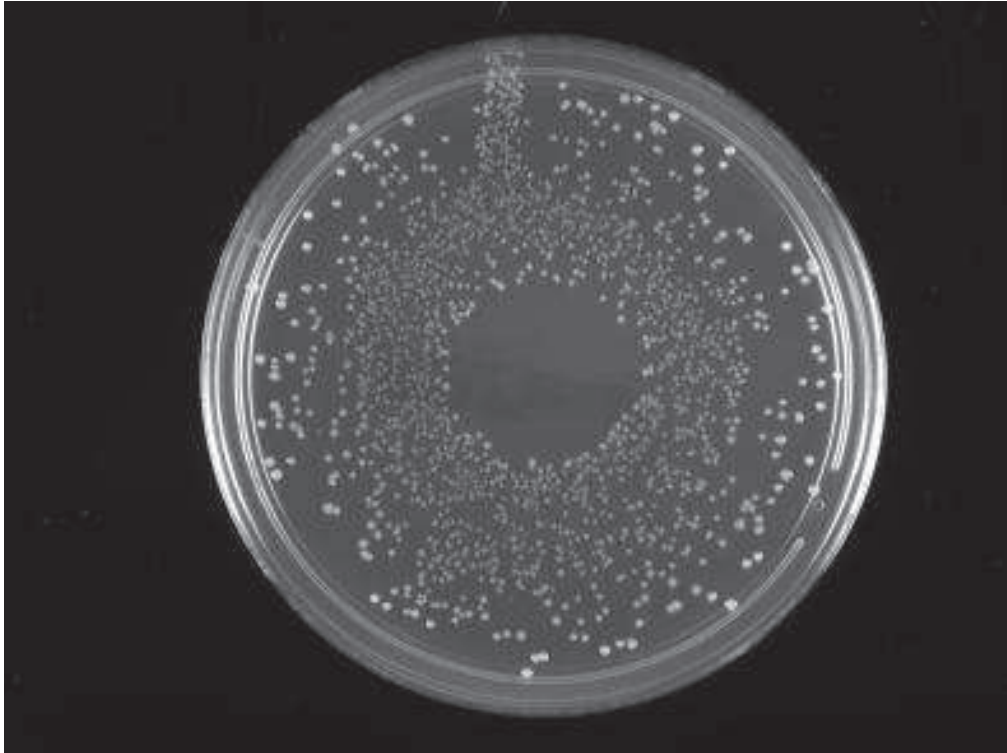


Abbildung 6: Bestimmung der Bakterienanzahl, Verdünnungsstufe 4

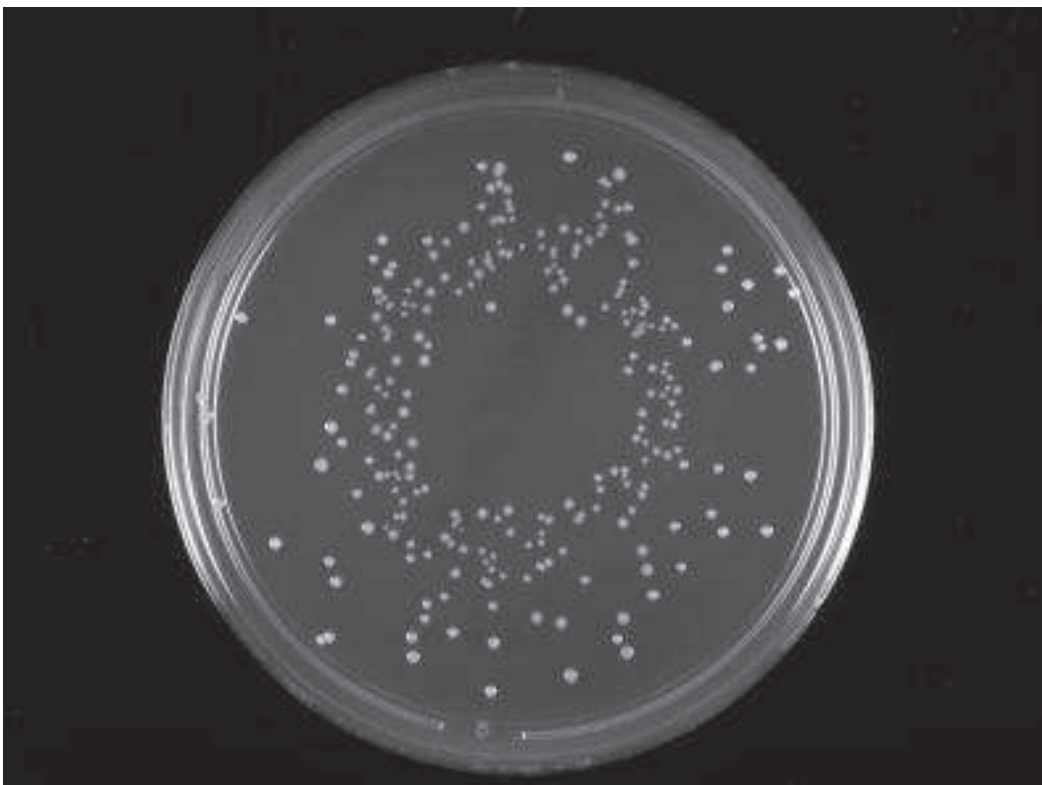


Abbildung 7: Bestimmung der Bakterienanzahl, Verdünnungsstufe 5

Desweiteren konnte durch diese Untersuchung sicher gestellt werden, dass die verwendete Listeriensuspension keine Kontaminationen anderer Bakterien enthält. Wie auf dem Fotos zu erkennen, sind alle Kolonien gleichmäßig, mit glatten Rand und weißlich glänzend auf der PC Platte gewachsen.

Bei der Auswahl der Inokulationsdichte von *Listeria monocytogenes* musste ein Kompromiss zwischen einer natürlicherweise zu erwartenden Kontamination von ca. 100 KbE/g und einer für die statistische Auswertung erforderlichen möglichst hohen Keimzahl gefunden werden. Das Inokulum wurde so gewählt, dass das Rohmaterial mit $2,5 \times 10^4$ KbE/cm² Listerien kontaminiert wird.

Je Ansatz wird 3 kg Fleisch zu ca. 600g schweren Fleischabschnitten portioniert. Die Fleischabschnitte hatten durchschnittlich folgende Abmessungen: 10cm x 10cm x 6cm; folglich beträgt die Oberfläche pro Stück 440cm². Pro Ansatz wurden fünf Abschnitte benötigt, um das gewünschte Gesamtgewicht von drei Kilogramm zu erreichen. Dies ergibt eine Gesamtoberfläche von ca. 2200cm² ($440\text{cm}^2 \times 5 = 2200\text{cm}^2$) pro Ansatz.

Für die Kontamination dieser Oberfläche wurden 0,3ml der Bakteriensuspension ($2,5 \times 10^8$ KbE/ml) mit Ringer Lösung bis zu 40ml aufgefüllt. Mit dieser Lösung wurde das Fleisch durch Besprühen beimpft und anschließend einen Tag bei 4°C gelagert, damit die Listerien sich an die neue Umgebung adaptieren können. Das Fleisch sollte gemäß untenstehender Rechnung mit $3,1 \times 10^4$ KbE/ cm² kontaminiert worden sein ($2,5 \times 10^8$ KbE/ml x 0,3ml / 2200cm² = $3,4 \times 10^4$ KbE/cm²).

5.2 Nachweis von Bakteriophagen im Enderzeugnis

5.2.1 Versuchsaufbau: Nachweis von Bakteriophagen

Um die rechtliche Einordnung der Bakteriophagen differenzierter betrachten zu können, wurde untersucht, ob in den mit Listex P100 behandelten Zwiebelmettwürsten die Bakteriophagen im Enderzeugnis noch nachweisbar sind. Für die Zuordnung einer rechtlichen Lebensmittelkategorie ist das Vorhandensein von Bakteriophagen im Endprodukt von großer Bedeutung. Falls keine Phagen mehr nachweisbar sind, würde dieser Fakt es erleichtern, die Verwendung des Phagens P100 in die lebensmittelrechtliche Kategorie der Verarbeitungshilfsmittel einzuordnen, da eine Voraussetzung für Verarbeitungshilfsstoffen ist, dass der eingesetzte Stoff keine technologischen Einfluss auf das Enderzeugnis haben darf. Nach dieser Einstufung könnten, wie in Kapitel 3.7 Rechtliche Problematik / Deklaration Listex P100 beschrieben, Bakteriophagen ohne Zulassung und Deklaration auf der Zutatenliste verwendet werden.

Neben der Kontrolle der Bakteriophagen im Produkt wurde ebenfalls kontrolliert, ob die hitzeinaktivierten Phagen, die im Hauptversuch eingesetzt wurden, durch die Wärmebehandlung abgetötet wurden. Zum Nachweis von Phagen im Produkt wurde eine Verdünnungsreihe mit den homogenisierten Proben aller Ansätze aus der ersten Versuchsreihe (Kapitel 5.3) angelegt und wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben Nährböden mit der sensitivsten Listerienkultur IDE 68 hergestellt.

Aus allen sechs Ansätzen des ersten Hauptversuches wurde jeweils eine Zwiebelmettwurst auf das Vorhandensein funktioneller Phagen analysiert. Folgende sechs Ansätze sind im Hauptversuch hergestellt worden: 1. Ansatz = Kontrolle, ohne jegliche Behandlung von Listex P100; 2. Ansatz = Zwiebelmettwürste mit Schutzkultur, ohne Listex; 3. Ansatz = Behandlung mit hitzeinaktivierten Bakteriophagen; 4. Ansatz = Behandlung mit $1,3 \times 10^5$ PbE/g; 5. Ansatz = Behandlung mit $1,3 \times 10^6$ PbE/g; 6. Ansatz = Behandlung mit $1,3 \times 10^7$ PbE/g.

5.2.2 Ergebnisse: Nachweis von Bakteriophagen

Fotos der behandelten Nährböden sind im Anhang Seite 7 zu finden. Bei der Kontrollprobe (Ansatz 1), die Probe die mit der Schutzkultur (Ansatz 2) sowie die Probe mit der mit der hitzeinaktivierten 1:10 verdünnten Phagenlösung (Ansatz 3) konnten keine Plaques erkannt und somit keine Phagen nachgewiesen werden. Die untersuchte hitzeinaktivierte Phagen-Inolulationslösung zeigt ebenfalls keine Plaquebildung.

Bei den Ansätzen, welche mit verschiedenen Konzentrationen von aktiven Phagen behandelt wurden (Ansätze 4-6), konnten Plaques gezählt werden. Ansatz 4 zeigt bei einer Behandlung mit $1,3 \times 10^4$ PbE/g eine Plaquebildung. Es konnten vier Plaques gezählt werden. Bei Ansatz 5 kann auch bei einer Behandlung mit $1,3 \times 10^5$ PbE/g noch drei Plaques gezählt werden. Ansatz 6 zeigt die Behandlung mit $1,3 \times 10^6$ PbE/g zwei Plaques. Der nachfolgenden Tabelle sind die nachgewiesenen Phagenanzahl in den Ansätzen 4 bis 6 zu den Untersuchungszeitpunkten 0h, 21h und 44h nach der Herstellung zu entnehmen.

Tabelle 1: Nachweis von Phagen im Enderzeugnis

Ausgangstitel	0h	21h	44h
Ansatz 4) $1,3 \times 10^6$ PbE/g	4×10^4 PbE/g	4×10^4 PbE/g	trübe Plaques
Ansatz 5) $1,3 \times 10^7$ PbE/g	3×10^5 PbE/g	4×10^4 PbE/g	trübe Plaques
Ansatz 6) $1,3 \times 10^8$ PbE/g	2×10^6 PbE/g	2×10^5 PbE/g	trübe Plaques

Da beim Ansatz 4 bei der Verdünnungsstufe 1:100 vier Plaques erkannt worden, sind in der Zwiebelmettwurst 40.000 PbE/g Phagen enthalten. Vier Plaques bei der Verdünnungsstufe 1:100 entsprechen 40 PbE bei der 1:10 Verdünnung. Auf den Nährboden wurden allerdings lediglich 10µl der Probe aufgetragen. Dies entspricht 4.000 PbE/ml. Da die Zwiebelmettwurst zur Untersuchung in Peptonwasser im Verhältnis von 1:10 homogenisiert wurde, sind in der Zwiebelmettwurst 40.000 PbE/g. Analog wurden die Anzahl der Phagen in den Ansätzen 5 und 6 berechnet. Die Phagenanzahl wurde während der Untersuchungen weiterhin kontrolliert und ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Um die Ergebnisse besser zu interpretieren zu können, wurde berechnet wie viele Phagen im Vergleich zu der ursprünglichen zugegebenden Phagenmenge noch nachgewiesen werden konnten.

Der Zwiebelmettwurst wurde im vierten Ansatz $1,3 \times 10^6$ PbE/g zugegeben.

Erläuterung: Phagentiter: 8×10^{10} PbE/ml, bei einer Verdünnung von 1:1000 $\rightarrow 8 \times 10^7$ PbE/ml, 50ml wurden davon für 3kg Fleisch verwendet: $\frac{50\text{ml} \times 8 \times 10^7 \text{ PbE/ml}}{3000\text{g}} = 1,3 \times 10^6 \text{ PbE/g}$.

Diese Anzahl lässt sich nun mit der nachgewiesenen Phagenanzahl ins Verhältnis setzen:

$\frac{1,3 \times 10^6 \text{ PbE/g}}{4 \times 10^4 \text{ PbE/g}} = 32,5$. Direkt nach der Herstellung konnte man bei diesem Ansatz demnach einen Phagen pro ca. 33 ursprünglich eingesetzten Phagen nachweisen. Analog konnte im Ansatz 5 ein Verhältnis von 1: 44 gefunden werden ($\frac{1,3 \times 10^8 \text{ PbE/g}}{3 \times 10^5 \text{ PbE/g}} = 44,4$) und beim sechsten Ansatz konnte pro 66 eingesetzten Phagen 1 Phage nachgewiesen werden ($\frac{1,3 \times 10^9 \text{ PbE/g}}{2 \times 10^6 \text{ PbE/g}} = 66,6$).

5.2.3 Diskurssion der Ergebnisse: Nachweis von Bakteriophagen

Die Untersuchung zeigt, dass bei den Ansätzen 1, 2 und in der hitzeinaktivierten Phagensuspension keine aktiven Bakteriophagen nachgewiesen werden konnten. Falls dennoch aktive Phagen in die untersuchte Probe gelangt sein sollten, wäre der Phagentiter demnach kleiner als 100 PbE/ml (da lediglich 10 μ l von der 1:10 verdünnten Lösung auf die Nährböden gegeben wurde). Diese Nachweisgrenze ist hinreichend, um davon ausgehen zu können, dass erstens die Kontrollprobe und die Schutzkulturprobe nicht kontaminiert wurden und zweitens die Wärmebehandlung der Phagensuspension erfolgreich war. Die Autorin kann demnach davon ausgehen, dass bei dem Herstellungsprozess keine Phagenübertragung mit der Kontrollprobe bzw. der Schutzkulturprobe stattgefunden hat. Zur Sicherheit wurde auch die Wurstprobe auf Phagen untersucht, welche mit der hitzeinaktivierten Lösung behandelt wurde (Ansatz 3). Wie zu erwarten war, zeigt sich bei dieser Probe selbst bei der niedrigsten Verdünnung keine Lyse, so dass keine Phagen nachgewiesen werden konnten.

Bei den Proben, welche mit verschiedenen Konzentrationen von Phagen behandelt wurden (Ansatz 4-6), lassen sich Bakteriophagen direkt nach der Herstellung im Produkt nachweisen. Es ist gut zu erkennen, dass die Anzahl der im Produkt nachgewiesenen Phagen mit

der Ursprungskonzentration korreliert. Je mehr Phagen eingesetzt werden, desto mehr können letztendlich auch nachgewiesen werden. Allerdings nimmt die Anzahl der aktiven Phagen nach Herstellung der Zwiebelmettwürste sehr schnell ab, so dass nach 44h nur noch „trübe Plaques“ beobachtet werden konnten.

Weiterhin ist zu beobachten, dass bei einer höheren Phagenanzahl im Produkt weniger Phagen nachgewiesen werden können. Bei der höchst dosierten Probe im Ansatz 6 konnte pro 66 eingesetzte Phagen einer nachgewiesen werden. Werden weniger Phagen eingesetzt wie zum Beispiel im Ansatz 4, so kann jedoch jeder 33ter Phage nachgewiesen werden.

Nach Informationen von Steven Hagens (Chief Scientific Officer von EBI Food Safety) sind die verwendeten Phagen nach 24 Stunden nicht mehr im Produkt aktiv. Wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist, können nach 21h Bakteriophagen in der Zwiebelmettwurst nachgewiesen werden. Beim nächsten Untersuchungszeitraum (44h) erscheinen bereits trübe Plaques. Die trübe Plaquesbildung ist eventuell auf die vorhandenen Laktobazillen der Starterkultur zurückzuführen. Diese können auf BHI-Platten wachsen und werden nicht durch den Phagen P100 infiziert.

Für die rechtliche Einordnung von Bakteriophagen, würden diese Untersuchungsergebnisse daher noch nicht vollständig ausreichen, um das Produkt Listex P100 von den Verarbeitungshilfsstoffen ausschließen. Zwar können nach 21h aktive Phagen nachgewiesen werden, jedoch kommt das Produkt Zwiebelmettwurst erst nach einer Reifung von 48h in den Markt. Die Bedeutung der trüben Plaquesbildung müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden, um herauszufinden, ob Phagen nach 48h im Enderzeugnis vorliegen. Wäre dies der Fall, so würde die Verwendung des Produkts in Zwiebelmettwurst eine technologische Wirkung erzielen und wäre somit von den Verarbeitungshilfsstoffen ausschließen. Dies würde bedeuten, dass das Produkt als Zusatzstoff einzuordnen wäre.

5.3 Erste Versuchsreihe

5.3.1 Versuchsaufbau der ersten Versuchsreihe

Das inokulierte Schweinefleisch wurde in den einzelnen Ansätzen wie folgt behandelt:

1. Ansatz Kontrollprobe, ohne jegliche Behandlung
2. Ansatz statt Starterkultur Schutzkultur Holdback 261
3. Ansatz 50 ml 1:10 verdünnte, hitzeinaktivierte Listex P100 Suspension
4. Ansatz 50 ml 1:1000 verdünnte Listex P100 Suspension
5. Ansatz 50 ml 1:100 verdünnte Listex P100 Suspension
6. Ansatz 50 ml 1:10 verdünnte Listex P100 Suspension.

Wie in Kapitel 4.2 untersucht, betrug der Phagentiter des verwendeten Listex P100 Produktes zur Zeit der Applikation 8×10^{10} PbE/ml. Nach einer Einwirkzeit von ca. zehn Minuten wurde das Rohmaterial mit den benötigten Zutaten zu Zwiebelmettwürsten verarbeitet und bei 6°C gelagert. Die benutzte Rezeptur befindet sich im Anhang Seite 5. Zudem sind im Anhang auf der Seite 11 Fotos von dem beimpfen Fleisch und dem Brät zu finden.

Auf dem Fleisch sind $3,4 \times 10^4$ KbE/ cm² Listerien (5.1 Vorbereitung: Beimpfen des Rohmaterials). Für den 4. Ansatz (1:10 verdünnte Listex P100 Lösung) wurden 4×10^{11} PbE/50ml Phagen eingesetzt (8×10^9 PbE/ml x 50 ml = 4×10^{11} PbE/50ml). Dies sind $\frac{4 \times 10^{11} \text{PbE}}{2200 \text{cm}^2} = 181818181$ PbE/cm². Das Verhältnis der Phagen zu den Listerien im Ansatz 4 ist folglich:

$$5347 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \left(\frac{181818181 \text{PbE}/\text{cm}^2}{3,4 \times 10^4 \text{KbE}/\text{cm}^2} = 5347 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \right).$$

Analog dazu liegt im Ansatz 5 das Verhältnis $535 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$ und bei Ansatz 6 das Verhältnis $53 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$. Abgerundet wird mit folgenden Werten gearbeitet $5000 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$, $500 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$ und $50 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$.

Zu fünf festgesetzten Zeitpunkten (0, 21 und 44 Stunden, sowie 6 und 13 Tage nach Herstellung) sollten von allen sechs Ansätzen jeweils drei Proben genommen werden und auf Listerien untersucht werden. Dazu wurden Proben von ca. 10g in einem Verhältnis von

1:10 mit Peptonwasser homogenisiert, und nach einer Stunde Ruhezeit bei Raumtemperatur wurden 100µl der homogenisierten Probe auf „Brilliance Listeria“ Platten (List) spiraliert. Direkt nach der Herstellung wurde zusätzlich jeweils 1ml auf List-Platten pepitiert, um eine niedrigere Nachweisgrenze zu erhalten. Da bei den vorliegenden Ergebnissen keine sehr niedrige Nachweisgrenze erforderlich war, wurde in den folgenden Untersuchungszeitpunkten auf diesen Untersuchungsschritt verzichtet. Des Weiteren wurden die pH - Werte der Proben gemessen.

5.3.2 Ergebnisse der ersten Versuchsreihe

Auf den folgenden zwei Seiten sind die Ergebnisse des ersten Versuches den Tabellen zu entnehmen. Tabelle 2 zeigt den Verlauf der pH- Werte, und Tabelle 3 können die vorgefundenen Keimzahlen von *Listeria monocytogenes* entnommen werden.

Tabelle 2: Ergebnisse des ersten Hauptversuches: pH Wert

Probe	09.02.2011 19:00Uhr	10.02.2011 16:00Uhr	11.02.2010 16.00 Uhr	16.02.2010 11.00 Uhr	23.02.2011 12.00 Uhr
	pH- Wert 0h	pH-Wert 21h	pH- Wert 44h	pH- Wert 7d	pH- Wert 13d
Kontrolle	5,52	5,60	5,61	5,62	5,58
Kontrolle	5,52	5,61	5,64	5,65	5,59
Kontrolle	5,52	5,60	5,63	5,65	5,60
Ø	5,52	5,60	5,63	5,64	5,59
Schutzkultur	5,75	5,85	5,81	5,81	5,79
Schutzkultur	5,75	5,84	5,78	5,80	5,81
Schutzkultur	5,75	5,84	5,79	5,83	5,82
Ø	5,75	5,84	5,79	5,81	5,81
Hitzeinaktiviert	5,54	5,59	5,60	5,60	
Hitzeinaktiviert	5,55	5,60	5,59	5,59	
Hitzeinaktiviert	5,54	5,59	5,62	5,62	
Ø	5,54	5,59	5,60	5,60	
Phagensuspension 1:1000	5,54	5,55	5,60	5,60	
Phagensuspension 1:1000	5,54	5,55	5,61	5,61	
Phagensuspension 1:1000	5,54	5,54	5,59	5,59	
Ø	5,54	5,55	5,60	5,60	
Phagensuspension 1:100	5,70	5,75	5,75	5,75	
Phagensuspension 1:100	5,70	5,76	5,75	5,75	
Phagensuspension 1:100	5,69	5,75	5,74	5,74	
Ø	5,70	5,75	5,75	5,75	
Phagensuspension 1:10	5,50	5,50	5,53	5,53	
Phagensuspension 1:10	5,50	5,48	5,53	5,53	
Phagensuspension 1:10	5,49	5,49	5,52	5,52	
Ø	5,50	5,49	5,53	5,53	

Tabelle 3: Ergebnisse des quantitativen>Listeriennachweises: erster Hauptversuch

	09.02.2011 19:00Uhr	10.02.2011 16:00Uhr	11.02.2010 16:00 Uhr	16.02.2010 11:00 Uhr	23.02.2011 12:00 Uhr
Probe	Zeitabstand 0h	Zeitabstand 21h	Zeitabstand 44h	Zeitabstand 7d	Zeitabstand 13d
Kontrolle	9,60E+03	1,10E+04	1,10E+04	9,77E+03	1,13E+04
Kontrolle	1,10E+04	9,00E+03	9,70E+03	1,33E+04	1,08E+04
Kontrolle	1,70E+04	1,10E+04	9,50E+03	1,39E+04	1,08E+04
Ø	1,25E+04	1,03E+04	1,01E+04	1,23E+04	1,10E+04
Schutzkultur	1,30E+04	5,60E+03	1,10E+04	6,59E+03	9,04E+03
Schutzkultur	1,20E+04	7,10E+03	8,00E+02	8,34E+03	8,63E+03
Schutzkultur	9,70E+03	6,30E+03	1,50E+03	9,45E+03	1,44E+04
Ø	1,16E+04	6,33E+03	4,43E+03	8,13E+03	1,07E+04
Hitzeinaktiviert	1,50E+04	1,00E+04	1,20E+04		
Hitzeinaktiviert	1,20E+04	1,20E+04	1,30E+04		
Hitzeinaktiviert	1,50E+04	1,30E+04	1,20E+04		
Ø	1,40E+04	1,17E+04	1,23E+04		
Phagensuspension 1:1000	1,30E+04	1,20E+04	1,30E+04		
Phagensuspension 1:1000	1,60E+04	1,20E+04	1,30E+04		
Phagensuspension 1:1000	1,50E+04	1,20E+04	1,10E+04		
Ø	1,47E+04	1,20E+04	1,23E+04		
Phagensuspension 1:100	1,30E+04	1,10E+04	1,13E+04		
Phagensuspension 1:100	1,50E+04	1,10E+04	1,00E+04		
Phagensuspension 1:100	1,40E+04	1,10E+04	1,20E+04		
Ø	1,40E+04	1,10E+04	1,11E+04		
Phagensuspension 1:10	1,20E+04	9,90E+03	1,10E+04		
Phagensuspension 1:10	1,20E+04	1,00E+04	1,20E+04		
Phagensuspension 1:10	1,20E+04	9,20E+03	1,10E+04		
Ø	1,20E+04	9,70E+03	1,13E+04		

5.3.3 Diskussion der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe

Tabelle 2 zeigt, dass bei allen Ansätzen ist pH- Wert im Laufe der Untersuchungszeitpunkte leicht gestiegen. Gewöhnlich sollte der pH-Wert im Laufe der Reifung etwas absinken. Der pH-Wert im Enderzeugnis sollte zwischen 5,4 und 5,7 liegen. Je niedriger der Wert ist, desto höher ist die mikrobiologische Stabilität, Werte unterhalb von 5,4 würden jedoch das Produkt sensorisch auffällig erscheinen lassen. Der vergleichsweise hohe pH Wert könnte durch eine zu geringe Zugabe von Milchsäure (Spiro Spezial) bei der Herstellung erklärt werden.

Der Tabelle 3 kann man entnehmen, dass nach 44 Stunden keine signifikante Abnahme der Listerienpopulation festgestellt werden konnte. Die geringen Unterschiede der Listerienanzahl zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten können sich auf Messungenauigkeiten zurückführen lassen. Nach diesen Versuchsergebnissen scheinen die Bakteriophagen keinen Einfluss auf die Anzahl der Listerien im Enderzeugnis zu haben.

Schutzkultur Holdback 261 der Firma Danisco scheint bei dieser Lebensmittelmatrix und den äußeren Bedingungen ebenfalls wirkungslos zu sein. Die geringe Temperatur von 6°C während der Lagerung der Zwiebelmettwürste könnte zu gering für ein Wachstum und die Produktion der antimikrobiellen Substanzen der enthaltenen Mikroorganismen sein.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde nochmals Kontakt mit dem Hersteller des Produktes Listex P100 aufgenommen. Steven Hagens (Chief Scientific Officer von EBI Food Safety) erläutere, dass EBI Food Safety noch keine Erfahrung mit der Behandlung des Produkts Zwiebelmettwurst hat. Jedoch seien erfahrungsgemäß die Phagen lediglich 24 Stunden auf dem zu behandelten Lebensmittel aktiv. Da nach 44 Stunden noch kein Einfluss des Produktes Listex P100 auf die Listerienpopulation festgestellt werden konnte, wurden auf die weiteren Untersuchungszeitpunkte nach sieben bzw. nach vierzehn Tage verzichtet.

Desweiteren wurde die genaue Vorgehensweise des Versuchsaufbaus nochmals gemeinsam besprochen und mögliche Gründe für die scheinbare Wirkungslosigkeit der Phagen zu finden. Ein möglicher Grund dafür, dass die Bakteriophagen in diesem Versuchsaufbau wirkungslos erscheinen, könnte die geringe Einwirkzeit von zehn Minuten auf der Fleischoberfläche sein.

Nach dem Wolfen des Fleisches ist die Wirkung der Phagen erheblich reduziert, da dadurch die Fläche, auf der die Phagen mit den Listerien in Kontakt treten können, um ein Vielfaches erhöht ist. Daher sollen den folgenden Untersuchungen die Einwirkzeit der Bakteriophagen bedeutend erhöht werden. Zudem sind die verwendeten Phagenkonzentrationen durch den erniedrigten Ausgangsphagentiter eventuell zu gering. Laut Steven Hagens ist eine Verwendung des Produktes mit vorgefundenem Phagentiter mit einer Verdünnung von 1:10 weiterhin möglich. Die vorgenommenen Verdünnungen im Ansatz zwei und drei mit bis zu 1:1000 verdünnter Listex P100 Lösung ist allerdings höchstwahrscheinlich zu gering, um signifikante Unterschiede aufzeigen zu können.

Im weiteren Versuch soll daher der Einfluss der Einwirkzeit auf die Wirkung der Phagen untersucht werden. Folgende Einwirkzeiten sollen untersucht werden: eine Stunde, drei Stunden und eine Einwirkung über Nacht von 18 Stunden. Die Konzentrationen der Listex P100 Lösung wird in allen Ansätzen einer 1:10 Verdünnung entsprechen. Ein weiterer Ansatz mit 18 Stunden Einwirkzeit wird mit der unverdünnten Listex P100 Suspension behandelt.

5.4 Zweiter Versuchsreihe

5.4.1 Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe

Um die Einwirkzeit der Bakteriophagen in Abhängigkeit zur Wirkung auf die Listerien zu beurteilen, wurden nochmals fünf Ansätze vorbereitet. Die Ansätze wurden mit 2kg angesetzt, da aus dem ersten Versuch bekannt war, dass der Mengenverlust durch das Wolfen gering ist. Alle Ansätze wurden wie in Kapitel `5.2 Beimpfung des Rohmaterials` beschrieben, mit Listerien beimpft. Die gleichen fünf Listerienstämme aus dem ersten Hauptversuch wurden über Nacht kultiviert, jeweils 1 ml jeder Listeriensuspension in ein Gefäß pepitiert und auf 50ml mit Ringerlösung aufgefüllt (1:10 Verdünnung). Für jeden Ansatz (2kg) wurden 0,2ml dieser Inokulationssuspension mit Ringerlösung auf 40ml aufgefüllt und mittels Besprühen das Rohmaterial beimpft. Für einen 2kg schweren Ansatz wurden drei Fleischteile mit 600g (10cm x 10cm x 6cm) und ein kleines Fleischstück mit 200g (10 cm x 5cm x 4cm) portioniert. Die Oberfläche der Ansätze betrug ca. 1540cm² (3

$\times 440\text{cm}^2 + 220\text{cm}^2 = 1540\text{cm}^2$). Das Fleisch wurde demnach mit kontaminiert $3,2 \times 10^4$ KbE/cm² ($2,5 \times 10^8$ KbE/ml $\times 0,2\text{ml} / 1540\text{cm}^2 = 3,2 \times 10^4$ KbE/cm²).

Nach einer 24 stündigen Adaptationsphase wurde das Schweinefleisch mit einer 1:10 Verdünnung des Produktes Listex P100 behandelt und nach einer, drei bzw. 18 Stunden Einwirkzeit mit den weiteren Zutaten zu Zwiebelmettwurst verarbeitet. Die Phagenanzahl der Suspension in diesen Ansätzen betrug 4×10^{11} PbE/50ml (8×10^9 PbE/ml $\times 50 \text{ ml} = 4 \times 10^{11}$ PbE/50ml). Dies sind $2,6 \times 10^8$ PbE/cm² ($\frac{4 \times 10^{11} \text{PbE}}{1540\text{cm}^2} = 259740259$ PbE/cm²).

Das Verhältnis der Phagen zu den Listerien im Ansatz 4 ist folglich:

$$8116 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \left(\frac{259740259 \text{PbE}/\text{cm}^2}{3,2 \times 10^4 \text{KbE}/\text{cm}^2} = 8116 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \right), \text{ ca. } 8.000 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$$

Beim vierten Ansatz betrug die Einwirkzeit ebenfalls 18 Stunden und der Ansatz wurde mit einer unverdünntem Listex P100 Suspension behandelt. Die Phagenanzahl der Suspension im vierten Ansatz betrug demnach 4×10^{12} PbE/50ml

(8×10^{10} PbE/ml $\times 50\text{ml} = 4 \times 10^{12}$ PbE/50ml). Dies entsprechen $2,6 \times 10^9$ PbE/cm² ($\frac{4 \times 10^{12} \text{PbE}}{1540\text{cm}^2} = 2597402597$ PbE/cm²).

Das Verhältnis der Phagen zu den Listerien in diesem Ansatz beträgt:

$$81168 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \left(\frac{2597402597 \text{PbE}/\text{cm}^2}{3,2 \times 10^4 \text{KbE}/\text{cm}^2} = 81168 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}} \right), 80.000 \frac{\text{PbE}}{\text{KbE}}$$

Der erste Ansatz diente als Kontrollprobe und wurde nicht mit Bakteriophagen behandelt. Die Rezeptur befindet sich im Anhang auf Seite 5. Nach der Auskunft von EBI Food Safety sind die Bakteriophagen nach dem Wolfen durch die vergrößerte Oberfläche nicht mehr in der Lage, die Listerienpopulation bedeutsam zu senken. Daher wurden lediglich die Listerienanzahl direkt nach der Herstellung, 22 Stunden und vierzehn Tage nach der Herstellung untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den 22 Stunden und nach Ablauf der gewöhnlichen Mindesthaltbarkeit ist nicht zu erwarten, zumal Untersuchungen aus dem Hause Dr. Erdmann ergeben haben, dass sich *Listeria monocytogenes* nicht im Produkt Zwiebelmettwurst vermehren kann.

5.4.2 Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe

Auf den nächsten Seiten sind den Tabellen 4 und 5 die Keimzahlen und die pH-Werte der untersuchten Ansätze zu den unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen zu entnehmen.

Tabelle 4: Ergebnisse des zweiten Hauptversuches: pH Wert

	17.02.2011 15.00Uhr	18.02.2011 12.00Uhr	23.02.2011 11.00 Uhr	02.03.2011 11.00Uhr
	Zeitabstand 0h	Zeitabstand 22h	Zeitabstand 6d	Zeitabstand 13d
Probe	pH- Wert	pH- Wert	pH- Wert	pH- Wert
Kontrolle	5,54	5,52	5,57	5,54
Kontrolle	5,55	5,51	5,58	5,56
Kontrolle	5,56	5,51	5,56	5,58
Ø	5,55	5,51	5,57	5,56
1h Einwirkzeit	5,53	5,50	5,58	5,57
1h Einwirkzeit	5,53	5,51	5,57	5,58
1h Einwirkzeit	5,48	5,50	5,56	5,59
Ø	5,51	5,50	5,57	5,58
3h Einwirkzeit	5,41	5,54	5,48	5,49
3h Einwirkzeit	5,43	5,44	5,49	5,50
3h Einwirkzeit	5,48	5,45	5,46	5,49
Ø	5,44	5,48	5,48	5,49
18h Einwirkzeit	5,50	5,55	5,58	5,60
18h Einwirkzeit	5,49	5,55	5,61	5,59
18h Einwirkzeit	5,51	5,54	5,59	5,59
Ø	5,50	5,55	5,59	5,59
18h Einwirkzeit (unverdünnt)	5,40	5,39	5,47	5,47
18h Einwirkzeit (unverdünnt)	5,39	5,39	5,44	5,48
18h Einwirkzeit(unverdünnt)	5,43	5,40	5,44	5,49
Ø	5,41	5,39	5,45	5,48

Tabelle 5: Ergebnisse des quantitativen>Listeriennachweises: zweiter Hauptversuch

	17.02.2011 12.00Uhr	18.02.2010 10.00 Uhr	23.02.2011 11.00 Uhr	02.03.2011 11.00Uhr
	Zeitabstand 0h	Zeitabstand 22h	Zeitabstand 6d	Zeitabstand 13d
Probe	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Kontrolle	1,64E+04	1,61E+04	1,46E+04	1,39E+04
Kontrolle	1,67E+04	1,71E+04	1,72E+04	1,32E+04
Kontrolle	1,72E+04	1,62E+04	1,44E+04	1,46E+04
Ø	1,68E+04	1,65E+04	1,54E+04	1,39E+04
1h Einwirkzeit	9,67E+03	8,79E+03	7,48E+03	7,46E+03
1h Einwirkzeit	9,27E+03	8,58E+03	6,33E+03	7,48E+03
1h Einwirkzeit	8,97E+03	7,72E+03	7,32E+03	7,85E+03
Ø	9,30E+03	8,36E+03	7,04E+03	7,60E+03
3h Einwirkzeit	5,73E+03	5,52E+03	4,62E+03	3,38E+03
3h Einwirkzeit	5,71E+03	4,58E+03	5,40E+03	5,27E+03
3h Einwirkzeit	6,60E+03	4,84E+03	5,29E+03	3,46E+03
Ø	6,01E+03	4,98E+03	5,10E+03	4,04E+03
18h Einwirkzeit	4,64E+03	3,78E+03	4,42E+03	3,32E+03
18h Einwirkzeit	4,39E+03	4,42E+03	4,06E+03	2,86E+03
18h Einwirkzeit	5,20E+03	4,66E+03	2,25E+03	3,71E+03
Ø	4,74E+03	4,29E+03	3,58E+03	3,30E+03
18h Einwirkzeit (unverdünnt)	7,12E+02	5,00E+02	3,00E+02	2,00E+02
18h Einwirkzeit (unverdünnt)	4,00E+02	3,00E+02	6,00E+02	7,00E+02
18h Einwirkzeit(unverdünnt)	7,35E+02	8,00E+02	8,00E+02	1,00E+03
Ø	6,16E+02	5,33E+02	5,67E+02	6,33E+02

5.4.3 Diskussion der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe

Wie man in der Tabelle 3 erkennen kann, liegen die pH Werte innerhalb des Normbereiches für Zwiebelmettwürste.

Zur besseren Übersicht wurden die Werte aus der Tabelle 4 in der folgenden Grafik visualisiert:

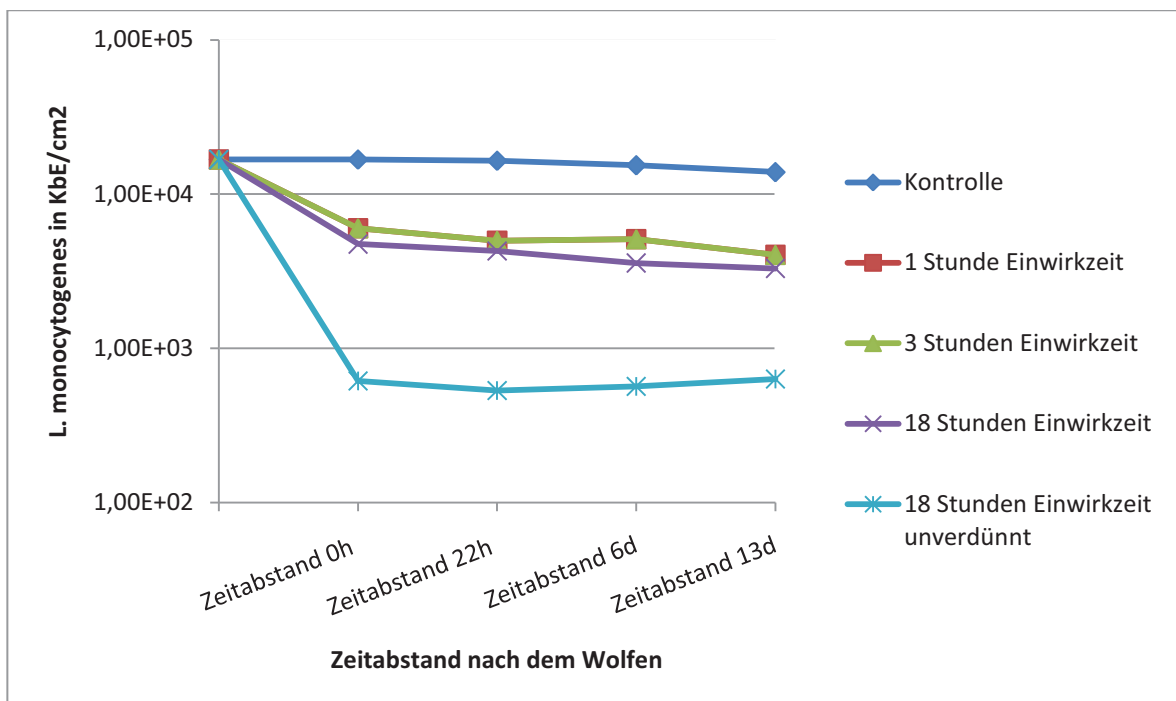


Abbildung 8: Visuelle Darstellung der Ergebnisse des zweiten Versuchs

Unter diesem Versuchsaufbau kann man deutlich einen Einfluss der Bakteriophagen auf die Listerienpopulation erkennen. Bei der Verwendung einer 1:10 verdünnten Phagenlösung ($2,6 \times 10^8$ PbE/cm²) kann eine Abnahme von ca. 50% der ursprünglichen Listerien verzeichnet werden.

Wird die Einwirkzeit um weitere zwei Stunden verlängert, so reduziert sich die Listerienanzahl um fast zwei Drittel. Eine weitere Erhöhung der Einwirkzeit von 18 Stunden bei gleicher Phagenkonzentration reduziert die Listerienanzahl geringfügig mehr. Erhöht man hingegen die Anzahl der Phagen auf $2,6 \times 10^9$ PbE/cm² überleben von den ursprünglichen

Listerien lediglich knapp 4%. Es ist demnach ein sehr hoher Überschuss an Phagen nötig, um eine erhebliche Abnahme der Listerien zu erreichen.

Wie bereits vermutet, wirken die Phagen nach dem Wolfen des Fleisches nur noch geringfügig bzw. zeigen nach 22 Stunden eine unbedeutende Wirkung. Der Rückgang der Listerienanzahl lässt sich vermutlich nur bis zu 22 Stunden nach der Herstellung auf die Phagenbehandlung zurückführen. Zwar kann man nach 22 Stunden noch eine leichte Abnahme der Listerienpopulation erkennen, jedoch kann dieses Ergebnis auch bei den Kontrollproben verzeichnet werden. Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass der Rückgang der Listerien nach 22 Stunden natürlicher Art ist und sich auf die Lebensmittelmatrix der Zwiebelmettwurst zurückführen lässt. Der größte Effekt der Behandlung tritt, wie erwartet, vor dem Wolfen ein.

Laut EG VO 2073/2005 dürfen in 25 g höchstens 100 KbE/g in Produkt Zwiebelmettwurst nachgewiesen werden. Natürlich vorkommende Kontaminationen von Schweinefleisch liegen in Bereichen von bis zu 200 KbE/g vor. Unter den Voraussetzungen, welche in der zweiten Versuchsreihe beschrieben wurden, kann man bereits eine Abnahme von 50% der ursprünglichen Listerienpopulation erreichen. Dies würde, mit der Annahme einer natürlich vorkommenden Listerien Kontamination von bis zu 200 KbE/g, einen Wert von 100 KbE/g bedeuten. Mit diesem Wert liegt der Hersteller immer noch im rechtlich erlaubten Grenzwert von maximal 100 KbE/g.

Festzuhalten ist, dass je höher die Konzentration der Phagen ist, desto höher ist die Abtötungsrate der Listerien. Daneben ist ein weiterer Einflussfaktor auf die Wirkung der Phagen die Einwirkzeit der Bakteriophagen vor der Verarbeitung des Fleisches. Der erste Hauptversuch hat gezeigt, dass eine zehnminütige Einwirkzeit zu gering ist, um signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Erzeugnissen festzustellen. Eine Einwirkzeit von einer Stunde hingegen genügt bereits, um 50% der ursprünglichen Listerienpopulation abzutöten. Ein noch besseres Ergebnis kann bei noch längeren Einwirkzeiten erzielt werden.

6 Fazit: Prognose für den Einsatz von Bakteriophagen

Zwei wesentliche Parameter beeinflussen die Wirksamkeit von Listex P100 im Produkt Zwiebelmettwurst: zum einen die Einwirkzeit und zum anderen die Konzentration der Phagen. Um eine signifikante Abnahme der Listerien zu erreichen benötigt man einen wesentlichen Überschuss von Bakteriophagen. Zudem hat die Einwirkzeit von Listex P100 ebenfalls einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit. Die Bakteriophagen müssen mindestens eine Stunde bevor das Fleisch verarbeitet wird auf das Rohmaterial aufgebracht werden. Längere Einwirkzeiten erhöhen den Wirkungsgrad genauso wie höhere Konzentrationen von Bakteriophagen in der Lösung.

Mit der Verwendung von mindestens $2,6 \times 10^8$ PbE/cm² und einer Einwirkzeit von einer Stunde, kann man bereits eine Abnahme von 50% der ursprünglichen Listerienpopulation erreichen. Unter Einhaltung der vorher beschriebenen Parameter würde die prophylaktische Behandlung des Rohstoffes zu einer Steigerung der Lebensmittelsicherheit führen. Die Behandlung von Schweinefleisch mit Listex P 100 zur Herstellung von Zwiebelmettwurst, stellt für *Listeria monocytogenes* eine Hürde dar. Zwar konnte in den vorangegangenen Untersuchungen keine vollständige Abtötung aller Listerien erzielt werden, jedoch ermöglicht die Behandlung mittels Listex P100 eine Reduktion der nachweisbaren *Listeria monocytogenes* im Produkt. Bei der Verwendung von $2,6 \times 10^9$ PbE/cm² konnten die Listerien im Produkt um 96% reduziert werden.

Eine 100%ige Sicherheit, wie man sie zum Beispiel mit einer Hitzebehandlung erreichen könnte, ist voraussichtlich mit dem Produkt Listex P100 nicht möglich. Es bleibt vermutlich immer ein Restrisiko, dass ein Bakterium nicht von einem Bakteriophagen getroffen wird und somit die Behandlung überlebt.

Der prophylaktische Einsatz von Bakteriophagen gegen Listerien im Produkt Zwiebelmettwurst kann nichtsdestotrotz Potenzial für die Industrie haben. Sollten sich Unternehmen allerdings für die Verwendung von Bakteriophagen gegen Listerien im Produkt entscheiden, so müsste zunächst die rechtliche Problematik der Zulassung und Deklaration geklärt werden. Zudem würde es sich empfehlen, weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Phagenkonzentrationen und Einwirkzeiten durchzuführen, um diese Parameter optimal aufeinander einstellen zu können. Daneben sollte das betreffende

Unternehmen prüfen, inwieweit sich der Einsatz der neuen Methode ökonomisch rechnen würde. Je nachdem, wie viel Verlust durch den Verwurf von kontaminiertem Rohmaterial entsteht, könnten sich die Mehrkosten für den Kauf des Produktes Listex P100 lohnen. Zusammenfassend kann das Produkt Listex P100 und damit der Einsatz von Bakteriophagen gegen pathogene Keime Potential für die Industrie haben.

III. Literaturverzeichnis

Bartel, B., und M. Malzcan. „Milchwirtschaftliche Mikrobiologie.“ 133. Hamburg: Behrs Verlag, 2003.

Baumgart, J., W. Heeschen, F.v. Rheinbaben, and R. Zschaler. "Lexikon Lebensmittel-Mikrobiologie und -Hygiene." 179-180. Plauen: Behr's Verlag, 2004.

BfR- Bundesinstitut für Risikobewertung. „Schutz vor lebensmittelbedingten Infektionen mit Listerien.“ *Verbraucheraufklärung*, 03 2008: 1-4.

Bülte, M. "Listeria monocytogenes." 42-43. Hamburg: Behr's Verlag, 2008.

BVL- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. „Bestrahlte Lebensmittel.“ 22. 09 2006.

http://www.bvl.bund.de/cln_007/nn_491658/DE/01__Lebensmittel/01__Sicherheit__Kontrollen/072__Bestrahlung/lm__bestrahlung__node.html (Zugriff am 01. 03 2011).

Carlton, R.M., W.H. Noordman, B. Biswas, E.D De Meester, and M.J. Loessner. "Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in food: genome sequence, bioinformatic analyses, oaltoxicity stuy,n application." *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005: 301-312.

De Meester, D., and M. Offenhaus. *EBI Food Safety*. 02 01, 2011.

<http://www.ebifoodsafety.com/> (accessed 02 01, 2011).

Demazeau, G., und N. Rivalain. „The development of High Hydrostatic Pressure Processes as an alternative to other pathogen reduction methods.“ *Journal of Applied Microbiology*, 2011: 1365- 2672.

Dr. Teufer, T., and C. Dr. Jagow. "Bakteriophagen in der Lebensmittelherstellung: eine rechtliche Einordnung." *ZRL*, 01 2007: 25-50.

EFSA. "The use and mode of action of bacteriophages in food production." *The EFSA Journal*, 04 22, 2009: 1-26.

Ennahar, S, et al. „Production of Pediocin AcH by Lactobacillus plantarum WHE 92 Isolated from Cheese.“ *Applied and Environmental Microbiology*, 12 1996: 4381-4387.

- Fosgreen, A. "Es macht nichts, wenn die Wurst etwas schillert." *Tagesanzeiger*, 02 07, 2008: <http://sc.tagesanzeiger.ch/dyn/wissen/lifescience/839532.html>.
- Geisen, R, F Lücke, und L Krögerl. „Sichere Produkte bei Fleisch und Fleischerzeugnissen.“ Von Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung Institut für Mikrobiologie, 94. Kulmbach: Kulmbacher Reihe, 1990.
- Graves, LM, et al. „*Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest.“ *Int J Syst Evol Microbiol.*, 01. 06 2010: 1280-1288.
- Graw, J., und W. Henning. „Genetik.“ 115. Heidelberg: Springer Verlag, 2006.
- Guenther, S., D. Huwyler, S. Richard, and M. Loessner. "Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready To-Eat Food." *Applied and Environmental Microbiology*, 01 01, 2009: 93-100.
- Hagens, S., and M. Offenhaus. "Bacteriophages- new weapons or food safety." *food technology*, 04 2008: 46-52.
- Heller, K.J., L. Fieseler, and M.J. Loessner. "Bakteriophagen." Hamburg: Behr's Verlag, 2011.
- Holck, A, und J Berg. „Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham by Virulent Bacteriophages and Protective Cultures.“ *Appl Environ Microbiol.*, 11 2009: 6944-6946.
- Keweloh, Dr. Heribert. "Mikroorganismen in Lebensmitteln - Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene." 215-217. Paderborn: Pfanneberg, 2009.
- Klump, J., et al. "The Terminally Redundant, Nonpermuted Genome of *Listeria* Bacteriophage A511." *Journal of Bacteriology*, 09 04, 2008: 5753-5760.
- Krämer, J. "Lebensmittelmikrobiologie." 81-88. Stuttgart: Eugen Ulmer KG Verlag, 2007.
- Kunz, B. "Grundriß der Lebensmittel-Mikrobiologie." 168-170. Hamburg: Behr's Verlag, 1994.
- Leclercq, A, et al. „*Listeria rocourtiae* sp. nov.“ *Int J Syst Evol Microbiol.*, 13. 11 2006: 2210-2214.
- LFGB. "Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch." 2005.

Max Rubner-Institut. *Schutzkulturen für Oberflächen-gereifte Käse*. 19. 03 2011.
http://www.mri.bund.de/no_cache/de/institute/mikrobiologie-und-biotechnologie/forschungsprojekte/schutzkulturen-fuer-oberflaechen-gereifte-kaese.html
(Zugriff am 19. 03 2011).

Mosqueda-Melgar, J, P Elez-Martínez, RM Raybaudi-Massilia, und O Martín-Belloso.
„Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid
foods: a review.“ *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 08. 09 2008: 747-759.

Pichardt, K. "Lebensmittelmikrobiologie- Grundlagen für die Praxis." 187-188. Berlin:
Springer Verlag, 1998.

Robert-Koch-Institut. "Listeriose 2001 bis 2009." *Epidemiologisches Bulletin*, 08 30 Nr.
34, 2010.

Saldana, G, E Puertolas, S Condom, I Alvarez, und J Raso. „Inactivation kinetics of pulsed
electric field-resistant strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in
media of different pH.“ *Food Microbiol.* , 25. 01 2010: 550-558.

Sinell, H.J. "Einführung in die Lebensmittelhygiene." 52-55. Stuttgart: Parey Verlag, 2004.

Sossna, R. "Bakteriophagen gezielt gegen Listerien einsetzen." *Deutsche Milchwirtschaft*,
2005: 993-994.

Versalovic, J, T Koeuth, und J Lupski. „Distribution od repetitive DNA sequences in
eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.“ *Nucleic Acids
Researches*, 13. 09 1991: 6823-6831.

IV. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Esther Pia David

Anhang

A.	Methodenvorschrift API Listeria	
	A.1 Betriebsanleitung des verwendeten API Listeria Systems	1
	A.2 Ergebnis des API Listeria IDE 760	2
B.	Arbeitsanweisung der Firma EBI Food Safety : Phagentiter Bestimmung	3
C.	Methodenvorschrift des Dr. Erdmann Instituts: Isolierung genomischer DNA	4
D.	Rezepturen: Zwiebelmettwurst	5
E.	Ergebnis des Versuchs: Nachweis von Bakteriophagen	7
F.	Fotodokumentation: erster Hauptversuch	11
G.	Methodenvorschrift des Dr. Erdmann Instituts: quantitativer <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> Nachweis	12
H.	Produktinformationen der Schutzkultur Holdback 261	14
I.	Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Arbeitsmittel	16

A. Methodenvorschrift API Listeria

A.1 Betriebsanleitung des verwendeten API Listeria Systems

REF 10 300

api® Listeria

System zur Identifizierung von *Listeria*

EINFÜHRUNG UND TESTERKLÄRUNG

API Listeria ist ein standardisiertes System zur Identifizierung von *Listeria* anhand von miniaturisierten Reaktionen und einer Datenbasis. Die komplette Liste der mit dem System zu identifizierenden Mikroorganismen finden Sie in der Prozenttabelle am Ende der Arbeitsanleitung.

PRINZIP

Der API Listeria Streifen besteht aus 10 Mikroröhren, die dehydrierte Substrate zum Nachweis von Enzymaktivität oder Kohlenhydratfermentation enthalten. Die Stoffwechselprodukte, die während der Inkubation entstehen, bewirken Farbumschläge, entweder direkt oder nach Zugabe der Reagenzien. Die Ablesung der Reaktionen erfolgt anhand der Ablesetabelle, die Identifizierung mit der Profilliste der Arbeitsanleitung oder einer Identifizierungssoftware.

PACKUNGSGRÖSSE (für 10 Tests):

- 10 API Listeria Streifen
- 10 Ampullen API Suspension Medium, 2 ml
- 1 Ampulle ZYM B Reagenz
- 10 Inkubationswannen
- 10 Ergebnisblätter
- 1 Arbeitsanleitung

ZUSAMMENSETZUNG

Streifen
Die Zusammensetzung des API Listeria Streifens finden Sie in der Ablesetabelle dieser Arbeitsanleitung.

Medium

API Suspension Medium 2 ml	Demineralisiertes Wasser
-------------------------------	--------------------------

Reagenz

ZYM B Reagenz 3 ml	Fast Blue BB (aktive Substanz) 0,12 g 2-Methoxyethanol 100 ml
-----------------------	--

RIB: Kann die Fortfärbungsfähigkeit beeinträchtigen.
R10: Kann das Rind im Materialschichten, R10: Einzigartig.
R20/R12: Versauerungsschicht beim Erhitzen, Versäuerung und Bindung mit der Haut.
R55: Exzessives verdünntes Reagenz mit Haut oder Augen vermeiden. Dämpfe nicht einatmen.
S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt benachrichtigen.
S46: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt benachrichtigen.
S53: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt benachrichtigen.

Die angegebenen Mengen können je nach Konzentration der verwendeten Ausgangsmaterialien angegangen werden. Weitere Informationen entnehmen Sie dem Sicherheitsdatenblatt, das auf Anfrage erhältlich ist.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Reagenzien:
- McFarland Standard 1 (Best Nr. 70 900)
- Identifizierungssoftware (bei bioMérieux anfragen)

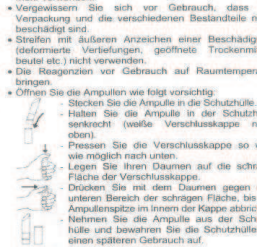
Materialien:

- Pipetten oder PSpipetten
- Schutzhülle für Ampullen
- Ampullenständer
- Allgemeine mikrobiologische Laborausstattung

VORSICHTSMASSNAHMEN

Für die *in vitro* Diagnostik und die mikrobiologische Kontrolle.

- Nur für die Verwendung durch Fachkundige bestimmt.
- Dieser Kit enthält Bestandteile tierischen Ursprungs. Da durch die Kontrolle der Herkunft und/oder des Gesundheitszustandes der Tiere nicht völlig gewährleistet werden kann, dass diese Produkte keine übertragbaren pathogenen Agenzien enthalten, ist es empfehlenswert, diese als potenziell infektiös zu betrachten und unter Beachtung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln (nicht einatmen, nicht einstrichen).
- Die Proben, Mikroorganismen und beimpften Produkte müssen als potenziell infektiös betrachtet und unter Beachtung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen sachgemäß behandelt werden. Während der gesamten Testdurchführung müssen aseptische Arbeitsbedingungen und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen für die zu untersuchende Keimgruppe eingehalten werden, siehe NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissues, Approved Guidelines* - December 1997. Weitere diesbezügliche Informationen finden Sie in *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, NIH Publication No. (CDC) 93-8395, 3rd Edition (May 1993) oder in den jeweils gültigen Richtlinien.
- Die Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Vergewissern Sie sich vor Gebrauch, dass die Verpackung und die verschiedenen Bestandteile nicht beschädigt sind.
- Streifen mit äußeren Anzeichen einer Beschädigung (deformierte Verpackungen, geöffnete Trockenmittelbeutel etc.) nicht verwenden.
- Die Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- Öffnen Sie die Ampullen wie folgt vorsichtig:
 - Stecken Sie die Ampulle in die Schutzhülle.
 - Halten Sie die Ampulle in der Schutzhülle senkrecht (weiße Verschlusskappe nach oben).
 - Pressen Sie die Verschlusskappe so weit wie möglich nach unten.
 - Legen Sie Ihren Daumen auf die schräge Fläche der Verschlusskappe.
 - Drücken Sie mit dem Daumen gegen den unteren Bereich der schrägen Fläche, bis die Ampullen Spitze in ihrem Kapsel abstößt.
 - Nehmen Sie die Ampulle aus der Schutzhülle und bewahren Sie die Schutzhülle für einen späteren Gebrauch auf.



api® Listeria

078871 - DE - 2003/01

IVD

- Ampulle ohne Tropfpipette: Enternen Sie vorsichtig die Verschlusskappe.
- Ampulle mit Tropfpipette: Drehen Sie die Ampulle um, und halten Sie sie senkrecht. Drücken Sie seitlich auf die Verschlusskappe, so dass das gesamte Reagenz in die Tropfpipette läuft.
- Die angegebene Performance wurde gemäß dem Verfahren der vorliegenden Arbeitsanleitung ermittelt. Jede Abweichung von diesem Verfahren kann die Ergebnisse beeinflussen.
- Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen der klinische Hintergrund oder andere Zusammenhänge, die Probenherkunft, Kolonien- und mikroskopische Morphologie des Stammes sowie gegebenenfalls die Ergebnisse anderer Tests, insbesondere des Antibiogramms, berücksichtigt werden.

LAGERUNGSBEDINGUNGEN

Streifen:
Die Streifen sind bei 2-8°C bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Medien:
Die Medien sind bei 2-30°C bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Reagenz:
Das Reagenz muss bei 2-8°C unter Lichtabschluss gelagert werden und ist bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen der Ampullen und Überführung des Reagenzes in das Tropfpipettengefäß kann das Reagenz 1 Monat (oder bis zum angegebenen Verfallsdatum, wenn dieses kürzer ist) aufbewahrt werden. Notieren Sie das Datum, an dem die Ampulle geöffnet wurde, auf dem Etikett des Fläschchens. Das ZYM B Reagenz ist sehr lichtempfindlich: Umwickeln Sie das Fläschchen mit Aluminiumfolie. Achten Sie darauf, dass das Fläschchen nach Gebrauch rasch wieder in den Kühlschrank gestellt wird. ZYM B hat normalerweise eine gelbliche Färbung. Verwerfen Sie das Reagenz, sobald sich eine rosa Verfärbung (Verfallsanzeichen) zeigt.

GEBRAUCH DES REAGENZES

- Öffnen Sie die Reagenzampulle wie im Abschnitt 'Vorsichtsmaßnahmen' beschrieben (Ampulle mit Tropfpipette).
- Geben Sie einen Tropfen Reagenz ab.
- Verschließen Sie das Fläschchen nach Gebrauch wieder gut und lagern Sie es wie im Abschnitt 'Lagerungsbedingungen' beschrieben.

PROBEN (ENTNAHME UND VORBEREITUNG)

API Listeria darf nicht zur direkten Testung von klinischen oder anderen Untersuchungsmaterialien verwendet werden. Die zu identifizierenden Mikroorganismen müssen zuerst gemäß den üblichen mikrobiologischen Verfahren auf einem geeigneten Kulturmedium isoliert werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Auswahl der Kolonien

- Prüfen Sie, ob der zu untersuchende Stamm zum Genus *Listeria* gehört (kurze, grampositive, polymorphe Stäbchen, bei 25°C beweglich, bei 37°C jedoch unbeweglich, Katalase positiv und Oxidase negativ).
 - Da die Proben oft eine Mischung aus mehreren *Listeria* Spezies enthalten, ist es empfehlenswert, zunächst eine Subkultur auf Blutagar anzulegen (Einzelkolonien inkubieren Sie für 24 Stunden bei 36°C ± 2°C).
- ANMERKUNG:** Folgende Medien können zur Züchtung der Keime, die im API Listeria System benutzt werden sollen, verwendet werden:
- Nicht selektive Blutagarmedien auf der Basis von Columbia- oder Trypsin-Soja, mit oder ohne Arabinose.
 - Selektivmedien für *Listeria* auf der Basis von McEwen-Medium, das die enzymatische Aktivität der Bakterien im API Listeria Streifen hemmt. Wenn dieses Medium für die Isolierung benutzt wird, legen Sie bitte eine Subkultur auf Blutagar an.

Vorbereitung des Streifens

- Stellen Sie eine Inkubationswanne mit Deckel bereit und geben Sie zur Herstellung einer feuchten Kammer ca. 3 ml destilliertes oder demineralisiertes Wasser (oder anderes Wasser ohne Zusätze bzw. Derivate, die Gasblasen erzeugen (z.B. Cl₂, CO₂)) in die Wanne.
- Notieren Sie die Referenznummer des Stammes auf dem dafür vorgesehenen seitlichen Abschnitt der Inkubationswanne. (Die Referenznummer nicht auf dem Deckel notieren, da er während des Arbeitsablaufes verwechselt werden oder abhanden kommen kann).
- Nehmen Sie den Streifen aus der Verpackung.
- Legen Sie den Streifen in die Wanne.
- Verwerten Sie das Trockenmittel.

Vorbereitung des Inokulums

- Öffnen Sie eine Ampulle API Suspension Medium (2 ml) wie im Abschnitt 'Vorsichtsmaßnahmen' (Ampulle ohne Tropfpipette) beschrieben.
- Nehmen Sie mit einer Pipette oder PSpipette einige Einzelkolonien vom Agar ab. Verwenden Sie vorzugsweise junge Kulturen (18-24 Stunden).
- Stellen Sie eine Keimsuspension entsprechend dem Trübungsstandard McFarland 1 her. Diese Suspension muss sofort verwendet werden.
- Notieren Sie die Art der Hämolyse auf dem Ergebnisblatt; die Hämolyse hat den Charakter eines Zusatztests.

Beimpung des Streifens

- Pipettieren Sie die Keimsuspension in die Mikroröhren des Streifens. Um Blasenbildung am Boden der Röhren zu vermeiden, halten Sie die Inkubationswanne leicht schräg und legen Sie die Pipette/PSpipette am Rand des Becherglases ab.
- Füllen Sie für den [DIM] Test Röhren und über den [DIM] Test Röhren das Becherglas, dass sich kein konvexer Meniskus bildet.
- Füllen Sie für die Tests ESC bis TAG nur die Röhren (ca. 10 µl).

ANMERKUNG 1: Ein korrektes Befüllen ist sehr wichtig. Ungegend oder zu stark gefüllte Röhren können zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen.

- Decken Sie die Inkubationswanne ab.
- Inkubieren Sie für 18 bis 24 Std. bei 36°C ± 2°C in aerobem Atmosphäre.

bioMérieux® sa Deutsch - 1

bioMérieux® sa Deutsch - 2

api® Listeria

078871 - DE - 2003/01

ABLESUNG UND INTERPRETATION

Ablesung des Streifens

- Geben Sie 1 Tropfen ZYM B Reagenz in den [DIM] Test.
- Lesen Sie innerhalb 3 Minuten alle Reaktionen mit der Ablesetabelle der Arbeitsanleitung ab.
- Notieren Sie die Reaktionen in Form von + oder - auf dem Ergebnisblatt.
- Notieren Sie außerdem die Hämolyseart. Das Ergebnis der Tests wird bei der Interpretation des Streifens berücksichtigt.

Interpretation

Die Identifizierung erhält man anhand des numerischen Profils.

- Erstellung des numerischen Profils:
Die biochemischen Reaktionen auf dem Ergebnisblatt sind in 3-er Gruppen eingeteilt. Jede positive Reaktion erhält den Wert 1, 2 oder 4 je nach Position des Tests innerhalb der Gruppe (1., 2. oder 3. Test). Die Zahlenwerte jeder Gruppe werden addiert (negative Reaktion = 0), so erhält man 4 Ziffern, welche das numerische Profil ergeben.

Identifizierung

- Die Identifizierung erfolgt anhand der Datenbasis (V 1.1) mit dem numerischen Profil.
- Schlagen Sie das Profil in der Profilliste der Arbeitsanleitung nach.
- mit der Identifizierungssoftware: Geben Sie das 4-stellige numerische Profil über die Tastatur ein.



6 510 *Listeria monocytogenes*

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Medien, Streifen und Reagenzien unterliegen in den verschiedenen Stadien der Produktion systematisch durchgeführten Qualitätskontrollen. Die mikrobiologische Qualitätskontrolle der API-Teststreifen im Labor kann vorzugsweise mit dem 1. *Listeria innocua* ATCC 33090 oder einem der folgenden Stämme durchgeführt werden:

1. *Listeria innocua* ATCC BAA-130
2. *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

ATCC: American Type Culture Collection, 1980 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	[DIM]	ESC	oMAN	DARL	XYL	RHA	MDG	RIB	G1P	TAG
1.	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
2.	+	+	-	+	+	-	V	-	+	-
3.	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

* Ergebnis kann manchmal als (-) abgelesen werden.
Profil nach Anzecht auf Columbia-Agar mit Hämoglobin.
Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Qualitätskontrolle in Übereinstimmung mit den jeweils gültigen Vorschriften durchzuführen.

LIMITIERUNGEN

- Das API Listeria System dient nur zur Identifizierung der in der Datenbasis enthaltenen Keime der Gattung *Listeria* (siehe Prozenttabelle am Ende der Arbeitsanleitung). Andere Mikroorganismen können weder identifiziert noch ausgeschlossen werden.
- Es dürfen nur Reinkulturen verwendet werden.

EFTE ERGEBNISSE

Die 4-ärten Ergebnisse der verschiedenen biochemischen Reaktionen entnehmen Sie der Prozenttabelle am Ende dieser Arbeitsanleitung.

PERFORMANCE

643 Stämme unterschiedlicher Herkunft und Stämme aus Stammsammlungen, die zu den Spezies der Datenbasis gehören, wurden getestet.
- 95,91% der Stämme wurden korrekt identifiziert (mit oder ohne Zusatztests).
- 0,62% der Stämme wurden nicht identifiziert.
- 0,47% der Stämme wurden falsch identifiziert.

BESEITIGUNG DER ABFÄLLE

Es liegt in der Verantwortung jedes Labors, die entstandenen Abfälle und Abwässer gemäß der jeweiligen Risikogruppe zu behandeln und deren Entsorgung in Übereinstimmung mit den gültigen gesetzlichen Bestimmungen sicherzustellen.

api® Listeria

078871 - DE - 2003/01

ABLESETABELLE

TESTS	AKTIVE BESTANDTEILE	MENGE (µg/Vert.)	REAKTIONEN	ERGEBNISSE	
				NEGATIV	POSITIV
[DIM]	Enzymsubstrat	0,100	Differenzierung <i>L. innocua</i> f. <i>monocytogenes</i>	ZYM B / - 3 min	
ESC	Acidul Emerald	0,16 0,024	Hydrolyse (ESCuln)	hellgelb	schwarz
oMAN	4-Nitrophenyl-D-mannopyranosid	0,045	o-MANNose	farblos	gelb
DARL	D-Arabin	0,4	Säurebildung (D-Arabinol)		
XYL	D-Xylose	0,4	Säurebildung (XYlose)		
RHA	L-Rhamnose	0,4	Säurebildung (Rhamnose)		
MDG	Methyl-α-D-Glukopyranosid	0,4	Säurebildung (Methyl-α-D-Glukopyranosid)	rot / rot orange	gelb / gelb orange
RIB	D-Ribose	0,4	Säurebildung (Ribose)		
G1P	Glukose-1-Phosphat	0,4	Säurebildung (Glukose-1-Phosphat)		
TAG	D-Tagatose	0,4	Säurebildung (TAGatose)		

- Die angegebenen Mengen können je nach Konzentration der verwendeten Ausgangsmaterialien angegangen werden.
- Einige Nüchtern enthalten Bestandteile tierischen Ursprungs, vor allem Peptone.

METHOODIK
PROFILLISTE
PROZENTABELLE
LITERATUR
SYMBOLS

S. I
S. II
S. III
S. IV

bioMérieux® sa
au capital de 11 879 045 €
673 620 999 RCS LYON
69280 Marcy l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 76 87 20 00
Fax 33 (0)4 76 87 20 90
http://www.biomérieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15609
Durham, NC 27714-0659 / USA
Tel. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

Getrukt in Frankreich

Das Logo ist ein eingetragenes und geschütztes Warenzeichen von bioMérieux sa oder einer ihrer Filialen.

bioMérieux® sa Deutsch - 3

A.2 Ergebnis des Api Listeria IDE 760



B. Arbeitsanweisung der Firma EBI Food Safety: Phagentiter Bestimmung

Phage titer estimation

Materials required:

- BHI-agar plates, ~85 mm diameter, ~16ml medium (1.2% agar)
- Overnight culture indicator strain *L. innocua* in ½ strength BHI-broth (NaCl adjusted to 5g/l)
- Incubation stove 30°C
- Thermal block/water bath at 42°C
- Pipettes
- Vortexer
- Eppendorf caps
- ½ strength BHI- (NaCl adjusted to 5g/l)-soft-agar (0.4% agar) 5mL aliquots in test tubes – molten and kept at 42°C
- SM-buffer (autoclaved):
 - 100 mM NaCl
 - 10 mM MgSO₄
 - 50 mM Tris-HCl pH 7.5

Procedure:

1. Prepare serial dilutions in duplicate:

- 1.1. Add of 900 µL SM-buffer to Eppendorf caps (alternatively for 100x dilution steps use 990 µL).
- 1.2. Add 100 µL of P100 sample to the prepared cap (alternatively for 100x dilution steps use 990 µL).
- 1.3. Mix gently by vortexing for 2s at lowest speed, followed by slowly inverting cap.
Repeat twice.
- 1.4. Transfer 100 µL from this cap to the next cap and repeat mixing procedure.
- 1.5 Repeat until the two dilution series are complete (dilution up to 10⁻⁸)

2. Preparation of plates:

- 2.1 If stored cold, ensure plates are at room temperature.
- 2.2 Melt soft-agar test tubes and place at 42°C, triplicate tubes for each dilution to be tested.
- 2.3 Add 200 µL of indicator bacteria to the soft agar.
- 2.4 Mix gently and pour onto a plate, evenly distributing the soft agar, by gently rocking the plate.
- 2.5 Let the soft-agar harden for 5 min.
- 2.6 Carefully place drops of 10 µL starting at the highest dilution onto the plate with a pipette.
- 2.7 Incubate at 25-30°C overnight

3. Evaluation of plates:

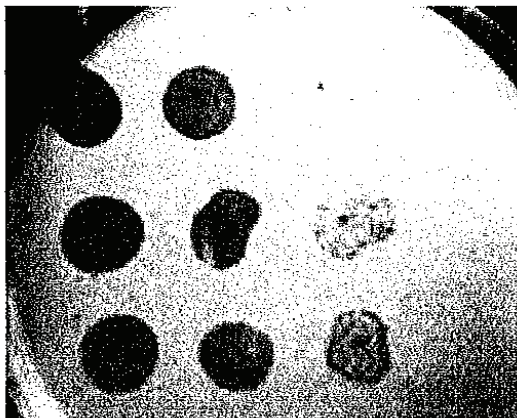


Fig 1. Lysis zones created by phages in 10µL spots in a serial dilution

- 3.1 While this method is not precise, the dilution with separate single plaques allows rough estimation of the titer.
Dilution factor x 100 times number of plaques = titer in order of magnitude.

C. Methodenvorschrift des Dr. Erdmann Instituts: Isolierung genomischer DNA

1. Isolierung genomischer DNA

Ausgangsmaterial: Bakterien / Hefen: 2-3 gut gewachsene Kolonien oder 1ml Flüssigkultur
Schimmel: eine Kolonie (ø 1cm) oder 1ml Flüssigkultur

Möglichst wenig Agar in die Probe bringen und Zellmaterial gut homogenisieren: Bei manchen Schimmelpilzkulturen hilft vortexen mit green beads, oder zweimaliges einfrieren und kochen (3 min 95°C). Gram-positive Bakterien können mit Lysozym (10mg/ml 30 min 37°C) vorbehandelt werden.

DNA-Isolierung mit dem MagnaPure oder Chemagen System. Alternativ per Hand oder Qiagen-Kit.

Handaufreinigung genomischer DNA mit GES (Rademaker and de Bruijn)

- Zellmaterial in 1ml ¼ Ringer oder RB (150mM NaCl; 10mM EDTA; pH 8.0) resuspendieren; pelletieren (1' 10.000 rpm)
- Zellmaterial in 100 µl TE (10mM Tris; 1mM EDTA; pH 8.0) resuspendieren; gegebenenfalls Lysozym (10µl 100mg/ml) zugeben und 30' bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 500µl GES (60% Guanidine thiocyanate; 100mM EDTA; 1% N-lauroyl sarcosine); mischen und Inkubation 5' +4°C
- Zugabe von 250µl 7.5M Ammoniumacetat; mischen und Inkubation 5' +4°C
- Zugabe von 500µl Chloroform; vortexen und 5' zentrifugieren (10,000 rpm) (Eppis gut verschließen oder Schraubdeckel-Gefäße verwenden!)
- 700µl der oberen Phase abnehmen und zu 378µl Isopropanol in ein frisches Eppi geben; vorsichtig mischen und 5' bei 10,000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen und DNA-Pellet mit 200µl 70%Ethanol waschen. Erneut zentrifugieren; Ethanol vorsichtig abnehmen; Pellet trocknen (5' RT) und in 100µl Wasser lösen (20' 37°C).

Die so isolierte DNA ist in der Regel für die meisten PCR-Anwendungen geeignet. Einige Organismen (z.B. *Aspergillus niger*) produzieren allerdings Substanzen, die die PCR inhibieren. In diesem Fall muss die DNA nochmals über eine Säule (*high pure PCR product purification kit*, Roche) gereinigt werden.

D. Rezeptur : Zwiebelmettwurst

Versuch 1:

Schweineschulter	3000g	94,90%
AVO Meister Club Starterkultur	0,35g	0,01%
(Artikelnummer: 608112)		
Nitritpökelsalz	68,50g	2,17%
Gewürzmischung	32,00g	1,01%
Spiro Spezial	60,00g	1,89%

Sterildarm

3160,85g 100%

Versuch 2:

Schweineschulter	2000g	94,90%
AVO Meister Club Starterkultur	0,21g	0,01%
(Artikelnummer: 608112)		
Nitritpökelsalz	45,72g	2,17%
Gewürzmischung	21,28g	1,01%
Spiro Spezial	41,92g	1,89%

Sterildarm

2107,48g 100%

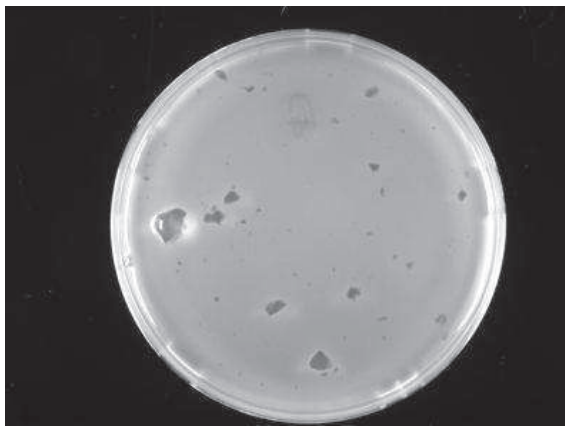
Zubereitung :

- Fleisch in Würfel schneiden
- Zugabe von Nitritpökelsalz, Gewürzmischung und Starterkultur- vermengen
- Zugabe von Spiro Spezial- vermengen
- Wolfen mit einer 3mm großen Lochscheibe (MADO, Modell Primus)
- Füllen mit einem Handfüller (Dick) in Sterildärme
- Reifung in der Klimakammer bei +6°C

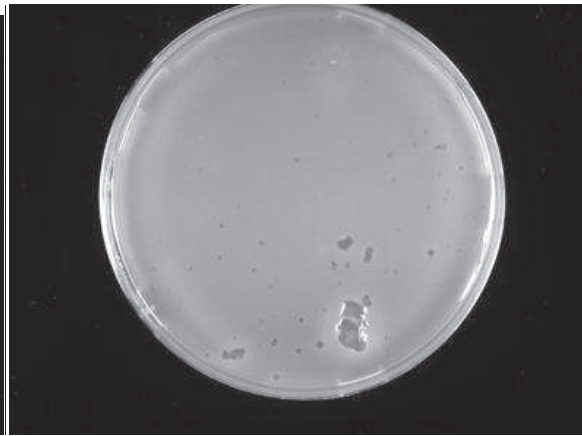
Für den Ansatz 6 des ersten Versuchs wurde statt der Starterkultur 1,8g Schutzkultur der Firma Danisco eingesetzt (Holdbac 261).

E. Ergebniss des Versuchs: Nachweis von Bakteriophagen

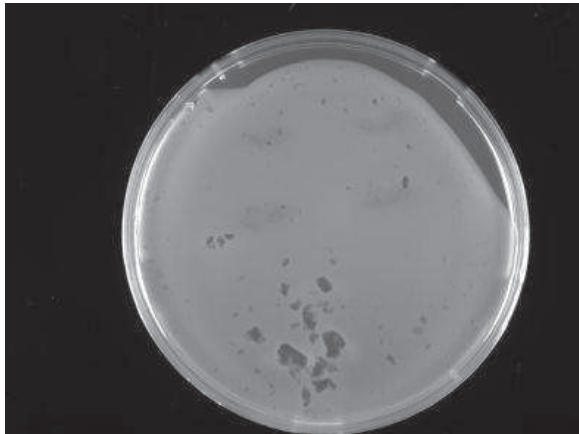
Phagennachweis direkt nach Herstellung der Zwiebelmettwürste:



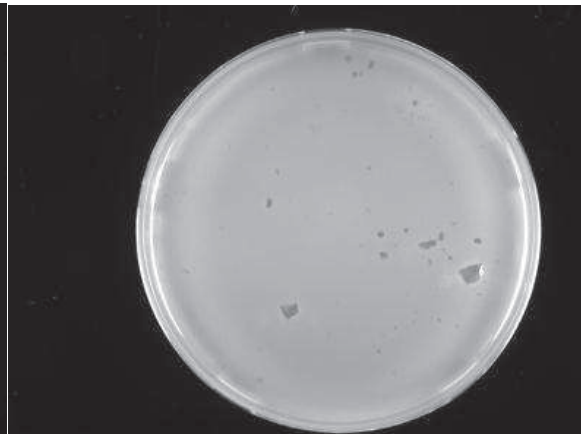
Ansatz 1 : 0h Kontrolle



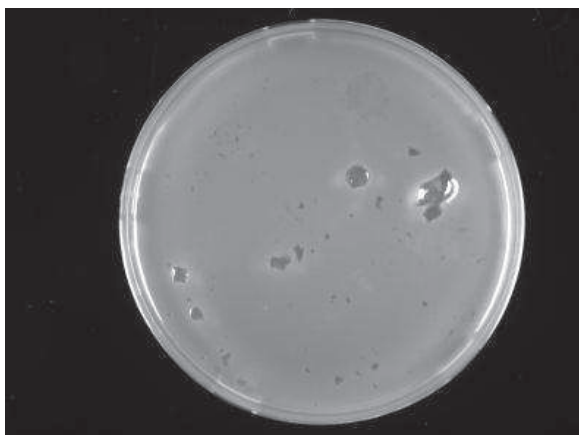
Ansatz 2: 0h Schutzkultur



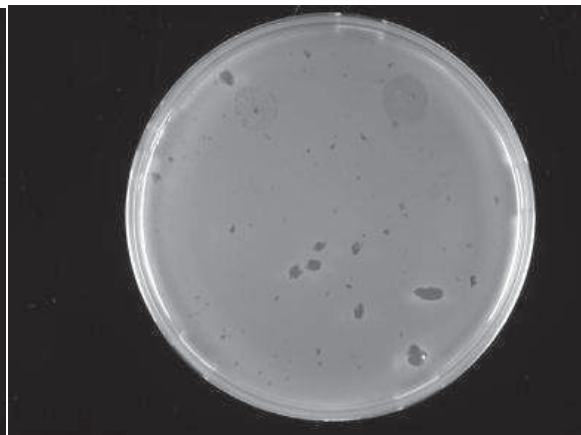
Ansatz3: 0h Hitzeinaktiviert



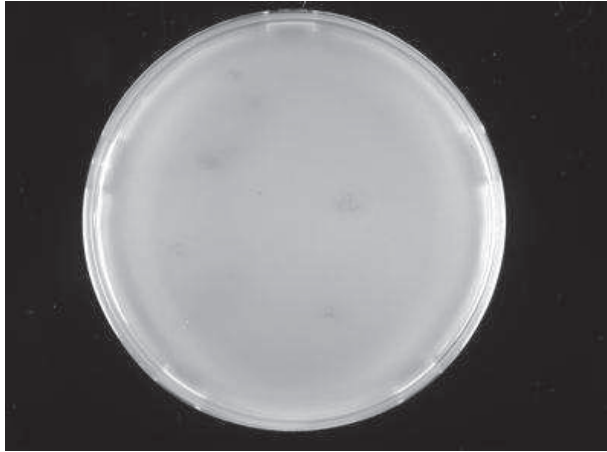
Ansatz 4: 0h Phagenbehandlung 1:1000



Ansatz 5 : 0h Phagenbehandlung 1:100



Ansatz 6: 0h Phagenbehandlung 1:10



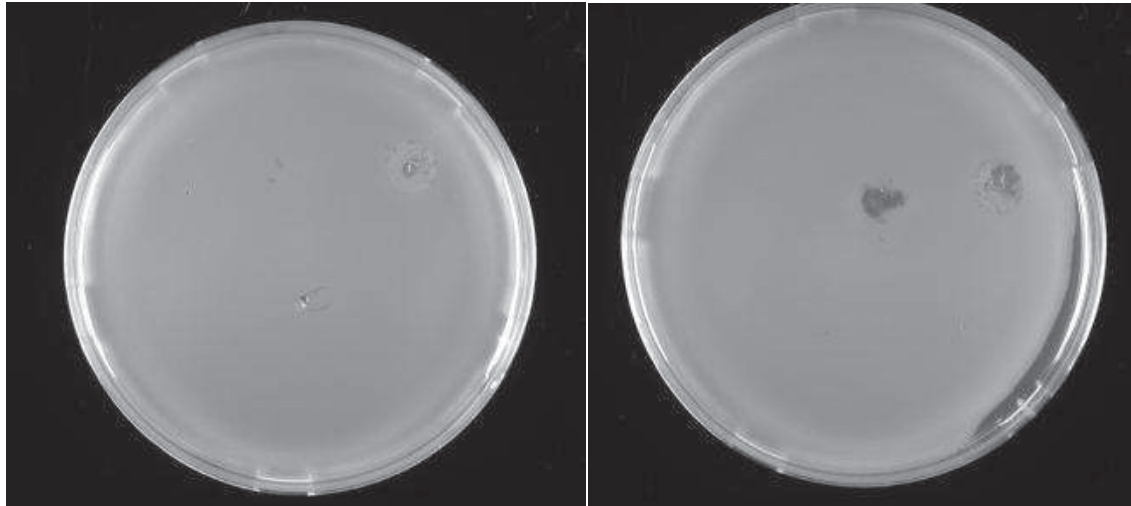
Hitzeinaktivierte Phagenlösung

Die Unebenheiten in Agar lassen sich darauf zurückführen, dass beim Herstellen des Nährbodens des Agar bereits an Temperatur verloren hat. Folglich kam es zu Klumpenbildung. Die Plaquebildung ist auf den Fotos teilweise schwer zu erkennen.

hitzeinaktiviert

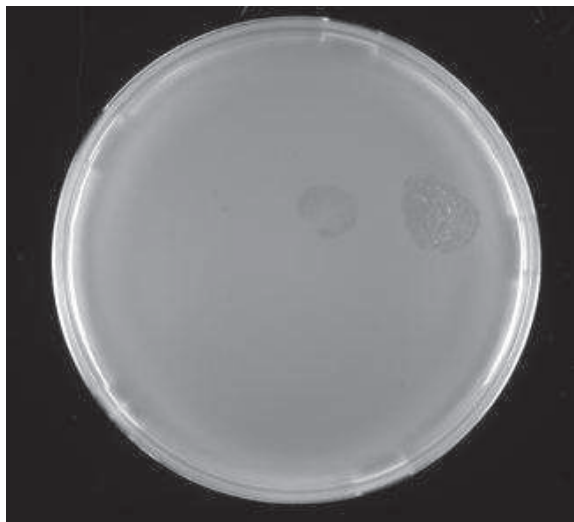
21h nach der Herstellung:

Auf die Untersuchung der Kontroll-, Hitzeinaktivierten- und Schutzkulturproben wurde im folgenden verzichtet, da nach der ersten Kontrolluntersuchung davon ausgegangen werden kann, dass die Proben keine Phagen enthalten. Wie auf den Fotos zu erkennen ist der Agar durch die Pipettierspitze leicht beschädigt worden. Dies lässt sich in den Fotos schlecht von den Lysezonen unterscheiden.



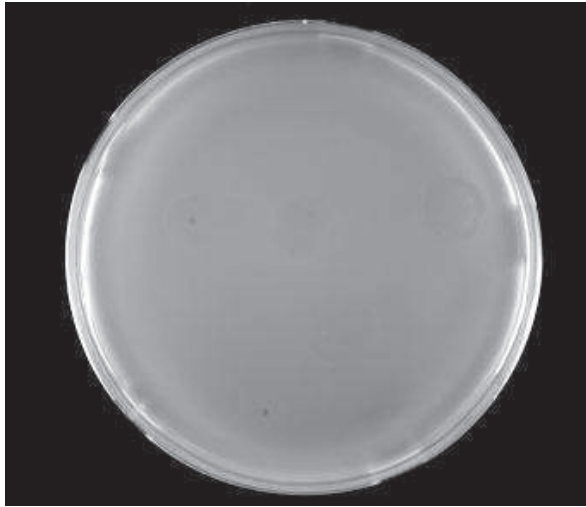
Ansatz 3:21h Phagenbehandlung 1:1000

Ansatz 4:21h Phagenbehandlung 1:100

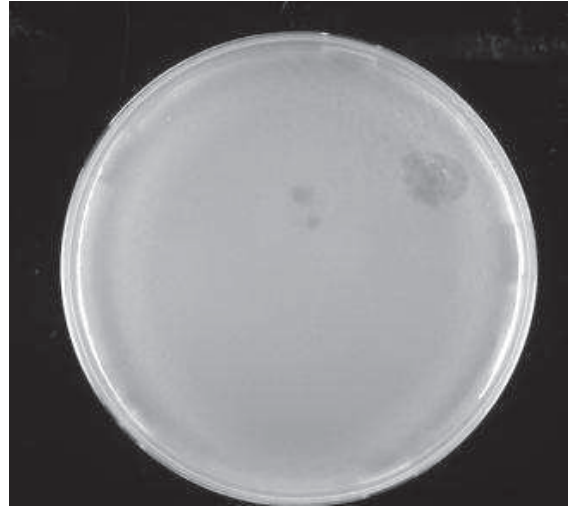


Ansatz 5:21h Phagenbehandlung 1:10

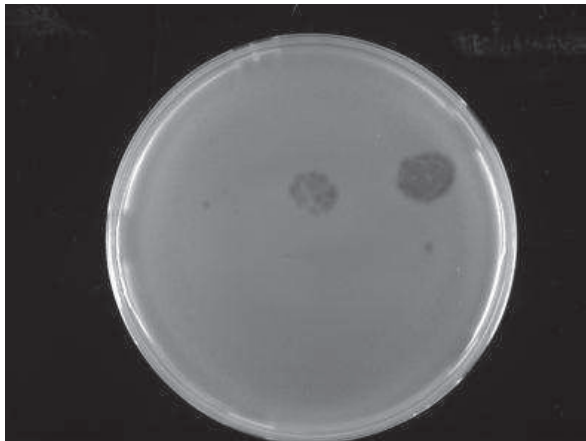
Phagennachweis 45h nach der Herstellung:



Ansatz 3:45h Phagenbehandlung 1:1000



Ansatz 4:45h Phagenbehandlung 1:100



Ansatz 5:45h Phagenbehandlung 1:10

Ab diesem Zeitpunkt ist eine trübe Plaquebildung zu erkennen.

F. Fotodokumentation des Hauptversuches



Beimpfte Schweineschulter nach der Behandlung mit Listex P100



Grundmasse vor dem Wolfen



Brät nach dem Wolfen (Lochscheibe 3mm)

G. Methodenvorschrift: quantitativer *Listeria monocytogenes* Nachweis des Dr. Erdmann Instituts

INSTITUT DR. ERDMANN <small>Labor für Lebensmittelsicherheit und Umwelthygiene</small>	Prüfverfahren – Nr.: 5.4 14 03-Mi Horizontales Verfahren für die Zählung von <i>Listeria</i> monocytogenes DIN EN ISO/IEC 17025	Gültig ab: 15.03.2004
		Revision: 05
		Seite 1 von 3

Anwendung:

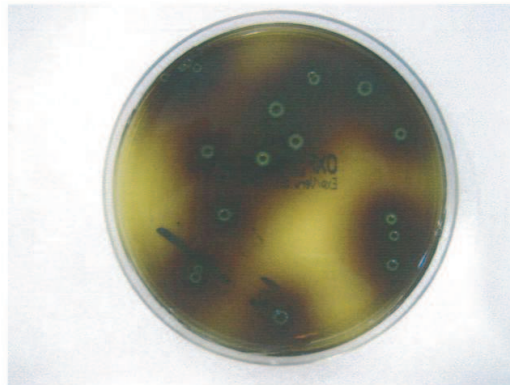
Diese Methode legt in Anlehnung der in § 64 LFGB genannten Methode den Nachweis von Listerien in Fleisch und Fleischerzeugnissen fest.

Kurzbeschreibung der Methode (Zählverfahren):

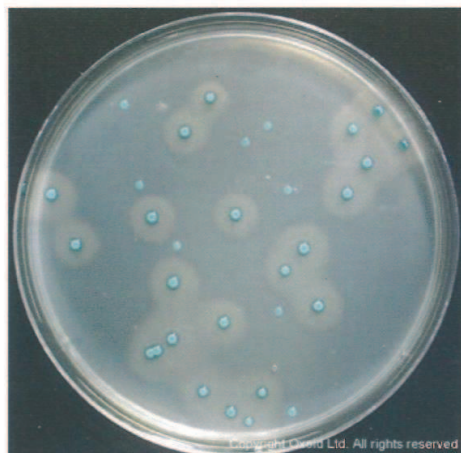
1. **Probeneinwaage:** 10g Probenmaterial werden in einen sterilen Stomacherbeutel verbracht.
2. **Homogenisierung:** 10 g der Probe werden mit der neunfachen Menge Peptonwasser im Stomacher für 20 s homogenisiert (Erstverdünnung).
3. **Wiederbelebung:** Zur Wiederbelebung wird die Erstverdünnung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
4. **Beimpfung:** Beim Nachweis erfolgt die Beimpfung auf Oxford-Agar durch ausspateln von 1 ml auf drei Nährbodenplatten (0,33 ml pro Platte). Zusätzlich können in abhängigigkeit der zu erwartenden Keimzahl zusätzlich Spatelplatten mit 0,1 ml aus der Erstverdünnung und der Zweitverdünnung angelegt werden. Zusätzlich werden zur direkten Ermittlung von *L. monocytogenes* je 2x 0,5 ml der Erstverdünnung auf Listeria Brilliance Agarplatten ausgespatelt.
5. **Bebrütung:** Die Bebrütung der Nährböden erfolgt bei 37 °C für 48 h
6. **Auswertung:**
 Oxford-Agar: *Listeria* spp. grau-grüne bis schwarze Kolonien mit schwarzem Hof (Äskulinspaltung) und schwarzem gesenktem Zentrum

	Datum:	Unterschrift:
Erstellt: F. Zirkelbach, geändert: Chr. Heuermann, geändert: Karin Dickbertel	27.11.2008	
Prüfung und Freigabe (GL): Dr. Thomas Wilke	27.11.2008	

INSTITUT DR. ERDMANN Labor für Lebensmittelsicherheit und Umwelthygiene	Prüfverfahren – Nr.: 5.4 14 03-Mi Horizontales Verfahren für die Zählung von <i>Listeria</i> monocytogenes DIN EN ISO/IEC 17025	Gültig ab: 15.03.2004
		Revision: 05
		Seite 2 von 3



Listeria Brilliance Agar: *Listeria monocytogenes* → Grünblaue leicht erhabene Kolonien mit Hofbildung (Abbildung unten).
Listeria innocua → Grünblaue leicht erhabene Kolonien ohne Hofbildung.



7. **Bestätigung:** Zur Bestätigung *Listeria* spp. verdächtige Kolonien werden biochemisch mittels Api Listeria (Fa. bioMérieux) auf ihre Identität hin überprüft. Zusätzlich werden je Nährboden und Verdünnungsstufe zur weiteren Bestätigung 5 verdächtige Kolonien (bei <5 Kolonien alle) auf *Listeria monocytogenes* hin untersucht, d.h. bis zu maximal 20 Kolonien sind zu prüfen. Die Überprüfung erfolgt nach Anlage S. 5ff Absatz 9.5f.
8. **Auswertung:** Aus den gezählten Kolonien der Oxford-Agarplatte errechnet sich die Keimzahl *Listeria* spp.. Aus den charakteristische Kolonien, die auf *Listeria* Brilliance Agar ermittelt wurden, und die als *Listeria monocytogenes* eindeutig identifiziert wurden, errechnet sich die Keimzahl für *Listeria monocytogenes*. (Siehe Anlage S.6 Abs. 10)

INSTITUT DR. ERDMANN <small>Labor für Lebensmittelsicherheit und Umwelthygiene</small>	Prüfverfahren – Nr.: 5.4 14 03-Mi Horizontales Verfahren für die Zählung von <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> DIN EN ISO/IEC 17025	Gültig ab: 15.03.2004
		Revision: 05
		Seite 3 von 3

Durchführung: Die Vorschriften sind einzuhalten, Abweichungen von dieser Arbeitsanweisung bedürfen der Genehmigung durch den technischen Leiter.

Mitgeltende Unterlagen: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 L 00.00-22 LFGB: Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* Teil 2: Zählverfahren

Herstellieranweisung api *Listeria* (Fa. bioMérieux)

Diese Methoden liegen dieser Vorschrift in Kopie bei.

H. Produktinformationen der Schutzkultur Holdback 261

CULTURES DIVISION
food.protect@danisco.com
www.danisco.com
Seite 1 / 2
Gültig ab: 27. September 2007

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 223284-7.2DE

Materialnr. 51262150

HOLDBAC™ 261 100 kg
HOLDBAC™ Protective Cultures

Beschreibung

Konzentrierte, gefriergetrocknete Kultur

Anwendungsempfehlungen

1 Tüte für 100 kg \approx 50g
Für alle schnittfesten Rohwürste, die eine zügige, aber nicht zu starke Säuerung erfordern. Alle Fleischprodukte aus reinem Muskelfleisch und Hackfleisch sowie Streichwürste, die wenig oder gar keinen Zucker enthalten (weniger als 2g Glukose / kg).
Die anwendungstechnischen Hinweise entsprechen unserem Für nicht bestimmungsspezifischen Einsatz kann keine Gewährleistung übernommen werden.

Gebrauchsanleitung

Die Kultur vor der Anwendung in lauwarmem Wasser (25 °C - 30 °C) lösen (0,5 l je 50 g Kulturmischung). Diese Lösung wird während des Küdervorgangs langsam dem Brat zugegeben oder vor dem Wärmegrad für Fleisch mitgegeben. Für die Kultur als Schutzkultur eingesetzt, das Fleisch in die Flüssigkeit eintauchen.

Zusammensetzung

Staphylococcus xylosus
Lactococcus lactis
Lactobacillus plantarum
Trägerstoff: Dextrose, wasserfrei

Die Informationen in diesem Dokument basieren auf unseren eigenen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten und sind nach unserem besten Wissen zuverlässig. Anwender sollten jedoch eigene Tests durchführen, um die Eignung unserer Produkte für ihre spezifischen Zwecke zu gewährleisten, und sicherstellen, dass die Produkte für den vorgesehenen Zweck geeignet sind. Wir übernehmen keine Haftung für Schäden, die aus dem Gebrauch unserer Produkte resultieren, oder indirekte Schäden dar. Es wird keine Haftung für mögliche Patentverletzungen übernommen.

CULTURES DIVISION
food.protect@danisco.com
www.danisco.com
Seite 2 / 2
Gültig ab: 27. September 2007

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 223284-7.2DE

Materialnr. 51262150

HOLDBAC™ 261 100 kg
HOLDBAC™ Protective Cultures

Verpackung

Verbundfolie aus PE, PET, Al

Füllmenge

50 g ± 2 g

Reinheit und rechtlicher Status

HOLDBAC™ 261 100 kg erfüllt die von der EU-Gesetzgebung festgelegten Standards.
Diese Stämme wurden aufgrund ihrer technologischen Qualitäten ausgewählt. Sie haben eine lange Geschichte als sicheren Gebrauch in Lebensmitteln, wo sie als Zusatzstoff eingesetzt werden können.
Die Stämme sind allgemein als sicher (GRAS) anerkannt für den Gebrauch in Fleisch- und Geflügelprodukten in den USA.
Die Bestimmungen zur Lebensmittelkennzeichnung sollen stets hinsichtlich des Status dieses Produktes zu Rate gezogen werden, da die Gesetzgebung betreffend der Verwendung in Lebensmitteln von Land zu Land unterschiedlich sein kann.

Sicherheit und Handhabung

Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

GMO Status

HOLDBAC™ 261 100 kg besteht weder aus gentechnisch veränderten Organismen im Sinne der Europäischen Richtlinien (EU) 1829/2003 und 1830/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003, noch enthält es diese oder wurde daraus hergestellt.

Allergene

Die nachfolgende Tabelle gibt an, welche der folgenden Allergene und der daraus hergestellten Produkte enthalten sind:

Ja	Nein	Allergene	Beschreibung der Bestandteile
X		Weizen	
X		andere Getreide	
X		Eier	
X		Kraut- und Schalenfrüchte	
X		Fisch	
X		Erbsen	
X		Soja	
X		Milch (einschließlich Laktose)	
X		Schalenfrüchte	
X		Sellerie	
X		Senf	
X		Sesam	
X		Schwefelkohlenstoff (bis zu 10 mg / kg)	
X		Lupine	
X		Weichtiere	

Regelmäßige Bestimmungen sollten abete zu Rate gezogen werden, da die Kennzeichnungsanforderungen zur Allergeneithaltung von Land zu Land unterschiedlich sein können.

Die Informationen in diesem Dokument basieren auf unseren eigenen Forschungs- und Entwicklungsarbeiten und sind nach unserem besten Wissen zuverlässig. Anwender sollten jedoch eigene Tests durchführen, um die Eignung unserer Produkte für ihre spezifischen Zwecke zu gewährleisten, und sicherstellen, dass die Produkte für den vorgesehenen Zweck geeignet sind. Wir übernehmen keine Haftung für Schäden, die aus dem Gebrauch unserer Produkte resultieren, oder indirekte Schäden dar. Es wird keine Haftung für mögliche Patentverletzungen übernommen.

I. Auflistung der Bezugsquellen der verwendeten Arbeitsmittel

Holdback 261	Danisco, Kopenhagen, Dänemark
Lixtex P100	EBI Food Safety, Wageningen, Holland
Brilliance Listeria Agar Base	Oxoid, Basingstoke, England
Brain Heart Infusion	Oxoid, Basingstoke, England
Peptonwasser	Oxoid, Basingstoke, England
Plate Count	Oxoid, Basingstoke, England
Brilliant Listeria Agar	Oxoid, Basingstoke, England
Starterkultur	AVO, Belm, Deutschland
Gewürze	AVO, Belm, Deutschland
frische Schweineschulter	Tönnies, Rheda-Wiedenbrück, Deutschland
Spiro Spezial	AVO, Belm, Deutschland
Sterildärme	Kalle, Wiesbaden, Deutschland