

Schlussbericht

zu dem IGF-Vorhaben

**Schnellnachweis mikrobieller Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen
mittels Durchflusszytometrie und verflüssigbarer Probenahme-Matrix**

der Forschungsstelle(n)

FS 1 Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., Duisburg

FS 2 wfk - Cleaning Technology Institute e. V., Krefeld

FS 3 Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V., Quakenbrück

Das IGF-Vorhaben 386 ZN der Forschungsvereinigung Umwelttechnik wurde über die



im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Energie

aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Duisburg, 30.04.2014

Ort, Datum

Dipl.-Ing. A. Hugo

Name und Unterschrift des/der Projektleiter(s)
an der/den Forschungsstelle(n)

Krefeld, 30.04.2014

Dr. rer. nat. O. Rigbers

Quakenbrück, 30.04.2014

Dr.-Ing. H. Steinkamp

1 Forschungsthema

Schnellnachweis mikrobieller Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen mittels Durchflusszytometrie und verflüssigbarer Probenahme-Matrix

2 Zusammenfassung

Die sichere und reproduzierbare Beprobung von inhomogen feuchten Oberflächen auf Schmutz und Mikroorganismen ist eine bis heute nicht zufriedenstellend gelöste Aufgabe. Aufgrund der Arbeitsabläufe in den Unternehmen werden Untersuchungsergebnisse immer häufiger binnen Stunden erwartet. Diese Anforderung kann eine Zellzahlbestimmung durch Ausplattierung von Verdünnungsreihen mit anschließender Bebrütung der Zellkulturen nicht erfüllen. Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden zwei neuartige Verfahren zur Probenahme von feuchten und inhomogen feuchten Oberflächen in Kombination mit der Durchflusszytometrie als analytischem Verfahren zur Zellzahlbestimmung kombiniert.

Bei der *indirekten Methode* werden durch Aufpressen einer porösen Gelatinematrix als Schaumpad auf die zu beprobende Fläche anhaftende Mikroorganismen aufgenommen. Als Hilfsmittel kann zusätzlich Spülflüssigkeit verwendet werden. Diese Gelatineschaummatrix ist wiederverflüssigbar und kann nach Aufbereitung mittels eines Durchflusszytometers vermessen und analysiert werden.

Bei dem zweiten entwickelten Probenahme-Verfahren handelt es sich um eine *direkte Methode*, bei der die Keime direkt mittels Hydrozyklon aufgenommen und vermessen werden können. Dabei wird vorab Spülflüssigkeit mittels einer Zweistoffdüse auf die Fläche aufgesprüht, um vorhandene Mikroorganismen zu suspendieren. Die Mikroorganismensuspension wird dann abgesaugt, in einem Hydrozyklon abgeschieden und kann ohne weitere Aufbereitungsschritte direkt einer Färbung und durchflusszytometrischen Analyse unterzogen werden.

Eine spezifische Anfärbung des Probenmaterials ermöglicht die Differenzierung des biologischen Probenmaterials hinsichtlich „lebend“, „tot“ und „Vitalitätsstatus unbekannt“.

Die Vorteile der indirekten Beprobung mit Gelatineschaumpads liegen in dem geringen apparativen Aufwand und der einfachen Durchführung der Probenahme. Die Vorteile der direkten Beprobung mit dem Zyklon liegen im Vergleich zum indirekten Verfahren in den sehr hohen Wiederfindungsraten, den deutlich schwächeren Matrixeffekten bei der zytometrischen Analyse, dem geringeren Zeitaufwand des gesamten Verfahrens und der guten Ablösung auch von angetrockneten Mikroorganismen. Nachteilig wirken sich die relativ aufwändige Beprobungsprozedur und der hohe apparative Aufwand aus. Diese Methode hat sich sowohl für leicht als auch für stark angetrocknete Mikroorganismen als besonders effektiv erwiesen.

Die Nachteile der indirekten Methode mittels schwammartiger Schaummatrix im Vergleich zur direkten Probenahme mittels Hydrozyklon liegen in den längeren Zeiten für die Probenbearbeitung (Hydrolyse der Schaummatrix, Filtration der Mikroorganismen), als auch dem stärkeren Hintergrundsignal aus Schaumbestandteilen, wodurch sich eine um ca. 0,5 \log_{10} -Stufen niedrigere Wiederfindung ergibt.

Die Nachweisgrenzen verschiedener praxisrelevanter Mikroorganismen (*E. coli*, *S. aureus* und *C. albicans*) konnten für diese Färbemethode in Kombination mit der durchflusszytometrischen Quantifizierung mit etwa 10^2 Zellen/ml bestimmt werden (vgl. Abschnitt 8.6.2.3). In Anwendungstests in der Praxis konnten mit der Kombination von dynamischen Gelpadmethode und Durchflusszytometrie 10^3 Zellen/100cm² detektiert werden (vgl. Abschnitt 8.8.2). Die Ergebnisse von Probenahme und Zellzahlbestimmung mit den neuen Verfahren sind vergleichbar zu mit Plattenverfahren erzielten Resultaten (Abschnitt 8.7.4). Der Einfluss verschiedener Rückstände, die verfahrensbedingt auftreten und möglicherweise eine Messung im Durchflusszytometer verfälschen können, wurde untersucht.

Durch den Einsatz von Antikörpern konnte die quantitative Analyse von Mikroorganismen um die qualitative Information einer selektiven Bestimmung relevanter Mikroorganismenpopulationen erweitert werden. Demnach ist eine qualitative Analyse zur Kontrolle von branchenrelevanten Keimen möglich.

Der wesentliche Vorteil der neu entwickelten Methodenkombination liegt in der Schnelligkeit der Probenahme, Messung und Auswertung. Ergebnisse sind somit in weniger als 120 Minuten verfügbar.

In Anwendungstests bei Unternehmen konnte gezeigt werden, dass insbesondere das indirekte Probenahme-Verfahren für die Anwendung in der Praxis geeignet ist.

Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.

Danksagung

Die Forschungsstellen IUTA, wfk und DIL danken allen Unternehmensvertretern für ihr Engagement und eingebrachtes Expertenwissen im projektbegleitenden Ausschuss.

Förderhinweis:

Das IGF-Vorhaben 386ZN der Forschungsvereinigung Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. - IUTA und kooperierenden Forschungsvereinigung Reinigungs- und Hygienetechnologie wird über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

3 Durchführende Forschungsstelle(n)

Forschungsstelle 1:

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA)

Bliersheimer Straße 6047229 Duisburg

Leiter der Forschungsstelle: Prof. Dr.-Ing. D. Bathen / Dr.-Ing. Stefan Haep

Projektleiter: Dipl.-Ing. A. Hugo

Forschungsstelle 2:

wfk - Cleaning Technology Institute e. V.

Campus Fichtenhain 11 47807 Krefeld

Leiter der Forschungsstelle: Dr. rer. nat. J. Bohnen

Projektleiter: Dr. rer. nat. O. Rigbers

Forschungsstelle 3:

Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V. (DIL)

Professor-von-Klitzing-Straße 7 49610 Quakenbrück

Leitung der Forschungsstelle: Dr.-Ing. V. Heinz

Projektleiter: Dr.-Ing. H. Steinkamp

4 Inhalt

Inhaltsverzeichnis

1	Forschungsthema.....	1
2	Zusammenfassung.....	1
3	Durchführende Forschungsstelle(n).....	3
4	Inhalt.....	4
5	Wissenschaftlich- technische und wirtschaftliche Problemstellung.....	11
5.1	Wissenschaftlich-technische Problemstellung	11
5.2	Wirtschaftliche Problemstellung	11
5.3	Stand der Forschung.....	12
6	Forschungsziel	15
7	Gegenüberstellung von Ergebnissen und Zielsetzung des FuE-Vorhabens.....	16
8	Darstellung der Methoden und Ergebnisse	19
8.1	Arbeitsfelder der Methodenentwicklung	19
8.2	Arbeitspaket 1: Applikationsentwicklung I: Aseptische Probenahme durch Fluidabsaugung und -sammlung.....	20
8.3	Arbeitspaket 2: Herstellung und Optimierung einer aseptischen Probenahmematrix (Schaummaterial)	31
8.4	Arbeitspaket 3: Aseptische Probenahme mittels der in AP 2 entwickelten Probenahmematrix (Applikationsentwicklung II)	40
8.5	Arbeitspaket 4: Einbindung von Mikroorganismen in die Probenahmematrix und Unterscheidung von Mikroorganismen und sonstigen Partikeln.....	60
8.6	Arbeitspaket 5: Aseptische Aufbereitung der Probenahmematrix für die Anwendung der Durchflusszytometrie	66
8.7	Arbeitspaket 6: Vergleich der neu entwickelten Verfahren mit etablierten Beprobungsverfahren.....	103
8.8	Arbeitspaket 7: Anwendungstests.....	111
9	Veröffentlichte bzw. zur Veröffentlichung vorbereitete Arbeiten im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben.....	117
10	Gewerbliche Schutzrechte, soweit erworben oder zu erwerben beabsichtigt	118
11	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielte Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten	118
11.1	Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielte Ergebnisse	118
11.2	Innovativer Beitrag der erzielte Ergebnisse	119
11.3	Gewerblich-industrielle Anwendungsmöglichkeiten der erzielte Ergebnisse	120
12	Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzeptes.....	121
13	Literatur	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Arbeitsfelder und Leitkriterien der Methodenentwicklung	19
Abbildung 2:	Abschwemm-Pistole (Reuter 1980)	21
Abbildung 3:	Funktionsprinzip Zyklon A: Vertikaler Querschnitt B: Horizontaler Querschnitt	21
Abbildung 4:	Künstliche Anschmutzung von Beprobungsflächen (9 cm ²) mit fluoreszierenden Partikeln	23
Abbildung 5:	A: Ablösung der Anschmutzung; B: Aufbau Zyklon-Einheit; C: Aufnahme der abgelösten Anschmutzung	24
Abbildung 6:	Funktionsprinzip Zyklon: A: Versuchsaufbau für die Volumenstrom-Einstellung B: Regelventil und Partikelfilter C: Durchflussmessgerät TSI 4100	24
Abbildung 7:	Mikroskopische Bildauswertung	25
Abbildung 8:	Lage der mikroskopisch ausgewerteten Aufpunkte der Probenahme­flächen vor/nach der Beprobung	26
Abbildung 9:	Aufbau zur Untersuchung der Ultraschall-Unterstützung bei der Flächenbeprobung	26
Abbildung 10:	Prozentualer Reinigungserfolg bei Standard-Flüssigkeitsvolumen	27
Abbildung 11:	Prozentualer Reinigungserfolg bei Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens	28
Abbildung 12:	Test auf Aerosolfreisetzung von einer angeschmutzten Oberfläche mittels OPZ und Fluoreszenzdetektor.	29
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Gelatinepad-Herstellung	33
Abbildung 14:	Gelatineverarbeitung: Erwärmen einer Gelatinelösung unter Rühren (links), Schaumgenerator von Hansa-Mixer (rechts)	34
Abbildung 15:	Aufgeschlagene Gelatineschäume vor dem Trocknungsprozess (links) Geschnittene Gelatineschaumpads (rechts)	35
Abbildung 16:	Dichte der aufgeschlagenen Schäume auf Gelatinebasis	37
Abbildung 17:	Dichte der getrockneten Schäume auf Gelatinebasis	37
Abbildung 18:	Restfeuchte der getrockneten Gelatineschaumpads	38
Abbildung 19:	Schaumstruktur (20 Mesh, 10 %)	39
Abbildung 20:	Schaumstruktur (6 Mesh, 10 %)	39
Abbildung 21:	Schaumstruktur (20 Mesh, 15 %)	39
Abbildung 22:	Schaumstruktur (6 Mesh, 15 %)	39
Abbildung 23:	Schaumstruktur (20 Mesh, 20 %)	39
Abbildung 24:	Schaumstruktur (6 Mesh, 20 %)	39
Abbildung 25:	Rasterelektronische Aufnahme, Schaumstruktur DIL-Schaumpad	40
Abbildung 26:	Rasterelektronische Aufnahme, Schaumstruktur eines kommerziellen Produkts	40
Abbildung 27:	Ermittlung der Wasseraufnahme A) ohne Umgebungseinflüsse und B) durch Belastung mit einem Metallplättchen	41

Abbildung 28: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (15 %, 20 Mesh)	42
Abbildung 29: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (10 %, 20 Mesh)	43
Abbildung 30: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (20 %, 20 Mesh)	43
Abbildung 31: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (10 %, 6 Mesh)	44
Abbildung 32: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (20 %, 6 Mesh)	44
Abbildung 33: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (15 %, 6 Mesh)	45
Abbildung 34: Wasseraufnahme bei mechanischer Belastung	46
Abbildung 35: Wasseraufnahme ohne Umgebungseinflüsse bzw. im Stillstand	46
Abbildung 36: Wasseraufnahme bei manuellen Kreisbewegungen	46
Abbildung 37: Statische und bewegte Schaumpad-Methode	49
Abbildung 38: Statische Schaumpad-Methode	50
Abbildung 39: Einfluss von Schaumpaddichte und -konzentration auf den prozentualen Reinigungserfolg	52
Abbildung 40: Untersuchungsergebnisse zur Schaumpad-Lagerungsstabilität	53
Abbildung 41: Reinigungserfolg für Teflon- und Glasoberflächen	54
Abbildung 42: Prozentualer Reinigungserfolg beim Scale-Up der Untersuchungsfläche	55
Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmeorte für eine tropfenförmige Anschmutzung	56
Abbildung 44: Prozentualer Reinigungserfolg einer tropfenförmigen Anschmutzung	56
Abbildung 45: Kontaminationsverschleppung:	57
Abbildung 46: Schaumpad Rückstände auf der Fläche nach erfolgter Beprobung	57
Abbildung 47: Erweiterte mikroskopische Aufnahmeorte für eine tropfenförmige Anschmutzung	58
Abbildung 48: Prozentualer Reinigungserfolg einer tropfenförmigen Anschmutzung mittels der dynamischen Schaumpad-Methode	58
Abbildung 49: Abreinigungserfolg der dynamischen Methode – Materialverschleppung	59
Abbildung 50: Prozentualer Reinigungserfolg für unterschiedliche Anschmutzungsvolumina	59
Abbildung 51: Kontamination eines Gelatineschaumpads mit einer Bakterienkultur (links) und Schaumpads zur Verflüssigung im Stomacherbeutel (rechts)	62
Abbildung 52: Nachweis des Keimes <i>E.coli</i> K12 in einem Gelatineschaumpad (15 %, 20 Mesh)	64
Abbildung 53: Nachweis des Keimes <i>Staphylococcus xylosus</i> in einem Gelatineschaumpad (15 %, 20 Mesh)	64
Abbildung 54: Nachweis des Keimes <i>Staphylococcus xylosus</i> in einem Gelatineschaumpad (10 %, 6 Mesh)	64
Abbildung 55: Nachweis des Keimes <i>E. coli</i> K12 in einem Gelatineschwämmchen (10 %, 6 Mesh)	65

Abbildung 56: CyFlow® SL (Partec GmbH, Münster)	67
Abbildung 57: Mit Mikroorganismensuspension angeschnutzte, glatte Edelstahloberfläche.	72
Abbildung 58: Darstellung von Vorwärtsstreulicht (forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (side scatter) in der Durchflusszytometrie.	73
Abbildung 59: Strukturformel von Propidiumiodid (www.lifetechnologies.com)	74
Abbildung 60: Strukturformel von Fluoresceindiacetat (www.sigmaaldrich.com)	75
Abbildung 61: Graphische Darstellung der Messwerte durch die Software FloMax nach einer Lebend/Tot-Färbung am Beispiel von <i>Candida albicans</i> :	78
Abbildung 62: Auswertung eines Dotplots nach einer Lebend/Tot-Färbung am Beispiel von <i>Candida albicans</i> .	79
Abbildung 63: Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen Mikroorganismenproben	80
Abbildung 64: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9® und PI) für <i>C. albicans</i> .	81
Abbildung 65: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9® und PI) für <i>E. coli</i>	82
Abbildung 66: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9® und PI) für <i>S. aureus</i> .	82
Abbildung 67: Dotplots von Zellsuspensionen aus <i>S. aureus</i> und <i>C. albicans</i>	83
Abbildung 68: Nachweis von lebenden Zellen mit Fluoresceindiacetat (in Aceton).	84
Abbildung 69: Nachweis von lebenden Zellen mit SYTO RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain.	85
Abbildung 70: Durchflusszytometrische Analyse von Proben wässriger Lösungen mit FITC-gelabelten Antikörpern.	86
Abbildung 71: Vergleich verschiedener Verfahren zum Nachweis von <i>C. albicans</i> Zellen.	87
Abbildung 72: Durchflusszytometrische Analyse von Suspensionen mit <i>C. albicans</i> .	88
Abbildung 73: Zellzahlen von <i>C. albicans</i> und <i>S. aureus</i> nach der durchflusszytometrischen Messung, in NaCl-Lösung (0,85 %) oder in vollentsalztem, autoklaviertem Wasser.	89
Abbildung 74: Einfluss von Tensiden (Tween® 80, Triton® X-100) und des Polymers PEG-400 auf die durchflusszytometrische Messung.	90
Abbildung 75: Einfluss von zwei Reinigungs- und zwei Desinfektionsmitteln auf die Analyse im Durchflusszytometer.	91
Abbildung 76: Diagramm der <i>S. aureus</i> -Zellzahlen mit Anschmutzungen unterschiedlicher Blutkonzentrationen (0,1 % bis 10 %). (Fehlerbalken: SD, n=3).	92
Abbildung 77: Diagramm der <i>C. albicans</i> -Zellzahlen mit Anschmutzungen unterschiedlicher Blutkonzentrationen (0,1 % bis 10 %). (Fehlerbalken: SD, n=3).	93

Abbildung 78: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von <i>C. albicans</i> (10^5 Zellen) ohne Blutzusatz (A) und mit 0,1 % Blut in der Probe (B).	93
Abbildung 79: Diagramm der <i>S. aureus</i> -Zellzahlen in Anwesenheit von unterschiedlichen Ölkonzentrationen. (Fehlerbalken: SD, n=3).	94
Abbildung 80: Diagramm der <i>C. albicans</i> -Zellzahlen in Anwesenheit von unterschiedlichen Ölkonzentrationen. (Fehlerbalken: SD, n=3).	94
Abbildung 81: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von <i>C. albicans</i> (10^5 Zellen) ohne Öl-Zusatz (A) und mit 0,1 % Öl in der Probe (B).	95
Abbildung 82: Einfluss von Blut auf die Antikörperfärbung von <i>C. albicans</i> .	96
Abbildung 83: Einfluss von Öl auf die Antikörperfärbung von <i>C. albicans</i> .	96
Abbildung 84: Einfluss von Proteinase K (20 mg/ml) auf fünf ausgewählte Mikroorganismen (<i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. atrophaeus</i> und <i>L. lactis</i>).	97
Abbildung 85: Anzahl der koloniebildenden Einheiten der fünf getesteten Mikroorganismen nach Filtration durch einen Celluloseacetatfilter im Vergleich zur direkten Zellzahlbestimmung der eingesetzten Suspensionen.	99
Abbildung 86: Dotplots der Lebend/Tot-Färbung einer per Schaumpad aufgenommenen <i>C. albicans</i> -Probe (10^6 Zellen/ml) nach Verflüssigung mit Proteinase K und Mikrofiltration.	100
Abbildung 87: Mikroorganismenverlust durch Einbindung in eine Gelatinematrix, Behandlung mit Proteinase K und Mikrofiltration; Analyse im Durchflusszytometer im Vergleich zur direkten Analyse der Ausgangssuspension.	100
Abbildung 88: Vergleich der Einbindung von <i>C. albicans</i> in eine Gelatinematrix, mit und ohne Andruckkraft (5 N).	101
Abbildung 89: Reste von Flüssigkeiten und Gelatine bleiben nach der Probenahme auf der beprobten Oberfläche zurück.	101
Abbildung 90: Antrocknungsversuch mit <i>S. aureus</i> auf Kunststoff und Edelstahl	102
Abbildung 91: Antrocknungsversuch mit <i>C. albicans</i> auf Kunststoff und Edelstahl.	103
Abbildung 92: Vergleich der Probenahme von <i>C. albicans</i> von einer Edelstahloberfläche mittels Tupfer und mittels Gelatineschaumpad	105
Abbildung 93: Vergleich der Probenahme von <i>S. aureus</i> von einer Edelstahloberfläche mittels Tupfer und mittels Gelatineschaumpad	106
Abbildung 94: Vergleich der Dotplots nach Probenahme von <i>S. aureus</i> mit Tupfer oder Schaumpad von einer Kunststoff oder einer Edelstahloberfläche	107
Abbildung 95: Probenahme von <i>S. aureus</i> und <i>C. albicans</i> von einer feuchten Oberfläche mittels RODAC-Abklatschplatten.	107
Abbildung 96: Dotplots der Probenahme von <i>C. albicans</i> mittels Hydrozyklon von einer Edelstahloberfläche (9 cm^2 , poliert).	109

Abbildung 97: Probenahme von <i>C. albicans</i> mittels Hydrozyklon von zwei verschiedenen Edelstahloberflächen (poliert und gebürstet). Analyse mittels Durchflusszytometer und per Plattenverfahren.	109
Abbildung 98: Dotplots der Probenahme von 10^6 <i>C. albicans</i> -Zellen mittels Schaumpad und mittels Hydrozyklon von polierten Edelstahloberflächen.	110
Abbildung 99: Vergleich der Probenahme von <i>C. albicans</i> mittels Hydrozyklon und Schaumpad von einer polierten Stahloberfläche. Analyse mittels Durchflusszytometer und per Plattenverfahren.	111
Abbildung 100: Podestkante, während der Produktion (Schlachtbetrieb)	112
Abbildung 101: Schürzenwaschkabinett, während der Produktion (Schlachtbetrieb)	113
Abbildung 102: Geländer, während der Produktion (Schlachtbetrieb)	113
Abbildung 103: Edelstahlwand, während der Produktion (Schlachtbetrieb)	113
Abbildung 104: Probenahmeort Würzepfanne (Brauerei)	113
Abbildung 105: Probenahmeort Würzepfanne, Rand (Brauerei)	114
Abbildung 106: Probenahmeort Würzepfanne, Deckel (Brauerei)	114
Abbildung 107: Dotplots der Probenahme aus einem fleischverarbeitendem Betrieb.	116
Abbildung 108: Dotplots der Probenahmen: A) Waschbecken B) Kühlschrank.	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Charakteristik der Probenahmeverfahren zum Nachweis mikrobiologischer Kontaminationen	13
Tabelle 2:	Zählereignisse während der Probenahme mit Fluoreszenz- und Weißlichtdetektor	30
Tabelle 3:	Eigenschaften der verwendeten Speisepulvergelatine	32
Tabelle 4:	Rezeptur Gelatinelösungen	34
Tabelle 5:	Parametereinstellung vom Schaumgenerator	35
Tabelle 6:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (15 %, 20 Mesh)	43
Tabelle 7:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (10 %, 20 Mesh)	43
Tabelle 8:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (20 %, 20 Mesh)	43
Tabelle 9:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (10 %, 6 Mesh)	44
Tabelle 10:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (20 %, 6 Mesh)	44
Tabelle 11:	Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (15 %, 6 Mesh)	45
Tabelle 12:	Partikelrückstände an Eckpunkten	56
Tabelle 13:	Partikelrückstände an Eckpunkten und Außenpunkten	59
Tabelle 14:	Vergleich der Wiederfindung von <i>E.coli</i> K 12 im Schwammmaterialien „3M“ und Gelita	65
Tabelle 15:	Wiederfindung von <i>E.coli</i> K12 in einem Schaumpad direkt und nach einem Tag	66
Tabelle 16:	Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung	68
Tabelle 17:	Verwendete Mikroorganismen	69
Tabelle 18:	Zusammensetzung CASO-Agar (pH 7,3 ± 0,2)	69
Tabelle 19:	Zusammensetzung Plate-Count-Agar	69
Tabelle 20:	Zusammensetzung CASO-Bouillon (pH 7,3 ± 0,2)	70
Tabelle 21:	Verwendete Antikörper zur Differenzierung	74
Tabelle 22:	Eingesetzte Desinfektions- und Reinigungsmittel	76
Tabelle 23:	Ergebnisse der Probenahme in einem Schlachtbetrieb (GKZ/100 cm ²)	114
Tabelle 24:	Ergebnisse der Probenahme in einer Brauerei (GKZ / 100 cm ²)	115

5 Wissenschaftlich- technische und wirtschaftliche Problemstellung

5.1 Wissenschaftlich-technische Problemstellung

Im Bereich des Gesundheitswesens und der Lebensmittelproduktion bestehen hohe Anforderungen an die Reinigung und Desinfektion von Oberflächen und mit Produkt in Kontakt kommenden Anlagenteilen. Von Bobe (2008) wird darauf hingewiesen, dass die häufig praktizierte Sterilisation nicht grundsätzlich zu gereinigten Systemen führt. Sterilisationsrückstände verbleiben auf den Oberflächen und können ggf. als Haftgrund und Nährboden für nachfolgende Kontaminationen dienen. Die Notwendigkeit der Entwicklung eines nachweisstarken Untersuchungsverfahrens zur Überprüfung der Reinigungs- und Desinfektionsschritte wird somit deutlich.

Aufgrund der Arbeitsabläufe in den Unternehmen werden diese Untersuchungsergebnisse immer häufiger binnen Stunden erwartet. Z. B. wird in der Fleischverarbeitung, aber auch bei der Getränkeherstellung und -abfüllung sowie im Brauereiwesen, häufig im Zweischichtrythmus produziert und so bleibt nur wenig Zeit bis zur Freigabe der zwischenzeitlich gereinigten Produktionsanlagen. In diesen Branchen werden gereinigte Oberflächen auch häufig nicht getrocknet, sondern bleiben bis zur Wiederaufnahme der Produktion bzw. einer weiteren Verwendung feucht. Die Oberflächen sind dabei nicht homogen benetzt. Sowohl trockene als auch nasse Flächen sind in der Praxis gleichermaßen benachbart anzutreffen (Tyrell 2010).

5.2 Wirtschaftliche Problemstellung

In verschiedenen Wirtschaftszweigen sind zur Gewährleistung einer ausreichenden Hygiene Reinigungskontrollen nach erfolgter Anlagen-Nassreinigung essentiell, insbesondere bei der Fleisch- und Fischverarbeitung, der Abfüllung von Getränken oder im Braubereich. Bis zum Vorliegen entsprechender Untersuchungsergebnisse kann ein zwischenzeitlich erzeugtes Produkt nicht freigegeben werden, so dass entweder längere Stillstandszeiten in Kauf genommen werden oder eine separate Lagerung der Chargen bis zu ihrer Freigabe erfolgen müssen. Dies führt zu Mehrkosten in Produktion und Logistik. Außerdem sind die derzeit angewendeten Methoden (z. B. Abklatsch- oder Abstrichproben) sehr ungenau, so dass eine entsprechend hohe Anzahl an Proben erforderlich ist, um einigermaßen verlässliche Einschätzungen zur Oberflächenkontamination treffen zu können (Lemmen, S.; H. Häfner, D. Zolldann et al. 2001; Poletti, L.; C. Pasquarella; M. Pitzurra et al. 1999; Vescia, N.; D. D'Alessandro; J.F. Osborn et al. 2008). Insgesamt entstehen zusätzliche Kosten, die durch ein einfacheres und zuverlässigeres Bewertungsverfahren, das ohne externe Laboranalysen auskommt, deutlich reduziert werden können.

Im Bereich der Getränkeindustrie findet zwar seit einigen Jahren im Massengeschäft eine Marktkonzentrierung auf wenige große Anbieter statt, andererseits nimmt aber die Zahl kleinerer Brauereien und Anbieter von regionalen Spezialitäten weiter zu. So erhöhte sich - trotz leicht rückläufiger Absatzmengen - die Zahl der Braustätten von 1.298 im Jahr 2000 auf 1.327 im Jahr 2009 (Deutscher Brauer-Bund 2010).

Hygieneprobleme bzw. unerwünschte mikrobiologische Kontaminationen von Produkten stellen ein hohes Gesundheitsrisiko dar und verursachen zudem sehr hohe Kosten. Immer wieder werden Lebensmittel aus dem Handel zurückgerufen oder vor dem Verlassen der Produktionsstätte verworfen, weil der hygienische Status nicht korrekt eingehalten wurde. Neben den hohen Kosten von Rückrufaktionen kommt es zu deutlichen Imageverlusten. Die Kosten für eine solche Aktion belaufen sich im internationalen Vergleich durchschnittlich auf 540.000 US-\$, hinzu kommt der Imageschaden, der zusätzliche Kosten von ca. 10.000 bis 7 Mio. US-\$ verursacht (AFC Consultants International GmbH 2007).

Weltweit, auch in entwickelten Industrienationen, belasten nosokomiale (im Krankenhaus erworbene) Infektionen den Erfolg medizinischer Maßnahmen. In Deutschland treten nach aktuellen Schätzungen ca. 400.000 bis 600.000 nosokomiale Infektionen jährlich auf (Gastmeier P. und Geffers C. 2008). Busley und Popp gehen sogar von 800.000 im Krankenhaus erworbenen Infektionen aus (Busley, A. und Popp, W. 2009). Etwa 40.000 bis 70.000 dieser Infektionen enden tödlich (Gastmeier, P.; C. Geffers, D. Sohr et al. 2003).

Schätzungen zufolge infizieren sich jährlich 20.000 Menschen in Deutschland mit MRSA (Bundesärztekammer 2009), was alleine Kosten von 100 bis 200 Mio. € verursacht (Korczak D. und Schöffmann C. 2010) (MRSA: Sammelbezeichnung für alle antibiotikaresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme, in der Regel als Multiresistenz gegen verschiedene Antibiotika-Gruppen ausgebildet).

Durch die Kontrolle des Reinigungs- und Desinfektionseffektes mittels Methoden mit erhöhter Sicherheit und durch Berücksichtigung von schwer zugänglichen Stellen und speziellen Umgebungsbedingungen (wie bspw. Feuchtigkeit) kann das Gesundheitsrisiko deutlich verringert und die Kosten für Rückrufaktionen, Fehlchargen im Lebensmittelbereich sowie Folgekosten im medizinischen Bereich deutlich gesenkt werden.

5.3 Stand der Forschung

Probenahme von an Oberflächen anhaftende Mikroorganismen

Nach vorliegenden Ergebnissen und den Angaben der Industrie ist die sichere und reproduzierbare Beprobung von inhomogen feuchten Oberflächen auf Schmutz und Mikroorganismen eine bis heute ungelöste Aufgabe. Derzeit etablierte Verfahren stellen in diesem Zusammenhang die Abklatsch-Methode, Spülverfahren sowie die Probenahme mittels Tupfern dar (DIL; IUTA und wfk 2010). Bei der Abklatsch-Probenahme werden feste Nährböden direkt in Kontakt mit der zu prüfenden Oberfläche gebracht und so Mikroorganismen abgenommen. Beim Einsatz von Abschwemm-Verfahren werden Bauteile mit Fluiden abgespült und diese Lösungen anschließend untersucht. Tupfer werden nach der Beprobung mit einer Kochsalzlösung ausgeschüttelt und diese anschließend ebenfalls zur Untersuchung gebracht. Die Untersuchung der jeweilig gewonnenen Matrix auf Mikroorganismen erfolgt in der Regel durch Anlegen von Zellkulturen in unterschiedlicher Konzentration, mehrtägiges Bebrüten und anschließendes Auszählen der Kulturen der Verdünnungsstufen.

Die genannten Verfahren weisen im Wesentlichen drei Nachteile auf, vgl. Tabelle 1:

- Die Ergebnisse des klassischen Ausplattierens liegen aufgrund der erforderlichen Bebrütungszeiten erst nach mehreren Tagen vor.
- Die nach klassischen Verfahren gewonnenen Ergebnisse weisen eine große Streubreite auf bzw. sind häufig nicht reproduzierbar (Lemmen, S.; H. Häfner, D. Zollmann et al. 2001; Poletti, L.; C. Pasquarella; M. Pitzurra et al. 1999; Vescia, N.; D. D'Alessandro; J.F. Osborn et al. 2008).
- Feuchte oder nasse Oberflächen können nur eingeschränkt reproduzierbar beprobt werden (Buttner, M. P.; P. Cruz; L. D. Stetzenbach et al. 2004; DIL; IUTA und wfk 2010).

Tabelle 1: Charakteristik der Probenahmeverfahren zum Nachweis mikrobiologischer Kontaminationen

Verfahren	Zeitbedarf	Beprobung feuchter Oberflächen möglich	Reproduzierbarkeit / Wiederfindung
Abklatschmethode (verfügbar)	hoch (Tage)	schlecht	schlecht
Tupfer-/Schwammmethode (verfügbar)	hoch (Tage)	schlecht	schlecht
Tupfermethode - Durchflusszytometrie	gering (< 2h)	?	zu untersuchen
Gelatine + Zytometrie (verfügbar)	gering (< 2 h)	schlecht	zufriedenstellend
Schaumpad + Zytometrie	gering (< 2 h)	ja	zu untersuchen
Fluiderfassung + Zytometrie	gering (< 2 h)	ja	zu untersuchen

Schnellmethoden zum analytischen Nachweis von Mikroorganismen

Verschiedene Methoden sind in der Lage, lebende Mikroorganismen auch in kurzer Zeit nachzuweisen. Hier sind die Epifluoreszenz, LAL-Test, Impedanzmessung oder ATP-Methode zu nennen.

Da diese Verfahren unterschiedliche Nachteile aufweisen (DIL; IUTA und wfk 2010), die einen Einsatz im Rahmen der Reinigungskontrolle erschweren, wurde von den Antragstellern im Rahmen eines IGF-FuE-Vorhabens ein Ansatz zur Lösung dieser Problematik auf Grundlage der Durchflusszytometrie erarbeitet (IUTA, DIL und wfk, 2010). Die Durchflusszytometrie stellt für diesen Fall ein ideales Verfahren zur Zellzahlbestimmung dar. Ausgehend von flüssigem Probenmaterial lässt sich das hierin enthaltene lebende und tote Zellmaterial innerhalb kurzer Zeit unterscheiden und quantifizieren (Schmidt, M.; M.K. Houfar, S.B. Nicol et al. 2006; Shapiro, H. M. 2003), indem die Zellen in einer engen Messküvette vereinzelt werden und hier einen Laserstrahl durchlaufen. Die Streulichtsignale werden als Maß für Zellzahl und -größe detektiert. Die Abnahme von Schmutz und Mikroorganismen von den Flächen erfolgt bei diesem Verfahren mittels Gelatine-Gel, welches als warmes, flüssiges Sol auf den Oberflächen reversibel aufgebracht wird. Das Material wird in vorliegenden Fall zur anschließenden Analyse mittels Durchflusszytometer enzymatisch verflüssigt. Mit der Entwicklung dieses im Vergleich zu konventionellen Methoden wesentlich schnelleren Beprobungs- und Analyseverfahrens ist es damit möglich, trockene Oberflächen hinsichtlich ihrer mikrobiellen Kontamination effektiv zu beurteilen.

Das gesamte Beprobungsverfahren benötigt inklusive Auswertung eine Zeitspanne von nur ca. 2 Stunden. Somit ist eine wesentliche Forderung für ein geeignetes Beprobungsverfahren für die Reinigungskontrolle erfüllt. Allerdings wurde die Methode ausschließlich zur Beprobung trockener Oberflächen entwickelt. Für eine Anwendung auf feuchten Oberflächen muss ein neuartiges Probenahmekonzept entwickelt werden. An dieses neuartige Konzept werden noch höhere Anforderungen gestellt. Es muss in der Lage sein, flächenbezogen unterschiedliche Wassermengen aufzunehmen und diese anschließend quantitativ der Auswertung im Durchflusszytometer zuführen. Die Matrizes der klassischen Probenahmeverfahren können für die Untersuchung im Zytometer nicht unmittelbar verflüssigt werden, sondern müssen entsprechend eluiert und aufbereitet werden. Der Einsatz einer fluiden homogenen Gelmatrix, wie sie im abgeschlossenen Projekt entwickelt wurde, ist für den angestrebten Anwendungsfall nicht möglich, weil sie zusätzliche Feuchte von der Oberfläche nicht in vertretbaren Zeiträumen aufnehmen kann und lokal die Aushärtung der Gelatine und damit die Einbindung der zu untersuchenden Kontamination verhindert wird.

In verschiedenen Wirtschaftszweigen sind zur Gewährleistung einer ausreichenden Hygiene Reinigungskontrollen nach erfolgter Anlagen-Nassreinigung essentiell, insbesondere bei der Fleisch- und Fischverarbeitung, der Abfüllung von Getränken oder im Braubereich. Bis zum Vorliegen entsprechender Untersuchungsergebnisse kann ein zwischenzeitlich erzeugtes Produkt nicht freigegeben werden, so dass entweder längere Stillstandszeiten in Kauf genommen werden oder eine separate Lagerung der Chargen bis zu ihrer Freigabe erfolgen müssen. Dies führt zu Mehrkosten in Produktion und Logistik. Außerdem sind die derzeit angewendeten Methoden (z. B. Abklatsch- oder Abstrichproben) nur bedingt exakt, so dass eine entsprechend hohe Anzahl an Proben erforderlich ist, um einigermaßen verlässliche Einschätzungen zur Oberflächenkontamination treffen zu können (Lemmen, S.; H. Häfner, D. Zoldann et al. 2001; Poletti, L.; C. Pasquarella; M. Pitzurra et al. 1999; Vescia, N.; D. D'Alessandro; J.F. Osborn et al. 2008). Insgesamt entstehen zusätzliche Kosten, die durch ein einfacheres und zuverlässigeres Bewertungsverfahren, das ohne externe Laboranalysen auskommt, deutlich reduziert werden können.

Aus den dargestellten Ausführungen zum Stand der Technik wird deutlich, dass derzeit nur stark eingeschränkte Möglichkeiten zur repräsentativen Probenahme bestehen mit denen mikrobielle Belastungen feuchter Oberflächen quantitativ erfasst werden können. Mit einer flüssigen Gelatinematrix, wie im Vorgängerprojekt eingesetzt, ist die Einbindung von zusätzlicher Feuchtigkeit nicht möglich, insbesondere wenn lokal zu hohe Wasserkonzentrationen auftreten, die ein Abbinden der Struktur verhindern. Die Einbindung der Oberflächenfeuchtigkeit über die nachträgliche Quellung von ausgehärteter Gelatine ist nicht befriedigend, weil dieser Vorgang nicht nur sehr lange dauert, sondern auch die Einbindung von Mikroorganismen nicht gewährleistet ist. Zum anderen gelingt die vollständige Abnahme der weichen Gelmatrix nach der weitgehenden Quellung nicht mehr mit einfachen Mitteln. Seitens der Industrie wurde großes Interesse signalisiert, die für trockene Oberflächen verfügbaren Schnellmethoden auch auf die Anwendung bei feuchten Oberflächen zu erweitern.

Die bearbeiteten Forschungsfragestellungen sind branchenübergreifend sowohl für Unternehmen der Lebensmittelverarbeitung als auch der Reinigungstechnologie und Umwelttechnik von Interesse.

6 Forschungsziel

Im Rahmen des Vorhabens wird die Entwicklung von Probenahme-Verfahren angestrebt, mittels derer fluide Schichten von Oberflächen einschließlich der darauf haftenden Mikroorganismen abgenommen, in einer Matrix gesammelt und diese zeitnah innerhalb von etwa 2 Stunden der Analyse im Durchflusszytometer zugeführt werden kann.

Verfahrensbedingt vermeidet die neue Methode Inhomogenitäten der bestehenden Probenahmemethoden (z. B. Anpressdruck). Um unterschiedlichen Flüssigkeitsmengen auf den Oberflächen Rechnung zu tragen, erfolgt die Beprobung unmittelbar durch Absaugung als auch mittelbar durch Aufsaugen in eine kapillarwirksame Matrix. Dabei wird insbesondere untersucht, ob zur quantitativen Ablösung und Überführung der Oberflächenkontaminationen eine Ultraschallunterstützung eingesetzt werden kann, ohne die Aktivität der Mikroorganismen signifikant zu verändern. Über die geeignete Aufbereitung der Probenmatrix eröffnet die Durchflusszytometrie auch die Möglichkeit der Differenzierung von Mikroorganismen und kann so in der jeweiligen Branche relevante Fremdkontaminationen als unerwünschte Querkontaminationen identifizieren (beispielsweise für relevante Bierhefen in der Brauindustrie, Listerien u. a.). Dazu sind geeignete Methoden zur Probenaufbereitung insbesondere der verflüssigten Matrix zu entwickelt worden, um diese direkt einer durchflusszytometrischen Analyse zuführen zu können.

Im Einzelnen sind folgende Entwicklungen und Untersuchungen Projektgegenstand:

- Entwicklung standardisierter Probenahmeverfahren zur direkten bzw. indirekten Sammlung inhomogen verteilter Oberflächenfeuchtigkeit einschließlich der darin enthaltenen und auf der Feststoffoberfläche fixierten Mikroorganismen.
- Bewertung des Einflusses der Anwendung zusätzlicher Spülflüssigkeit sowie von Ultraschall zum verbesserten Ablösen von Kontaminationen. Bewertung der Auswirkungen von Schallfrequenz und -Intensität auf die Ablöserate und die mikrobiologische Aktivität im Hinblick auf den Nachweis.
- Entwicklung einer rückstandslos entfernbaren Matrix zur effektiven Aufnahme von Schmutz und Mikroorganismen von feuchten oder nassen Oberflächen.
- Optimierung dieser Matrix hinsichtlich Saugfähigkeit, zeitabhängigem Wasseraufnahmeermögen und Elastizität über die Hydrokolloidrezeptur und das Herstellungsverfahren (Porengrößenverteilung, Kapillarität).
- Erarbeitung der Prozeduren zur vollständigen Verflüssigung der Matrix zur Reduzierung von Matrixeffekten und zum Absenken der Nachweisgrenze bei der Analyse im Durchflusszytometer.
- Entwicklung einer verbesserten Durchflusszytometrie-Methode, die zwischen Bakterien und Hefen unterscheiden kann. Das ermöglicht den Nachweis unerwünschter Querkontamination in vielen relevanten Branchen, beispielsweise bierhefeschädliche Kontaminanten in der Brauindustrie.
- Vergleich der entwickelten Methoden mit etablierten klassischen Untersuchungsmethoden (insbesondere Tupfmethode) hinsichtlich Abnahme- und Wiederfindungsraten in der Praxis.

Mit zeitnah vorliegenden Analyseergebnissen entfallen Kosten für die separate Zwischenlagerung von Produktchargen, die nach Probenahme bis zum Vorliegen der Analyseergebnisse erzeugt wurden und z. B. noch nicht für den Vertrieb freigegeben sind. Die Wahrscheinlichkeit von Rückrufaktionen für bereits in Umlauf gebrachte Produkte sinkt durch die erhöhte Reproduzierbarkeit und höhere Genauigkeit der Probenahme und Analyse. Die erhöhte Genauigkeit bei der Beurteilung der mikrobiellen Kontamination von feuchten oder nassen Oberflächen lässt die Anzahl konventioneller Abklatschproben letztendlich auf Null sinken, so dass die neu entwickelte Methode auch diese Kosten mindert.

Nachfolgend sollen die Arbeiten und ihre Ergebnisse näher erläutert werden.

7 Gegenüberstellung von Ergebnissen und Zielsetzung des FuE-Vorhabens

Nachfolgend sollen in einer tabellarischen Übersicht die angestrebten Ziele und erreichten Ergebnisse des Forschungsvorhabens gegenüber gestellt werden. Anschließend erfolgt eine ausführliche Darstellung der wissenschaftlich-technischen Projekthalte.

Gegenüberstellung: Ziele und Ergebnisse IGF 386 ZN

Nr.	Ziel des Arbeitsschrittes	Erzielte Ergebnisse
1	Aseptische Probenahme durch Fluidabsaugung und -sammlung (Applikationsentwicklung I)	<p>Zur unmittelbaren Erfassung eines Fluids mit Mikroorganismen durch Absaugung von der Oberfläche wurde eine Kombination aus Sprüheinheit sowie kombinierter Saug- und Trägheitsabscheidung hinsichtlich der Verfahrensparameter optimiert. Als künstliche Anschmutzung kamen selektiv nachweisbare, fluoreszierende Tracer-Partikel zum Einsatz. Die Verwendung einer zusätzlichen Hilfsphase (Spülung) vor dem Absaugen hat sich dabei als hilfreich erwiesen.</p> <p>Die Abnahmerate der Oberflächenkontaminationen kann auch ohne unterstützenden Einfluss von Ultraschall oder Tensiden mit über 95 % als ausreichend bezeichnet werden.</p> <p>In auftretenden Sprühverlusten (Aerosolnebel) konnten keine Oberflächenkontaminationen nachgewiesen werden.</p> <p>Es wurde eine Methode zur differentiellen Anfärbung (tot/lebend) von praxisrelevanten Mikroorganismen etabliert. Die Analyse erfolgte durch Durchflusszytometrie, hierbei wurden relevante Parameterkenngrößenbereiche festgelegt. Die Nachweisgrenze lag bei 10^2 Zellen/ml.</p> <p>Eine Auswahl von möglichen Elutionslösungen zur Aufnahme von Mikroorganismen von den Oberflächen wurde festgelegt.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht</p>
2	Herstellung und Optimierung einer aseptischen Probenahmematrix (Schaummaterial)	<p>Ausgehend von Speisegelatinepulver wurde eine Verfahrensweise zur Herstellung saugfähiger Hydrokolloid-Schaumpads unter Verwendung eines Schaumgenerators im Technikumsmaßstab entwickelt.</p> <p>Die Charakterisierung der Schäume und Optimierung der Prozessparameter erfolgte anhand von Dichtemessungen, Strukturuntersuchungen per Lichtmikroskopie und REM sowie Messungen der Wasseraufnahmekapazität.</p> <p>Es wurde eine spezifische Probenvorbereitungsmethodik mit einer</p>

Nr.	Ziel des Arbeitsschrittes	Erzielte Ergebnisse
		<p>Verflüssigung durch Proteinase K und Mikrofiltration etabliert. Hierdurch wurden Matrixeffekte reduziert und eine Aufkonzentrierung der Mikroorganismen erzielt.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht</p>
	<p>Aseptische Probenahme mittels der in 2. Entwickelten Probenahmematrix (Applikationsentwicklung II)</p>	<p>Für die Beprobung von inhomogen feuchten Oberflächen konnten erfolgreich zwei unterschiedliche Beprobungsverfahren (direkt durch Spülfluid-Zugabe und Absaugen und indirekt durch statisches oder dynamisches Aufpressen eines Hydrokolloids) etabliert und mit einer Analyse per Durchflusszytometrie kombiniert werden. In Untersuchungen unter Verwendung fluoreszierender Tracer-Partikel wurden dazu die Bedingungen der Probenahme, wie Anpressdruck der Schaumpads oder Absaugvolumenstrom, optimiert. Demnach konnten über 90 % der Oberflächenkontamination mit beiden Anpressmethoden von der Oberfläche abgenommen werden.</p> <p>Die Aufnahme mikrobieller Oberflächenkontaminationen in die Schaummatrix entspricht dem Referenzwert der Kontrollproben, die auf einem CASO-Agar nachgewiesen wurden.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht.</p>
4	<p>Aufbereitung der Probenahmematrix für die Durchflusszytometrie</p>	<p>Es wurde eine aseptische Aufbereitungsmethode für Gelatinematrices etabliert. Diese Methode wurde hinsichtlich der Wiederfindungsrate spezifiziert, ebenso wurde für die Probenahme mittels Hydrozyklon die Wiederfindungsrate bestimmt. Der Einfluss von Störkomponenten (Reiniger, Desinfektionsmittel, verschiedene Ansammlungen) wurde untersucht und kritische Grenzwerte festgelegt.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht.</p>
5	<p>Einbindung und Differenzierung von Mikroorganismen in die Probenahmematrix</p>	<p>Zur Differenzierung zwischen relevanten mikrobiellen Organismengruppen wurde eine Methode zur selektiven Markierung auf der Basis von Antikörpern entwickelt und spezifiziert. Es wurde eine hohe Selektivität erzielt.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht</p>
6	<p>Vergleich zu etablierten Beprobungsverfahren</p>	<p>Die beiden neu entwickelten Methoden wurden in Bezug auf Wiederfindungsraten, Messgrenzen und Handhabbarkeit sowohl untereinander, als auch mit den etablierten Methoden (Tupfer-Verfahren und Abklatschmethode) verglichen. Die jeweiligen Kenngrößen wurden vergleichend bestimmt und bewertet.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht.</p>
7	<p>Anwendungstests</p>	<p>Es wurden Anwendungstest in der Praxis (fleischverarbeitende Betriebe, Getränkeabfüllung, Betriebsküche) durchgeführt. Es wurden weitere Optimierungen/Anpassungen für die indirekte Probenahme vorgenommen. Die Eignung für den Nachweis mikrobieller Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen mit der neu entwickelten Methode konnte im Vergleich zu klassischen Probenahmetechniken demonstriert werden.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht.</p>
8	<p>Dokumentation und Berichterstattung</p>	<p>Alle Ergebnisse wurden über die gesamte Projektlaufzeit dokumentiert und im vorliegenden Abschlussbericht zusammengefasst.</p> <p>Das Ziel des Arbeitsschrittes wurde erreicht.</p>

Verwendung der Zuwendung

Die Durchführung der unten beschriebenen Untersuchungen erfolgte bei FS 1 im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplanes) im Umfang von insgesamt 22,4 Personenmonaten.

Die Durchführung der unten beschriebenen Untersuchungen erfolgte bei FS 2 im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplanes) im Umfang von insgesamt 14,3 Personenmonaten.

Die Durchführung der unten beschriebenen Untersuchungen erfolgte bei FS 3 im Berichtszeitraum durch wissenschaftlich-technisches Personal (Einzelansatz A.1 des Finanzierungsplanes) im Umfang von insgesamt 23,5 Personenmonaten.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Ausgaben während der Projektlaufzeit waren für die Durchführung der geleisteten Arbeit notwendig und angemessen. Die im Berichtszeitraum durchgeführten Arbeiten stellen die Umsetzung der im Forschungsantrag vorgesehenen Arbeitsschritte dar und sind für die Erreichung des Forschungsziels wichtig. Die geleisteten Arbeiten waren zur Bearbeitung der genannten Arbeitspakete erforderlich.

8 Darstellung der Methoden und Ergebnisse

8.1 Arbeitsfelder der Methodenentwicklung

Gegenstand des FuE-Vorhabens ist die Entwicklung einer kombinierten Probenahme- und Analyseverfahren zur Bestimmung von mikrobiologischen (Rest-)Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen nach erfolgter Nassreinigung.

Zur Probenahme sind folgende Methoden vorgesehen:

1) Statische Schaumpad-Methode

Ein saugfähiges Gelatineschaumpad wird auf eine kontaminierte feuchte Oberfläche gepresst und nach einer definierten Einwirkzeit abgenommen.

2) Dynamische Schaumpad-Methode

Das Schaumpad wird nach dem Aufsetzen in einem definierten Bereich kreisend über diese Fläche bewegt.

3) Airbrush-Methode

Auf die feuchte Oberfläche wird Spülwasser aufgesprüht (Airbrush-System), abgesaugt und in einem Zyklon aufgefangen.

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, mikrobielle Konzentrationen qualitativ wie quantitativ zu detektieren, wobei hinsichtlich der mikrobiellen Aktivität zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden kann. Darüber hinaus besteht die Option des selektiven Nachweises spezifischer Mikroorganismenarten.

Die Methodenentwicklung und Validierung ist im Rahmen des FuE-Vorhabens im Wesentlichen auf die nachfolgend dargestellten vier Arbeitsfelder mit spezifischen Leitkriterien fokussiert, vgl. Abbildung 1:

- Schaummatrix-Entwicklung
- Entwicklung Probennahmesysteme (direkt / indirekt)
- Probenaufbereitung und zeitnaher Nachweis mikrobieller Belastung
- Praxisanwendung, Methodvalidierung

Die diesen Arbeitsfeldern zugeordneten Projektinhalte sind nachfolgend dargestellt.

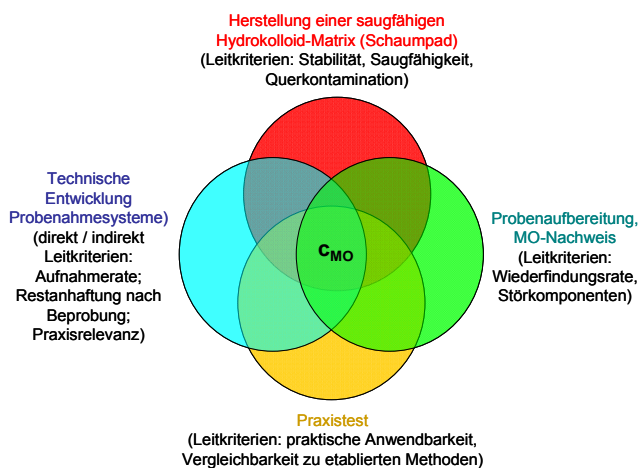


Abbildung 1: Arbeitsfelder und Leitkriterien der Methodenentwicklung

8.2 Arbeitspaket 1: Applikationsentwicklung I: Aseptische Probenahme durch Fluidabsaugung und -sammlung

8.2.1 Verfahrensgrundlagen

Eine Ablösung von Oberflächenanhaftungen durch Spülverfahren stellt neben der mechanischen Reinigung eine intensiv untersuchte Technologie im Zusammenhang mit der Oberflächenreinigung dar. Während bei einer mechanischen Reinigung die Haftkräfte zwischen Oberfläche und Verschmutzung überwunden werden, führt eine Fluidzugabe zusätzlich zu einer Strömungsbildung und somit zum Abschwämmen der Anhaftungen in die Fluidmatrix. Wechselwirkungen aufgrund von Dipolwirkungen zwischen einem Fluid und der abgelösten Anhaftung stabilisieren zusätzlich die Dispersion und ermöglichen eine sichere Abreinigung. Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit bei der Nassreinigung scheint nach neueren Erkenntnissen für nicht immergierte (offene) Systeme von untergeordneter Bedeutung zu sein (Mauermann 2012). Damit kommt der Spüllösung bzw. den Auftragsbedingungen eine stärkere Bedeutung hinsichtlich einer effektiven Reinigungswirkung zu.

1. Im hier betrachteten Fall soll eine Abschwämmung durch auf der Fläche vorhandenes Fluid sowie zugegebene Spülflüssigkeit erreicht werden, wobei der Fluidimpuls dahingehend dosiert sein muss, dass
2. keine Zerstörung der Mikroorganismen-Zellwand auftritt,
3. eine gute Dosierbarkeit auch kleiner Flüssigkeitsmengen möglich ist und
4. ein unkontrollierter Austrag von Ansammlungen der Oberfläche als Aerosol unterbunden wird.

Dabei soll die Möglichkeit bestehen, neben der Erfassung von bereits gelöstem Schmutz auch Altansammlungen abzulösen, um die gesamt auf der Oberfläche verbleibende Kontamination zu erfassen. Die Haftung von sphärischen Modellkörpern an Oberflächen wurde u. a. intensiv von Weigel (2004) mittels AFM (Rasterkraftmikroskop) sowie Ultrazentrifuge untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass tangential zur Oberfläche deutlich geringere Kräfte zum Ablösen von Partikeln und Hefezellen aufzubringen waren als normal.

Ergebnisse einer durchgeführten Patentrecherche zeigten, dass nur wenige dokumentierte technische Entwicklungen für die angestrebte Probenahmemethode nutzbar sind. Beispielsweise ist in der Literatur ein Abschwemmverfahren nach Thran (1979) erwähnt, das auf eine Oberfläche von 5 cm² innerhalb einer Minute eine Fluidmenge von 100 ml aufbringt (Oberhäuser 2004). Das Fluid kann mit oder ohne Druck aufgebracht werden (Trautsch 2003) und steht nach anschließender Sammlung für eine weitere analytische Untersuchung zur Verfügung. Die Methode ist insbesondere für den Einsatz im Bereich der Fleischverarbeitung bzw. des Schlachtgewerbes entwickelt worden (Trautsch 2003). Eine weitere Alternative stellt nach Otten (2005) ein 1977 von Leistner et al. entwickeltes Verfahren dar, bei dem Flüssigkeit per Rotor auf Teilflächen von 10 bis 40 cm² aufgebracht wird. Diese Entwicklungen haben zu einem patentrechtlich angemeldeten Verfahren von Reuter (1980) geführt (vgl. Abbildung 2), welches eine sinnvolle Basis für eine technische Umsetzung der Entwicklungsarbeiten dieses Vorhabens darstellt.

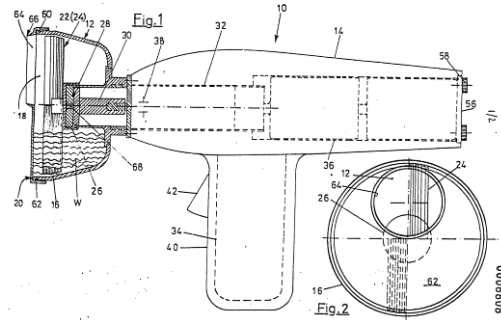


Abbildung 2: Abschwemm-Pistole (Reuter 1980)

Im vorliegenden Fall einer Beprobung von bereits gereinigten Flächen liegen nur geringe Ausgangskonzentrationen vor. Daher ist auch ein möglichst geringes Probennahmevolumen von Vorteil, um möglichst hohe Konzentrationen für einen analytischen Nachweis nutzen zu können. Entsprechend dieser Anforderungen und Ergebnisse wird eine *Zugabe von Spülflüssigkeit* in geringem Umfang und mit mäßigem Impuls per Zweistoffdüse bei geringen Tropfendurchmessern vorgenommen. Die Zugabe der Spülflüssigkeit erfolgt durch entsprechende manuelle Ausrichtung der Düse tangential zur Oberfläche.

Die *Abnahme der Flüssigkeit* erfolgt mittels Nassaugverfahren. Mit einer Pumpe wird das Fluid auf der Oberfläche durch eine Ansaugspitze (Durchmesser 0,7 mm) im Unterdruck über ein wenige Zentimeter abmessendes Schlauchstück abgesaugt und in einem Zyklonabscheider transportiert. Während die angesaugte Luft durch den gesamten Querschnitt des Ansaugschlauches in den Zyklon strömt, bildet sich an den Wänden ein Flüssigkeitsfilm aus, in welchem die Partikel in Strömungsrichtung bewegt werden. Aufgrund der dort vorherrschenden Trägheitskräfte trennen sich Gas- und Flüssigkeitsphase; die Gasphase verlässt den Zyklon durch das zentrale Tauchrohr zur Pumpe; der Flüssigkeitsstrom mit dispergierten partikulären Kontaminanten sinkt entlang der Wänden zum Boden des Zyklons (Abbildung 3). Dieser ist als Schraubdeckel ausgeführt, der das gewonnene Probenmaterial enthält. Die gesammelte Flüssigkeitsmenge steht somit für eine weitere analytische Untersuchung, z. B. mittels Durchflusssytopmetrie, zur Verfügung.

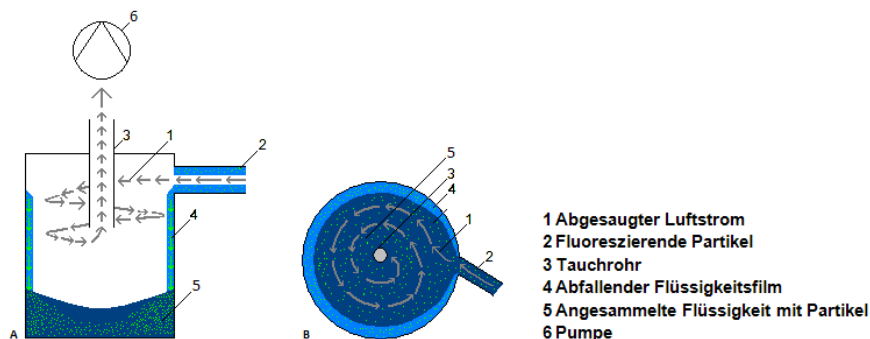


Abbildung 3: Funktionsprinzip Zyklon A: Vertikaler Querschnitt B: Horizontaler Querschnitt

Parameter einer Bewertung sind Abnahmerate, Fluid-Verluste bis zum Probensammler, die erforderliche Saugleistung sowie die Fähigkeit, spezifische Mikroorganismen zählfähig abzulösen und aufzunehmen.

In der ersten Phase der Methodenentwicklung kommen anstelle von Mikroorganismen fluoreszierende Partikel als leicht zu identifizierende Kontamination zum Einsatz. Somit lassen sich falsche Rückschlüsse über den Reinigungserfolg einer Methode durch Aktivitätsänderungen der Mikroorganismenpopulation vermeiden.

8.2.2 *Material und Methoden*

8.2.2.1 Geräte und Materialien

Geräte und Material

- Polierte Edelstahlplatten (Testmonitor)
- Gebürstete Edelstahlplatten (Testmonitor)
- Eppendorf Pipetten 100-1000 µl, 20-200 µl, 5-50 µl (ROTH)
- Eppendorf Pipettenspitzen gelb, blau (ROTH)
- Olympus BX41 Systemmikroskop
- Permanentmarker
- Geodreieck
- Mini Airbrush Kompressor Set Modell 6035-02
- Airbrush Pistole ABC180
- TSI 4100 Durchflussmesser
- Schläuche aus Gummi
- Edelstahlring, $d_i = 48 \text{ mm}$, $h = 10 \text{ mm}$
- Pumpe KNF Neuberger Typ No35AN.18
- 2 x Partikelfilter
- Regelventil
- Stoppuhr
- Abdeckung aus Karton
- Metallobjektträger
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digitec
- 100 ml Messkolben
- Stab-Ultraschallerzeuger: HD2200 Plus, Fa. Bandelin Electronic GmbH & Co KG, Kopfdurchmesser Stab-Sonotrode 10 mm, PUS = 200W (100%), F = 20 kHz

Reagenzien

- Partikel-Dispersion (2,65 %ige wässrige Dispersion, Fluoresbrite Polystyrol-Latex-Partikel, Durchmesser 1 µm; Extinktionsmaximum $\lambda = 441 \text{ nm}$; Emissionsmaximum bei $\lambda = 486 \text{ nm}$; Polysciences Europe GmbH, Eppelheim/D)
- VE-Wasser
- Detergenz Triton X-100 in einer Verdünnung 1:1000

8.2.2.2 Herstellung der Partikel-Dispersion als künstliche Anschmutzung

Ein Tropfen der gebrauchsfertigen Partikel-Dispersion wird in einem 100 ml Messkolben vorgelegt und bis zur Markierung mit VE-Wasser aufgefüllt. Nach 15 minütigem Suspendieren im Ultraschallbad werden anschließend 5 µl des Detergenz Triton in 5000 µl der verdünnten Partikel-Dispersion zugesetzt und bei 5 °C gekühlt gelagert. Vor Gebrauch der hergestellten Partikel-Tensid-Dispersion ist ein 15 minütiges Suspendieren im Ultraschallbad notwendig.

8.2.2.3 Durchführung der Anschmutzung von Oberflächen

Auf den zu untersuchenden Testmonitoren werden für die statische Schaumpad-Methode vier Quadranten als zu beprobende Areale mit einer Kantenlänge von entweder 3 x 3 cm² oder 1,5 x 1,5 cm² mit Abstand zueinander markiert, dieser Bereich mit einer Partikel-Tensid-Dispersion randübergreifend angeschmutzt und lichtgeschützt über Nacht eingelagert.

Vor der Beprobung erfolgt i. d. R. ein erneutes Anfeuchten für 5 Minuten (Mittelwert 100 µl/cm²). Die Anschmutzung enthält damit ca. $1,8 \cdot 10^5$ Partikel/cm².

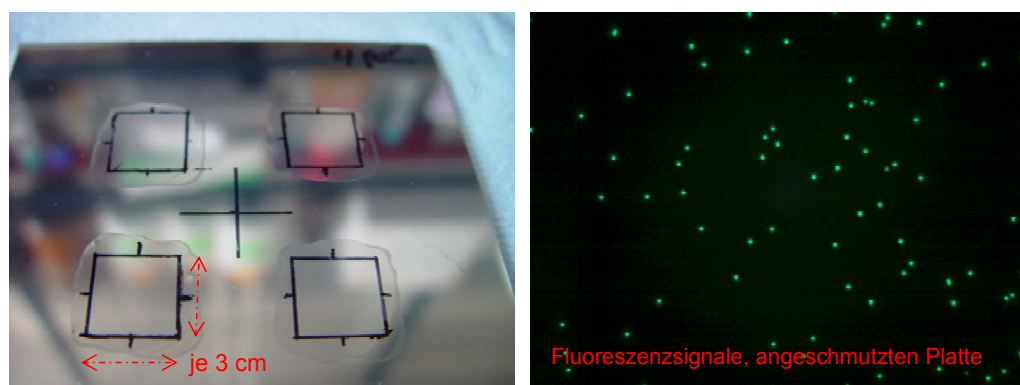


Abbildung 4: Künstliche Anschmutzung von Beprobungsflächen (9 cm²) mit fluoreszierenden Partikeln

8.2.2.4 Durchführung einer direkten Probenahme

Zur Durchführung der Reinigung wird ein Edelstahlring so auf der zu beprobenden Fläche platziert, dass sich die angeschmutzte Fläche innerhalb des Ringes mit einer Probenahmefläche von 14,5 cm² befindet. Anschließend wird die Airbrush-Pistole mit dem Kompressor verbunden und mit dem gewünschten Volumen an Waschflüssigkeit gefüllt. Der anschließend auf die Fläche aufgetragene Sprühstrahl muss bei der Beprobung alle Bereiche innerhalb des Ringes erfassen (Abbildung 5, Bildteil A). Die Menge Spülflüssigkeit wurde dabei im Bereich 0,5 ml bis 2 ml variiert, die zudosierte Luftmenge betrug 1,3 l/min bis 4 l/min. Damit ergeben sich flächenbezogene Fluidzugaben von 0,03 bis 0,15 ml/cm².

Anschließend erfolgt die Fluid-Abnahme mittels Saugzug und Abscheidung der Flüssigkeit im Zyklon (Abbildung 5, Bildteil B und C). Die derart abgereinigten Flächen werden entsprechend der nachfolgend dargestellten standardisierten mikroskopischen Bildauswerte-Methode beprobt. Für den Absaugvolumenstrom durch den Zyklon wurde ein per Massflowmeter (TSI) eingestellter Volumenstrom von 4 l/min als praxisrelevant

ermittelt. Die Regelung erfolgt durch Androsseln der Pumpe über ein im Gasstrom vorgeschaltetes Regelventil. Um Geräteschäden zu vermeiden, wird ein Partikelfilter vor dem Durchflussmessgerät und der Pumpe eingesetzt (Abbildung 6, Bildteil A, B und C). Der Druckverlust im Probenahme-System beträgt weniger als 0,9 kPa incl. Gebläsefilter und Saugspitze.



Abbildung 5: A: Ablösung der Verschmutzung; B: Aufbau Zyklon-Einheit;
C: Aufnahme der abgelösten Verschmutzung



Abbildung 6: Funktionsprinzip Zyklon:
A: Versuchsaufbau für die Volumenstrom-Einstellung B: Regelventil und Partikelfilter
C: Durchflussmessgerät TSI 4100

8.2.2.5 Durchführung der mikroskopischen Auswertung

Die Auswertung der Abreinigungseffektivität geschieht durch Bilanzierung der an der Fläche anhaftenden Partikelmenge vor und nach jeder vorgenommenen Beprobung. Bei der Airbrush- und der dynamischen Schaumpad-Methode werden i. d. R. jeweils 3 cm x 3 cm abmessende Quadraten beprobt (Abbildung 7, Bildteil A). Die mit der Ausgangskonzentration C_0 angeschmutzte Platte wird durch einen Metallobjektträger seitlich (Abbildung 7, Bildteil B) auf dem Objektisch des Mikroskops fixiert. Das verwendete Olympus-Systemmikroskop ist mit einer Weißlichtquelle sowie Strahlenteiler ausgestattet, der die Bildwiedergabe sowohl im Okular als auch mit Hilfe einer angeschlossenen Digitalkamera in elektronisch verarbeitbarer Form ermöglicht.

Die Weißlichtquelle lässt sich durch ein Filter auf einen selektiven Wellenlängenbereich um $\lambda = 441 \text{ nm}$ (blau) begrenzen. Damit lassen sich die verwendeten Testpartikel mit ihrem entsprechenden Extinktionsmaximum und Emissionsmaximum bei $\lambda = 486 \text{ nm}$ (grün-gelb) selektiv detektieren.

Die Bildauswertung erfolgt dahingehend, dass exemplarische Koordinatenpunkte je Teilfläche per Kamera aufgenommen und die dort detektierten Fluoreszenzsignale ausgewertet werden (Abbildung 8).

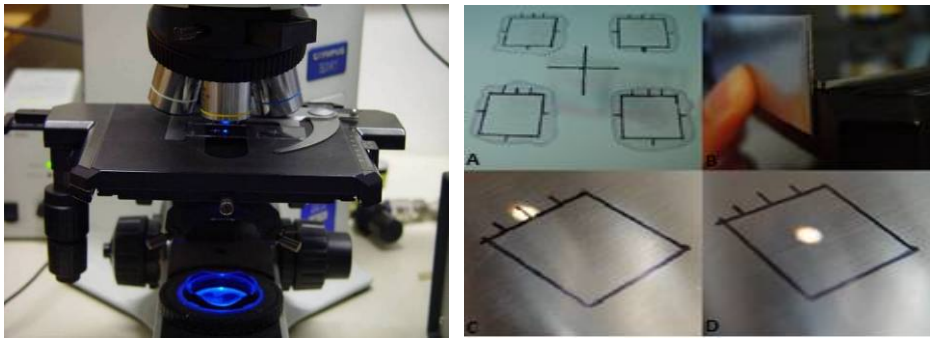


Abbildung 7: Mikroskopische Bildauswertung

Links: Systemmikroskop Olympus mit gefilterter Lichtquelle

rechts: A: Randübergreifende Anschmutzung B: Fixierung mittels Metallobjektträger

C: Ausgangspunkt des Lichtpunkts D: Horizontale Bewegung zum Ziel

Es werden von jedem auszuwertenden Plattenbereich folgende Bilder aufgenommen:

- 10-fache Vergrößerung, Weißlicht
- 50-fache Vergrößerung, Weißlicht
- 50-fache Vergrößerung, fluoreszierend

Bei einer 10-fachen Vergrößerung erfolgt die Vertikal-/Horizontalausrichtung des Mikroskoptisches anhand der im Okular sichtbaren oberen Markierungen des zu untersuchenden Quadraten mithilfe des Lichtpunktes (Abbildung 7, Bildteil C).

Ausgehend von den Markierungen erfolgt anschließend eine horizontale Bewegung des Objektisches (Abbildung 7, Bildteil D) mit anschließender Notierung der zugehörigen Abstandsskala des Mikroskops. Mit dieser Methode ist es möglich, wiederholt gleiche Punkte auf der Platte anzusteuern (Vor/nach Beprobung).

Für die exakte Wiederfindung des auszuwertenden Plattenbereichs nach einer Beprobung wird der Objektisch so lange bewegt, bis ein möglichst deckungsgleiches Bild der 50-fachen Vergrößerung mit dem bereits vorliegenden Bild vor erfolgter Beprobung erreicht wird.

Die anschließende Zählung der fluoreszierenden Partikel erfolgt unter Zuhilfenahme des EDV-Bildauswerteprogramms ImageJ der Programmversion 1.48b¹ mit den Programmparametern Threshold: 0-170 und Size (^2): 0.0002-Infinity. Es werden Flächenbereiche im Zentrum und an den Rändern der zu beprobenden Areale ausgewertet.

Grundsätzlich ist eine Auswertung der Partikelfläche oder alternativ der Partikelanzahl möglich. Im vorliegenden Fall hat sich eine flächenorientierte Auswertung als sinnvoll erwiesen. Über die Vorgabe eines einheitlichen Schwellwertes im Programm kann das digitale Bildrauschen im Verhältnis zu auszuwertenden Nutzsignalen, basierend auf Pixelanzahl und Partikelgröße, ausgeblendet werden.

Durch Differenzbildung der gezählten Partikelanzahl vor und nach Beprobung kann auf den prozentualen Reinigungserfolg geschlossen werden. Die Auswertung erfolgt unter Verwendung eines Ausreißertests nach Nalimov (mod. Grubbs-Test, geeignet für kleinen Stichprobenumfang).

¹ ImageJ 1.48b; <http://imagej.nih.gov/ij/> ; Zugriff: 08.04.2014

$$R = \left(\frac{C_0 - C}{C_0} \right) 100$$

R: Reinigungserfolg (entfernte Partikel, %)

C₀: Ausgangs-Anzahl Partikel im Untersuchungsbereich

C: Partikelzahl nach Beprobung im Untersuchungsbereich

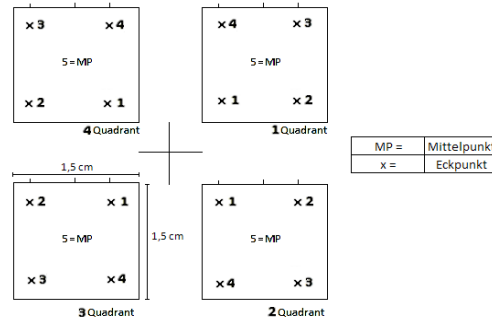


Abbildung 8: Lage der mikroskopisch ausgewerteten Aufpunkte der Probenahmeflächen vor/nach der Beprobung

8.2.2.6 Untersuchungen zur Ultraschall-Unterstützung

Um zu untersuchen, inwieweit die Abnahmerate für Anschmutzungen durch Ultraschalleinsatz positiv beeinflusst werden kann, wird die angeschmutzte, mit Flüssigkeit besprühte Oberfläche vor der Fluidabsaugung zusätzlich mit Ultraschall behandelt. Dazu wird eine Stab-Sonotrode (Ultraschallerzeuger HD2200 Plus, Fa. Bandelin Electronic GmbH & Co KG) mit einem Durchmesser von ca. 10 mm ca. 2 mm in die Flüssigkeit (4 ml) getaucht (Abbildung 9). Der Abstand zum Boden beträgt ebenfalls ca. 2 mm. Die Leistung des Gerätes beträgt ca. 200W (100%) bei einer Anregungsfrequenz von 20 kHz (Pulswiederholfrequenz 0,1s/s).

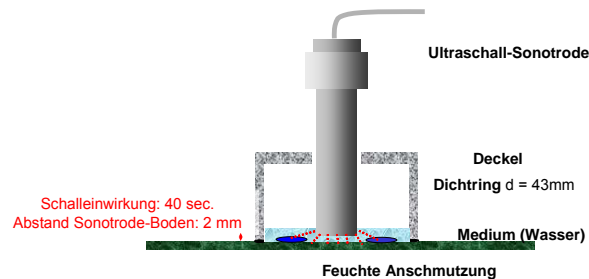


Abbildung 9: Aufbau zur Untersuchung der Ultraschall-Unterstützung bei der Flächenbeprobung

8.2.3 Ergebnisse

8.2.3.1 Prozentualer Reinigungserfolg bei Standard-Flüssigkeitsvolumen

Mit der Airbrush-Methode wurden wie vorangehend beschrieben zwei Probenahmeorte auf gebürsteten und polierten Edelstahl-Platten beprobt. Für die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungen sind dabei keine deckungsgleichen Probenahmeorte ausgewählt worden. Eine Fläche von 3 x 3 cm² wurde mit 300 µl der Partikeldispersion angeschmutzt. Der Umfang des aufgetragenen Spülwassers betrug 1 ml.

Nachfolgende Abbildung 10 gibt die Ergebnisse der Bildauswertung wieder. Demnach ist mit der Airbrush-Methode eine prozentuale Erfassung von > 99 % der vorhandenen

Anschmutzung möglich. Die Standardabweichung von unter 1 % weist auf eine hohe Reproduzierbarkeit dieser Methode hin. Die gewählte Beprobungsdauer von ca. 60 Sekunden ermöglicht ein mehrfaches Überstreichen der gesamten Fläche mit dem Spülfluid. Die während der Beprobung zugegebene Luftmenge beträgt 4 Liter.

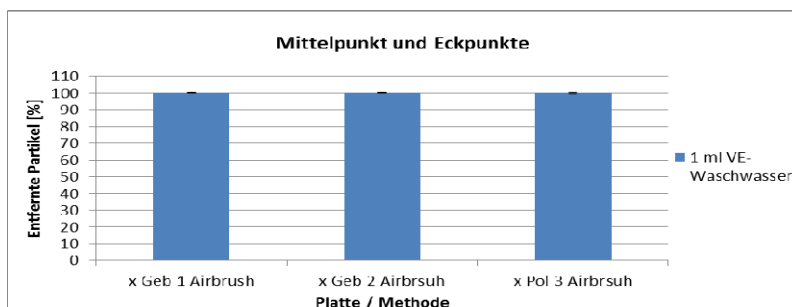
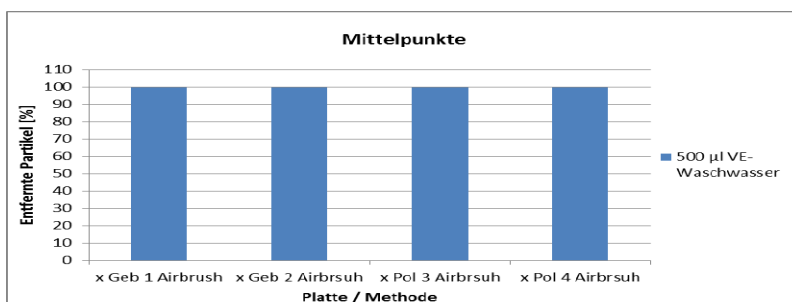
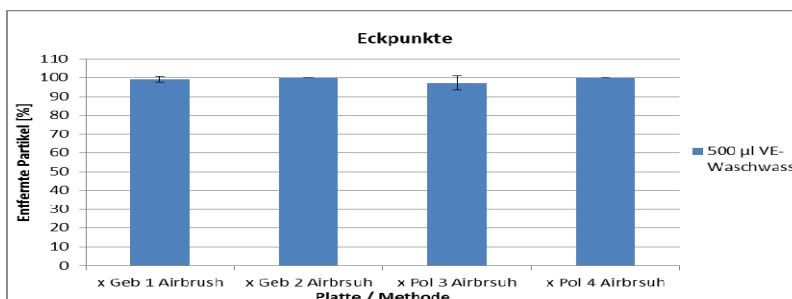


Abbildung 10: Prozentualer Reinigungserfolg bei Standard-Flüssigkeitsvolumen

4.3.2 Prozentualer Reinigungserfolg bei Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens

Um den Einfluss der zugegeben Fluidmenge zu untersuchen, wurde Waschfluid im Umfang von 500 µl bzw. 2 ml zugegeben. Die Anwendung der Airbrush-Methode zeigte auch bei verringertem Fluidvolumen einen Reinigungserfolg von >97 % (Abbildung 11). Die geringe Standardabweichung ist auch eine Bestätigung für die Reproduzierbarkeit der Methode. Gleiche Ergebnisse wurden für das erhöhte Waschfluidvolumen erzielt (hier nicht dargestellt).



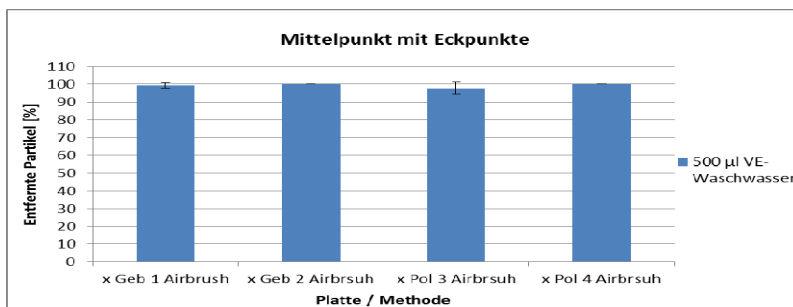


Abbildung 11: Prozentualer Reinigungserfolg bei Reduzierung des Flüssigkeitsvolumens

8.2.3.2 Ultraschall-Unterstützung

In den durchgeführten Untersuchungen wurde bei Anwendung von Ultraschall das vorhandene, den Schall übertragende Flüssigkeitsvolumen innerhalb der Anwendungsdauer von 40 Sekunden nahezu vollständig ausgetrieben.

Der Einsatz eines Ultraschallerzeugers mit Stabsonotrode ist darüber hinaus mit nicht unerheblichem apparativen Aufwand verbunden sowie an eine weitgehend waagerechte Ausrichtung der Flächen gebunden.

Die vorangegangenen dargestellten Ergebnisse zum ausschließlichen Einsatz der Sprühmethode zeigen, dass bereits ohne weitere Modifikationen grundsätzlich sehr hohe Abnahmeraten erzielt werden können. In den weiteren mikrobiologischen Anwendungsuntersuchungen wird daher auf den Einsatz von unterstützendem Ultraschall verzichtet.

8.2.4 Untersuchung der Partikelfreisetzung ausgehend von den Flächen während des Sprühvorgangs

Bei Sprühvorgängen werden Flüssigkeitströpfchen mit einem kinetischen Impuls auf nahegelegene Oberflächen geführt. Weiter wird ein Nebel feiner Tröpfchen in die Umgebung freigesetzt (Overspray). Um zu untersuchen, ob bei der Anwendung des Sprühverfahrens oberflächlich anhaftende Kontaminationen als Aerosol abgetragen werden, erfolgen Untersuchungen an mit fluoreszierendem Partikelmaterial künstlich angeschmutzten Oberflächen. Gemessen wird die luftgetragene Aerosolkonzentration im Umfeld des Auftragortes mit einem optischen Partikelzähler (OPZ), der alternativ zu einem klassischen Weißlichtdetektor mit einem speziellen Fluoreszenzdetektor ausgestattet ist. Während der Weißlichtdetektor alle partikulären Signale wie Tröpfchen oder Partikel erfasst, werden mit dem Fluoreszenzdetektor aufgrund der verwendeten spezifischen Wellenlänge ausschließlich im Bereich 486 nm streuende Partikel (Fluoreszenzbereich) gezählt. Damit lassen sich die von der Fläche freigesetzten Partikel spezifisch erfassen.

8.2.4.1 Versuchsaufbau (Geräte)

- Edelstahlplatte und Edelstahlring, Durchmesser Innen 48 mm, Höhe 10 mm
- Probenahmeschlauch zum Laser-Fluoreszenzdetektor bzw. PCS in 6 cm Abstand per Stativklemme am Stativ fixiert
- Optischer Partikelzähler (PCS, Fa. Palas GmbH, Karlsruhe, vgl. Abbildung 12), alternativ ausgestattet mit einem im Rahmen eines FuE-Vorhabens entwickelten

(IUTA 2004) Fluoreszenzdetektors mit Laseranregung (Anregungsmaximum $\lambda = 441$ nm, purpurblau; Emissionsmaximum der Partikel ca. $\lambda = 486$ nm, grünlichblau); Messbereich des Aerosolspektrometers: 120 nm - 40 μm $c_p \leq 5 \cdot 10^5$ P/cm³

- Auswerteeinheit für beide Detektoren (digitale Einzelsignalverarbeitung)
- Sprühpistole mit Kompressor
- Fluoreszierendes Polystyrol-Latex-Partikelmaterial, mittlerer Partikel-Durchmesser 1 μm , Extinktionsmaximum $\lambda = 441$ nm; Emissionsmaximum bei $\lambda = 486$ nm (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim/D)
- VE-Wasser

8.2.4.2 Untersuchungsmethode

- Auftragen von 300 μl partikelhaltiger Dispersion ($d_p = 1$ μm) innerhalb des Ringes auf einer Edelstahlplatte. Dispersion: ca. 2 ml Produkt auf 50 ml VE-Wasser verdünnt
- Antrocknungsdauer 15 min.
- Auftragen von 3 ml Spüllösung (VE-Wasser) per Sprühpistole, Volumenstrom = 1 ml im Zeitraum von 15 sec. (vgl. Abbildung 12)
- Gleichzeitig Gas-Probenahme zum Detektor für 50 sec. (Volumenstrom: 5 l/min)

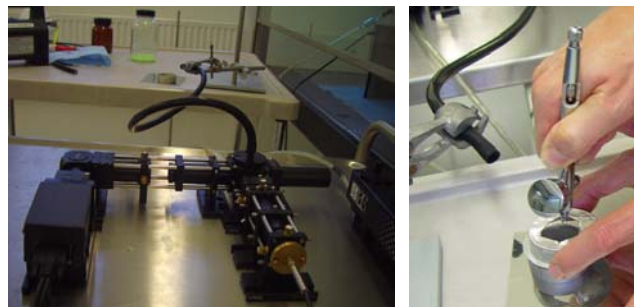


Abbildung 12: Test auf Aerosolfreisetzung von einer angeschmutzten Oberfläche mittels OPZ und Fluoreszenzdetektor.

Linker Bildteil: Laserdetektions-Einheit des OPZ, Probenahme-Fläche und Probenahme-Schlauch,

rechter Bildteil: Probenahme unter Verwendung einer Abdeckung

8.2.4.3 Ergebnisse

Während mit dem Weißlichtdetektor eine erhöhte Partikelanzahl erfasst werden konnte, liefern die Messungen mit dem Fluoreszenzdetektor Nullsignale bzw. nur sehr geringe Partikelanzahlen (Tabelle 2). Signale im hier detektierten Umfang können durch Verstärkungseffekte im Rahmen der Analog-Digitalwandlung im zur Signalverstärkung im Gerät verwendeten Photomultiplier hervorgerufen werden. Die Auswertung der Messung lieferten demnach keine Hinweise auf die Freisetzung von Oberflächenanhaftungen mit dem Aerosol.

Tabelle 2: Zählereignisse während der Probenahme mit Fluoreszenz- und Weißlichtdetektor

Messgröße	Detektor	Mittlere Partikelzahl (#/cm³)	n
Umgebungsluft	WLD	7	4
Umgebungsluft	FD	0	4
Sprühvorgang mit Abdeckung	WLD	54	2
Sprühvorgang mit Abdeckung	FD	2	4
Sprühvorgang ohne Abdeckung	WLD	14	1
Sprühvorgang ohne Abdeckung	FD	0	1

WLD: Weißlichtdetektor

FD Fluoreszenzdetektor

8.2.5 Verfahrensoptimierung

Eine Ablösung von trockenen und feuchten Anschmutzungen inerten Partikelmaterials mit der direkten Methode ist damit nahezu vollständig möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Methode in der vorliegenden Form für weitere Untersuchungen mit Mikroorganismen verwendet. Dabei ist die Effizienz der Ablösung im untersuchten Umfang weitgehend unabhängig von der Spülfluidmenge.

Das verwendete System aus Sprühpistole, Ansaugspitze und Zyklonabscheidung hat positive Resultate geliefert. Als nachteilig (vgl. die nachfolgenden Ausführungen zu mikrobiologischen Untersuchungen) kann der erforderliche Aufwand zur Probenahme angesehen werden, insbesondere die Verwendung eines Kleinkompressors bzw. einer Absaugpumpe.

Vor diesem Hintergrund werden zur Verbesserung der Verfahrensakzeptanz und Fertigungsoptimierung in der Praxis folgende Modifikationen angeregt:

- Integration einer Dichtkante in die Fluidbegrenzungs-Form gegen die Fläche zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten sowie
- Integration einer Teilabdeckung der einsprühseitigen Fläche der Form.
Vorteil: Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten auch bei einer Beprobung senkrechter Flächen
- Verwendung einer per manuell mit Druckluft angetriebenen Einstoffdüse, um die Flüssigkeit auf die Oberfläche aufzubringen.
Vorteil: Verzicht auf den Kleinkompressor-Einsatz
- Integration der Leitungsführung zwischen Düse und Zyklonkörper als senkrecht starres Steigrohr parallel am Zyklon, um die Schlauchlänge zu reduzieren. Anschluss der Düse über ein kurzes flexibles Schlauchsegment, das ausschließlich die Beweglichkeit der Spitze gewährleistet.
Vorteil: Reduzierung der Leitungslänge und Verlustflächen; Reduzierung der verwendeten Bauteil-Anzahl
- Fertigung der o. g. Ansaug- und Zycloneinheit aus einem sterilisierbaren, kostengünstigen Kunststoffmaterial als Einweg-Artikel zur Probenahme

Vorteil: keine Querkontamination durch evtl. mangelhaft ausgeführte Sterilisation von Edelstahl-Bauteilen

- Erzeugung der Ansaugleistung durch Verwendung einer per Hepa-Filter und Trocknungsstufe geschützten, batteriebetriebenen Niedervolt-Ansaugpumpe

Vorteil: Verzicht auf die Verwendung von 220 V-Netzspannung

Bei den zur Probenahme erforderlichen geringen Fluidmengen, Absaugvolumina und -distanzen ist zu erwarten, dass die Umsetzung der Vorschläge technisch problemlos möglich ist und mit diesen Maßnahmen eine Verfahrensakzeptanz in der industriellen Anwendungspraxis deutlich verbessert werden kann.

8.3 Arbeitspaket 2: Herstellung und Optimierung einer aseptischen Probenahmematrix (Schaummaterial)

8.3.1 Gelatine-Matrizes

Schwammartige Gelatine-Matrizes sind aufgrund unterschiedlicher Mechanismen in der Lage, Fluide einzubinden. Zum einen binden während des Quellvorgangs der verknäulten, langkettigen Gelatine-Moleküle Wasserstoffmoleküle durch Wasserstoffbrückenbindung an die hydrophilen, ionischen Gruppen des Gels. Diese Form des Gels wird als Hydrogele bezeichnet. Zum anderen sind schwammartige Strukturen aufgrund ihrer Kapillarstruktur in der Lage, in unterschiedlichem Umfang Flüssigkeiten zu binden. Diese Adhäsionskräfte nehmen mit abnehmendem Kapillardurchmesser zu.

Um die geforderte Wirkung der Gelatinerschaum-Matrix zu erreichen, müssen deren Phasengrenzflächen gezielt durch den Aufbau einer Gasblasenstruktur gestaltet werden. Dabei sollen stabile poröse Schwammstrukturen aus dem erstarrten Schaum realisiert werden, um die Phasentrennung durch Koaleszenz der Blasen z. B. aufgrund der Ostwald-Reifung (Borcherding 2004) zu verhindern. Weiterhin müssen die Lamellen der Schwammstruktur eine ausreichende Festigkeit aufweisen, um ein rückstandsfreies Ablösen des Schwamms von der beprobten Oberfläche zu ermöglichen. Die Matrizes müssen weiterhin mit der Forderung nach Verflüssigbarkeit konsistent sein.

Zunächst werden diese Schaumpads im Labormaßstab auf Basis von Hydrokolloiden hergestellt. Dabei werden sowohl die Verschäumungsbedingungen als auch die Schaumzusammensetzung (z. B. Gelatineart, Gelatinekonzentration, Zuckerzusatz, Zusatz von grenzflächenaktiven Substanzen) variiert.

Zur Entwicklung der Probenahmetechnik ist zu untersuchen, welchen Einfluss eine Variation der

- Schaumpaddichten/-konzentrationen,
- Schaumpadflächen,
- Anschmutzungsvolumen,
- Waschflüssigkeitsvolumen sowie der,
- Oberflächenmaterialien

zur Folge hat.

Die Entwicklungsarbeiten der Probenahmematrix und Probenahmemethode sind über die Materialeigenschaften und Anwendungsbedingungen voneinander abhängig.

Um mit vertretbarem Aufwand Ergebnisse erzielen zu können, kommen in der ersten Entwicklungsphase fluoreszierende Partikel als selektiv detektierbare Kontamination anstelle von Mikroorganismen zum Einsatz. Somit können falsche Rückschlüsse über den Reinigungserfolg einer Matrix-Methodenkombination durch natürliches Vermehren oder Absterben der Mikroorganismen vermieden werden.

8.3.2 Material und Methoden

8.3.2.1 Verwendete Rohwaren

Für die Herstellung einer aseptischen Probenahmematrix wurde aus Schweineschwarze hergestellte Speisepulvergelatine verwendet. Es kamen zwei unterschiedliche Produkte der Gelita AG zum Einsatz. Die beiden Produkte unterscheiden sich in ihrer Mesh-Zahl und in der Viskosität (s. Tabelle 3). Weiterhin wurden bei der Herstellung destilliertes Wasser sowie das Salz Natriumazid eingesetzt.

Tabelle 3: Eigenschaften der verwendeten Speisepulvergelatine

Gelatineart	Partikelgröße	Bloomwert	Viskosität
Typ A ¹	6 Mesh (grobkörnig)	260 Bloom	3,57 mPas
Typ A	20 Mesh (feinkörnig)	260 Bloom	3,84 mPas

¹ Typ A: Durch sauren Aufschluss gewonnen, Typ B: Durch alkalischen Aufschluss gewonnen

8.3.2.2 Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Herstellung der Schaumpads

- Schaumgenerator: Fa. Hansa-Mixer, Typ TOP-Mix-D, Bj. 2002, Masch.-Nr. 40173
- Heizplatte: Fa. SI-Analytics, SLR Laborrührer, 230 V, 920 W
- Präzisionswaage: Fa. Sartorius Acculab, ATILON 4202-I, Messbereich: Max 4200 g, d=0,01 g
- Plattformwaage: Fa. Sauter, E1210 Max 60 kg, min 500 g, T=-60 kg, e=10 g, d_d = 1 g, d_T = 1 g
- Rührwerk: Fa. IKA-Werke, Eurostar power control-visc P1, 10M/M-D15
- Thermometer: Fa. Testo, Typ 945 (kalibriert)
- Kühlhaus: Zur Zwischenlagerung der gefertigten Gelatineschäume bei 4 - 5 °C
- Propellerrührer, 3-flügelig
- Umlufttrockenschrank: Fa. Heraeus, Typ UT 5060E, 220 V, 1 ~ 50/60 Hz, 250 °C Nenntemperatur, Temperaturschutz DIN 12880, Schutzart IP20, 3,2 kW
- Schneidemaschine: Fa. Bizerba, Typ V58, 0,300 kW, 50 Hz,
- Blockmesser: Fa. Dick Ergogrip, 21 cm Klinge
- Sortiermesser: Fa. Dick Ergogrip, 21 cm Klinge
- Schneidebrett aus Kunststoff

Dichtebestimmung:

- Digital-Messschieber: Fa. Format professional quality, Digital-Messschieber für Absolut- und Relativmessungen mit großer LCD-Anzeige, Messbereich: 150 mm/6 Inch, 200 mm/8 Inch, 300 mm/12 Inch, Auflösung: 0,01 mm/0,0005 Inch

Restfeuchtebestimmung:

- Vakuumtrockenschrank: Fa. Memmert
- Wägegläschen mit Deckel
- flache Glasschale
- Seesand, gereinigt

Bestimmung der Wasseraufnahme:

- Präzisionswaage: Fa. Sartorius Laboratory, Typ L 610 D
- Stoppuhr: Model No. KT 188
- Thermometer: Fa. Testo Typ. 735 (kalibriert)
- Gittersieb
- Kunststoffbehälter
- Papiertücher zum Wischen
- Pipettierhilfe (Peleusball)
- große Petrischale
- Glaspipette
- Metallplättchen

Mikroskopie der Gelatineschäume (Schaumstruktur):

- Stereomikroskop: Fa. Wild Heerbrugg, Typ Wild M8
- Spiegelreflexkamera: Fa. Nikon, Typ D70
- Lichtquelle: Fa. Volpi, Intralux 6000LL
- Skalpell
- Millimeterpapier

8.3.3 Herstellung der Gelatineschaumpads

Die Herstellung der Gelatineschaumpads erfolgt in mehreren Schritten, die in Abbildung 13 schematisch dargestellt sind und im Folgenden beschrieben werden.

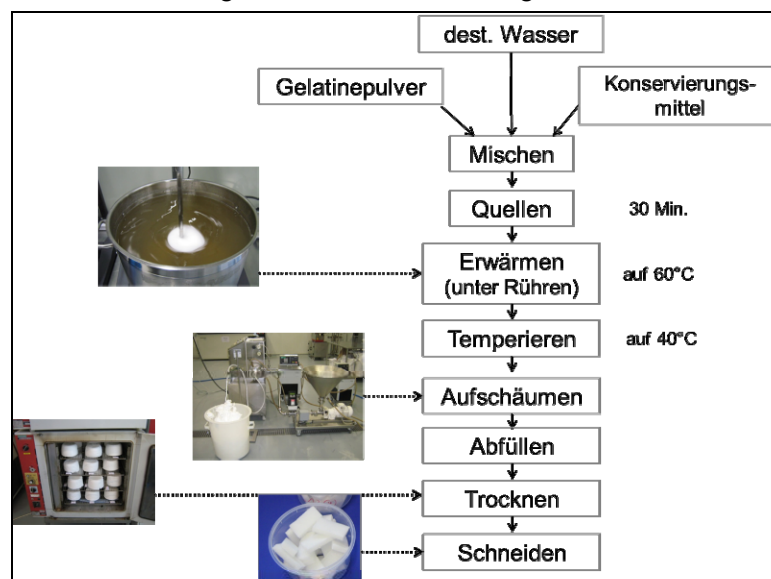


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gelatinepad-Herstellung

8.3.3.1 Herstellung der Gelatinelösung

Die Herstellung der Gelatinelösung wurde nach einer Gebrauchsanweisung der Gelita AG durchgeführt. Als Materialausgangsrohstoff diente die Speisepulvergelatine aus Schweineschwarte. Daneben wurden destilliertes Wasser und Natriumazid als Konservierungsmittel eingesetzt. Es wurden Gelatinelösungen in vier Konzentrationen mit je einer Ansatzmenge von 15 kg hergestellt. Die Rezepturen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Rezeptur Gelatinelösungen

Konzentration Gelatine- lsg. Zutaten	5 %	10 %	15 %	20 %
Speisepulvergelatine	0,75 kg	1,5 kg	2,25 kg	3,00 kg
Dest. Wasser	14,25 kg	13,50 kg	12,75 kg	12,00 kg
Natriumazid	0,0075 kg	0,0075 kg	0,0075 kg	0,0075 kg

Die Gelatine und das destillierte Wasser wurden nach den Vorgaben der Rezeptur abgewogen und in einem Edelstahlbehälter vermischt. Beim Vermischen der Komponenten wurde das Salz Natriumazid hinzugefügt, um die Haltbarkeit der hergestellten Schaumpads zu gewährleisten. Bei der zu einem späteren Zeitpunkt erstellten 15- und 20-prozentigen Gelatinelösung (6 Mesh) wurde kein Natriumazid beigemischt. Die gequollenen Lösungen wurden mit Alufolie zugedeckt, so dass die Gelatinegranulate ohne Umgebungseinflüsse durchquellen konnten.

Die Quellung erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur (s. Abbildung 14, linker Bildteil). Sobald der Großteil der Gelatine gelöst war, erfolgte unter Rühren eine Erwärmung auf 60°C. Nach dem Erreichen der gewünschten Temperatur wurde die Lösung auf 40°C temperiert.



Abbildung 14: Gelatineverarbeitung: Erwärmen einer Gelatinelösung unter Rühren (links), Schaumgenerator von Hansa-Mixer (rechts)

8.3.3.2 Aufschäumen der Gelatinelösung

Zum Aufschäumen wurden die Gelatinelösungen in den Pumpentrichter des Schaumgenerators (s. Abbildung 14, rechter Bildteil) gegossen.

Tabelle 5 ist zu entnehmen, nach welchen Parametern der Schaumgenerator zum Aufschäumen kalibriert wurde. Nach der Kalibrierung erfolgte eine Erhitzung der Manteltemperatur des Mixkopfes und Pumpentrichters auf 30 bzw. 35 °C. Die unterschiedlichen Gelatinelösungen (5-, 10-, 15- und 20 %) wurden mithilfe des Schaumgenerators

in Schäume mit einer Dichte von 50-, 100- und 150 g Schaumgewicht pro Liter aufgeschlagen. Der Pumpendurchsatz lag bei 15 Liter pro Stunde und die Mixkopfdrehzahl lag konstant bei 500 Umdrehungen pro Minute. Der Systemdruck variierte in einem Bereich von 1,3 bis 4,3 bar. Während des Schaumaufschlagens wurde die Produktausgangs- und die Produktaustrittstemperatur gemessen und die Schaumdichte der Proben bestimmt. Die Dichte der Schäume wurde aus dem Quotienten von Masse und Volumen errechnet. Das über einen Schlauch austretende Produkt wurde in den vorgesehenen Behältern (1,2 l Volumen) bis zum Rand abgefüllt und abgewogen. Im Anschluss wurden die Schäume in einem Kühlhaus bei 4 bis 5 °C zwischengelagert.

Tabelle 5: Parametereinstellung vom Schaumgenerator

Parameter	Einheit
Schaumgewicht (Dichte)	[g/l]
Pumpendurchsatz	[L/h]
Mixkopfdrehzahl	[U/min]
Luftzufuhr	[L/h]
Ansatzmenge	[kg]
Manteltemperatur (Mixkopf)	[°C]
Manteltemperatur (Pumpentrichter)	[°C]
Systemdruck	[bar]

8.3.3.3 Trocknung der Gelatineschäume

Die im Kühlhaus zwischengelagerten Gelatineschäume wurden vor der Trocknung auf mehrere Gitterroste verteilt (s. Abbildung 15) und im Umlufttrockenschrank für ca. 120 h getrocknet. Die Trocknung erfolgte bei angelehnter bzw. halboffener Tür, sodass ein Durchzug bei Raumtemperatur gewährleistet war.



Abbildung 15: Aufgeschlagene Gelatineschäume vor dem Trocknungsprozess (links)
Geschnittene Gelatineschaumpads (rechts)

8.3.3.4 Schneiden der Gelatineschäume

Mit einem Blockmesser wurden die getrockneten Schäume in zwei Hälften zerteilt und im Anschluss mit einer Schneidemaschine in 10 mm dicke Scheiben geschnitten. Aus den Scheiben wurden quaderförmige Schaumpads in den Maßen 60 x 30 x 10 mm angefertigt (vgl. Abbildung 15).

8.3.4 Analyse der Schaumpads

Bei den hergestellten Gelatineschaumpads wurden ausgewählte charakteristische Parameter näher betrachtet und analysiert. Hierzu gehören die Dichte und das Volumen,

der Restfeuchtegehalt nach der Trocknung sowie die Mikroskopie der Schaumstruktur. Da es nicht möglich war aus der 5-prozentigen Gelatinelösung einen trockenen Schaum mit fester homogener Struktur zu erzeugen, wurden diese bei den Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

Dichte und Volumen

Die geschnittenen Schaumpads wurden mit einem Digital-Messschieber exakt vermessen und gewogen. Aus der Masse (m) und dem Volumen (V) wurde die Dichte (ρ) $\rho=m/V$ bestimmt.

Restfeuchte

Die Bestimmung der Restfeuchte erfolgte unter Anwendung der Seesandmethode. Hierfür wurden Gelatineschaumpads mit einer Schaumdichte von 100 und 150 g/l aus den 6- und 20 Mesh-Lösungen verwendet. Die Wägeschälchen wurden mit ca. 20 g Seesand befüllt und die Schaumpads hineingelegt. Anschließend wurden die Proben mit dem Sand verrieben, um die Oberfläche aufzulockern. Die Trocknung erfolgte für drei Stunden im Trockenschrank bei ca. 100 °C. Im Anschluss wurden die Schwämmchen im Exsikkator abgekühlt und ausgewogen. Die Bestimmung der Restfeuchte erfolgte in Dreifachbestimmung. Der Trockensubstanzgehalt ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$T = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} 100$$

m_1 : Leermasse der Wägeschale in g

m_2 : Masse der Wägeschale und Probe vor der Trocknung

m_3 : Masse der Wägeschale und Probe nach der Trocknung

Mikroskopie der Schäume (Schaumstruktur)

Unter Anwendung eines Stereomikroskops wurde die Schaumstruktur der Schaumpads untersucht. Zu Beginn wurden mit einem Skalpell kleine Streifen aus den horizontal liegenden Pads herausgeschnitten. Die zu untersuchenden Streifen wurden gefärbt, damit die Schaumstruktur unter dem Mikroskop besser zu erkennen ist. Die Mikroskopie der Schaumpads erfolgte in einer 18-fachen Vergrößerung mit einem Maßstab von 1:5 mm. Als Hilfsmittel für den Übertragungsmaßstab wurde Millimeterpapier genutzt. Die Verwendung einer Lichtquelle sorgte für angemessene Lichtverhältnisse. Mit einer Spiegelreflexkamera wurden pro Schaumprobe 5-6 Bilder aufgenommen.

8.3.5 Ergebnisse und Diskussion

Dichte der aufgeschlagenen und getrockneten Schäume

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die Dichte der Gelatineschäume vor und nach der Trocknung. Die Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei Messungen. Vor dem Trocknen (Abbildung 16) weisen die Schäume mit einem Aufschlag von 150 g/l jeweils die höchste Dichte auf. Insgesamt hat der Schaum aus der 20 Mesh-Gelatine, der aus einer 15-prozentigen Lösung hergestellt wurde, die höchste Dichte. Die Dichte der mit 100 g/l aufgeschlagenen Schäume liegt bei allen Schäumen bei etwas über 120 g/l und die mit 50 g/l aufgeschlagenen Gelatineschäume bei ca. 75 g/l. Beim Vergleich zwi-

schen den unterschiedlichen Konzentrationen und Mesh-Zahlen sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

In Abbildung 17 sind die Werte nach dem fünftägigen Trocknungsprozess dargestellt. Der Schaum aus der 6 Mesh Gelatine, der in 20-prozentiger Lösung hergestellt wurde, hat die höchste Dichte mit 53 g/l auf. Es ist zu erkennen, dass die Schäume mit einer Dichte von 150 g/l schwerer sind als die anderen Schaumproben. Zudem sind die Schäume aus einer 6 Mesh Gelatinelösung schwerer als die aus einer 20 Mesh stammenden Lösung.

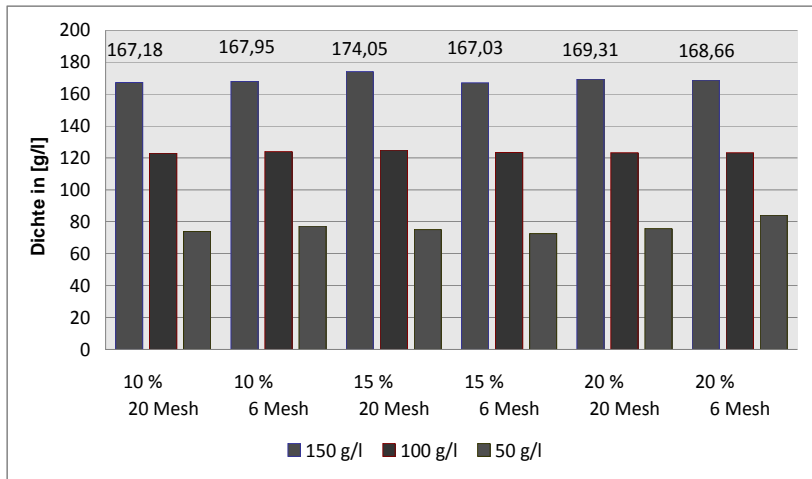


Abbildung 16: Dichte der aufgeschlagenen Schäume auf Gelatinebasis

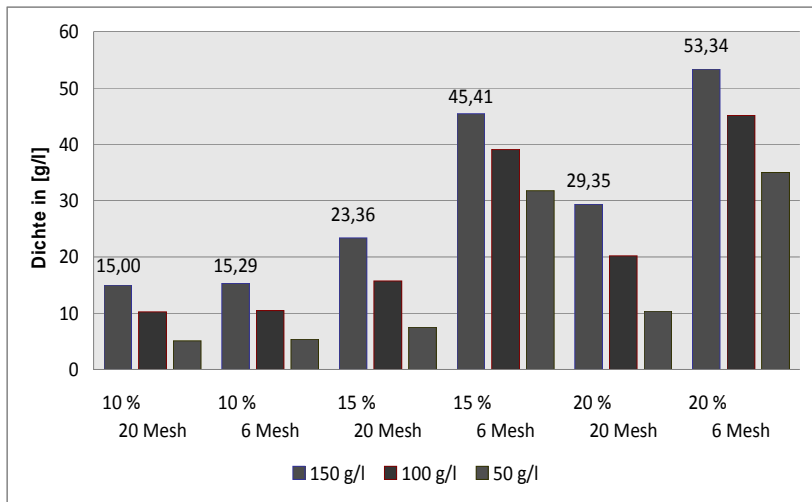


Abbildung 17: Dichte der getrockneten Schäume auf Gelatinebasis

Restfeuchte

Die Werte der Restfeuchtebestimmung sind in Abbildung 18 dargestellt. Durch die ermittelnden Feuchtwerte sollten Informationen hinsichtlich einer Haltbarkeit der Schwämmchen gewonnen werden. Zur Bestimmung der Restfeuchte wurden Gelatineschaumpads mit einer Dichte von 100- und 150 g/l verwendet. Die Restfeuchte wurde mit der Seesandmethode bestimmt und die resultierenden Werte aus dem arithmetischen Mittel ermittelt. Die höchste Restfeuchte liegt bei 11,5 % und stammt aus einem Schwämmchen, dass aus einer 6 Mesh Gelatinelösung mit einer Dichte von 150 g/l hergestellt wurde.

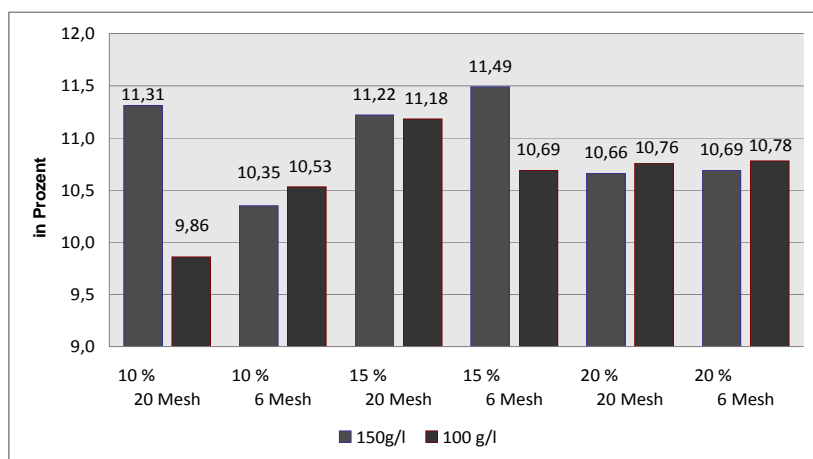


Abbildung 18: Restfeuchte der getrockneten Gelatineschaumpads

Ab einem Restfeuchtegehalt von mehr als 16 % besteht bei Gelatinepulver die Gefahr einer Verklumpung und mikrobiellen Wachstums (Schieber, Gareis 2007). Die ermittelten Werte weisen darauf hin, dass ein mikrobieller Verderb der Gelatineschaumpads nicht zu erwarten ist.

Schaumstruktur

In Abbildung 19 bis Abbildung 24 ist die mikroskopische Vergrößerung ausgewählter Gelatineschaumpads dargestellt. Durch die Aufnahmen sollten Informationen bezüglich der Schaumstruktur gewonnen werden. Die Aufnahmen liegen in einer 18-fachen Vergrößerung mit einem Maßstab von 1:5 mm vor. Es wurden Schäume mit einer Schaumdichte von 150 g/l mikroskopiert.

An den Abbildungen sind die charakteristischen Eigenschaften eines Polyederschaums erkennbar. Die Anordnung der Gasblasen ist gut zu erkennen. Die dunkel unterlegten Bereiche charakterisieren die Membranen bzw. Lamellen in einem formfesten Zustand. Es ist an den Abbildungen erkennbar, dass die Membranen mehrschichtig sind und die Lamellen verdecken.

Der Polyederschaum wird durch seine hohe Stabilität gegenüber anderen Schäumen charakterisiert. Für die Bildung eines Polyederschaums sind grenzflächenaktive Verbindungen entscheidend. Die undurchdringliche Aneinanderreihung der Gasblasen bewirkt eine Deformation. Dadurch zieht sich das Dispersionsmittel zu Lamellen zusammen (vgl. Dörfler (2002), S. 357). Es entsteht die charakteristische, wabenartige Struktur eines Polyederschaums (vgl. Ströbel (2007), S. 13).

Auf den Abbildungen ist zu erkennen, dass Verbände von Gasblasen dicht aneinander angrenzen, was zu einem Zusammenziehen der Lamellen führt (Abbildung 19 bis Abbildung 24). Eine erhöhte Proteinkonzentration führt zu kleineren Gasblasen und festeren Schäumen (vgl. Cheftel et al. (1992), S. 114). Bei Vergleich der Abbildung 21 bis Abbildung 23 bestätigt sich die Aussage der zitierten Literatur. Die Stabilisierung der Gasblasen beruht auf den Gelatineeigenschaften. Die in den Abbildungen gut zu erkennenden, ausgebildeten Membranen beruhen auf den Protein-Wasser-Wechselwirkungen. Durch die schaubildenden und -stabilisierenden Eigenschaften besitzen Proteine wie Gelatine, die Fähigkeit, durch ihre partielle Denaturierung eine luftundurchlässige Membran zu bilden. Die nach außen liegenden Membranen werden

durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Gelatine begründet. Die zentral liegenden Schichten sind mit den Äußeren durch Wasserstoffbrücken oder elektrostatische Interaktionen verbunden (vgl. Westphal et al. (2003), S. 170).

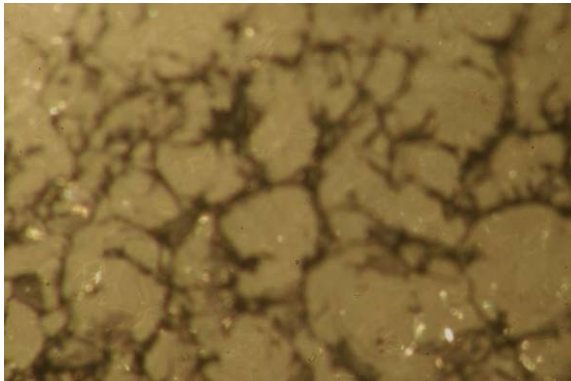


Abbildung 19: Schaumstruktur (20 Mesh, 10 %)

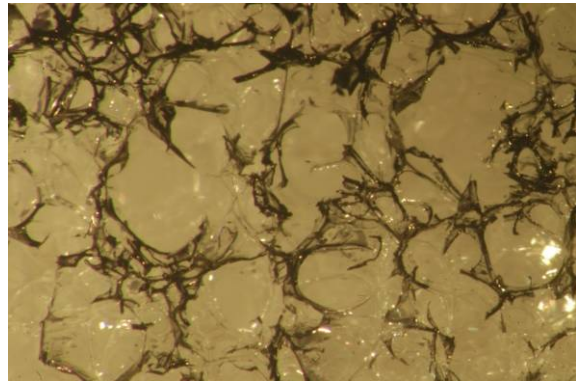


Abbildung 20: Schaumstruktur (6 Mesh, 10 %)

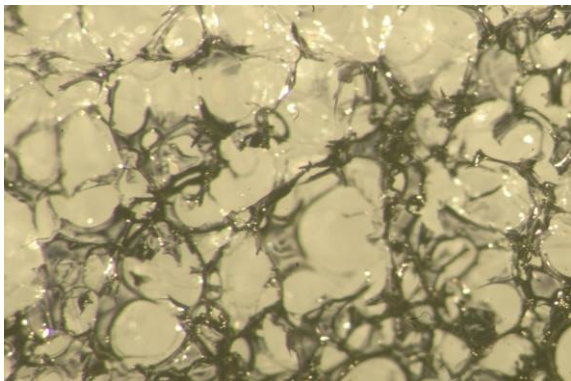


Abbildung 21: Schaumstruktur (20 Mesh, 15 %)

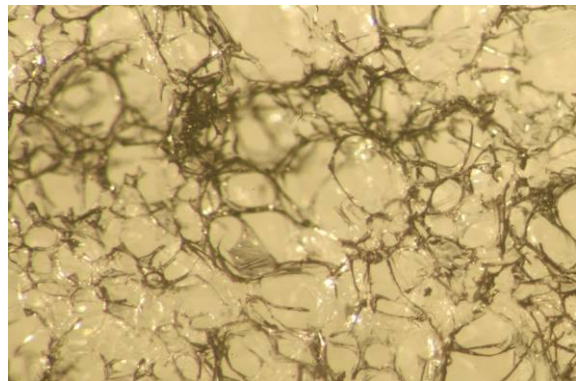


Abbildung 22: Schaumstruktur (6 Mesh, 15 %)

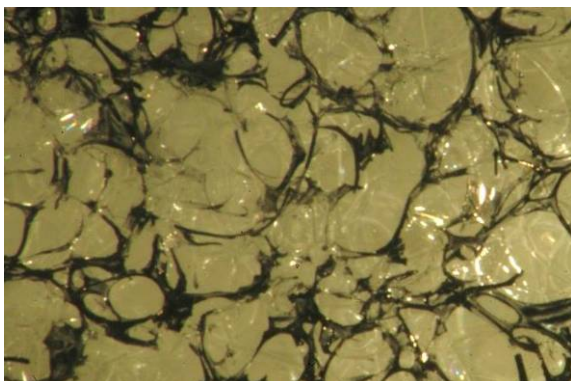


Abbildung 23: Schaumstruktur (20 Mesh, 20 %)

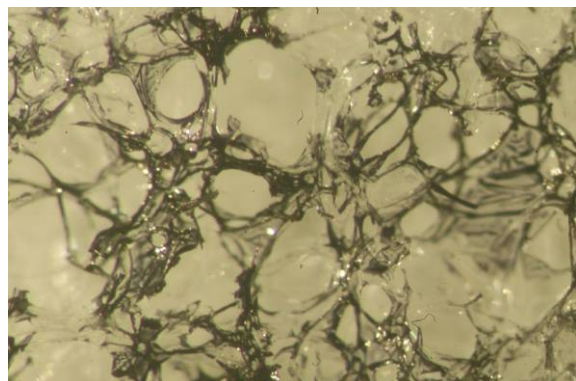


Abbildung 24: Schaumstruktur (6 Mesh, 20 %)

Zur weiteren Strukturaufklärung sind Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der im Rahmen des Vorhabens erzeugten Schaumkörper angefertigt (vgl. Abbildung 25) und entsprechenden Aufnahmen kommerzieller Schaumpads (Abbildung 26) gegenüber gestellt worden. Die Anzahl der Knotenpunkte pro Volumen ist demnach bei den kommerziellen Gelatineschaumpads höher als bei den im Rahmen des Vorhabens erzeugten Schaumkörpern, entsprechend liegt ein höherer Anteil kürzerer Lamellen vor.

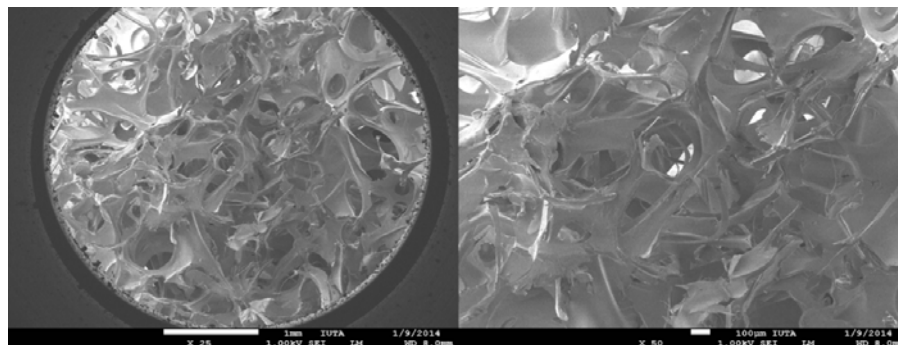


Abbildung 25: Rasterelektronische Aufnahme, Schaumstruktur DIL-Schaumpad

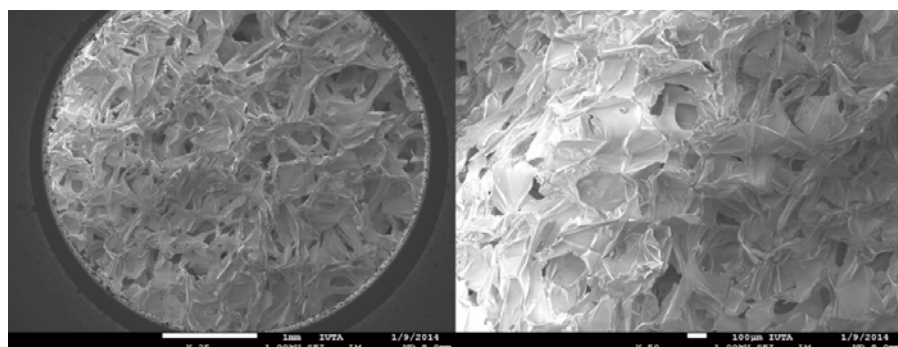


Abbildung 26: Rasterelektronische Aufnahme, Schaumstruktur eines kommerziellen Produkts

8.4 Arbeitspaket 3: Aseptische Probenahme mittels der in AP 2 entwickelten Probenahmematrix (Applikationsentwicklung II)

Ziel des Arbeitspakets 3 ist die Entwicklung einer geeigneten Applikationstechnik zur Probenahme auf feuchten Oberflächen mit den entwickelten Schaumpads. Aufgrund der porösen Struktur wird das die Oberfläche benetzende Fluid in die definiert aufgesprengte Struktur eingesogen und festgehalten. Schaumpad-Matrix und eingebundene Oberflächenkontaminanten lassen sich anschließend durch Reverflüssigung der Gelmatrix trennen.

Bei der ausreichenden Dimensionierung des Schwammkörpers ist die vollständige Aufnahme des Fluids möglich, insbesondere kleinere Fluidmengen können so vollständig aufgenommen werden. Einen Nachteil der porösen Struktur der Schaumpads stellt die gegebenenfalls nicht vollflächige Flächenpressung dar, die zu einer nur eingeschränkten Abnahme des Oberflächenwassers führen kann.

Eine weitere mögliche Applikationsform für Gelatineschaumpads stellt eine poröse Kartusche dar, durch die eine Zweiphasenströmung angesaugt werden soll und in der sich enthaltene Oberflächenflüssigkeit sowie Spülwasser abscheiden sollen. Aufgrund der guten Abscheideleistung der direkten Methode unter Verwendung eines Zyklons und

der im Vergleich einfacheren Handhabung dieser Methode wird die Kartuschenlösung in den weiteren Darstellungen nicht weiter berücksichtigt.

8.4.1 Untersuchungen zur Wasseraufnahme

8.4.1.1 Material und Methoden

Verwendete Geräte und Hilfsmittel, Wasseraufnahme

- Präzisionswaage: Fa. Sartorius Laboratory, Typ L 610 D
- Stoppuhr: Model No. KT 188
- Thermometer: Fa. Testo Typ. 735 (kalibriert)
- Gittersieb
- Kunststoffbehälter
- Papiertücher zum Wischen
- Pipettierhilfe (Peleusball)
- große Petrischale
- Glaspipette
- Metallplättchen

Untersuchung der Wasseraufnahme

Die Bestimmung des Wasseraufnahmevermögens der Schaumpads wurde im Langzeit- und im Kurzzeitversuch vorgenommen. Das Ziel vom Langzeitversuch war es herauszufinden, welche Pads am meisten Flüssigkeit aufnehmen und dabei ihre Stabilität weitestgehend beibehalten. Hierfür wurden die Schäume gewogen und für insgesamt 60 Minuten in ein Wasserbad mit einer Temperatur von etwa 22 °C gelegt. In einem Zeitabstand von fünf Minuten erfolgte die Überprüfung der Wasseraufnahme durch Bestimmung des Gewichtes.

Für die Anwendung der Schaumpads in der betrieblichen Praxis ist von Bedeutung, welche Menge an Flüssigkeit in einer kurzen Zeit aufgenommen wird. Als Zeitraum haben die Projektpartner 30 Sekunden festgelegt. Für diese Versuche wurden Schaumpads mit einer Dichte von 150 g/l verwendet. 2 ml Wasser wurden in eine große Petrischale pipettiert und die Pads in die Schale gelegt. Die Versuche wurden in drei Teile untergliedert: Im ersten Teil wurde die Wasseraufnahme ohne Einflüsse bzw. im Stillstand bestimmt. Beim zweiten Versuch wurden die Schaumpads durch manuelle Kreisbewegungen rotiert und als dritte Variante mit einem 42 g schweren Metallplättchen belastet (s. Abbildung 27). Die Messung der Flüssigkeitsaufnahme erfolgte in 10-Sekunden-Taktung. Die absolute Wasseraufnahme entspricht der Differenz aus dem Endgewicht und dem Ausgangsgewicht.

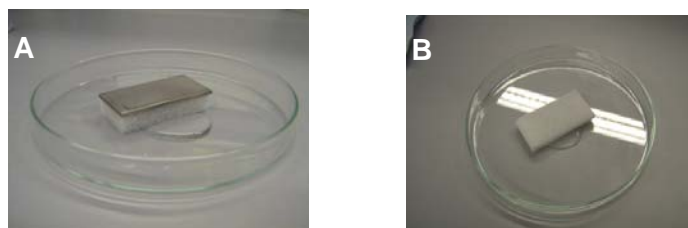


Abbildung 27: Ermittlung der Wasseraufnahme A) ohne Umgebungseinflüsse und B) durch Belastung mit einem Metallplättchen

8.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Wasseraufnahme

In Abbildung 28 bis Abbildung 33 werden die Ergebnisse zur Wasseraufnahme im Langzeitversuch aufgeführt. Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, wie viel Flüssigkeit die Gelatineschaumpads in einem fest definierten Zeitraum aufnehmen. Ein weiterer zu beobachtender Parameter war die Veränderung der Schaumstruktur. Bei den aufgeführten Werten handelt es sich um die Mittelwerte aus drei Testreihen. Die verwendeten Schaumpads entstammen aus einer 6 Mesh und 20 Mesh Gelatinelösung in unterschiedlichen Konzentrationen und Schaumdichten. Die Wasseraufnahme der Schaumpads wurde in einem Zeitraum von 60 Minuten überprüft. Die Auswertung der Tests fand unter Berücksichtigung der gemessenen Parameter Länge, Breite, Höhe, sowie der Dichte und dem Volumen der einzelnen Gelatineschaumpads statt (siehe Tabelle 6 bis Tabelle 11). Die Wasseraufnahme der Schaumpads wird im Zeitverlauf in Gramm angezeigt.

In Abbildung 28 wird die Wasseraufnahme von drei Schaumpads, die aus einer 15-prozentigen (20 Mesh) Gelatinelösung aufgeschäumt wurden, dargestellt. Die geometrischen Daten der Gelatineschaumpads sind Tabelle 6 zu entnehmen. Bei den Gelatineschaumpads mit den Schaumdichten 150- und 100 g/l lässt sich ein äquivalentes Aufnahmeverhalten beobachten. Das Schaupad mit einer Dichte von 50 g/l weist eine weitaus geringere Wasseraufnahme auf.

Abbildung 29 zeigt die Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads aus einer 10-prozentigen (20 Mesh) Lösung. Die geometrischen Daten der Schaumpads sind in Tabelle 7 dargestellt. Das Schaupad mit einer Dichte von 150 g/l bindet mehr Wasser als die anderen Gelatineschaumpads, wobei die maximale Wasseraufnahmekapazität der Schaumpads mit zunehmender Konzentration geringer wird (Abbildungen 29 bis 31).

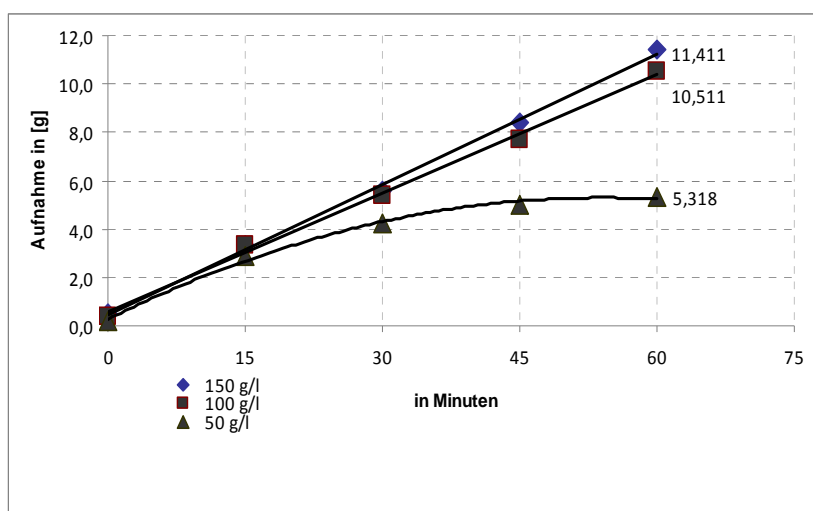


Abbildung 28: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (15 %, 20 Mesh)

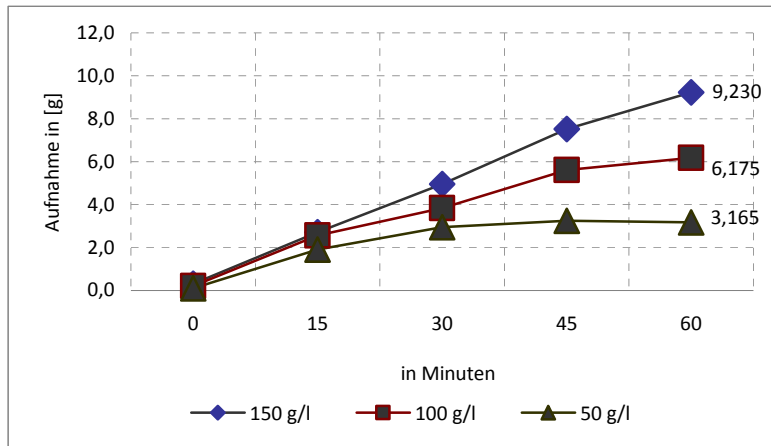


Abbildung 29: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (10 %, 20 Mesh)

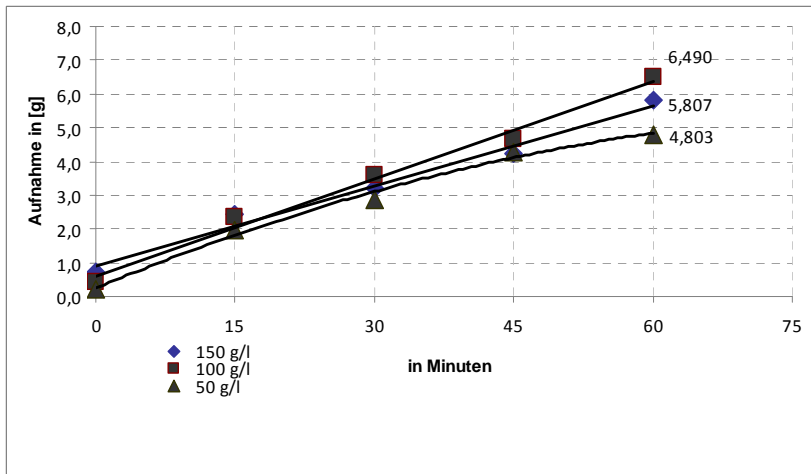


Abbildung 30: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (20 %, 20 Mesh)

Tabelle 6: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (15 %, 20 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm ³]	[g/cm ³]
Schaumpad aus 150 g/l	59,91	29,67	10,34	0,490	18,38	0,0266
Schaumpad aus 100 g/l	58,09	29,70	10,13	0,390	17,49	0,0223
Schaumpad aus 50 g/l	57,22	29,80	9,98	0,179	17,03	0,0105

Tabelle 7: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (10 %, 20 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm ³]	[g/cm ³]
Schaumpad aus 150 g/l	59,41	30,37	10,10	0,317	18,22	0,0174
Schaumpad aus 100 g/l	58,23	30,70	9,67	0,211	17,27	0,0122
Schaumpad aus 50 g/l	57,60	28,58	9,52	0,106	15,68	0,0067

Tabelle 8: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (20 %, 20 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm ³]	[g/cm ³]
Schaumpad aus 150 g/l	58,48	30,92	10,64	0,723	19,24	0,0376
Schaumpad aus 100 g/l	57,45	29,39	9,79	0,418	16,52	0,0253
Schaumpad aus 50 g/l	59,34	29,59	9,81	0,228	17,22	0,0132

Abbildung 30 zeigt, dass das Gelatineschaumpad mit einer Schaumdichte von 100 g/l mehr Wasser bindet als das mit einer Dichte von 150 g/l. Wie zuvor schon in Abbildung 28 und Abbildung 29 dargestellt ist, bindet das Gelatineschaumpad mit einer Dichte von 50 g/l die geringste Wassermenge. Das Aufnahmeverhalten des 150 g/l-Pads weist im Vergleich zu den zuvor dargestellten eine geringere Wasseraufnahme auf. Die geometrischen Daten der Gelatineschaumpads sind Tabelle 8 zu entnehmen.

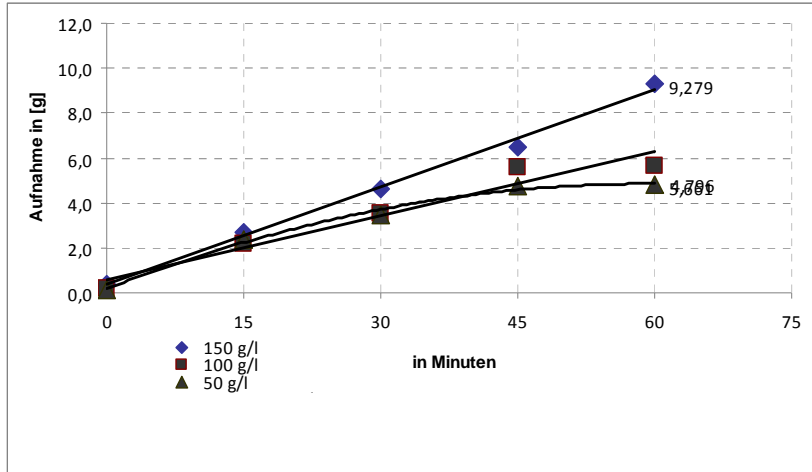


Abbildung 31: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (10 %, 6 Mesh)

Tabelle 9: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (10 %, 6 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm³]	[g/cm³]
Schaumpad aus 150 g/l	58,85	30,92	10,56	0,354	19,22	0,0184
Schaumpad aus 100 g/l	58,03	29,83	9,86	0,206	17,06	0,0121
Schaumpad aus 50 g/l	57,30	29,18	9,74	0,148	16,29	0,0091

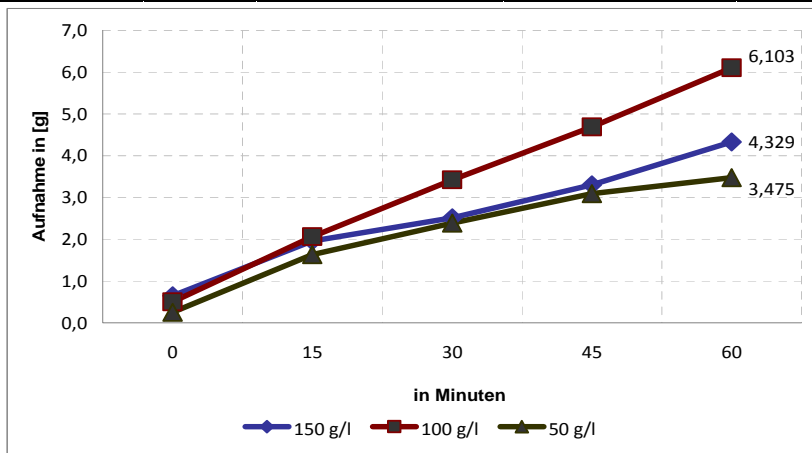


Abbildung 32: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (20 %, 6 Mesh)

Tabelle 10: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (20 %, 6 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm³]	[g/cm³]
Schaumpad aus 150 g/l	59,55	30,26	10,24	0,645	18,46	0,0350
Schaumpad aus 100 g/l	59,40	30,39	9,90	0,503	17,88	0,0281
Schaumpad aus 50 g/l	59,02	29,89	9,85	0,252	17,39	0,0145

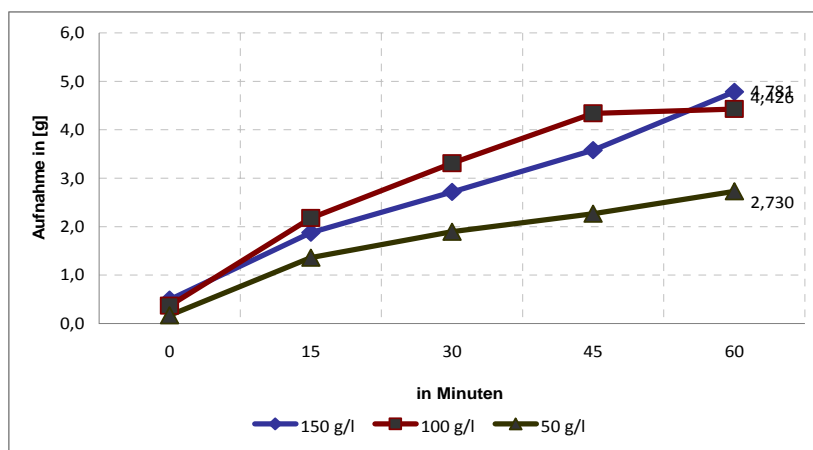


Abbildung 33: Wasseraufnahme von Gelatineschaumpads (15 %, 6 Mesh)

Tabelle 11: Geometrische Daten der Gelatineschaumpads (15 %, 6 Mesh)

Parameter	Länge	Breite	Höhe	Ausgangsmasse	Volumen	Dichte
[Einheit]	[mm]	[mm]	[mm]	[g]	[cm ³]	[g/cm ³]
Schaumpad aus 150 g/l	59,33	29,55	10,01	0,495	17,56	0,0282
Schaumpad aus 100 g/l	59,24	29,23	9,91	0,368	17,18	0,0215
Schaumpad aus 50 g/l	59,92	29,58	10,01	0,171	17,75	0,0096

Die Abbildung 31 bis Abbildung 33 zeigen die Messergebnisse zur Wasseraufnahme der Schaumpads, die aus einer 6 Mesh Gelatinelösung hergestellt wurden. Wie bei den 20 Mesh auch, wurden hier die geometrischen Daten der Gelatineschaumpads berücksichtigt (Tabelle 9 bis Tabelle 11). Die getesteten Pads weisen im Vergleich zur 20 Mesh Gelatinelösung nach 60 Minuten ein ähnliches Verhaltensmuster auf. Das mit einer Dichte von 150 g/l hergestellte Schwämmchen zeigt die höchste Wasseraufnahme (Abbildung 31 und Abbildung 33). Die Gelatineschaumpads mit einer Dichte von 50 g/l binden weniger Wasser, als die mit anderen Dichten hergestellten Schäume und wiegen nach 60 Minuten durchschnittlich 3,7 g. Wie zuvor bei den Pads aus 20 Mesh Gelatine, nimmt das Gelatineschaumpad mit einer Schaumdichte von 100 g/l mehr Wasser auf, als die mit einer Dichte von 150 g/l.

Neben den Langzeitversuchen wurden zusätzlich Versuche zur Wasseraufnahme in Kurzzeit durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war herausfinden, wie viel Wasser die Gelatineschaumpads (150 g/l) in 30 Sekunden bei unterschiedlichen Messmethoden aufnehmen. Gemessen wurde die Aufnahme im 10-Sekunden-Takt. Vor Versuchsbeginn wurde die Ausgangsmasse der zu untersuchenden Pads bestimmt. In zwei Versuchsabläufen wurden die Ergebnisse aus dem arithmetischen Mittel ermittelt.

In Abbildung 34 wird die Wasseraufnahme bei Belastung mit einem 42 g schweren Metallplättchen dargestellt. Die Schaumpads nehmen innerhalb 30 Sekunden mehr als 1 g Wasser auf. Die aus einer 20-prozentigen Gelatinelösung hergestellten Pads nehmen im Vergleich mehr Wasser auf als die aus einer 10- und 15-prozentigen Lösung hergestellten. Bei den aus der 15-prozentigen Lösung hergestellten Schaumpads ist ein äquivalentes Verhalten der Wasseraufnahme zu beobachten.

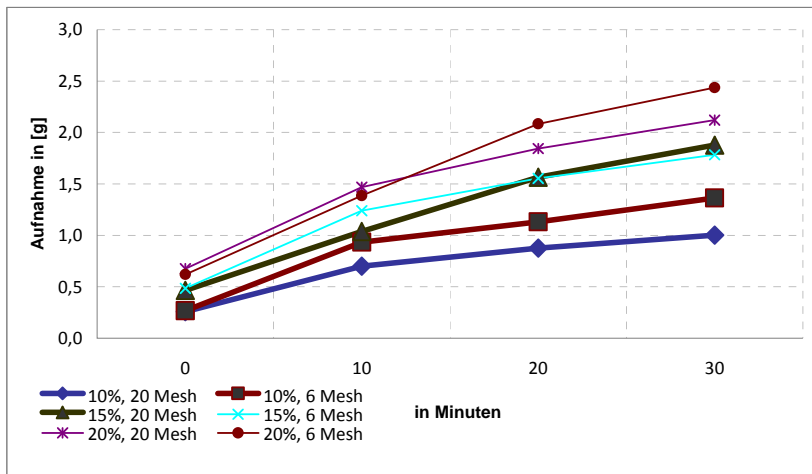


Abbildung 34: Wasseraufnahme bei mechanischer Belastung

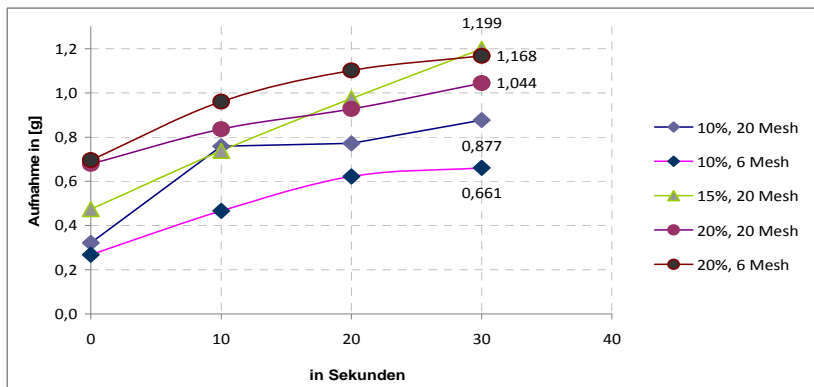


Abbildung 35: Wasseraufnahme ohne Umgebungseinflüsse bzw. im Stillstand

Abbildung 35 gibt die Untersuchungsergebnisse zur Wasseraufnahme der Schaumpads ohne Gewichts- und Bewegungseinflüsse wieder. Im Vergleich zu Abbildung 34 zeigt sich ein z. T. abweichendes Wasseraufnahmeverhalten. Das Gelatineschaumpad einer 15-prozentigen (20 Mesh) Lösung bindet in 30 Sekunden mehr Wasser, als die beiden Pads einer 20-prozentigen Lösung. Es ist ein anderes Aufnahmeverhalten im Vergleich zu Abbildung 34 zu beobachten. Die Schaumpads nehmen demnach ohne Druck- und Bewegungseinfluss weniger Wasser auf.

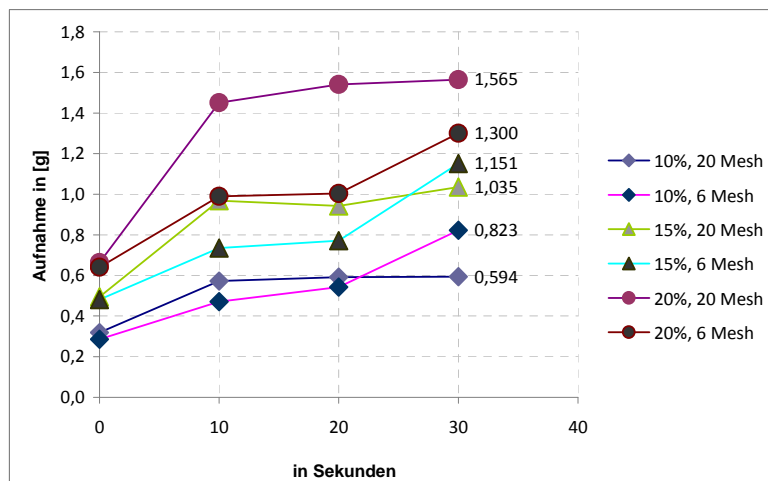


Abbildung 36: Wasseraufnahme bei manuellen Kreisbewegungen

In Abbildung 36 wird die Wasseraufnahme in Kurzzeit bei manueller Kreisbewegung dargestellt. Die Schwämmchen, die aus einer 20-prozentigen (20 Mesh) Gelatinelösung hergestellt wurden, binden mehr Wasser als die aus den anderen Konzentrationen. Gemäß der Darstellung in Abbildung 35 nehmen die Schaumpads, mit Ausnahme des Pads einer 10-prozentigen Lösung (20 Mesh), mehr Wasser auf.

Anhand der ermittelten Ergebnisse ist festzustellen, dass die Pads mit einer Schaumdichte von 150 g/l den größten Anteil an Wasser binden und ihre Struktur weitgehend erhalten bleibt.

Die Wasseraufnahme der Schaumpads lässt sich durch eintretende Protein-Wasser-Wechselwirkungen bzw. die Löslichkeit im Wasser erklären. Es existieren zwischen den Proteinketten der Gelatine unterschiedliche Wechselwirkungen. Diese nehmen nach Wasserkontakt Einfluss auf die Peptidbindungen (Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol) der Seitenketten der Aminosäuren. Ein anderer Grund ist die auftretende Löslichkeit im Wasser. Während der Wasseraufnahme kommt es zu einer Dissoziation der Protein- und Wassermoleküle. Zudem wird die Löslichkeit durch Temperatur und Ionenkonzentration beeinflusst (Cheftel et al. (1992), S. 52).

Ein weiterer Faktor für das Verhalten der Schaumpads bei der Wasseraufnahme ist die irreversible Denaturierung der Schäume. Bei Wasserkontakt findet an der Grenzfläche Wasser/Luft Adsorptionsprozesse statt. Durch die Protein-Wasser-Wechselwirkungen an der Grenzfläche werden die intramolekularen Wasserstoffbrückenverbindungen gelöst. Zudem kommt es zu einer strukturellen Auffaltung, welche zu einer Instabilität der Schaumpads führt (Cheftel 1992, S. 63). Während der 60-minütigen Langzeitmessung war zu beobachten, dass die Schaumpads im Verlauf der Zeit instabil werden. Dieses Verhalten war vor allem bei den aus 50 g/l hergestellten Schwämmchen (Abbildung 28 bis Abbildung 33) zu beobachten. Im Zeitraum der Messung konnte die Instabilität durch ein Zusammenschrumpfen der Schaumstruktur registriert werden.

In den durchgeführten Langzeitversuchen weisen die Schaumpads mit einer Schaumdichte von 150 g/l (Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 31 und Abbildung 33) die höchste Wasseraufnahme auf. Die aus einer 15-prozentigen Konzentration erstellten Schaumpads binden dabei das meiste Wasser. Die hohe Wasseraufnahme lässt sich durch die Schaumdichte von 150 g/l und durch deren Ausgangskonzentration begründen. Bei erhöhtem Gelatineanteil steigt gemäß Literaturangaben die Wasseraufnahme (Cheftel et al. (1992), S. 77).

Wasseraufnahme unter der Einwirkung von Salzen

Ein weiterer untersuchter Parameter ist die Einwirkung von Salzen auf die Wasseraufnahmefähigkeit. Das für die Gelatineschaumpads verwendete Natriumazid lag in einer niedrigen Konzentration (0,05 %) vor. Nach Literaturangaben erhöht die Zugabe von Salz in niedriger Konzentration die Hydratation des Proteins (Cheftel et al. (1992), S. 79). Die Ionen des Salzes wechselwirken mit der Ladung der Proteine und reduzieren die elektrostatische Anziehung. Ein weiterer Effekt ist die vermehrte Anlagerung von Wassermolekülen, welche die Löslichkeit erhöhen (Cheftel et al. (1992), S. 53). Die allgemein geringer ausfallende Wasseraufnahme der Schwämmchen aus 6 Mesh Gelatine (Abbildung 26 und 27) lassen sich durch den Verzicht des Salzes Natriumazid erklären. Bei Betrachtung der Abbildung 30 und Abbildung 32 ist erkennbar, dass die Schaumpads mit einer Schaumdichte von 100 g/l mehr Wasser aufnehmen als die mit 150 g/l, wobei die Pads aus jeweils einer 20-prozentigen Gelatinelösung hergestellt wurden. In

diesem Fall bestätigt sich nicht die Aussage aus der zitierten Literatur, dass bei steigender Proteinkonzentration die Wasseraufnahme steigt. Da für die Schwämmchen aus feinkörniger Gelatine zusätzlich Natriumazid verwendet wurde, könnte hier die Begründung für die höhere Wasseraufnahme liegen. Auf diese Weise lässt sich zudem das Aufnahmeverhalten, das in Abbildung 31 dargestellt ist, erklären. Im Vergleich zu der 15- und 20-prozentigen Lösung aus 6 Mesh Gelatine, weist die 10-prozentige Gelatinelösung eine höhere Wasseraufnahme auf. Dies kann wiederum durch das Wirken des Salzes Natriumazid begründet werden.

Zusammenfassung, Wasseraufnahmevermögen

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Gelatineschaumpads aus einer 20 Mesh Lösung allgemein eine höhere Wasseraufnahme aufweisen als die aus 6 Mesh hergestellten Produkte. Die poröse Mikrostruktur und spezielle Oberflächenkörnung der Schaumpads stellen bezüglich der Wasseraufnahme begünstigende Faktoren dar (vgl. Figura (2004), S. 5). Die Geschwindigkeit der Aufnahme lässt sich durch Parameter, wie die Partikelgröße, die Porösität, der Partikeloberfläche und der Hohlraum im inneren der Partikel erklären (vgl. Cheftel et al. (1992), S. 78).

Durch die durchgeführten Kurzzeittests ist festzustellen, dass die Gelatineschaumpads bereits nach 10 Sekunden Flüssigkeit absorbieren. Da auch hier die Pads mit einer erhöhten Gelatinekonzentration in kurzer Zeit viel Wasser binden, eignen sich diese für Reinigungskontrollen auf feuchten Oberflächen. Die Belastung der Schaumpads mit ca. 42 g schweren Metallplättchen (Abbildung 34) begünstigt die Wasseraufnahme. Der erzeugte Druck führte zu einer nicht sichtbaren Veränderung der Oberfläche. Es folgt eine Veränderung der Porenstruktur, sodass mehr Wasser aufgenommen werden kann. Die Schaumpads nehmen durch ihre Absorptionseigenschaften zwar Flüssigkeit auf, jedoch weniger als wenn Druck auf die Pads ausgeübt wird. Ohne mechanischen Einfluss wird entsprechend eine geringere Menge an Wasser aufgenommen (siehe Abbildung 35). Durch die Kreisbewegung nehmen die Gelatineschaumpads mehr Flüssigkeit als im Stillstand auf (siehe Abbildung 36). Da die Kreisbewegung manuell und nicht unter standardisierten Bedingungen stattfand, ist es schwierig zu mutmaßen, worauf die Wasseraufnahme beruht.

8.4.3 Statische und dynamische Schaumpad-Methode

Um eine optimale Quellfähigkeit und Kapillarwirkungen zu ermöglichen, ist eine möglichst große Kontaktfläche zwischen der zu beprobenden Oberfläche und dem Schaumpad von Vorteil. Eine Vergrößerung dieser Kontaktfläche kann durch flächiges Aufsetzen von Gewichten ermöglicht werden.

Da die hier auftretenden Kräfte größer sind als bei der statischen Schaumpad-Methode, können diese Kräfte je nach Schaumpadzusammensetzung zu einer starken Destabilisierung der Schaumpadstruktur führen. Nachfolgend sind die diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen beschrieben.

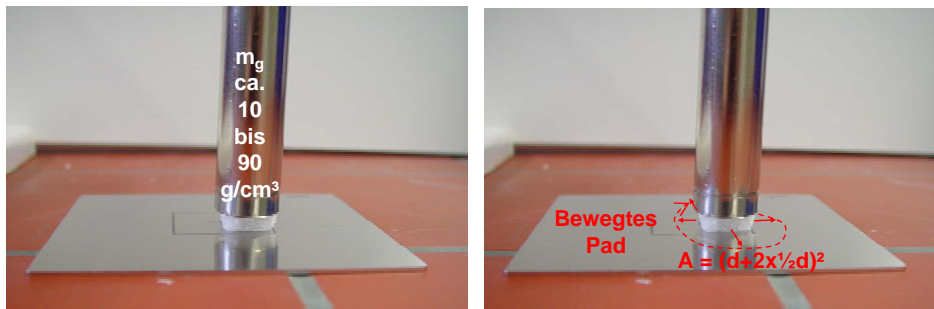


Abbildung 37: Statische und bewegte Schaumpad-Methode

8.4.3.1 Material und Methoden der Schaumapplikation

Material

- Polierte Edelstahlplatten (Testmonitor)
- Gebürstete Edelstahlplatten (Testmonitor)
- Schaumpads:
 - DIL (Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V. ; F&E)
 - Kommerzielles Produkt (Gelita Spon; Gelita Medical GmbH, (Gelita 2010)), Material unsteril sowie steril verpackt)
- Eppendorf Pipetten 100-1000 µl, 20-200 µl, 5-50 µl (ROTH)
- Eppendorf Pipettenspitzen gelb, blau (ROTH)
- Olympus BX41 Systemmikroskop
- Permanentmarker
- Geodreieck
- Skalpell
- Beschwerungsgewichte
- Gewichte, 26 g, 51,62 g, 205 g
- Muffe, Stativklemme, Stativständer
- Stoppuhr, Oregon-scientific-timer
- Abdeckung aus Karton
- Metallobjektträger

Reagenzien

- Partikel-Tensid-Dispersion (vgl. Abs. 8.3)
- VE-Wasser
- Detergenz Triton X-100

Durchführung, statische Methode

Das VE-Waschwasser wird auf angeschnitzte Quadraten (1,5 cm x 1,5 cm) der zu beprobenden Fläche randübergreifend ausgestrichen. Nach 5 Minuten Einwirkungszeit erfolgt das Aufsetzen der zugeschnittenen Schaumpads mitsamt deren Beschwerungsgewichten. Es ergeben sich folgende Flächenpressungen:

Quadrant 1: Ohne Gewicht

Quadrant 2: 12 g/cm²

Quadrant 3: 22 g/cm²

Quadrant 4: 89 g/cm²

Wegen des großen Verhältnisses von Länge zu Grundfläche werden die im Quadranten 4 verwendeten 205 g-Normgewichte mittels Stativklemme locker gesichert. Dabei wird darauf geachtet, dass sich das Gewicht weitgehend reibungsfrei auf das Schaumpad absenken kann. Die Entfernung der Schaumpads erfolgt nach 5 Minuten. Abbildung 38 zeigt die entsprechend zusammengepressten Probenahmekörper. Die Auswertung erfolgt gemäß der im Abschnitt 3.2 dargestellten Vorgehensweise vor und nach Probenahme.



Abbildung 38: Statische Schaumpad-Methode

Durchführung, dynamische Schaumpad-Methode

Das Befeuchtungswasser wird auf den angeschmutzten Quadraten (3 cm x 3 cm) innerhalb des angezeichneten Randes ausgestrichen. Nach 5 Minuten Einwirkungszeit erfolgt das Aufsetzen des Schaumpads. Anschließend wird dieses für 2 Minuten in Kreisbahnen bewegt und anschließend von der Oberfläche entfernt. Dabei wird ein größerer Bereich überstrichen als die Grundfläche des Probenahmekörpers.

8.4.3.2 Ergebnisse und Diskussion – Statische Methode

Statische Methode - Einfluss von Schaumpaddichte und -konzentration auf den Reinigungserfolg

Um den Einfluss von Schaumpad-Zusammensetzung und –dichte auf den Reinigungserfolg zu untersuchen, kamen folgende Probenahmekörper auf polierten/gebürsteten Oberflächen zum Einsatz:

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1. Konzentration: 10 % | Dichte: 100 g/l |
| 2. Konzentration: 10 % | Dichte: 150 g/l |
| 3. Konzentration: 15 % | Dichte: 75 g/l |
| 4. Konzentration: 20 % | Dichte: 100 g/l |

Die Probenahmeflächen umfassen jeweils 1,5 cm x 1,5 cm, die Anschmutzung erfolgt jeweils mit 75 µl der Partikel-Dispersion (vgl. Abschnitt 8.2.2.2). Zur Anfeuchtung werden 40 µl VE-Wasser zugegeben.

Die nachfolgenden Abbildungen geben den prozentualen Reinigungseffekt der folgenden Probenahmeorte an, jeweils mit Angabe des aufgelegten Gewichts:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| Eckpunkte ohne Ausreißer | \bar{x} drei Eckpunkte |
| Eckpunkte mit Ausreißer | \bar{x} vier Eckpunkte |

Mittelpunkte

Mittelpunkt und Eckpunkten ohne A.

Mittelpunkt und Eckpunkten mit A.

Geb. = gebürstet; Pol.= poliert

Mittelpunkt des Quadranten

\bar{x} drei Eckpunkte mit Mittelpunkt

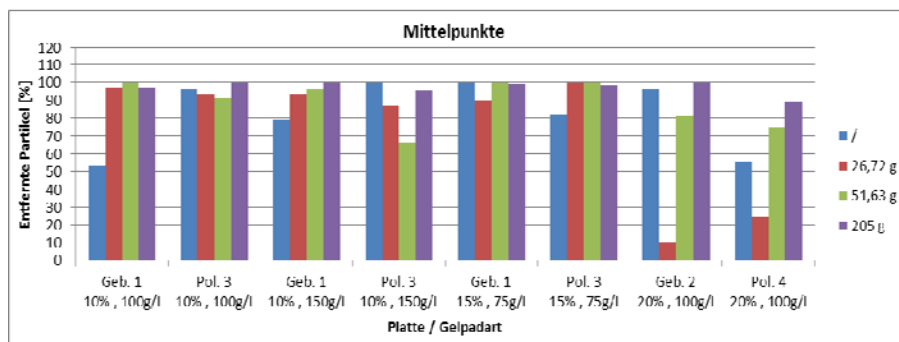
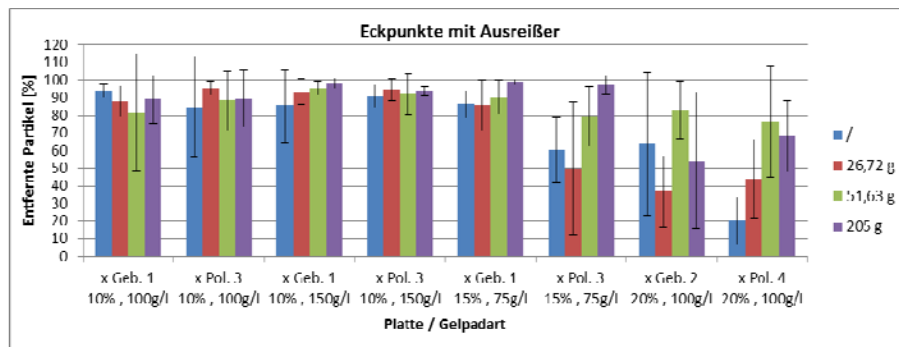
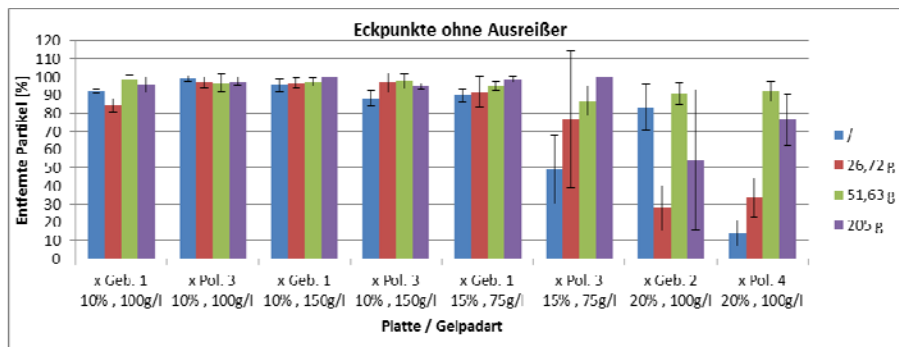
\bar{x} vier Eckpunkte mit Mittelpunkt

x in der x-Diagramm achse = \bar{x}

Wie die Darstellungen zeigen, ergeben sich die höchsten prozentualen Reinigungserfolge bei den niedrig konzentrierten Schaumpad. Sie sind weitgehend von der Dichte wie auch der beprobten Materialoberfläche unabhängig.

Eine Steigerung des prozentualen Reinigungserfolges konnte für die hoch konzentrierten Schaumpads besonders durch Einsatz hoher Beschwerungsgewichte erreicht werden, die eine Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen aufgesetztem Schaumpad und der feuchten Oberfläche hervorrufen, wodurch Kapillar- und Quelleffekte gefördert werden.

Die aufgrund des höheren Feststoffanteils höhere Stabilität der 20 %igen Schaumpads im Vergleich zu einem 10 % Schaumpad führt zu einer entsprechend geringeren Kompressionsrate gegenüber dem ausgeübten Druck der aufgelegten Gewichte.



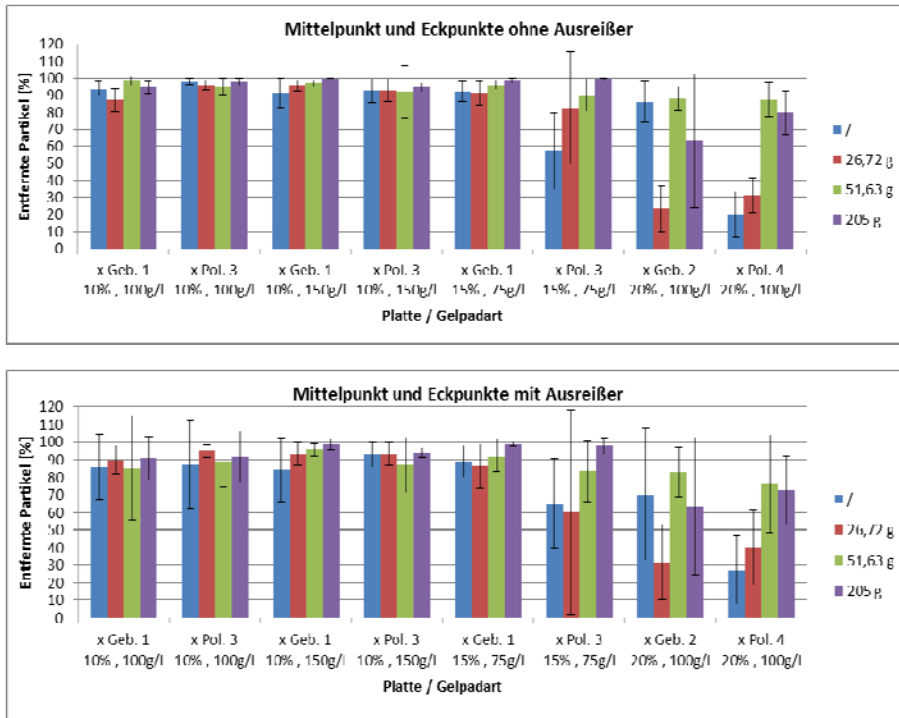


Abbildung 39: Einfluss von Schaumpaddichte und -konzentration auf den prozentualen Reinigungserfolg

Lagerungsstabilität und Alterungseffekte

Um den Einfluss der Luftfeuchtigkeit bzw. Lagerungsdauer von Schaumpads an der Atmosphäre zu untersuchen, wurden Reinigungsergebnisse von über 12 Monate unter Luftereinfluss in verschlossenen Kunststoff-Dosen gelagerten mit steril verpackten kommerziellen Schaumpads auf polierten/gebürsteten Edelstahloberflächen verglichen. Die Untersuchungen wurden gemäß vorangehend dargestellter Vorgehensweise durchgeführt.

Nachfolgende Abbildung 40 gibt die Auswertungsergebnisse der Untersuchungen wieder. Demnach nimmt die Schwankungsbreite der Ergebnisse bei längerer Lagerung an der Atmosphäre zu. Eine Probenahme mit sterilen Schaumpad besaß auch unter Betrachtung der Standardabweichungen eine höhere Reproduzierbarkeit. Als mögliche Ursache wird eine Anlagerung von Wassermolekülen aus der Umgebungsluft an den ionischen Verbindungsstellen der Polymerstruktur diskutiert, welche somit als Vorsättigung fungiert und eine Flüssigkeitsaufnahme während der Beprobung möglicherweise reduziert.

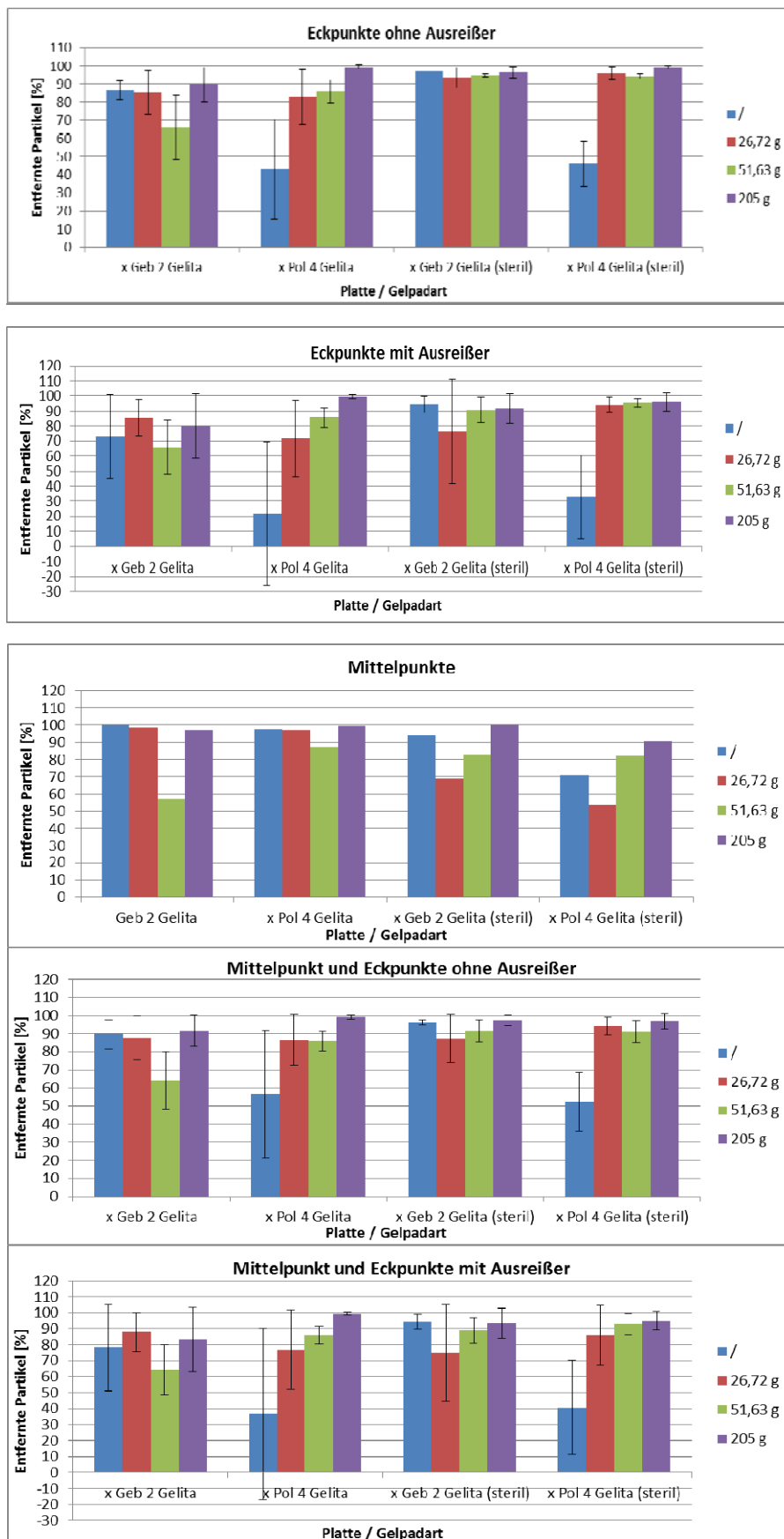


Abbildung 40: Untersuchungsergebnisse zur Schaumpad-Lagerungsstabilität

Entfernung von fluoreszierenden Partikeln von Teflon- und Glasoberflächen

Um den Einfluss des Oberflächenmaterials bzw. unterschiedlicher Oberflächenenergien auf den Reinigungserfolg zu untersuchen, wurde neben den Untersuchungen an Metalloberflächen Glas- und Teflon-Oberflächen beprobt. Die Vorgehensweise zur Beprobung bzw. Auswertung entspricht ebenfalls der vorangehend dargestellten Arbeitsweise.

Zur Beprobung von 1,5 cm x 1,5 cm abmessenden Testflächen wurden Schaumpads der Ausgangskonzentration 15 % und Schaumdichte 75 g/l verwendet. Alternativ kamen kommerzielle Produkte zum Einsatz. Die Anschmutzung erfolgt je Testfläche mit 75 µl, die Anfeuchtung mit 40 µl VE-Waschwasser. Aufgrund der Oberflächeneigenschaften und erschwerten Identifikationsmöglichkeiten war eine mikroskopische Auswertung identischer Stellen nur an den Mittelpunkten möglich.

Nachfolgende Abbildung 41 gibt die Ergebnisse der Auswertungen wieder. Demnach korreliert der Reinigungserfolg mit zunehmendem Anpressdruck der Schaumpads für beide Materialien. Die Abnahmeraten sind demnach mit denjenigen für Edelstahloberflächen vergleichbar.

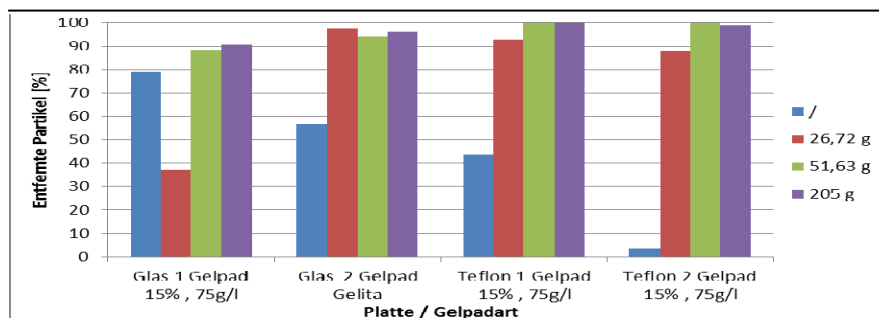


Abbildung 41: Reinigungserfolg für Teflon- und Glasoberflächen

Reinigungserfolg beim Scale up der Testfläche

Zur Erzielung einer ausreichenden Repräsentativität des Probenahmeverfahrens erfolgt eine Verfahrensanwendung auf einem gegenüber den vorangehenden Untersuchungen 4-fach großem Flächenareal. Die Beaufschlagung erfolgte mit dem höchsten der verwendeten spezifischen Flächengewichte (89 g/cm²).

Zur Beprobung von 3 cm x 3 cm abmessenden Testflächen wurden Schaumpads der Ausgangskonzentration 10 % und Schaumdichte 150 g/l verwendet. Alternativ kamen Schaumpads der Ausgangskonzentration 15 % und Schaumdichte 75 g/l zum Einsatz. Die Anschmutzung erfolgt je Testfläche mit 300 µl, die Anfeuchtung mit 160 µl VE-Waschwasser.

Bis auf ein untersuchtes Material wurde Abnahmeraten von über 90 % erzielt (vgl. Abbildung 42). Dies entspricht in etwa den vorliegenden Ergebnissen für die kleinere Fläche. Daher scheint ein Scale up der Probenahmemethode möglich.

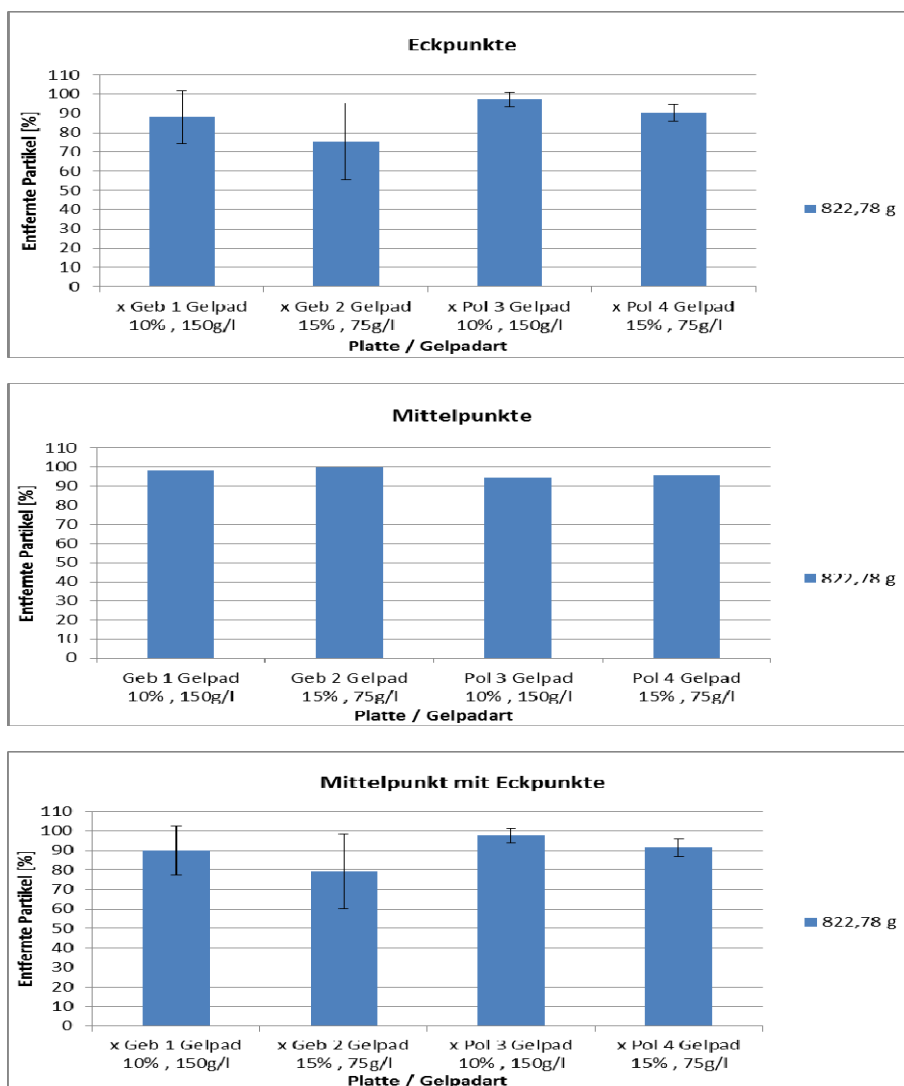


Abbildung 42: Prozentualer Reinigungserfolg beim Scale-Up der Untersuchungsfläche

Verteilung inhomogener Feuchtigkeit an der Oberfläche

Um zu überprüfen, ob es beim Aufsetzen eines Schaumpads zu einer Verteilung der auf der Oberfläche befindlichen Partikel kommt, wurde wie in Abbildung 43 dargestellt eine Anschmutzung durch eine Partikel-Dispersion ausschließlich inmitten eines 3 cm x 3 cm Quadranten einer gebürsteten/polierten Oberfläche platziert. Nach Antrocknung über Nacht erfolgte eine mikroskopische Erfassung der Anschmutzung. Nach anschließender Beaufschlagung mit Waschflüssigkeit für 5 Minuten erfolgte die Abreinigung mittels Schaumpad.

Um einen Aufsetzdruck einer Hand zu simulieren, wird für fünf Minuten zusätzlich ein Anpressdruck über ein Gewicht von 108,4 g aufgebracht. Vergleichend wurden weitere Schaumpads ohne Einsatz von Gewichten untersucht. Neben der Partikelverschleppung in den Außenbereichen wird die Partikelkonzentration im Randbereich, nahe dem Rand und in der Mitte des Tropfens ebenfalls erfasst.

Zur Beprobung von 3 cm x 3 cm abmessenden Testflächen wurden sterile kommerzielle Schaumpads verwendet. Die Anschmutzung erfolgt je Testfläche mit 35 µl, die Anfeuchtung mit 160 µl VE-Waschwasser.

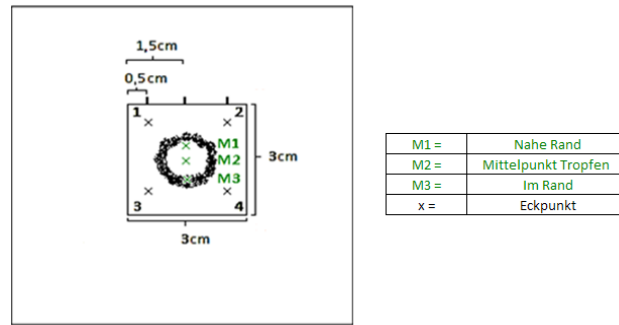


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahmeorte für eine tropfenförmige Verschmutzung

Tabelle 12: Partikelrückstände an Eckpunkten

Eckpunkte	Gelita steril	Geb 1 G	Pol 3 G	Eckpunkte	Gelita steril	Geb 2 G	Pol 4 G
Quadrant	Gewicht	Übrige Partikel	Übrige Partikel	Quadrant	Gewicht	Übrige Partikel	Übrige Partikel
1	/	1	3	1	108,4 g	0	0
2	/	0	2	2	108,4 g	1	0
3	/	0	1	3	108,4 g	0	2
4	/	0	4	4	108,4 g	1	1
Mittelwert	/	0	3	Mittelwert	108,4 g	1	1

Die Ergebnisdarstellung (Tabelle 9) zeigt, dass durchschnittlich sehr geringe Partikelkonzentrationen nach einer Beprobung auf den Oberflächen nachgewiesen werden konnten. Demnach erfolgt die Verdrängung von Partikeln in den vorherigen Versuchen nur in untergeordnetem Umfang. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass sich bei Vergleichen von deckungsgleichen Aufnahmen vor und nach einer Beprobung die zurückbleibenden Partikel noch weitgehend an den identischen Flächenbereichen befanden (Abbildung 44).

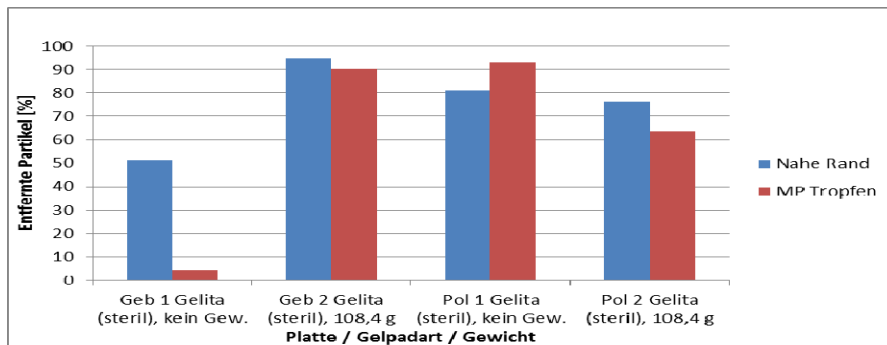


Abbildung 44: Prozentualer Reinigungserfolg einer tropfenförmigen Verschmutzung

Ausgehend von den in Abbildung 44 sichtbaren großen Schwankungen der Abreinigungsleistung lässt sich keine vergleichbare Aussage über den prozentualen Reinigungserfolg der Punkte nahe dem Rand und in der Mitte des Tropfes treffen. Weitere Messpunkte in diesen Bereichen würden sehr wahrscheinlich zu einer Anpassung des Reinigungserfolges unabhängig der Platten und Gewichtung führen. Die nachfolgende Abbildung 45 zeigt, dass eine Partikelentfernung flächig bis in den im Randbereich erfolgte; Restkontaminationen traten im Außenbereich nicht auf.

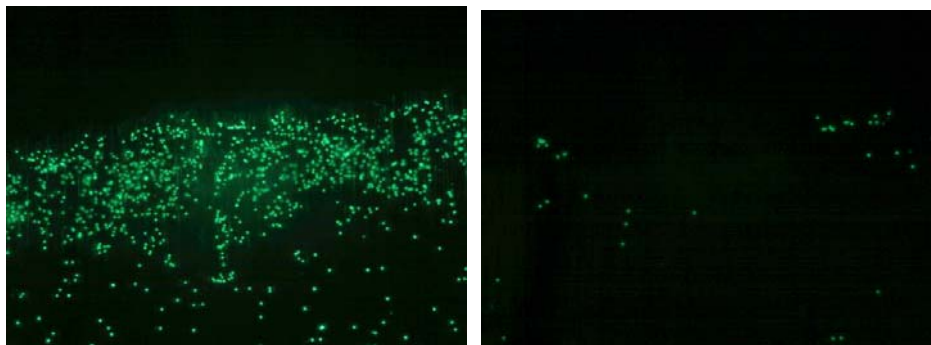


Abbildung 45: Kontaminationsverschleppung:

Links: 50x fluoreszierende Aufnahme im Randbereich, gebürstete Oberfläche vor und nach erfolgter Beprobung (deckungsgleiche Flächenbereiche)

rechts: Deckungsgleiche Stelle nach der Beprobung

8.4.3.3 Ergebnisse und Diskussion – Dynamische Methode

Stabilitätsüberprüfung unterschiedlicher Schaumpad-Materialien

Da durch Bewegen des Schaumpads über eine Oberfläche starke Kräfte auf dessen Struktur ausgeübt werden, kann es hier verstärkt zum Materialverlust kommen. Daher wurden mehrere unterschiedlich konzentrierte Schaumpads auf ihre Beständigkeit getestet. Bei nahezu allen im Rahmen des Vorhabens hergestellten, getesteten Schaumpads kam es zu einem hohen Materialverlust vergleichbar zur Darstellung in Abbildung 46. Demgegenüber waren Materialverluste und Restanhaftungen bei Anwendung der kommerziellen Gelatineschaumpads deutlich geringer bzw. nicht vorhanden.

Die in Abschnitt 8.3 diskutierten Analysen der Tetraeder-Schaumstrukturen, insbesondere die angefertigten REM-Aufnahmen, können hier ggf. Hinweise auf eine intensivere Vernetzung und damit homogenere mechanische Stabilität der kommerziellen Gelatineschaumpad-Produkte liefern. Liegen beim im Rahmen des Vorhabens hergestellten Material weniger stabilisierende Stränge innerhalb des Schaumpads pro Volumeneinheit vor, und werden diese Stränge durch die destabilisierende Wirkung der Wassermoleküle geschwächt, reicht die im Rahmen der Probenahme aufgebrachte Schubspannung wahrscheinlich aus, um Gelmaterialrückstände auf der beprobten Oberfläche zu hinterlassen. Zwischen den vernetzten Gelsträngen vorherrschende Kohäsionskräfte reichen dann zur Materialstabilisierung nicht aus. Die hohen Adhäsionskräfte zwischen Gelmaterial und Oberfläche zu überwinden.

Im Zusammenhang mit der Vernetzung des Gelatinematerials und Materialstabilität ist daher ggf. ein Einfluss der verwendeten Aufschäumtechnik, eingesetzten Luftmenge sowie Konzentration der Ausgangslösung und Schaumdichte näher zu untersuchen.

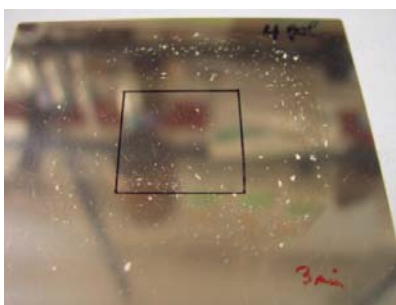


Abbildung 46: Schaumpad Rückstände auf der Fläche nach erfolgter Beprobung

Prozentualer Reinigungserfolg einer tropfenförmigen Anschmutzung

Es wurde weiter der Frage nachgegangen, ob es bei einer dynamischen Beprobung zu einer Verteilung der auf der Oberfläche befindlichen Partikel auf ursprünglich nicht kontaminierten Arealen kommen kann. Die Arbeitsweise erfolgt analog zur vorangehenden Darstellung der statischen Methode.

Zur Beprobung von 3 cm x 3 cm abmessenden Testflächen kamen sterile kommerzielle Gelatineschaumpads zum Einsatz. Die Anschmutzung erfolgt je Testfläche mit 35 µl, die Anfeuchtung mit 160 µl VE-Waschwasser.

Zusätzlich wurden noch weitere Außenpunkte, welche ursprünglich nicht angeschmutzt worden sind, photographisch ausgewertet, um die flächige Verteilung der Waschflüssigkeit durch das bewegte Schaumpad zu berücksichtigen (Punkte A1 bis A4 in Abbildung 47).

Gemäß der Ergebnisdarstellung in Abbildung 48 ist eine Abreinigung von mindestens 97 % der Partikel nahe dem Rand und in der Mitte des Tropfes für alle untersuchten Platten zu erkennen.

Die im Vergleich zu Abbildung 45 bessere Abreinigung der Abbildung 49 ist ggf. auf die in höherem Maße als bei der statischen Methode eingebrachten Bewegungs- und Reibungskräfte zurückzuführen.

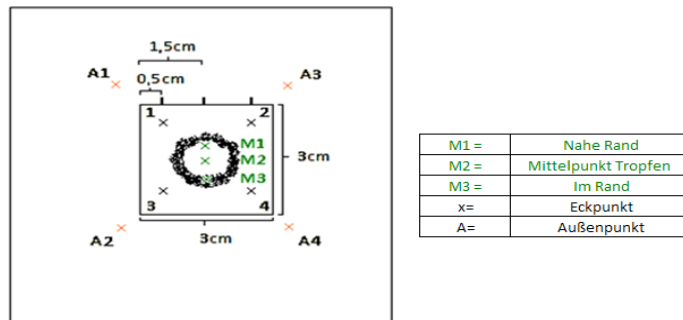


Abbildung 47: Erweiterte mikroskopische Aufnahmeorte für eine tropfenförmige Anschmutzung

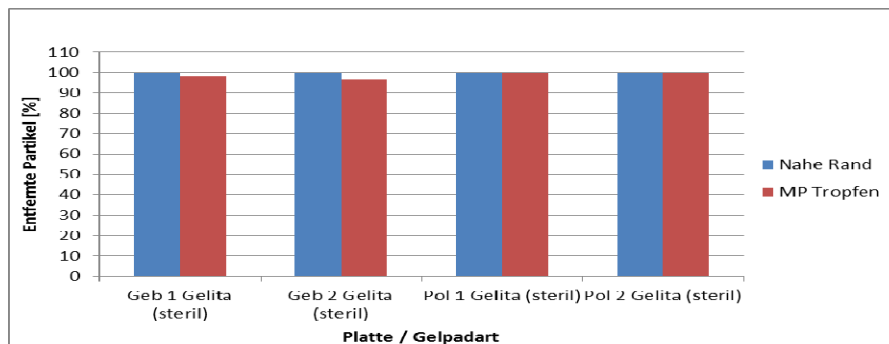


Abbildung 48: Prozentualer Reinigungserfolg einer tropfenförmigen Anschmutzung mittels der dynamischen Schaumpad-Methode

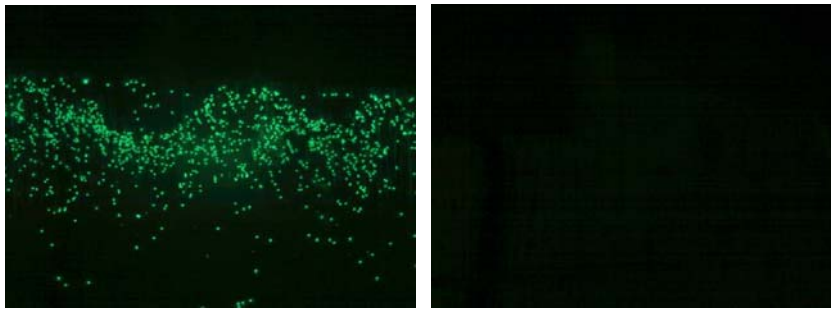


Abbildung 49: Abreinigungserfolg der dynamischen Methode – Materialverschleppung
 50 fache fluoreszierende Aufnahme im Randbereich, gebürstete Oberfläche,
 links vor, rechts nach erfolgter Beprobung (deckungsgleiche Flächenbereiche)

Prozentualer Reinigungserfolg für unterschiedliche Anschmutzungsmengen

Es sollte weiter die Effektivität der dynamischen Methode für unterschiedliche Anschmutzungsmengen überprüft werden. Die Vorgehensweise entsprach der Darstellung der vorangehenden Abschnitte.

Zur Beprobung von 3 cm x 3 cm abmessenden Testflächen wurden sterile kommerzielle Gelatineschaumpads verwendet. Die Anschmutzung erfolgt je Testfläche mit 100 µl, 200 µl und 300 µl und die Anfeuchtung mit 160 µl VE-Waschwasser.

Im Ergebnis wird mit einer Ausnahme ein Reinigungserfolg >98 % bei geringer Standardabweichung erreicht (vgl. Tabelle 7 und Abbildung 50).

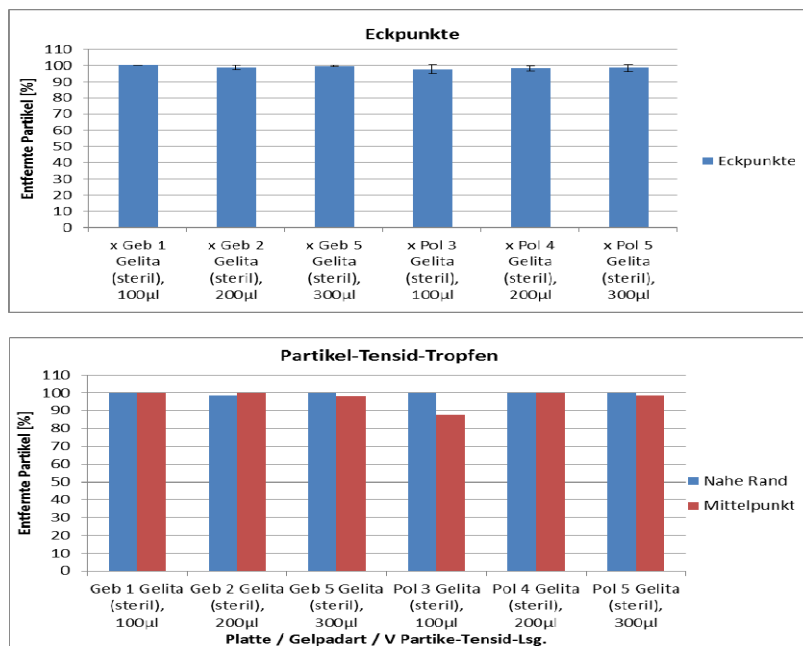


Abbildung 50: Prozentualer Reinigungserfolg für unterschiedliche Anschmutzungsvolumina

Tabelle 13: Partikelrückstände an Eckpunkten und Außenpunkten

Außen		Geb 1 G	Pol 3 G		Geb 2 G	Pol 4 G		Geb 5 G	Pol 5 G
Quadrant	V Partikel-Tensid-Lsg.	Übrige Partikel	Übrige Partikel	V Partikel-Tensid-Lsg.	Übrige Partikel	Übrige Partikel	V Partikel-Tensid-Lsg.	Übrige Partikel	Übrige Partikel
1	100 µl	1	0	200 µl	0	0	300 µl	2	0
2	100 µl	0	2	200 µl	2	0	300 µl	1	2
3	100 µl	1	0	200 µl	1	0	300 µl	1	0
4	100 µl	1	0	200 µl	3	3	300 µl	1	0
Mittelwert	100 µl	0,75	0,50	200 µl	1,50	0,75	300 µl	1,25	0,50

8.4.4 Zusammenfassende Bewertung der entwickelten Probenahmeverfahren auf Basis physikalischer Untersuchungen

Sowohl die Airbrush- als auch die dynamische Schaumpad-Methode eignen sich nach Betrachtung der erzielten prozentualen Reinigungsergebnisse unter Verwendung fluoreszierender Partikel auch für eine mikrobielle Probenahme. Die statische Schaumpadmethode weist vergleichend größere Schwankungen der Abnahmerate auf als die beiden anderen Methoden.

Mit der dynamischen Schaumpad-Methode können grundsätzlich auch komplexere Formen, beispielsweise Türgriffe, ohne großen apparativen Aufwand manuell beprobt werden. Gelmatrixreste führen trotz einer vorgeschalteten Sterilfiltration zu Interferenzen während einer durchflusszytometrischen Untersuchung, vgl. die nachfolgenden mikrobiologischen Untersuchungen.

Diesbezüglich ist die direkte Probenahmemethode von Vorteil. Bei dieser Methode entfällt eine Konzentration der Probe, falls anschließend eine durchflusszytometrische Untersuchung erfolgt. Nachteilig bei der direkten Methode ist der relativ hohe apparative Aufwand, der die Durchführung einer Probeentnahme deutlich erschwert.

Auf unebenen Oberflächen oder Kanten kann der Einsatz der Sprühmethode problematisch sein. Um diese Bereiche einer Beprobung zugänglich zu machen, sind weitere Untersuchungen auf Basis der Empfehlungen aus Abschnitt 8.2 von Vorteil.

Art der beprobten Fläche		Gelpad	Sprüh-/ Saugmethode
Ebene Oberfläche	eben	+	++
Winkel/Kante	eben	+	+
Rohrstrukturen	gekrümmt, gewölbt	+	--*
Lochbleche, Schlitze	durchbrochen	--	--*

* Beprobung praktisch nicht möglich bzw. Aufwand für Containment extrem hoch

8.5 Arbeitspaket 4: Einbindung von Mikroorganismen in die Probenahmematrix und Unterscheidung von Mikroorganismen und sonstigen Partikeln

8.5.1 Allgemeines

In diesem Arbeitspaket wird die Fähigkeit der in Arbeitspaket 2 entwickelten Schaumpads zur Einbindung von Mikroorganismen untersucht. Dazu werden Oberflächen definiert mit Tracerpartikeln sowie Mikroorganismen, die in einer wässrigen fluiden Phase dispergiert sind, kontaminiert. Es erfolgt eine Beprobung der kontaminierten Oberflächen mit den verflüssigbaren Schaumpads.

Anmerkung zur Darstellung mikrobiologischer Arbeitstechniken (Arbeitspakete 4-6): Die Arbeitspakete 4 bis 6 umfassen die mikrobiologisch ausgerichteten Arbeiten und sind fortlaufend eng miteinander verzahnt. Die angewandten mikrobiologischen Arbeitstechniken zur Probenaufbereitung und Zellzahlbestimmung kommen sowohl zur

Bestimmung der Keimzahl in den entwickelten Matrices, der Optimierung einer Kopplung von Probenahmeverfahren mit der Durchflusszytometrie als auch zur Untersuchung des Einflusses spezieller Stör- oder Begleitsubstanzen zum Einsatz. Ihre Darstellung erfolgt daher zu Beginn des jeweiligen Arbeitsabschnitts, in dem die Methoden erstmalig eingesetzt werden (AP4: Klassische Mikrobiologie; AP5: Aufbereitung zur Durchflusszytometrie).

8.5.2 Aufnahme und Wiederfindung von Mikroorganismen

8.5.2.1 Material und Methoden (FS 3)

Materialien:

- Vortex-Mixer: Fa. Bender & Hobein, Vortex Genie 2 Typ g-560 E, 220 V, 50 Hz
- Präzisionswaage: Fa. Kern, Kern EW 4200-2NM, Messbereich: Max=4200 g, Min=0,5 g, e=0,1 g, d=0,01 g
- Pipettenspitzen: Fa. Sarstedt, Biosphere FilterTips, 1250 μ l extra long
- Caso-Bouillon: Fa. Oxoid, CM 0129 Tryptone Soya Brath
- Pipette: Fa. VWR, Ergonomic High Performance Pipette
- Kurzzeitmesser: Model No. KT 188
- Stomacherbeutel: Fa. Interscience, BagLight
- Automatic Sarpette: Fa. Sarstedt
- Wasserbad: Fa. GFL, Inkubationsbad, 21 Liter Füllvolumen
- Pipette: Fa. Eppendorf, Research 100
- Petrischale, steril
- Verdünnungswasser, 9 ml Maximum Recovery
- Plastikröhrchen, steril
- Ethanol, vergällt 99,5 %
- Bunsenbrenner
- Untersuchungshandschuhe, unsteril
- Becherglas
- Halteklemme
- Pipettenspitzen, 100 μ l
- Drigalskispatel aus Glas
- Tablett
- Dreifüßiger Plattiertisch
- Baird Parker, Selektivnährboden
- Brilliance *E. coli*, Selektivnährboden
- CASO-Agar, TSA-Nährboden
- Pipette, serologisch

Methoden zur Aufnahme und Wiederfindung von Mikroorganismen

In diesem Untersuchungsabschnitt wurde überprüft, ob die aus Gelatine hergestellten Pads ausgewählte Mikroorganismen aufnehmen und diese in Nährmedien nachzuweisen sind. Für die Durchführung wurden Bakterien suspensionen mit dem gramnegativen Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 und dem grampositivem *Staphylococcus xylosus* in den Konzentrationen 10^2 , 10^4 und 10^6 Kolonie bildende Einheiten (KBE) hergestellt.

Zum Einsatz kamen Pads aus einer 10-prozentigen (6 Mesh) und einer 15-prozentigen Gelatinelösung (20 Mesh) mit einem Schaumgewicht von 150 g/l. Die Bakterienkulturen wurden jeweils in den Konzentrationen 10^2 , 10^4 und 10^6 verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte im dreifachen Ansatz.

Ein Milliliter der Suspension wurden auf eine Petrischale pipettiert, die Pads für 30 Sekunden in die Petrischale gelegt und so mit den Bakterien kontaminiert (s. Abbildung 51, links). Im Anschluss wurden die kontaminierten Schaumpads in Stomacherbeutel gelegt und diese mit Verdünnungswasser aufgefüllt (s. Abbildung 51, rechts). Zur Homogenisierung der Probe wurde der Beutelinhalt mit der Hand verteilt. Um die Schaumpads zu verflüssigen, wurden diese bei $41,5\text{ °C}$ für 5-10 Minuten ins Wasserbad gelegt. Nach vollständigem Auflösen der Gelatineschaumpads wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Zum Nachweis von *E. coli* K12- und *Staphylococcus xylosus* wurden die Selektivnährböden Brilliance *E. coli* und Baird Parker verwendet. Um die Gesamtkeimzahl der Gelatineschaumpads zu ermitteln, kam als Referenz der CASO-Agar, TSA-Nährboden zum Einsatz.

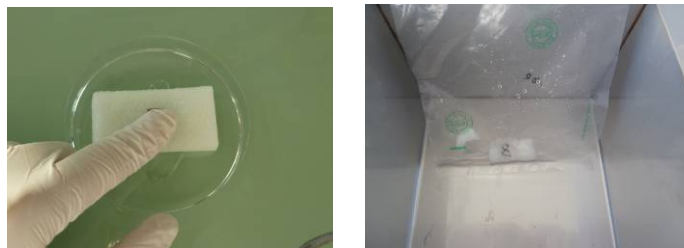


Abbildung 51: Kontamination eines Schaumpads mit einer Bakterienkultur (links) und Schaumpad zur Verflüssigung im Stomacherbeutel (rechts)

Weitere Untersuchungen zur Wiederfindung von Mikroorganismen wurden in verschiedenen Probenahme-Matrizen durchgeführt. Zum Einsatz kamen Schaumstrukturen der Unternehmen 3M sowie Gelita (Gelita Spon). Beim 3M-Produkt handelt es sich um einen handelsüblichen Polymer-Schwamm, beim Gelita-Schaumpad um ein handelsübliches Gelatine-Produkt, das in der Medizin als Hämostat zum Einsatz kommt. Die Probenaufbereitung erfolgt mit zwei verschiedenen Methoden:

- Methode 1: Homogenisieren der Probenahmematrix bei Raumtemperatur
- Methode 2: Erwärmen der Probenahmematrix in Verdünnungsflüssigkeit bis zur Schmelze bei $41,5\text{ °C}$ und nachfolgendes Homogenisieren.

Anschließend wird jeweils eine Überprüfung der Gesamtkeimzahl vorgenommen (Verfahren B00.00-2* / L06.00-18).

Sowohl für die Arbeiten der Verfahrensentwicklung als auch die spätere Methoden anwendung sind Aussagen von Bedeutung, inwieweit die Nachweisrate durch einen zeitlichen Abstand zwischen Keimaufnahme im Schaum und weiterer Probenaufbereitung

beeinflusst wird. Dazu wird Gelatineschaummaterial analog zur obigen Darstellung mit je einem Milliliter einer Verdünnungslösung *E.coli K 12* in den Konzentrationen 10^2 , 10^4 , 10^6 KBE/ml angeschmutzt. Eine Überprüfung der Keimzahl (Verfahren: L06.00-36*) erfolgt zum einen unmittelbar, zum anderen nach einer Lagerung bei 4 bis 7 °C für 24 h.

8.5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Aufnahme und Wiederfindung von Mikroorganismen

In Abbildung 52 bis Abbildung 55 ist die Anzahl der Mikroorganismen dargestellt, die nach Kontamination der Gelatineschaumpads auf diesen mittels Selektivagar nachgewiesen werden konnte. Die dargestellten Werte wurden aus dem arithmetischen Mittel der dreifachen Ansätze ermittelt. Die in blau hinterlegten Säulen zeigen die wiedergefundenen Mikroorganismen auf den Selektivnährböden Brilliance *E. coli* an. In den roten Balken werden die im Baird Parker nachgewiesenen *Staphylococcus xylosus*-Keimzahlen dargestellt. Die schwarzen Balken stellen den Gesamtkeimzahlgehalt auf dem TSA-Nährboden CASO-Agar dar. Die Ergebnisse sind in logarithmischer Skalierung dargestellt.

In Abbildung 52 wird die Wiederfindung des gram-negativen Keimes *E. coli K12* in einem Gelatineschaupad aus einer 15% Lösung (20 Mesh) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Mikroorganismen aufgenommen werden und bei der kulturellen mikrobiologischen Analyse nachweisbar sind.

Abbildung 53 zeigt die Wiederfindung des gram-positiven Keimes *Staphylococcus xylosus*. Analog zu Abbildung 52 wird auch hier die Bakterienkultur in den Schaumpads nachgewiesen.

Die in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellten Ergebnisse zeigen die nachgewiesene Anzahl an Mikroorganismen in den Schaumpads aus einer 6 Mesh Gelatinelösung (10 %). In Abbildung 54 lässt sich eine Wiederfindung bzw. Einbindung von *Staphylococcus xylosus* erkennen. In Abbildung 55 wird die Aufnahme von *E. coli K12* dargestellt. Auch hier entsprechen die Konzentrationen an Mikroorganismen, die in den Schwämmchen wiedergefunden werden (blauer Balken) dem Referenzwert von den Kontrollproben, die auf dem CASO-Agar nachweisbar waren (schwarzer Balken).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Schaumpads die ihnen gebotenen Mikroorganismen aufnehmen. Bei der anschließenden mikrobiellen Analyse der Proben konnten die Keime nahezu vollständig nachgewiesen werden.

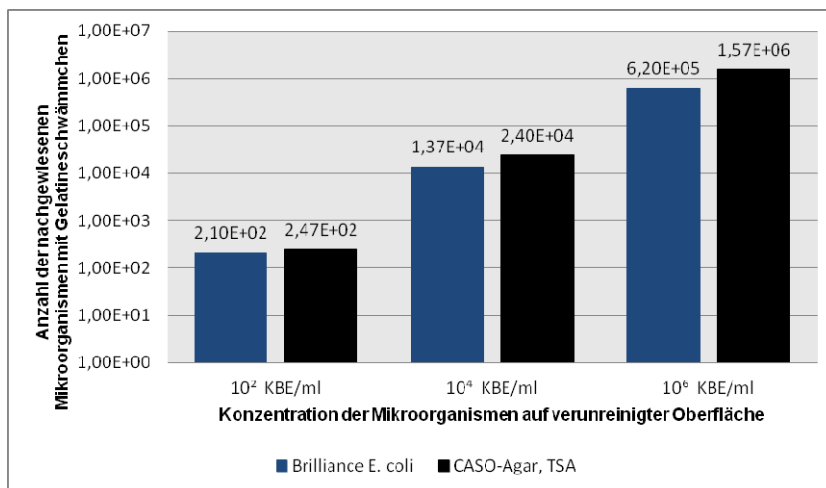


Abbildung 52: Nachweis des Keimes *E.coli K12* in einem Gelatineschaumpad (15 %, 20 Mesh)

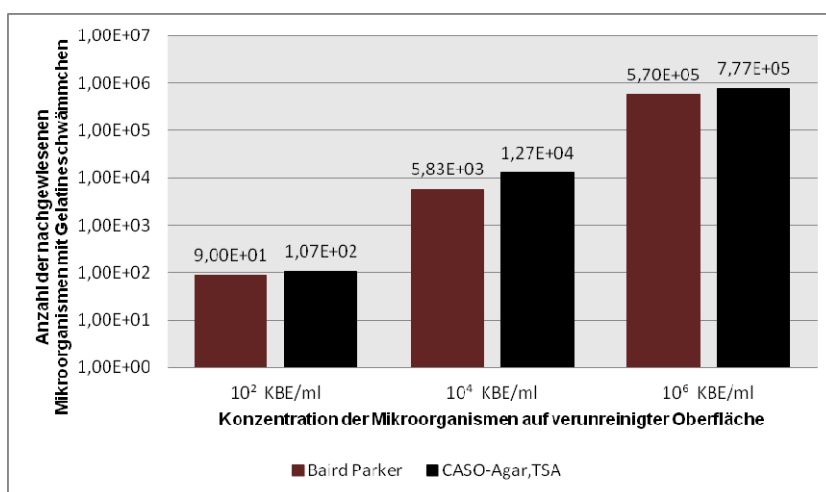


Abbildung 53: Nachweis des Keimes *Staphylococcus xylosus* in einem Gelatineschaumpad (15 %, 20 Mesh)

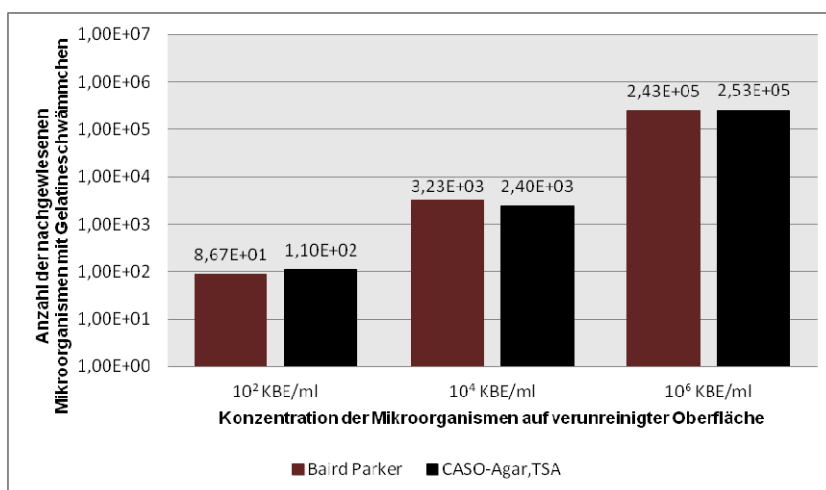


Abbildung 54: Nachweis des Keimes *Staphylococcus xylosus* in einem Gelatineschaumpad (10 %, 6 Mesh)

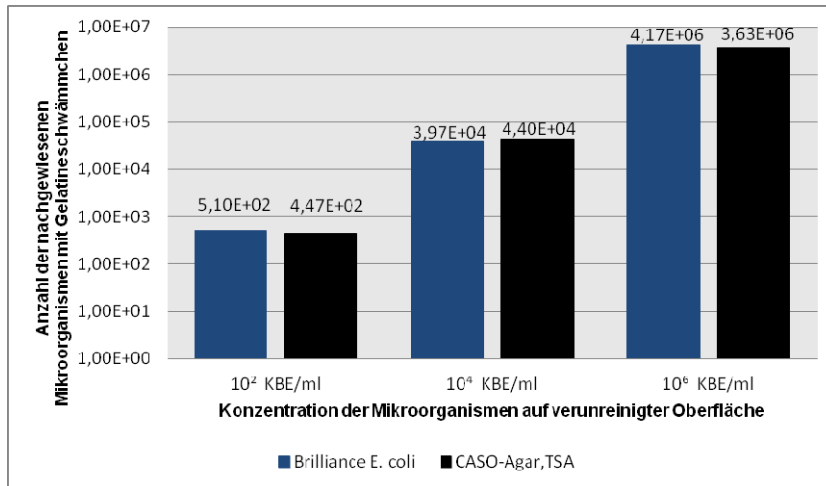


Abbildung 55: Nachweis des Keimes *E. coli* K12 in einem Gelatineschaumpad (10 %, 6 Mesh)

Vergleich von Schwammmatrizes

Nachfolgende Tabelle 14 gibt die Ergebnisse für die alternativ untersuchten Probenaufbereitungsverfahren unterschiedlicher Schwammmatrizes wieder. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nachweisrate von Mikroorganismen in verflüssigbaren Schwammmaterialien grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse zu klassischen Schwammmatrizes aufweist. In beiden Materialien lässt sich die Anschmutzung in der richtigen Größenordnung wiederfinden.

Tabelle 14: Vergleich der Wiederfindung von *E. coli* K 12 im Schwammmaterialien „3M“ und Gelita

Ausgangskonzentration	Probenahme-Matrix	Methode 1 GKZ [KbE / ml]	Methode 2 GKZ [KbE / ml]
10 ² KBE/ml Real: 1,7 x 10 ²	Schwammpad „3M“	1,3 x 10 ²	1,4 x 10 ²
	Gelatineschaumpad „Gelita Spon“	1,6 x 10 ² *	4,9 x 10 ²
10 ⁴ KBE/ml Real: 1,7 x 10 ⁴	Schwammpad „3M“	7,0 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴
	Gelatineschaumpad „Gelita Spon“	1,8 x 10 ⁴ *	3,7 x 10 ⁴
10 ⁶ KBE/ml Real: 4,1 x 10 ⁵	Schwammpad „3M“	1,6 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁵
	Gelatineschaumpad „Gelita Spon“	1,2 x 10 ⁶ *	2,8 x 10 ⁶

*gelartige Masse ist bei Raumtemperatur relativ schwer homogenisierbar

Probenalterung

Die Untersuchung von nach Probenahme für 24 Stunden gelagerter Schaumpad-Materialien liefert gegenüber einer unmittelbaren Auswertung leicht erhöhte KBE-Werte. Ihre Log-Stufe entspricht der Ausgangskonzentration.

Tabelle 15: Wiederfindung von *E.coli* K12 in einem Schaumpad direkt und nach einem Tag

Ausgangskonzentration	Direkt E.Coli [KBE/g]	Nach 1 Tag E.Coli [KBE/g]
10 ² KBE/ml Real: 2,3 x 10 ³	1,7 x 10 ²	2,5 x 10 ²
	1,5 x 10 ²	2,2 x 10 ²
10 ⁴ KBE/ml Real: 1,5 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
	4,8 x 10 ⁴	4,3 x 10 ⁴
10 ⁶ KBE/ml Real: 1,4 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶
	2,9 x 10 ⁶	5,0 x 10 ⁶

8.6 Arbeitspaket 5: Aseptische Aufbereitung der Probenahmematrix für die Anwendung der Durchflusszytometrie

8.6.1 Material und Methoden

8.6.1.1 Geräte

Brutschrank

Die Kultivierung von Mikroorganismen wurde in laborüblichen Brutschränken (Heraeus GmbH, Hanau) bei 37 °C (Anzucht von Bakterienkulturen) bzw. bei 30 °C (Anzucht von Pilzen) vorgenommen.

Zentrifuge

Zur Zentrifugation von Flüssigkeitsmengen bis 2 ml wurden Zentrifugen wie z. B. Galaxy 16 DH von VWR International GmbH (Darmstadt) genutzt. Flüssigkeitsmengen größer als 2 ml wurden mit Zentrifugen, wie z. B. 5804 R (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert.

Autoklav

Die Sterilisation der Flüssigabfälle, Medien sowie Gerätschaften erfolgte in einem Standautoklaven, Modell Tuttnauer 3870 ELV der Firma Systec GmbH in Wettengel.

Koloniezählgerät

Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE/ml) erfolgte durch Zählung der Kolonien mit Hilfe eines Koloniezählgerätes Schütt Count der Firma schuett-biotec GmbH, Göttingen.

Ultraschallbad

Zur Überprüfung des Einflusses einer Ultraschallbehandlung auf Mikroorganismen wurde ein Ultraschallbad der Firma Knauer GmbH (Berlin) bis max. 50 kHz verwendet. Hierzu wurden die Mikroorganismensuspensionen bis zu 5 min dem Einfluss von Ultra-

schall ausgesetzt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl (KbE/ml) erfolgte über das klassische Ausplattierverfahren auf CASO-Agar.

Heizblock

Zur Abtötung von Mikroorganismen zur Lebend/Tot-Färbung wurden diese in 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert und für 30 min bei 50 °C inkubiert. Dazu wurde ein digitaler Blockheizer der Firma Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) vom Typ HX-2 verwendet.

Bottle-Top-Filterhalter

Für die Sterilfiltration des sheath fluid für die Durchflusszytometrie wurde ein wiederverwendbarer Bottle-Top-Filterhalter aus Polysulfon der Firma Nalgene, Rochester mit einem GL45-Gewinde genutzt.

Spritzen-Filtervorsatz

Zur Aufkonzentrierung der Mikroorganismen nach einer Beprobung mit Gelatine wurde ein wiederverwendbarer Spritzen-Filtervorsatz aus Polytetrafluorethylen der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) für Filtermembranen mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Porengröße von 0,2 µm (Sartorius AG, Göttingen) verwendet.

CyFlow® SL

Das CyFlow® SL (Partec GmbH, Münster, vgl. Abbildung 56) ist ein Durchflusszytometer, mit dem fünf Parameter parallel gemessen werden können; dies sind die Größe und Granularität der zu untersuchenden Partikel (Zellen) sowie die drei Fluoreszenzen (grün, gelb/orange und rot).



Abbildung 56: CyFlow® SL (Partec GmbH, Münster)

8.6.1.2 Verwendete Lösungen

Sheath fluid

Pro Ansatz wurden 10 l vollentsalztes Wasser in 1 l-Portionen durch Filter (Material: Regenerierte Cellulose, Typ 184 von der Firma VWR International GmbH, Darmstadt mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert und anschließend für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Die Lösung wurde bei RT gelagert. Vor Gebrauch wurde 0,01 % (v/v) Tween® 20 zugesetzt.

Spülflüssigkeiten

Um die auf den inhomogen feuchten Flächen anhaftenden Mikroorganismen ablösen zu können, wurden zwei verschiedene Spülflüssigkeiten eingesetzt:

0,85 % (w/v) Natriumchlorid (NaCl)-Lösung: Es wurden 8,5 g Natriumchlorid in 1 l sterilem, partikelfreiem Wasser gelöst und für 20 min bei 120°C autoklaviert. Danach wurde die Lösung erneut durch Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm (Material: Cellulosemischester, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) sterilfiltriert und bei RT in 50 ml-Aliquots gelagert.

Sterilfiltriertes, vollentsalztes (VE)-Wasser

Vollentsalztes Wasser wurde in 1 l-Portionen durch Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert (Material: Regenerierte Cellulose, Typ 184 von der Firma VWR International GmbH, Darmstadt) und anschließend für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Zur besseren Handhabbarkeit wurden 50 ml-Aliquots hergestellt. Diese wurden zusätzlich durch Filter mit dem Porendurchmesser 0,2 µm (Material: Cellulosemischester, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) sterilfiltriert und bei RT gelagert.

Additive in den Spülflüssigkeiten

Zur besseren Ablösung der Kontaminationen von Oberflächen wurde der Einsatz von Tensiden in den beiden Spülflüssigkeiten (NaCl-Lösung bzw. VE-Wasser) getestet. Es wurden die Tenside Polysorbat 80 (Tween® 80), Triton® X-100 und das Polymer PEG-400 in den Konzentrationen von 0,01 % bis 1 % (v/v) getestet.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Zur Herstellung der Arbeitslösung des Farbstoffs SYTO® RNASelect™ Green Fluorescent Stain (Life Technologies GmbH, Darmstadt) wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,3) verwendet (Tabelle 16). Die Lösung wurde mit partikelfreiem Wasser angesetzt und anschließend erneut durch einen Filter mit dem Porendurchmesser 0,2 µm sterilfiltriert (Material: Cellulosemischester, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe).

Tabelle 16: Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung

Chemikalie	Menge in g/l
NaCl	8,18
di-Natrium-Hydrogen-phosphat-Dihydrat	1,77
KCl	0,20
Kalium-di-Hydrogen-phosphat	0,24

Natriumhypochloritlösung

Zur Dekontamination der Abfallflüssigkeit des CyFlow® SL, wurde Hypochloritlösung eingesetzt. Pro Liter der Abfallflüssigkeit wurden 2 ml einer 12 %-igen Hypochloritlösung hinzu pipettiert. Die enthaltenen Bakterien wurden abgetötet, die gebundenen Farbstoffe inaktiviert.

70 % Ethanol

Absolutes Ethanol wurde mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) auf 70 % verdünnt. Damit wurden Mikroorganismen inaktiviert, um die Möglichkeit zur Unterscheidung von lebenden und toten Mikroorganismen im Durchflusszytometer zu analysieren

Bakterienstämme und Pilze

Die für dieses Forschungsprojekt verwendeten Bakterien und Pilze wurden von der "Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die verwendeten Mikroorganismen einschließlich ihrer DSMZ Identifikationsnummer.

Tabelle 17: Verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismus	DSMZ Identifikationsnummer
<i>Bacillus atrophaeus</i> (ehemals <i>B. subtilis</i>)	2277
<i>Candida albicans</i> (<i>C. albicans</i>)	1386
<i>Escherichia coli</i> K12 (<i>E. coli</i>)	11250
<i>Lactococcus lactis</i> (<i>L. lactis</i>)	20481
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	799
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (<i>S. epidermidis</i>)	20044

8.6.1.3 Nährmedien**Nähragar**

Zur Anzucht bzw. um die koloniebildenden Einheiten (KbE) einer Bakterien- oder Pilzsuspension zu bestimmen, wurde entweder CASO-(Casein-Sojamehl-Pepton)-Agar oder Plate-Count-Agar genutzt. Die Zusammenstellung der Medien wird in Tabelle 18 und Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 18: Zusammensetzung CASO-Agar (pH 7,3 ± 0,2)

Chemikalie	Menge in g/l
Casein-Pepton	15
Sojamehlpepton	5
Natriumchlorid	5
Agar	15

Tabelle 19: Zusammensetzung Plate-Count-Agar

Chemikalie	Menge in g/l
Casein-Pepton	5
Hefeextrakt	2,5
Glukose	1
Agar	15

CASO-Bouillon

Zur Anzucht der verwendeten Mikroorganismen in einer Flüssigkultur wurde eine CASO (Casein-Sojamehl-Pepton)-Bouillon verwendet. Die Zusammenstellung des Mediums ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Zusammensetzung CASO-Bouillon (pH 7,3 ± 0,2)

Chemikalie	Menge in g/l
Caseinpepton	17
Sojamehlpepton	3
Natriumchlorid	5
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5
Glukose-Monohydrat	2,5

8.6.1.4 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Anzucht von Bakterien und Pilzen

Die verwendeten Mikroorganismen wurden auf CASO- bzw. Plate-Count-Agar oder in CASO-Bouillon schüttelnd über Nacht bei 37 °C, im Falle von *C. albicans* bei 30 °C, im Brutschrank bzw. Schüttler kultiviert.

Abschwemmen der Mikroorganismen von Agarplatten

Bewachsene Agarplatten wurden mit 4 ml 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung oder sterilfiltriertem VE-Wasser überschichtet. Die Mikroorganismen wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels von der Agar-Platte abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (20 min bei 1500 x g) wurden die Mikroorganismen sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser resuspendiert.

Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Um die Anzahl an lebenden bzw. noch vermehrungsfähigen Mikroorganismen zu bestimmen, wurden 100 µl verschiedener dezimaler Verdünnungsstufen in 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser auf CASO-Agar pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Je nach Mikroorganismus wurden die Platten bei 30 °C bzw. 37 °C für 18 Stunden bebrütet. Zur Ermittlung der koloniebildenden Einheiten wurden die Kolonien nach der Inkubationszeit mit einem Kolonienzählgerät ermittelt.

Abtöten der Mikroorganismen

Abgeschwemmte Mikroorganismen wurden durch Zentrifugation (3 min bei 13000 x g) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 70 % (v/v) Ethanol resuspendiert. Die Probe wurden für 30 min bei 50 °C inkubiert, anschließend für 3 min bei 13000 x g zentrifugiert und insgesamt dreimal mit 1 ml 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Schritten für jeweils 3 min bei 13000 x g zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde zur weiteren Ana-

lyse in 1 ml 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

Verwendete Probenahme-Matrices

Für die Aufnahme des auf den zu beprobenden Flächen inhomogen verteilten Flüssigkeitsfilms wurden verschiedene Probenahme-Matrices verwendet. Zum einen wurde ein kommerziell erhältliches Gelatineschaumpad (8 x 5 x 1 cm) der Firma Gelita AG (Eberbach) verwendet. Für die Versuche wurden Würfel mit einer Kantenlänge von 1 x 1 cm, bzw. 3 x 3 cm verwendet, um die Mikroorganismensuspension aufzunehmen.

Des Weiteren wurden Gelatineschaumpads verwendet, die vom Deutschen Institut für Lebensmitteltechnik e. V. (DIL, FS 3) produziert und zur Verfügung gestellt wurden. Die Schaumpads hatten eine Größe von etwa 6 x 3 x 1 cm und waren entweder aus 6 Mesh (Korngröße = 3 mm) grobkörniger, oder 20 Mesh (Korngröße = 0,8 mm) feinkörniger Schweinegelatine hergestellt worden. Mit Mesh wird u. a. die Korngröße eines Gelatinepulvers beschrieben, wobei je nach Mahlung sehr feine und auch sehr grobe Korngrößen möglich sind. Die Schaumpads wurden für die Versuche ebenfalls in Würfel mit Kantenlängen von 1 x 1 cm und 3 x 3 cm zugeschnitten. Für die Praxisversuche wurden aufgrund der Größe der zu beprobenden Fläche die kompletten Schaumpads (6 x 3 cm) verwendet.

Verflüssigung von Gelatineschaumpads

Um die in den Gelatineschäumen aufgenommenen Mikroorganismen einer durchflusszytometrischen Analyse zugänglich zu machen, wurden die verwendeten Gelatineschäume mit Hilfe von Proteinase K enzymatisch verflüssigt. Proteinase K hydrolysiert Peptidbindungen sowohl am Molekülende, als auch innerhalb der Molekülkette (Exo-, Endopeptidase), wodurch diese irreversibel verflüssigt werden. Die mit Mikroorganismen kontaminierten Gelatineschäume wurden in 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung oder sterilfiltriertem VE-Wasser aufgenommen und nach Zugabe von Proteinase K für bis zu 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Folgende Volumina wurden eingesetzt: Gelatineschäume mit einer Kantenlänge von 1 cm wurden in 1,5 ml Flüssigkeit gegeben und mit 37,5 µl einer Proteinase K-Lösung (Stammlösung 20 mg/ml) (30 U/mg; 7538.1 Carl Roth) versetzt. Gelatineschwämme mit einer Größe von 3 x 3 x 1 cm wurden in 4,5 ml Flüssigkeit aufgenommen und mit 20 bis 125 µl der Proteinase K-Lösung inkubiert. Bei einer Größe von 6 x 3 x 1 cm wurden die Schwämme in 10 ml Flüssigkeit aufgenommen und mit 100 - 150 µl Proteinase K inkubiert.

In weiteren Versuchsreihen wurde die thermische Auflösung der Gelatineschäume untersucht. Die Schaumpads wurden dazu für bis zu 3 h bei 40 °C inkubiert. Hier zeigte sich jedoch keine vollständige Verflüssigung der Schaumpads. Eine höhere Temperatur wurde nicht gewählt, um den Vitalitätszustand der später einzubindenden Mikroorganismen nicht zu verfälschen.

Eine Verflüssigung der Gelatineschwaumpads durch eine Behandlung mit der Protease Trypsin, bei der die Peptidbindungen von Proteinen nach den Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten werden, wurde nicht angewendet. Hier konnte bereits in Vorversuchen gezeigt werden, dass das Trypsin Mikroorganismen hydrolysiert, und es bei einer Messung im Durchflusszytometer für tote Mikroorganismen zu verfälschten Messergebnissen kommt.

Mikrofiltration

Zur Entfernung störender Matrixbestandteile der hydrolysierten Gelatine aus den zu untersuchenden Proben wurde eine Mikrofiltrationsmethode verwendet. Hierzu wurde die verflüssigte Probe mittels wiederverwendbarem Spritzen-Filtervorsatz durch einen Celluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen). Die in der Probe vorhandenen Mikroorganismen blieben auf dem Filter zurück und die Matrixbestandteile wurden abgetrennt. Anschließend wurde der Filter in dem Filtervorsatz gewendet. Mit Hilfe von 1 ml 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser und Luft wurden die Mikroorganismen vom Filter abgespült. Die so erhaltene Mikroorganismenprobe wurde für weitere durchflusszytometrische Analysen vorbereitet.

Anschmutzung von Prüfkörpern

Die Prüfkörper wurden mit einer definierten Menge an Bakterien oder Pilzen, suspendiert in NaCl-Lösung oder sterilfiltriertem VE-Wasser, angeschmutzt, um die Abnahme- und Einbindefähigkeit der Schäum pads in Bezug auf Oberflächenverschmutzungen zu überprüfen.

Zur Anschmutzung von glatten Edelstahl- oder Kunststoffoberflächen (Petrischale) wurden Bakterien oder Pilze von einer Agarplatte abgeschwemmt und mit NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Von dieser Suspension wurden 0,1 bis 1 ml auf die Oberfläche des Prüfkörpers aufgetragen. Für die Versuche mit angetrockneten Mikroorganismen wurden jeweils 0,1 ml Flüssigkeitsvolumen auf einer 9 cm² Fläche verteilt und über verschiedene Zeiten angetrocknet. Die Abnahme der noch feuchten Anschmutzung erfolgte mittels Gelatineschaumpad-Stückchen (Abbildung 57): Bei einem Flüssigkeitsvolumen von 0,1 ml wurden 1 cm³ große Stücke eingesetzt, bei Volumen von 1 ml Zuschnitte mit einer Größe von 3 x 3 x 1 cm. Angetrocknete Anschmutzungen (0,1 ml Flüssigkeitsvolumen) wurden ebenfalls mit einem 3 x 3 x 1 cm Schaumpad aufgenommen. Durch das Zusammenpressen und das Wiederauseinanderweichen des Gelatineschaumpad-Stückchens wurde die kontaminierte Flüssigkeit in den Schaum aufgenommen. Es wurden lebende, tote oder ein Gemisch aus lebenden und abgetöteten Mikroorganismen aufgetragen.



Abbildung 57: Mit Mikroorganismensuspension angeschmutzte, glatte Edelstahloberfläche. Die Beprobung erfolgte mit einem Gelatineschaumpad-Stückchen (1 x 1 cm).

Nach der Abnahme der Verschmutzung durch das Schaumpad wurde die auf der Oberfläche verbliebene Restverschmutzung mit Hilfe eines sterilen Probenbeutels (WhirlPak[®], Firma neoLab GmbH) abgenommen. Die angeschmutzten Prüfkörper wurden in einen Probenbeutel, der mit 1 ml 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung befüllt war, überführt und für 1 min ausgewalkt („stomaching“). Anschließend wurde die im Beutel vor-

handene Mikroorganismensuspension dazu verwendet, die auf den Prüfkörpern verbliebene Lebendzellzahl (KbE/ml) durch Ausplattieren auf Nähragarböden zu bestimmen.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beruht auf der optischen Charakterisierung von Einzelzellen in Suspension aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Dazu werden die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit durch ein unter Druck stehendes Flüssigkeitssystem geleitet und einzeln an einem Laser vorbei geführt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) gibt die Streuung des Lichtes an, das auf ein Partikel trifft, und ist damit abhängig vom Volumen der Zelle – kleine Zellen streuen weniger Licht als große Zellen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) fällt nach Streuung im rechten Winkel auf einen Detektor und ist ein Maß für die Granularität der Zellen (Abbildung 57). Diese wird maßgeblich durch die Größe und Struktur des Zellkerns, Faltungen in der bakteriellen Membran sowie die Anzahl von zellulären Vesikeln oder anderen Zellorganellen bestimmt. Zur weiterführenden Analyse der Zelleigenschaften ist es möglich, Chromogen-markierte Antikörper oder z. B. Nukleinsäure-bindende Farbstoffe einzusetzen, die durch das Laserlicht angeregt werden und spezifische Fluoreszenzen aufweisen.

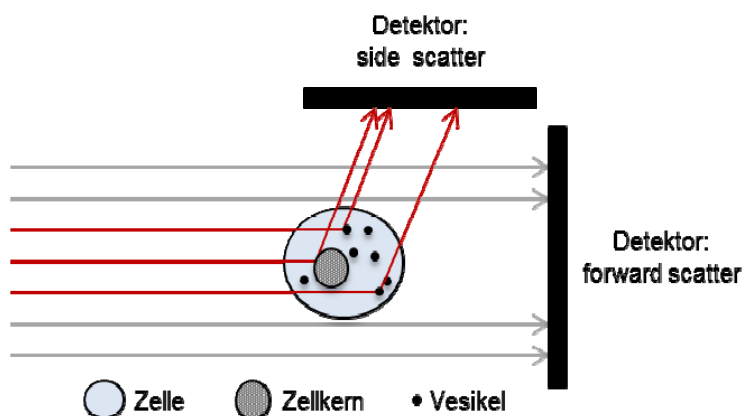


Abbildung 58: Darstellung von Vorwärtsstreulicht (forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (side scatter) in der Durchflusszytometrie.

Lebend/Tot-Färbung von Mikroorganismen

Lebende und/oder tote Mikroorganismen wurden mit dem *LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit* (Life Technologies GmbH, Darmstadt) angefärbt. Das Prinzip der Färbung beruht auf zwei Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen, SYTO9[®] und Propidiumiodid (PI). SYTO9[®] ist in der Lage durch intakte und defekte Membranen von Zellen zu penetrieren und bindet an die DNA der Zellen. Es färbt daher sowohl tote als auch lebende Zellen an. Die gefärbten Zellen zeigen bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm eine grüne Fluoreszenz. Propidiumiodid ist ebenfalls ein DNA-bindender Farbstoff, der jedoch nur durch defekte Membranen penetrieren kann und dementsprechend nur defekte bzw. tote Zellen anfärbt. Da Propidiumiodid eine höhere Affinität zu Nukleinsäuren hat als SYTO9[®], wird der Farbstoff SYTO9[®] verdrängt; die Zelle leuchtet bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm rot. Es ist ebenfalls möglich, dass Zellen beide Farbstoffe binden; der Vitalitätsstatus dieser gelb-fluoreszierenden Zellen ist

jedoch nicht bekannt. In Abbildung 59 ist die Strukturformel von Propidiumiodid dargestellt. Der Farbstoff SYTO9® ist von Life Technologies™ patentiert.

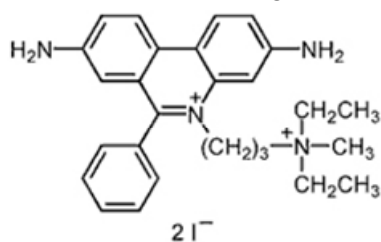


Abbildung 59: Strukturformel von Propidiumiodid (www.lifetechnologies.com)

Für die Anfärbung wurden 0,5 µl der Färbelösung pro Milliliter Zellsuspension eingesetzt. Die Färbung erfolgte soweit nicht anders angegeben für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Färbung wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert; es wurden dazu standardmäßig Zellsuspensionen mit Konzentrationen von 10⁶ bis 10⁰ Zellen/ml hergestellt und vermessen.

Bestimmung der Nachweisgrenze für Bakterien und Hefen

Es wurden Mikroorganismensuspensionen mit einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml hergestellt. Wenn benötigt, wurden Suspensionen aus lebenden und toten Zellen hergestellt. Die Zellen wurden mit SYTO9® und Propidiumiodid gefärbt und in Konzentrationen von 10⁶ bis 10¹ Zellen/ml im Durchflusszytometer gemessen.

Differenzierung von Mikroorganismen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern

Die Differenzierung von ausgewählten relevanten Mikroorganismen aus Abbildung 21 erfolgte mittels FITC-gelabelter Antikörper, die von der Firma antibodies-online GmbH (Aachen) bezogen wurden. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Anregung mit blau-grünem Licht der Wellenlänge 495 nm grünes Licht der Wellenlängen 520 bis 530 nm abgibt.

Lebende Mikroorganismen wurden in 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung bzw. sterilfiltriertem VE-Wasser so verdünnt, dass eine errechnete Zellzahl zwischen 10¹-10⁵ Bakterien/ml in den Proben vorlag. Pro Milliliter einer Bakteriensuspension wurde 0,5 µl bis 10 µl des entsprechenden Antikörpers (Tabelle 21) zugesetzt. Die Proben wurden für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in geeigneten Verdünnungen (10⁰-10⁶ Zellen/ml) direkt im Durchflusszytometer analysiert.

Tabelle 21: Verwendete Antikörper zur Differenzierung

Antigen	Antikörper
<i>S. aureus</i> Protein A	Anti- <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A (FITC)
<i>C. albicans</i>	Anti- <i>Candida albicans</i> (FITC)

Detektion von Mikroorganismen mit Fluoresceindiacetat (FDA)

Stoffwechselaktive, vitale Zellen sind in der Lage durch intrazelluläre Esterasen Fluoresceindiacetat (FDA; Abbildung 60), das in die Zelle diffundiert, zu einem fluoreszie-

renden Farbstoff (Fluorescein) zu hydrolysieren. Diese Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer gemessen werden.

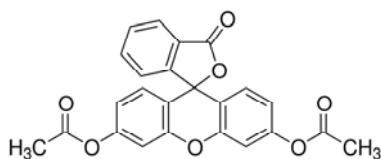


Abbildung 60: Strukturformel von Fluoresceindiacetat (www.sigmaaldrich.com)

Die Mikroorganismen wurden von CASO-Agarplatten, die über Nacht bebrütet worden waren, mit sterilfiltriertem VE-Wasser abgeschwemmt und in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden mehrmals mit sterilfiltriertem VE-Wasser gewaschen. Die Proben wurden so verdünnt, dass die zu beprobende Mikroorganismensuspension eine Zellzahl von 10^6 bzw. 10^3 Zellen/ml enthielt. Die Arbeitskonzentration der FDA-Lösung betrug 1 mg/ml (w/v), gelöst in DMSO bzw. Aceton. 1 ml der Mikroorganismensuspension wurde mit 2 μ l der FDA-Lösung gemischt und bei 30 °C bzw. 37 °C für 15, 30 bzw. 60 min inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit erfolgte die direkte durchflusszytometrische Analyse. Dazu wurden Verdünnungen von 10^0 - 10^{-6} KbE/ml im Durchflusszytometer vermessen.

Detektion von lebenden Mikroorganismen durch einen RNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff

Der Farbstoff SYTO[®] RNASelect[™] Green Fluorescent Cell Stain (Life Technologies GmbH, Darmstadt) bindet selektiv an Ribonukleinsäuren (RNA). Er ist in der Lage durch intakte Zellen zu penetrieren und kann daher für die Detektion von lebenden Zellen eingesetzt werden. Bei Anregung mit blauem Licht (z. B. 488 nm) liegt das Emissionsmaximum des an RNA gebundenen Farbstoffs bei 530 nm im grünen Bereich.

Ein Milliliter einer Mikroorganismensuspension mit einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml wurde mit 1 bis 10 μ l einer frisch hergestellten Gebrauchslösung des Farbstoffs (5×10^{-7} mol/l bzw. 5×10^{-6} mol/l) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer in geeigneten Verdünnungsstufen gemessen.

Einfluss von Desinfektionsmittelrückständen in den Proben

Auf desinfizierten oder gereinigten Oberflächen z. B. in der Lebensmittelindustrie oder im Krankenhausbereich können sich noch Reste verschiedener Desinfektions- oder Reinigungsmittel befinden. Deshalb wurden Desinfektions- und Reinigungsmittel aus verschiedenen Wirkstoffklassen (Abbildung 22) bezüglich ihres Einflusses auf die Lebend/Tot-Färbung und die Messung im Durchflusszytometer untersucht. Die Einwirkzeit der Desinfektionsmittel lag je nach eingesetzter Konzentration nach Herstellerangabe zwischen 5 und 60 min. Bei den Reinigungsmitteln wurden vom Hersteller 5 bis 20 min Einwirkzeit empfohlen. Für die Versuche wurde insgesamt für 30 min inkubiert, um einen einheitlichen Versuchsablauf zu erhalten.

Tabelle 22: Eingesetzte Desinfektions- und Reinigungsmittel

Desinfektions-/Reinigungsmittel	Wirkstoff	Getestete Konzentrationen	Empfohlene Konzentrationen
Desinfektionsmittel 1	Quartäre Ammoniumverbindung (Didecyldimethylammoniumchlorid)	1,5 % bis 3 %	0,5 % bis 3 %
Desinfektionsmittel 2	Quartäre Ammoniumverbindung (Benzyl-C12-18-alkyldimethylammoniumchlorid)	0,25 % bis 3 %	0,25 % bis 1 %
Reinigungsmittel 1	Kaliumhydroxid, Chlorabspalter, anionische Tenside	0,1 % bis 10 %	1 % bis 10 %
Reinigungsmittel 2	anorganische und organische Säuren, nichtionische Tenside	1 % bis 10 %	5 % bis 10 %

Ausgewählte Mikroorganismen wurden von Agarplatten abgeschwemmt und in 1 ml einer Desinfektionsmittelprobe (verschiedene Verdünnungen) aufgenommen (Zielkonzentration: 10^4 bis 10^6 Zellen/ml). Die Einwirkzeit betrug 30 min bei RT. Anschließend wurden die Mikroorganismen für 3 min bei $13000 \times g$ sedimentiert, in 1 ml 0,85 %-iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut für 3 min bei $13000 \times g$ sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,85 %-iger NaCl-Lösung resuspendiert, mit SYTO9[®] und Propidiumiodid gefärbt und unverdünnt im Durchflusszytometer gemessen. In einem weiteren Versuch wurden die Mikroorganismen im Desinfektionsmittel belassen und in diesem direkt gefärbt und gemessen. Parallel wurden mit Desinfektionsmittel behandelte, aber ungefärbte Proben auf Nähragarböden ausplattiert, um die Lebendzellzahl zu bestimmen.

Einfluss von Blut und Öl

Nach einer durchgeführten Reinigung und Desinfektion können betriebsbedingte Anschmutzungen wie z. B. Blut- oder Ölreste auf den Flächen verbleiben und Interferenzen bei einer Analyse mit dem Durchflusszytometer verursachen. Um einen möglicherweise negativen Effekt beurteilen oder ausschließen zu können, wurden Experimente mit Blut und Öl verschiedener Konzentrationen durchgeführt. Für die Experimente mit dem Öl als Anschmutzung wurde handelsübliches Rapsöl benutzt. Um den Effekt von Blut auf die Messung zu untersuchen wurde defibriniertes Schafblut von Oxoid Deutschland GmbH, Wesel verwendet.

8.6.2 Ergebnisse der Keimzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie

8.6.2.1 Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie ohne Gelatine

Die Durchflusszytometrie ist eine automatisierte Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen in Suspension. Sie stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Analyse von einzelnen Zellen bzw. Zellpopulationen dar. Die zu messenden Zellen werden vereinzelt und in einer Messzelle von einem Laser beleuchtet. Dadurch werden auf die Zellen aufgebrachte Fluorochrome (z. B. Fluoreszenz-gelabelte Antikörper oder Fluoreszenzfarbstoffe) angeregt, so dass sie detektiert werden können.

Zur Anfärbung der lebenden bzw. toten Mikroorganismen wurden im durchgeführten Forschungsprojekt die beiden Fluoreszenzfarbstoffe SYTO9[®] und Propidiumiodid (PI)

eingesetzt. Der DNA-bindende Farbstoff SYTO9[®] färbt dabei die lebenden Zellen, die dann nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Propidiumiodid kann nur durch defekte Membranen in Zellen eindringen und dementsprechend nur tote Zellen bzw. solche mit geschädigten Membranen anfärben. Zellen mit unbekanntem Vitalitätsstatus können beide Farbstoffe aufnehmen und leuchten dementsprechend gelb.

Die Analyse einer Zellprobe erfolgt im Durchflusszytometer anhand verschiedener Messgrößen. In einem Dotplot werden die Intensitätsbereiche zweier Parameter gegeneinander aufgetragen. In dem Beispiel von Abbildung 61 F sind die Intensitäten der roten und grünen Fluoreszenz gegeneinander gestellt. Auf der Y-Achse ist dabei die Intensität der roten Fluoreszenz, auf der X-Achse die Intensität der grünen Fluoreszenz von niedrig bis hoch aufgetragen. Jeder Punkt dieses Dotplots repräsentiert ein einzelnes „Ereignis“, d. h. die Passage einer Zelle oder eines anderen Partikels durch den Laserstrahl und in diesem Fall, die damit verbundenen Emissionen im grünen und roten Bereich. Diese werden wiederum von den entsprechenden Detektoren aufgenommen, elektronisch verarbeitet und letztendlich entsprechend Ihrer „roten“ und „grünen“ Emissionsintensitäten auf dem Dotplot platziert. In den Dotplot-Darstellungen wird die Anzahl der gemessenen Zellen, die aufgrund der hohen Anzahl häufig dicht beieinander oder übereinander aufgetragen werden, durch einen Farbgradienten angezeigt. In den blauen Bereichen liegen niedrige Anzahlen, in den schwarzen Bereichen hohe Anzahlen an gemessenen Partikeln vor. In den nachfolgenden Ausführungen werden diese Dotplots zur Erklärung der beobachteten Ergebnisse herangezogen. Abbildung 61 A zeigt die Aufzeichnung des forward scatter, also die Anzahl der gezählten Partikel bezogen auf die Größe. Wenn ein geeigneter Größenstandard mitgeführt wird, ist es möglich, anhand dieses Dotplots die Größe eines gemessenen Partikels abzuschätzen. Die in Abbildung 61 analysierte Hefe *C. albicans* ist mit einem typischen Durchmesser von 4 - 10 µm relativ groß und lässt sich hierdurch einfach erfassen. Bakterien sind jedoch so klein, dass eine Analyse allein über die Größe nicht durchgeführt werden kann. Sie verschwinden im sogenannten Hintergrundrauschen der Messlösung: Jede Lösung und jeder Partikel hat eine spezifische Eigenfluoreszenz, die von einem Durchflusszytometer gemessen wird und unter Umständen zu störenden Ereignissen während einer Messung führen kann.

Abbildung 61 B zeigt die Anzahl der gezählten Partikel bezogen auf die Granularität. Der side scatter erfasst die optisch streuende, innere Komplexität von Partikeln und spiegelt damit die charakteristische Granularität einer Zelle wieder, die z. B. abhängig ist von der Größe und Struktur des Zellkerns, Membranfaltungen und der Anzahl der Vesikel; für die hier beabsichtigte Messanwendung erfolgte keine Einbeziehung dieses Parameters.

Abbildung 61 C zeigt die grüne Fluoreszenz (FL1) der analysierten Partikel. Analog dazu analysieren FL2 (Abbildung 61 D) und FL3 (Abbildung 61 E) die gelbe bzw. rote Fluoreszenz. Die Anzahl der gemessenen Partikel wird dabei gegen die entsprechende Fluoreszenz aufgetragen. In Abbildung 61 F sind die grüne und rote Fluoreszenz gegenüber gestellt. Bei dieser Darstellung als Dotplot ist die Bildung von Populationen aus lebenden (grün fluoreszierenden) und toten (rot fluoreszierenden) Zellen am besten zu sehen. Mischpopulationen mit unbekanntem Vitalitätsstatus (gelb fluoreszierend) liegen zwischen diesen beiden Populationen.

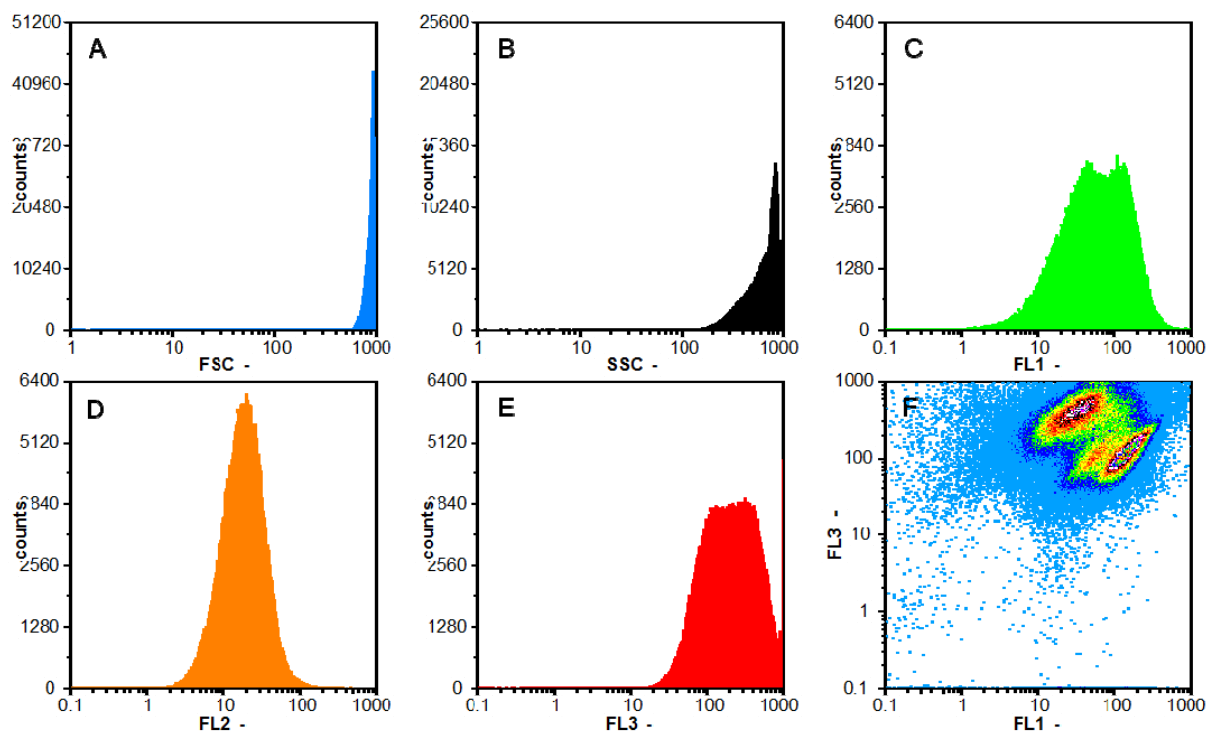


Abbildung 61: Graphische Darstellung der Messwerte durch die Software FloMax nach einer Lebend/Tot-Färbung am Beispiel von *Candida albicans*:

(A) forward scatter (FSC) analysiert die Größe der Zellen, (B) side scatter (SSC) analysiert die innere Struktur der Zellen (Granularität), (C) FL1 analysiert die grüne Fluoreszenz, (D) FL2 analysiert die gelbe Fluoreszenz, (E) FL3 analysiert die rote Fluoreszenz, (F) Dotplot Gegenüberstellung der Kanäle FL1 und FL3.

Ziel dieses Projektes war es, eine Methode für die Bestimmung der Anzahl lebender bzw. toter Mikroorganismen auf einer inhomogen feuchten Oberfläche zu entwickeln, um den Erfolg einer durchgeführten Desinfektion ermitteln zu können. In Abbildung 62 sind die Messdaten einer durchflusszytometrischen Untersuchung exemplarisch für Zellen der Hefe *Candida albicans* dargestellt, die mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9[®] und PI gefärbt wurden. Abbildung 62 A zeigt einen Dotplot mit den Rohdaten direkt nach der Messung. Um die Zellzahl der einzelnen Populationen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Flächenareale mit Hilfe der Software *FloMax* mit sogenannten Gates umrahmt. Dabei war es wichtig, die Populationen relativ eng einzugrenzen, um unspezifische Ereignisse nicht mit einzubeziehen. Die Software ermittelte die Anzahl der gemessenen Partikel in diesen Bereichen und gab sie als Count/ml-Wert, also die Anzahl der Ereignisse pro ml für die entsprechenden Gates wieder (Abbildung 62 B). Zur Vereinfachung der Darstellung und Verbesserung des Verständnisses, in welchem Bereich lebende und tote Mikroorganismen dargestellt sind, wurden die umrahmten Populationen mit Hilfe der Software analog zu ihrem Vitalitätsstatus eingefärbt (Multi Color Gating, vgl. Abbildung 62 C). Populationen aus lebenden Zellen sind grün (R3), Populationen aus toten Zellen rot (R1) und solche mit unbekanntem Vitalitätsstatus gelb (R2) dargestellt. Schwarz dargestellte Zählergebnisse zeigten optisch stark divergierende Eigenschaften zu den definierten Populationen und wurden deshalb als Hintergrundrauschen gewertet.

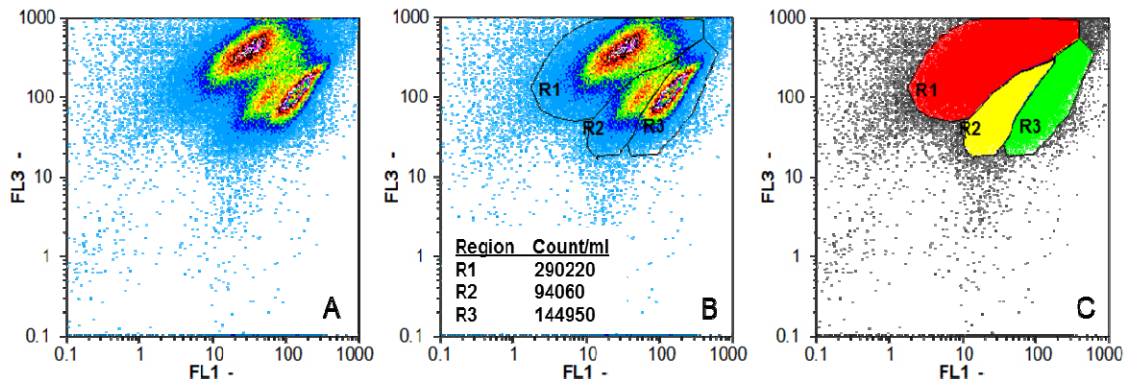


Abbildung 62: Auswertung eines Dotplots nach einer Lebend/Tot-Färbung am Beispiel von *Candida albicans*.

(A) Dotplot Gegenüberstellung der Kanäle FL1 und FL3, (B) Eingrenzen von Populationen durch Gates (R1, R2 und R3), (C) Einfärbung der Gates zur besseren Darstellung von einzelnen Populationen (R1, R2 und R3).

8.6.2.2 Detektion von ausgewählten Bakterien und Hefen (Lebend/Tot-Färbung)

Um Signale bzw. Populationen in Dotplots Bakterien und Hefen zuordnen zu können und um eine Abgrenzung gegenüber Hintergrundsignalen zu erzielen, wurden Zellsuspensionen mit lebenden und toten Zellen (Verhältnis 1:1) mit einer Endkonzentration von 10^5 Zellen/ml für jeden der eingesetzten Mikroorganismen hergestellt, mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9® und Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Generell war zu beobachten, dass bei Auftragung der beiden Fluoreszenzkanäle rot und grün die Populationen von Bakterien relativ zentral im Dotplot lagen, während Hefepopulationen (aufgrund ihrer großen Zellgröße und starken Anfärbbarkeit) im oberen rechten Quadranten lokalisiert waren (Abbildung 63). Die einzelnen Populationen der lebenden und toten Organismen waren in allen Fällen voneinander getrennt, so dass eine eindeutige Zuordnung der Zellen entsprechend ihres Vitalitätsstatus möglich war. Außerdem wurde festgestellt, dass die ungebundenen Farbstoffe ebenfalls Fluoreszenzsignale erzeugten, wobei die resultierende „Farbstoff-Population“ stets am linken Rand der Dotplots auftrat und nicht mit den Populationen der Mikroorganismen überlagerte.

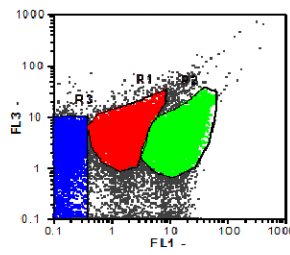
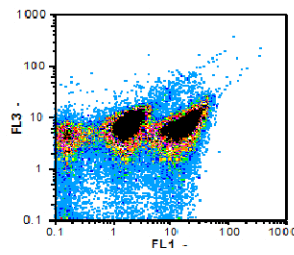
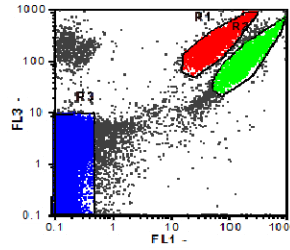
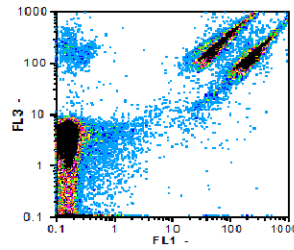
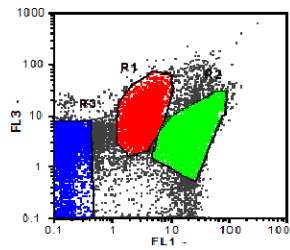
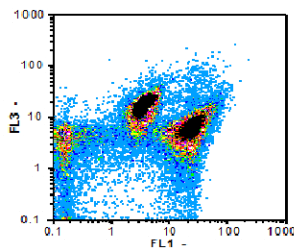
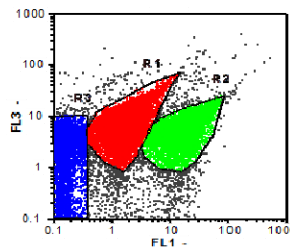
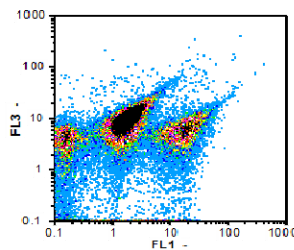
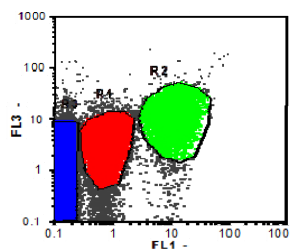
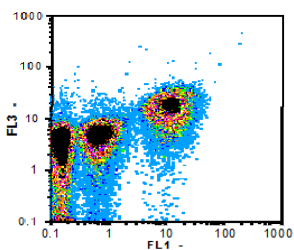
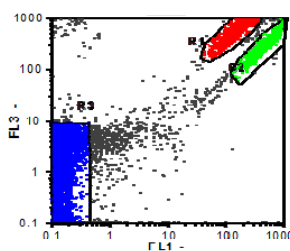
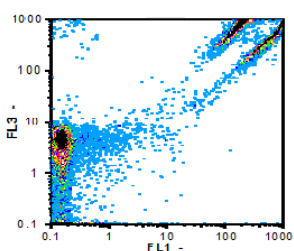
*B. atrophaeus*R1: $1,5 \times 10^5$ (tote Zellen)R2: $1,4 \times 10^5$ (lebende Zellen)*C. albicans*R1: $8,7 \times 10^4$ (tote Zellen)R2: $9,2 \times 10^4$ (lebende Zellen)*E. coli K12*R1: $1,0 \times 10^5$ (tote Zellen)R2: $1,2 \times 10^5$ (lebende Zellen)*L. lactis*R1: $1,4 \times 10^5$ (tote Zellen)R2: $4,4 \times 10^4$ (lebende Zellen)*S. aureus*R1: $9,1 \times 10^4$ (tote Zellen)R2: $7,3 \times 10^4$ (lebende Zellen)*S. cerevisiae*R1: $8,7 \times 10^4$ (tote Zellen)R2: $1,8 \times 10^5$ (lebende Zellen)

Abbildung 63: Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen Mikroorganismenproben (10^5 Zellen/ml) nach Färbung mit Syto9[®] und Propidiumiodid. In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. Rot eingefärbte Populationen stellen die toten Zellen dar, grün eingefärbte Populationen die lebenden Zellen. Signale, die durch die Farbstoffe verursacht werden, sind blau eingefärbt, das Hintergrundrauschen ist schwarz.

8.6.2.3 Ermittlung des Messbereichs für Bakterien und Hefen (Lebend/Tot-Färbung)

Die Ermittlung des Messbereichs und der unteren Messgrenze des Durchflusszytometers für verschiedene Mikroorganismen ist ein wichtiges Kriterium zur Bewertung einer durchgeführten Desinfektion, da diese Kenngröße die minimale Anzahl an Keimen in einer Probe angibt, die vom Gerät erfasst werden kann. Für verschiedene Durchflusszytometer der Firma Partec werden in der Literatur Nachweisgrenzen von 200 ± 30 Zellen/ml angegeben. Für die Ermittlung des Messbereichs wurden Mikroorganismensuspensionen definierter Zellzahl (10^5 Zellen/ml) hergestellt und davon ausgehend dekadisch verdünnt. Von den unterschiedlichen Suspensionen wurde einmal die Anzahl der koloniebildenden Einheiten per klassischem Plattenverfahren bestimmt, mit Syto9[®] gefärbt und im Durchflusszytometer vermessen, um die lebenden Mikroorganismen zu quantifizieren. Weiterhin wurden sie zur Abtötung der Mikroorganismen mit 70 %-igem Ethanol behandelt und im Anschluss mit Propidiumiodid gefärbt und ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert.

Für die Ermittlung der unteren Messgrenze für verschiedene praxisrelevante Mikroorganismen wurden Messungen mit je einem Vertreter gram-negativer Bakterien (*E. coli*), gram-positiver Bakterien (*S. aureus*) und einer Hefe (*C. albicans*) durchgeführt.

In Abbildung 64 bis Abbildung 66 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen in den Suspensionen der Hefe *C. albicans* korrelierten über den getesteten Bereich von 10^1 bis 10^5 Zellen/ml sehr gut mit den durch Kultivierung bestimmten Werten (Abbildung 64). Ähnliche Ergebnisse wurden für das Bakterium *E. coli* erzielt, jedoch konnten hier im Durchflusszytometer erst Zellkonzentrationen von 10^2 Zellen/ml detektiert werden (Abbildung 65). Im Fall des Bakteriums *S. aureus* waren ebenfalls korrelierende Werte für beide Färbemethoden und die Lebendzellzahlbestimmung mittels Ausplattierverfahren bis zu einer eingesetzten Zellzahl von 10^3 Zellen/ml zu beobachten (Abbildung 66), bei niedrigeren Konzentrationen war keine Quantifizierung im Durchflusszytometer möglich.

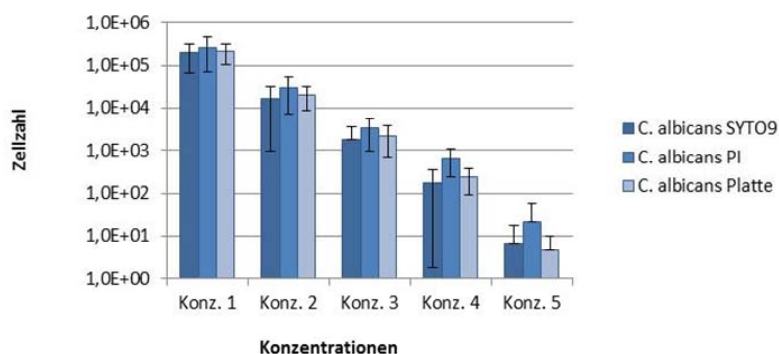


Abbildung 64: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9[®] und PI) für *C. albicans*.

Verschiedene Konzentrationen von Zellsuspensionen des Mikroorganismus *C. albicans* wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9[®] und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich wurde die Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf Nähragarböden bestimmt (Platte). (Fehlerbalken: SD, n=3).

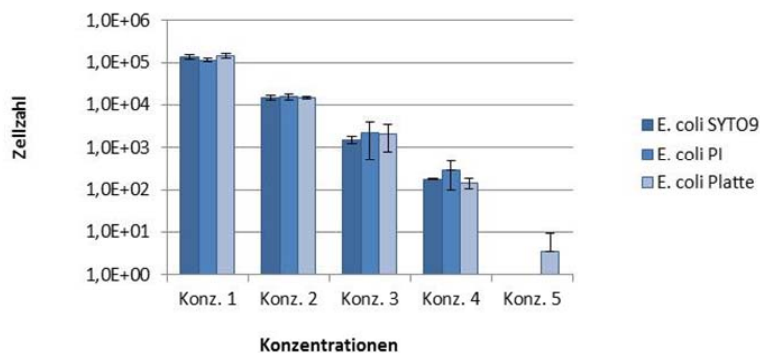


Abbildung 65: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9[®] und PI) für *E. coli*

Verschiedene Konzentrationen von Zellsuspensionen des Mikroorganismus *E. coli* wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9[®] und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich wurde die Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf Nähragarböden bestimmt (Platte). (Fehlerbalken: SD, n=3).

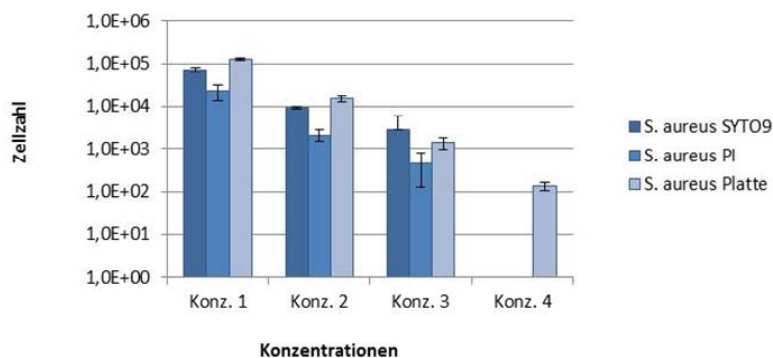


Abbildung 66: Messbereich der Lebend/Tot-Färbung (SYTO9[®] und PI) für *S. aureus*.

Verschiedene Konzentrationen von Zellsuspensionen des Mikroorganismus *S. aureus* wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9[®] und PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zusätzlich wurde die Lebendzellzahl durch Ausplattieren auf Nähragarböden bestimmt (Platte). (Fehlerbalken: SD, n=3).

8.6.2.4 Detektion eines Bakteriengemischs mit dem Durchflusszytometer

Da Mikroorganismen in der Natur nur in den seltensten Fällen in Reinkultur vorkommen, muss das angestrebte Verfahren in der Lage sein, auch Bakteriengemische zu detektieren und zu charakterisieren. Daher wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem eine Mischprobe aus *S. aureus* und *C. albicans* hergestellt, mit dem Lebendfarbstoff SYTO9[®] gefärbt und in einem Durchflusszytometer analysiert wurde. In Abbildung 67 sind vier Dotplots von verschiedenen Verdünnungsstufen der *S. aureus/C. albicans*-Mischprobe dargestellt (eingesetzte Zellzahlen von 10²/ml bis 10⁵/ml). In allen vier Dotplots sind jeweils zwei deutlich voneinander getrennt liegende Mikroorganismenpopulationen zu sehen. Die *C. albicans*-Population liegt dabei im oberen, rechten Quadranten des Dotplots, die *S. aureus*-Population befindet sich dagegen eher in der Mitte des Plots und zieht von dort leicht nach links unten. Beide Populationen sind in allen Verdünnungsstufen sehr gut voneinander getrennt und können leicht als eigenständige Bakterienpopulationen ausgemacht werden. Eine Analyse per Durchflusszytometrie ist

also sehr gut in der Lage, auch Mischproben mit unterschiedlichen Mikroorganismen zu analysieren und die Mikroorganismen aufgrund Ihrer unterschiedlichen optischen Eigenschaften nach der Anfärbung zu identifizieren. Dieser Versuch wurde auch mit anderen Mikroorganismenkombinationen erfolgreich durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

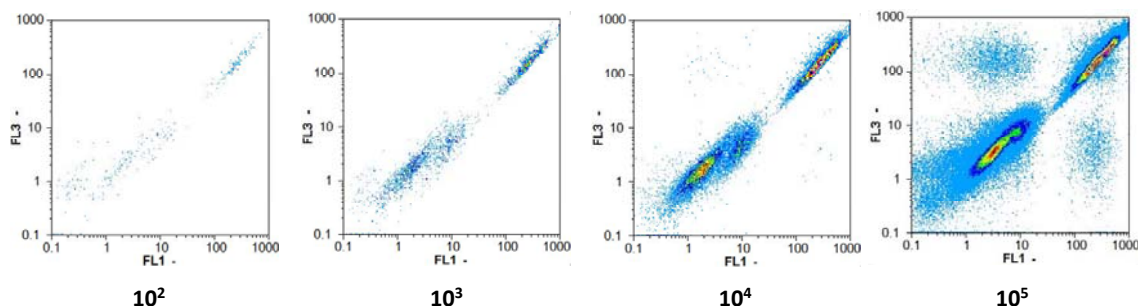


Abbildung 67: Dotplots von Zellsuspensionen aus *S. aureus* und *C. albicans* (Zellkonzentrationen jeweils 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 /ml). In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. Die Probe wurde mit SYTO9[®] gefärbt und in geeigneten Verdünnungen per Durchflusszytometrie analysiert

8.6.2.5 Fluoresceindiacetat (FDA) zum Nachweis von lebenden Zellen

Es wurde getestet, ob der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceindiacetat (FDA) als Ersatz für SYTO9[®] für den Nachweis von lebenden Zellen geeignet ist. FDA ist zunächst farblos und fluoresziert erst nach einer Esterase-abhängigen Hydrolyse, wobei Fluorescein entsteht. Nur lebende Zellen sind in der Lage das zellpermeable Fluoresceindiacetat zu verstoffwechseln und grün zu fluoreszieren. Die Bakterien *E. coli* und *S. aureus* sowie der Pilz *C. albicans* wurden mit FDA angefärbt. Das FDA wurde sowohl in Aceton, als auch in DMSO gelöst und den zu färbenden Zellsuspensionen in verschiedenen Mengen (2 μ l und 5 μ l pro ml Suspension) zugegeben. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeiten (15, 30 und 60 min) mit dem Farbstoff FDA inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Als Kontrolle wurde parallel für jeden Mikroorganismus eine Lebendfärbung mit SYTO9[®] durchgeführt und ebenfalls per Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 68).

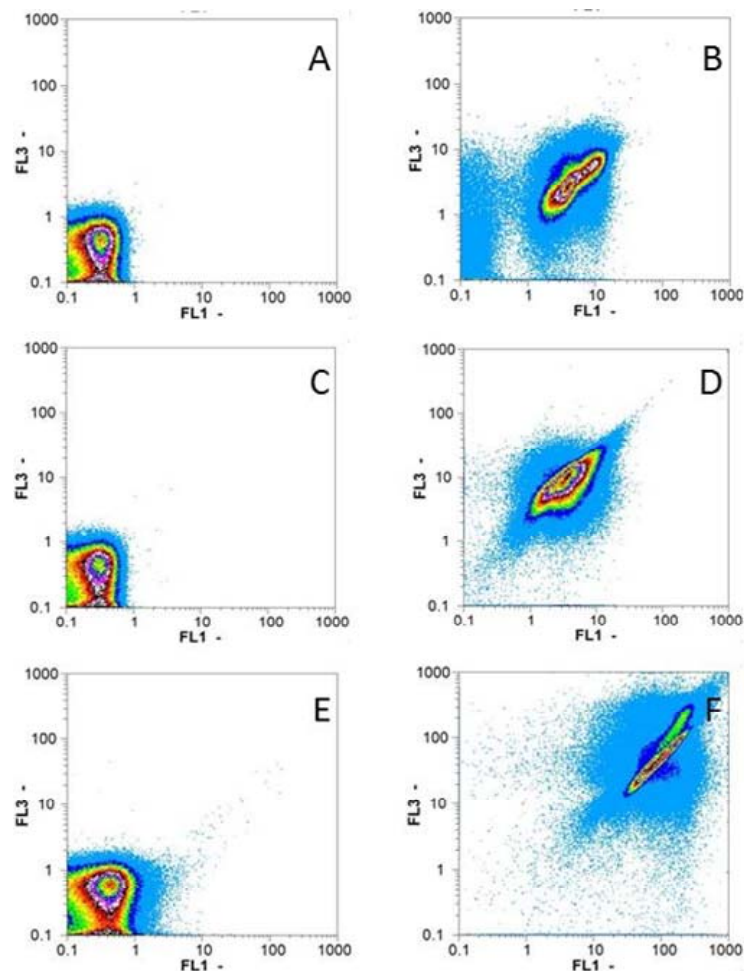


Abbildung 68: Nachweis von lebenden Zellen mit Fluoresceindiacetat (in Aceton).

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A): *E. coli* nach 30 min FDA-Färbung (B): *E. coli* nach 30 min SYTO9[®]-Färbung (C): *S. aureus* nach 30 min FDA-Färbung (D): *S. aureus* nach 30 min SYTO9[®]-Färbung (E): *C. albicans* nach 30 min FDA-Färbung (F): *C. albicans* nach 30 min SYTO9[®]-Färbung

Wie auf den Dotplots von Abbildung 68 zu sehen, ist Fluoresceindiacetat keine geeignete Färbemethode für das angestrebte Nachweisverfahren. Es konnten bei keinem der getesteten Mikroorganismen lebende Zellpopulationen (Bildteile A, C und E) nachgewiesen werden. Auch die beiden eingesetzten Lösemittel, die unterschiedlichen Inkubationszeiten und FDA-Zugabemengen hatten keinen Einfluss auf die ausbleibende Markierung mit FDA. Die Kontrollen die analog mit dem Farbstoff SYTO9[®] (Bildteile B, D und F) durchgeführt wurden, zeigten erwartungsgemäß Lebendpopulationen in den Dotplots. Somit ist FDA kein geeignetes Färbereagens für die Lebendfärbung des angestrebten Hygienemonitoringverfahrens.

8.6.2.6 SYTO RNASelect Green zum Nachweis von lebenden Zellen

Ein weiterer getesteter Farbstoff war „SYTO[®] RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain“. Dieser Farbstoff ist ebenfalls in der Lage die Zellmembran von lebenden Mikroorganismen zu passieren. Er bindet in der Zelle selektiv an die Ribonukleinsäuren (RNA). Bei Anregung mit blauem Licht mit einer Wellenlänge von ca. 490 nm liegt das Emissionsmaximum des an die RNA gebundenen Farbstoffs bei 530 nm im grünen

Bereich. Auch mit diesem Farbstoff wurde versucht, lebende Mikroorganismen anzufärben und per Durchflusszytometrie nachzuweisen. Es wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen (0,5 – 50 nmol/l) mit dem Bakterium *S. aureus* und dem Pilz *C. albicans* durchgeführt. Dabei wurden die Mikroorganismen nach Zugabe der Färbelösung für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und nachfolgend im Durchflusszytometer vermessen. Jeweils zwei Dotplots für die Kontrollen A und B (keine Mikroorganismen, nur Färbelösung) als auch zwei Dotplots für jeweils zwei Mikroorganismenproben (C: *S. aureus* und D: *C. albicans*) sind in Abbildung 69 dargestellt.

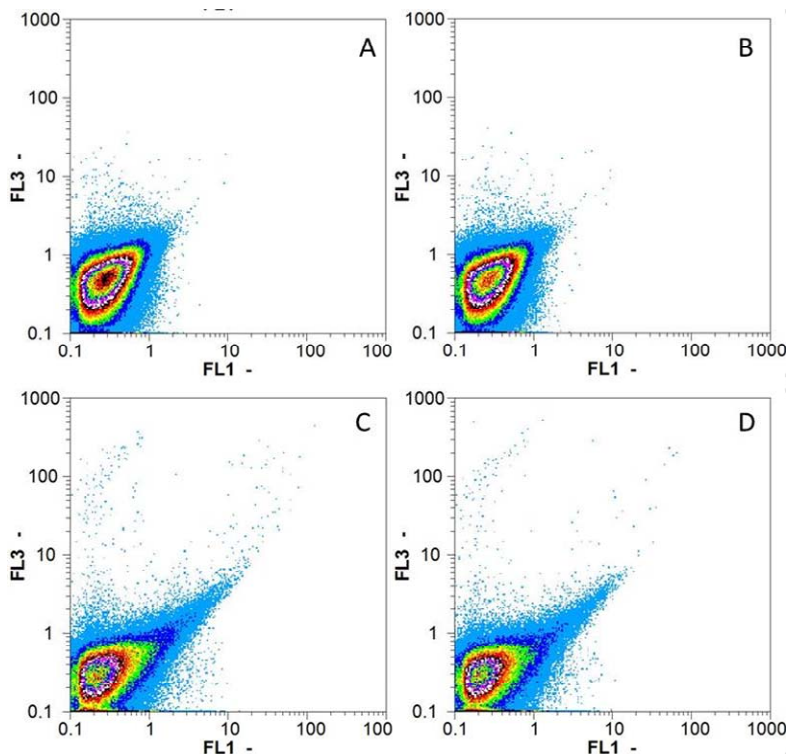


Abbildung 69: Nachweis von lebenden Zellen mit SYTO RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain. In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A, B): Kontrolle (nur Färbelösung); (C): *S. aureus* (10^6 Zellen); (D): *C. albicans* (10^6 Zellen).

Auch dieser Farbstoff war nicht für das Nachweisverfahren geeignet. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten zeigte, dass die eingesetzten Mikroorganismen nicht durch den Farbstoff SYTO RNASelect™ Green Fluorescent Cell Stain angefärbt werden konnten. Die Populationen im unteren linken Quadranten wurden als Hintergrundrauschen interpretiert. Sollten die Zellpopulationen angefärbt worden sein, wären sie nicht vom Rauschen unterscheidbar sondern überlagert gewesen.

8.6.3 Ergebnisse der qualitativen Analyse mittels Antikörper

8.6.3.1 Identifizierung von Mikroorganismen mittels FITC-gelabelter Antikörper

Bei Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen auf Oberflächen ist nicht nur die Anzahl an Mikroorganismen relevant, sondern auch die Zusammensetzung der mikrobiellen Population. Der Nachweis individueller Spezies ist durch den Einsatz von Chromophoren, die hochselektiv an einen relevanten Zielmikroorganismus binden, möglich. Die

spezifische Bindung des Farbstoffes an ein Bakterium oder eine Hefe kann z. B. durch den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoff-gelabelten Antikörpers erfolgen. Die Antikörper sind dabei gegen ein bestimmtes Oberflächenprotein (Antigen) gerichtet und binden hochspezifisch an den entsprechenden Mikroorganismus.

Zum Einsatz kamen in diesem Forschungsprojekt zwei mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gelabelte Antikörper, die gegen das Protein A auf der Oberfläche von *Staphylococcus aureus* gerichtet waren bzw. an ein Antigen auf der Oberfläche von *Candida albicans* banden.

8.6.3.2 Einfluss von ungebundenem Antikörper auf die durchflusszytometrische Messung

Es wurde untersucht, welchen Einfluss ungebundene Antikörper in einer Probe bei einer Messung im Durchflusszytometer zeigen. Da in diesem Versuch nur der Effekt ungebundener Antikörper untersucht werden sollte, wurden die Antikörper-Lösungen mit partikelfreiem Wasser 1:100 bzw. 1:500 verdünnt und durchflusszytometrisch analysiert.

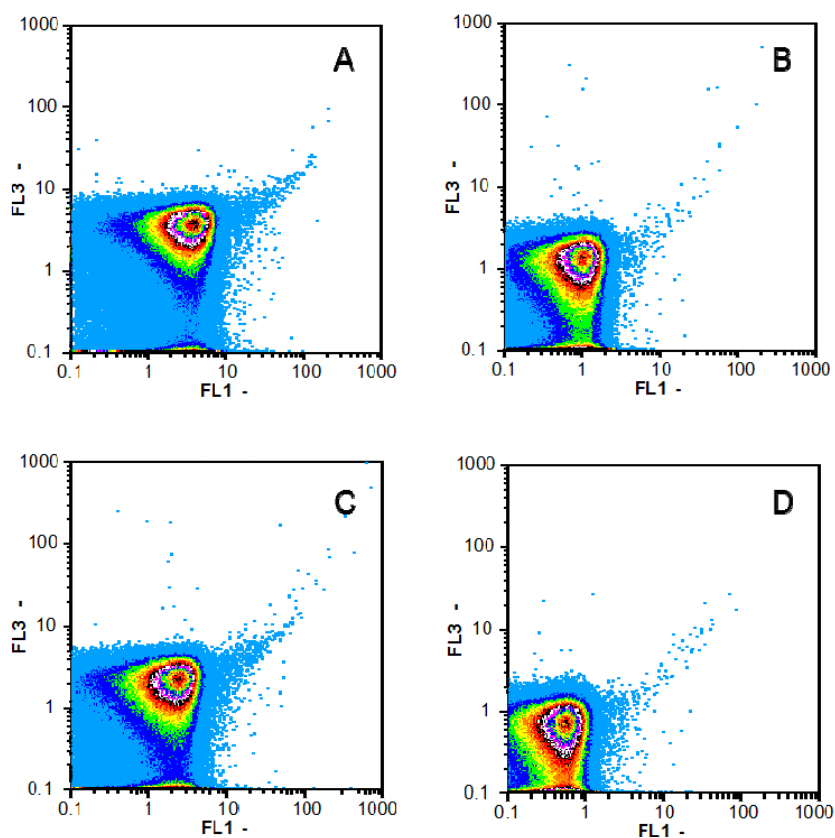


Abbildung 70: Durchflusszytometrische Analyse von Proben wässriger Lösungen mit FITC-gelabelten Antikörpern.

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A) und (B): *C. albicans* Antikörper, (C) und (D): *S. aureus* Antikörper, (A) und (C): Verdünnung 1:100 (10 µl/ml Antikörper-Lösung), (B) und (D): Verdünnung 1:500 (2 µl/ml Antikörper-Lösung).

Die Dotplots in Abbildung 70 zeigen die Analyseergebnisse für ungebundene Antikörper in der Messlösung. In den höher konzentrierten Proben (A und C) wird fast der komplette untere, linke Quadrant des Dotplots ausgefüllt. Bei einem Verhältnis von 1:500 (B und D) ist das Signal zwar etwas schwächer, im Plot nimmt die Antikörper-Population aber immer noch eine relativ große Fläche ein. Aus diesem Grund wurde untersucht, bis zu welcher Antikörper-Konzentration Zellen im Durchflusszytometer erfasst werden können, ohne dass es zu einem störenden Hintergrundsignal durch freie Antikörper kommt. Die Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration ist in Abbildung 71 am Beispiel von *C. albicans* dargestellt.

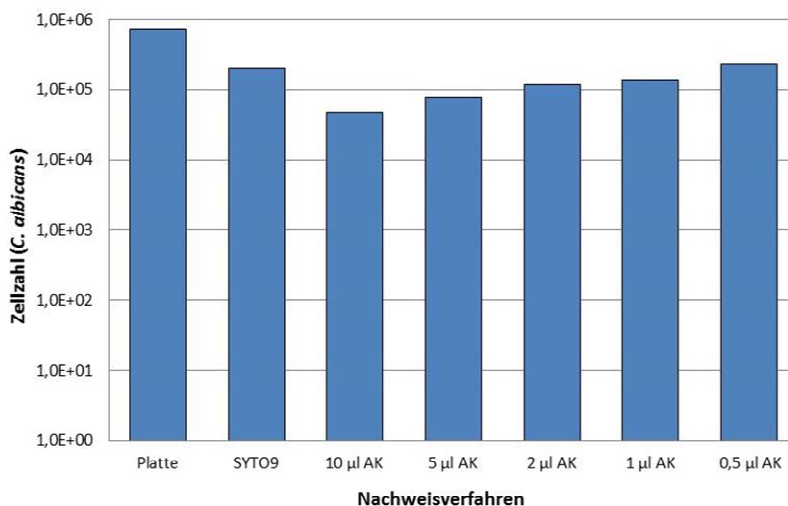


Abbildung 71: Vergleich verschiedener Verfahren zum Nachweis von *C. albicans* Zellen.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Zellsuspensionen auf Nährböden ausplattiert (Platte), mit dem Farbstoff SYTO9[®] gefärbt und mit unterschiedlichen Volumina einer Lösung mit Antikörpern (AK), die gegen ein Antigen von *C. albicans* gerichtet waren, inkubiert. Dargestellt sind die mit der jeweiligen Methode ermittelten Zellzahlen pro ml Suspension.

Die Lebendzellzahl der eingesetzten Suspension, bestimmt durch Kultivierung und Auszählung auf Nährböden betrug $7,3 \times 10^5$ Zellen/ml. Vergleichbare Werte wurden sowohl bei der Färbung mit SYTO9[®] erzielt ($2,0 \times 10^5$ Zellen/ml) als auch beim Einsatz des *C. albicans* Antikörpers ($2,3 \times 10^5$ Zellen/ml) in einer Verdünnung von 1:2000 (0,5 µl/ml Antikörper-Lösung). Abbildung 72 zeigt Dotplots zu verschiedenen Verdünnungen einer Zellsuspension von *C. albicans*, die in ihrer höchsten Konzentration (10^6 Zellen/ml) mit Antikörpern (Verdünnung 1:2000) gefärbt und anschließend verdünnt (10^5 bis 10^1 Zellen/ml) im Durchflusszytometer gemessen wurde. In der höchsten Zellkonzentration mit 10^6 Zellen/ml ist die *Candida albicans*-Population noch nicht eindeutig vom Hintergrundrauschen des ungebundenen Antikörpers zu unterscheiden. In der um den Faktor 10 verdünnten Probe lässt sich die Hefe (rot markiert) trotz des Signals durch den freien Antikörper eindeutig identifizieren. Eine optimale Eingrenzung der Population ist in den Verdünnungen 10^4 Zellen/ml und 10^3 Zellen/ml möglich, bei 10^2 Zellen/ml und 10^1 Zellen/ml sind nur noch wenige Signale zu erkennen.

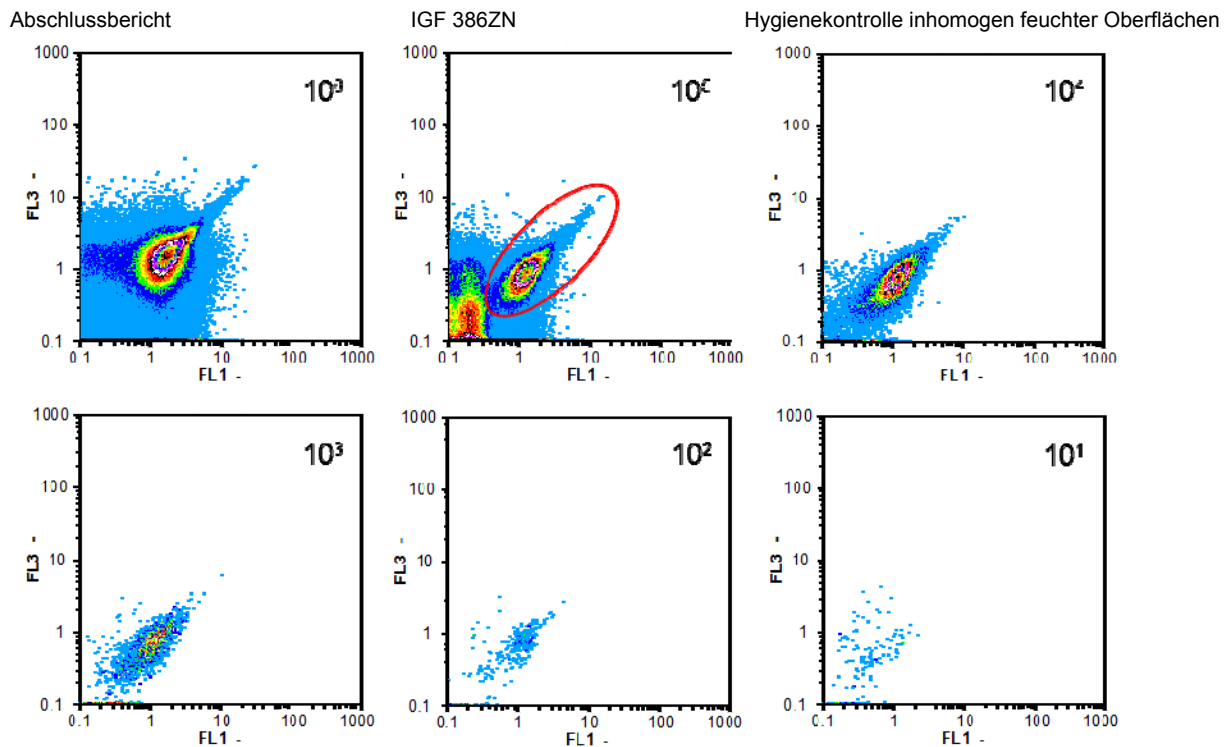


Abbildung 72: Durchflusszytometrische Analyse von Suspensionen mit *C. albicans*.

Die Färbung mit dem FITC-Antikörper (Verdünnung 1:2.000) erfolgte bei der Probe mit der höchsten Zellkonzentration (10^6 Zellen/ml); die verdünnten Suspensionen wurden aus dieser gefärbten Probe hergestellt. In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. Die Population von *C. albicans* wurde bei der 10^5 Zellen/ml Probe rot markiert, um die Abgrenzung gegenüber dem freien Antikörper zu verdeutlichen.

8.6.3.3 Untersuchungen zur Selektivität der Antikörper

Um die Selektivität der Antikörper zu untersuchen, wurden diese nicht nur mit den jeweiligen Zielorganismen eingesetzt, sondern auch mit anderen Mikroorganismen inkubiert. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Spezies *E. coli*, *S. aureus* und *S. cerevisiae* mit dem Antikörper gegen *C. albicans* inkubiert (Verhältnis 1:1000, 10^6 Zellen/ml) und durchflusszytometrisch in verschiedenen Verdünnungsstufen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass bei keinem der getesteten Fremdorganismen eine Markierung durch den *C. albicans*-spezifischen Antikörper stattfand (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch wurde ebenfalls mit dem *S. aureus*-Antikörper durchgeführt. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass der Antikörper spezifisch an *S. aureus*-Zellen nicht aber an andere Mikroorganismen gebunden hatte (Daten nicht gezeigt). Somit konnten keine Kreuzreaktionen der untersuchten Antikörper mit Antigenen anderer Mikroorganismen nachgewiesen werden.

8.6.4 Einfluss von Spülflüssigkeiten, Tensiden und Schmutzrückständen auf die Messung im Durchflusszytometer

8.6.4.1 Durchflusszytometrische Messung von Mikroorganismen in NaCl-Lösung und in demineralisiertem Wasser

Es wurde ermittelt, welche Spülflüssigkeit zur Ablösung von Mikroorganismen sich für das angestrebte neue Verfahren, bzw. die nachfolgende Analyse in einem Durchflusszytometer am besten eignete. Zum Vergleich der durchflusszytometrischen Messung mit NaCl-Lösung und autoklaviertem, demineralisiertem Wasser wurden zwei verschiedene Mikroorganismen (*S. aureus* und *C. albicans*) mit unterschiedlichen Färbereagenzien angefärbt. Es wurden die entsprechenden FITC-gelabelten Antikörper, sowie SYTO9® und Propidiumiodid verwendet. Für die Färbung mit Propidiumiodid wurden die Mikroorganismen vor der Färbung durch die Behandlung mit 70 %-igem Ethanol abgetötet. Die Messungen wurden in 0,85 %-iger NaCl-Lösung oder in demineralisiertem Wasser durchgeführt. Zur Kontrolle wurden die Lebendkeimzahlen der beiden Mikroorganismen mit Hilfe des klassischen Plattenverfahrens bestimmt. In Abbildung 73 sind die Ergebnisse dieses Versuchs in einem Diagramm dargestellt.

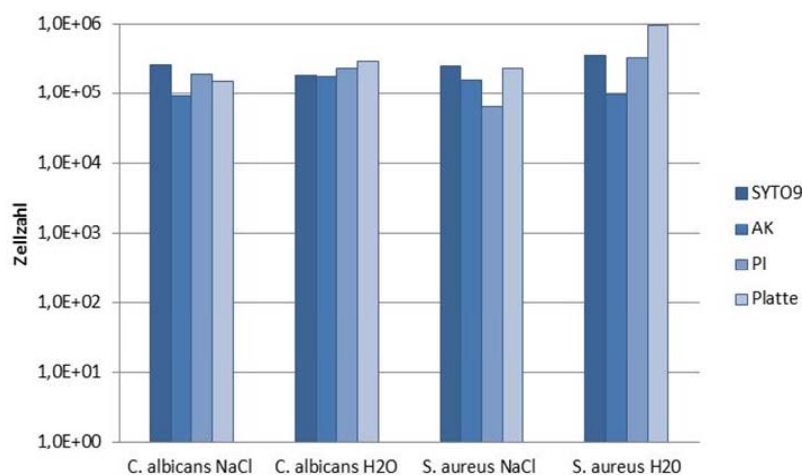


Abbildung 73: Zellzahlen von *C. albicans* und *S. aureus* nach der durchflusszytometrischen Messung, in NaCl-Lösung (0,85 %) oder in vollentsalztem, autoklaviertem Wasser.

Es konnten keine wesentlichen Unterschiede für die Vermessung von Suspensionen in vollentsalztem und autoklaviertem Wasser oder in 0,85 %-iger NaCl-Lösung festgestellt werden.

8.6.4.2 Einfluss von Tensiden auf die Messung im Durchflusszytometer

Auf gereinigten und desinfizierten Oberflächen können verfahrensbedingt Rückstände von Inhaltsstoffen der eingesetzten Reinigungsmittel verbleiben. Diese Substanzen können bei einer anschließend durchgeführten Oberflächenbeprobung mit aufgenommen werden. Dies gilt z. B. für Tenside, die jedoch auch ganz gezielt einer Spülflüssigkeit zugesetzt werden können, um die Oberflächenspannung des Wassers zu erniedrigen und so die Aufnahme von Mikroorganismen in die Spülflüssigkeit zu begünstigen. Um den Einfluss von oberflächenaktiven Substanzen auf die Färbung und Messung einer Zellsuspension zu untersuchen, wurden verschiedene Tenside (Tween® 80, Triton® X-100) sowie PEG-400 durchflusszytometrisch analysiert. Die Stoffe wurden zunächst in Konzentrationen von 0,01 bis 1 % in partikelfreiem Wasser und unter Zugabe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe SYTO9® und PI vermessen.

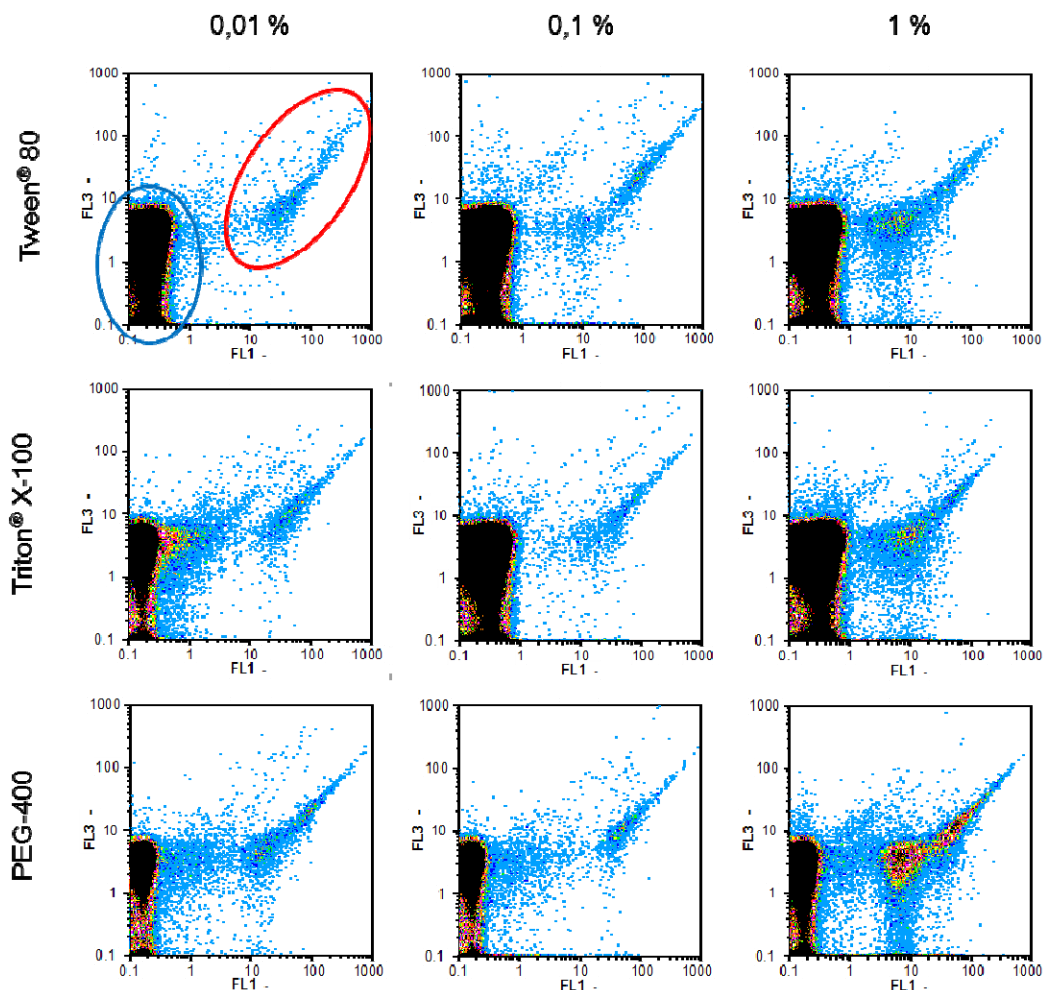


Abbildung 74: Einfluss von Tensiden (Tween® 80, Triton® X-100) und des Polymers PEG-400 auf die durchflusszytometrische Messung. Es wurden Konzentrationen von 0,01 bis 1 % (v/v, bzw. w/v) in partikelfreiem Wasser angesetzt und mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9® und PI inkubiert. Aufgetragen sind die Kanäle der grünen (FL1) und roten (FL3) Fluoreszenz. Blau umkreist ist das Hintergrundrauschen, das auf die Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen ist. Rot markiert ist eine Population, die durch die zugesetzten Stoffe verursacht wird und fälschlicherweise als mikrobielle Population interpretiert werden kann.

Wie in den Dotplots von Abbildung 74 zu erkennen ist, verursachen die beiden getesteten Tenside und das PEG-400 Hintergrundsignale, die sich auf den Dotplots von der Mitte aus in den rechten oberen Bereich ziehen. Somit sind diese untersuchten Stoffe nicht geeignet, um in einer Spülflüssigkeit eingesetzt zu werden, da die Gefahr einer Verwechslung mit Mikroorganismenpopulationen groß ist. Dies betrifft insbesondere den Nachweis von *C. albicans*, da hier die Population der lebenden Zellen fast deckungsgleich mit den „Interferenz“-Signalen liegt (vgl. Abbildung 63). Der Einfluss von in der Praxis verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmitteln, bzw. deren Rückständen auf eine durchflusszytometrische Analyse wird im nächsten Abschnitt untersucht.

8.6.4.3 Einfluss verschiedener Reinigungs- und Desinfektionsmittelrückstände auf die Lebend/Tot-Färbung

Bei der Reinigung und Desinfektion von Oberflächen in der Lebensmittelindustrie oder im Gesundheitswesen können Reste von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln zurückbleiben und eine zytometrische Messung möglicherweise negativ beeinflussen. Es wurde der Einfluss von insgesamt vier verschiedenen Reinigungs- und Desinfektionsmitteln, die üblicherweise bei der Reinigung und Desinfektion von unterschiedlichen Oberflächen eingesetzt werden, auf den durchflusszytometrischen Nachweis von Mikroorganismen untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Lösungen der Reinigungs- und Desinfektionsmittel (Konzentrationen 10 % und 3 %) mit in autoklaviertem, vollentsalztem Wasser vermessen und die Dotplots analysiert. Wie in den Dotplots von Abbildung 75 zu sehen, waren die durch die Reinigungs- und Desinfektionsmittel bedingten Matrixeffekte vor allem auf den unteren linken Quadranten beschränkt, und lagen somit nicht im Bereich der zu quantifizierenden mikrobiellen Populationen. Dabei zeigten die beiden auf quartären Ammoniumverbindungen basierenden Desinfektionsmittel 1 und 2 trotz geringer Konzentration (3 %) ein sehr viel stärkeres „Interferenz“-Signal als die beiden getesteten Reinigungsmittel 1 und 2 (Konzentration jeweils 10 %).

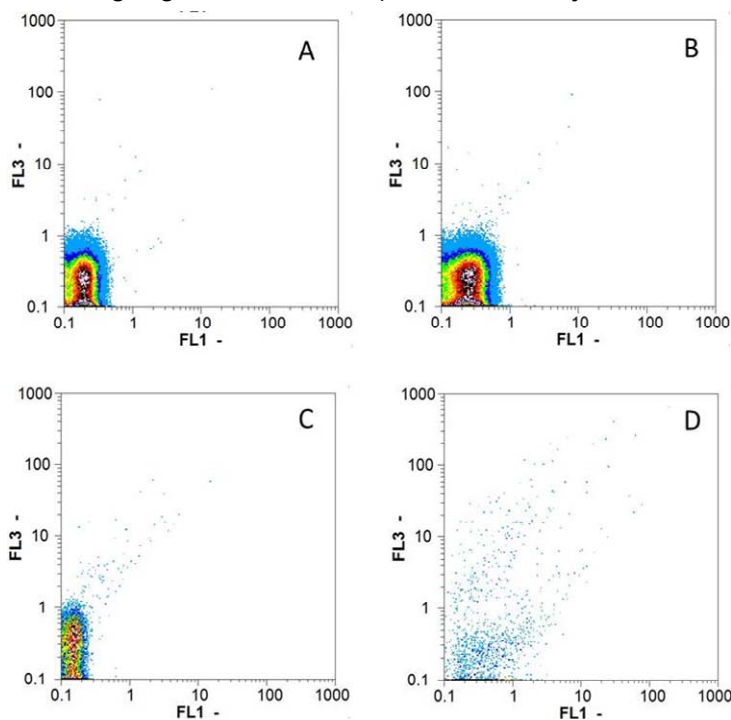


Abbildung 75: Einfluss von zwei Reinigungs- und zwei Desinfektionsmitteln auf die Analyse im Durchflusszytometer.

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A): Desinfektionsmittel 1 (B): Desinfektionsmittel 2 (C): Reinigungsmittel 1 (D): Reinigungsmittel 2

Der Einfluss der getesteten Desinfektionsmittelreste auf die Messung mittels Durchflusszytometer war vernachlässigbar gering. In den durchgeführten Versuchen wurden gezielt erhöhte Desinfektions- und Reinigungsmittelkonzentrationen (3 % bis 10 %) eingesetzt, um Trocknungsrückstände auf Oberflächen zu simulieren. Trotzdem blieb deren Einfluss in Form von Matrixeffekten (linker, unterer Quadrant) gering.

Zusätzlich wurden Versuche mit den Mikroorganismen *E. coli* K12 und *C. albicans* in Anwesenheit der beiden Desinfektionsmittel 1 und 2 durchgeführt. Diese wurden für 30

min bei unterschiedlichen Desinfektionsmittelkonzentrationen (0,25 %, 1,5 % und 3 %) inkubiert, anschließend mit SYTO9® und PI gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert. Zur Kontrolle wurde ein Teil ungefärbt auf Platten ausgestrichen. Auf den Dot-plots zeigte sich für beide Mikroorganismen eine definierte tote aber keine lebende Population (Daten nicht gezeigt). Auch auf den Kontrollplatten waren keine Keime nachweisbar, so dass von einer kompletten Inaktivierung der eingesetzten Mikroorganismenprobe ausgegangen wurde.

8.6.4.4 Einfluss von Blut und Ölrückständen auf die Lebend/Tot-Färbung im Durchflusszytometer

Neben Reinigungs- und Desinfektionsmitteln könnten auch andere betriebsbedingte Rückstände die Probenmessung im Durchflusszytometer verfälschen. In der Lebensmittelindustrie und im Gesundheitswesen häufig auftretende Schmutzrückstände, wie z. B. Blut oder Öl, können auf den Oberflächen antrocknen, durch die Behandlung mit dem Schaumpad oder Hydrozyklon wieder gelöst werden, und so Einfluss auf die zytometrische Analyse ausüben. Um eine solche Verschmutzung zu simulieren, wurden Blut und Öl in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit den Fluoreszenzfarbstoffen separat im Durchflusszytometer analysiert. In einem weiterführenden Versuch wurden Blut und Öl in verschiedenen Konzentrationen zu den Mikroorganismen *S. aureus* und *C. albicans* zugegeben und nach Färbung mit SYTO9® und Propidiumiodid im Durchflusszytometer vermessen und ebenfalls analysiert. Für die Versuche wurden Blut- und Ölkonzentrationen von 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % und 10 % verwendet.

Blutrückstände:

Die beiden Mikroorganismen *C. albicans* und *S. aureus* wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Blut versetzt, mit dem Lebendfarbstoff SYTO9® gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der Mikroorganismensuspension aus derselben Probe ohne jeglichen Blutzusatz angefärbt und ebenfalls durchflusszytometrisch analysiert. Parallel dazu wurde ein Aliquot der Ausgangssuspension auf Platten ausgestrichen und die Lebendzellzahl ermittelt. Die Ergebnisse der Analyse und Auszählungen für *S. aureus* und *C. albicans* mit Blutrückständen sind in Abbildung 76 und Abbildung 77 dargestellt.

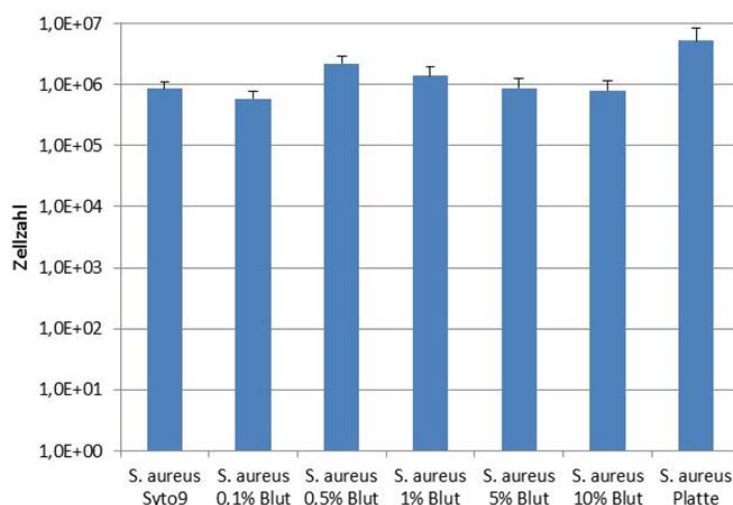


Abbildung 76: Diagramm der *S. aureus*-Zellzahlen mit Anreicherungen unterschiedlicher Blutkonzentrationen (0,1 % bis 10 %). (Fehlerbalken: SD, n=3).

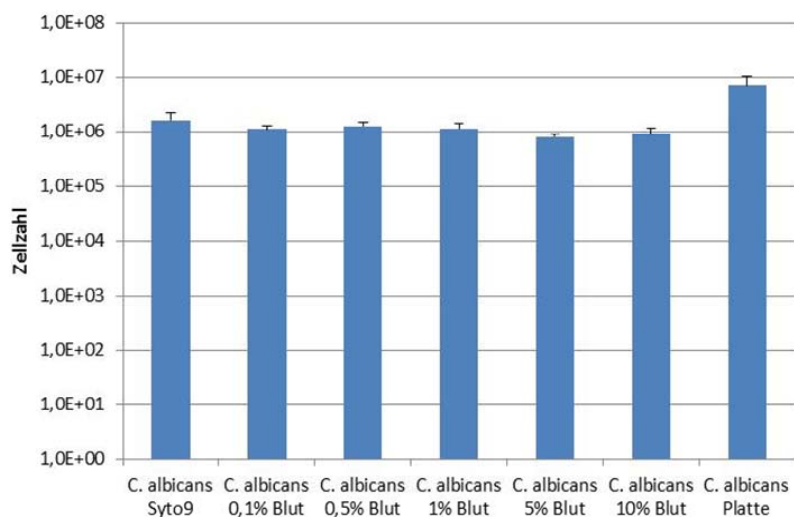


Abbildung 77: Diagramm der *C. albicans*-Zellzahlen mit Anschmutzungen unterschiedlicher Blutkonzentrationen (0,1 % bis 10 %). (Fehlerbalken: SD, n=3).

Wie in den beiden Diagrammen zu erkennen ist, hatten unterschiedliche zugesetzte Blutmengen keinen Einfluss auf den Nachweis von *S. aureus* und *C. albicans*. Die per Durchflusszytometrie ermittelten Zellzahlen lagen sowohl bei der Probe ohne jeglichen Blutzusatz, als auch bei den Proben mit den unterschiedlichen Blutkonzentrationen in einem ähnlichen Bereich von ca. 10^6 Zellen und differierten nicht mehr als um $\pm 0,2$ \log_{10} -Stufen.

Bei großen Zellzahlen (10^6 Zellen/ml) und hohen Blutkonzentrationen können sich die Mikroorganismenpopulationen mit den Matrixeffekten des Bluts und den Farbstoffen prinzipiell überlagern (Daten nicht gezeigt). Ab Zellzahlen von 10^5 Zellen/ml waren die Mikroorganismenpopulationen gut von den Hintergrundeffekten abgegrenzt und auswertbar. Als Beispiel sind in Abbildung 78 zwei Dotplots der Analyse von 10^5 *C. albicans*-Zellen/ml sowohl mit Blut als auch ohne Blutzusatz dargestellt. Die lebenden *C. albicans*-Zellen sind grün, die toten Zellen sind rot umkreist. Die im Dotplot erkennbare Population toter Zellen stellt im Vergleich zur Population der lebenden Zellen nur einen kleinen prozentualen Anteil dar, der auf natürlichen Absterbeereignissen beruht. Im linken, unteren Quadranten treten die „Interferenz“-Signale des Blutes und der zugegebenen Farbstoffe auf.

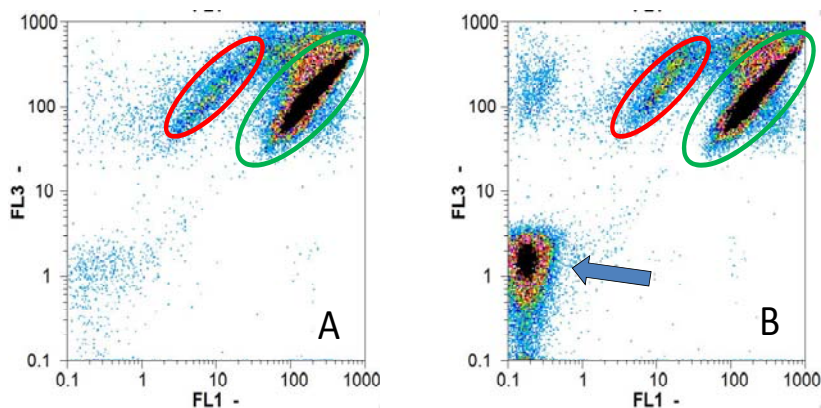


Abbildung 78: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von *C. albicans* (10^5 Zellen) ohne Blutzusatz (A) und mit 0,1 % Blut in der Probe (B).

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. Das „Interferenz“-Signal durch Blut ist mit einem Pfeil markiert.

Ölrückstände:

Die Mikroorganismen wurden mit verschiedenen Ölkonzentrationen (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % und 10 %) versetzt, mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO9[®] gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Auch hier wurden die beiden Mikroorganismen *S. aureus* und *C. albicans* für die Experimente eingesetzt. Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Aliquot jedes Keims unbehandelt angefärbt und vermessen, sowie eine Teilprobe per Plattenverfahren analysiert. In den beiden Diagrammen von Abbildung 79 und Abbildung 80 sind die Zellzahlen der beiden Mikroorganismen in Abwesenheit und in Anwesenheit verschiedener Ölkonzentrationen aufgetragen.

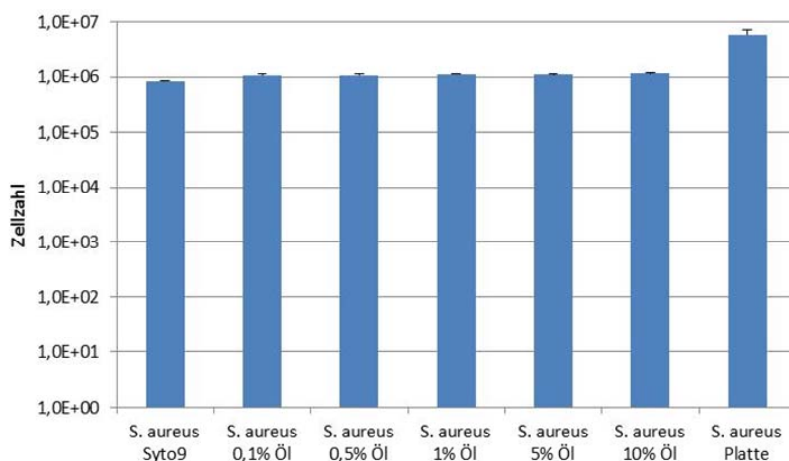


Abbildung 79: Diagramm der *S. aureus*-Zellzahlen in Anwesenheit von unterschiedlichen Ölkonzentrationen. (Fehlerbalken: SD, n=3).

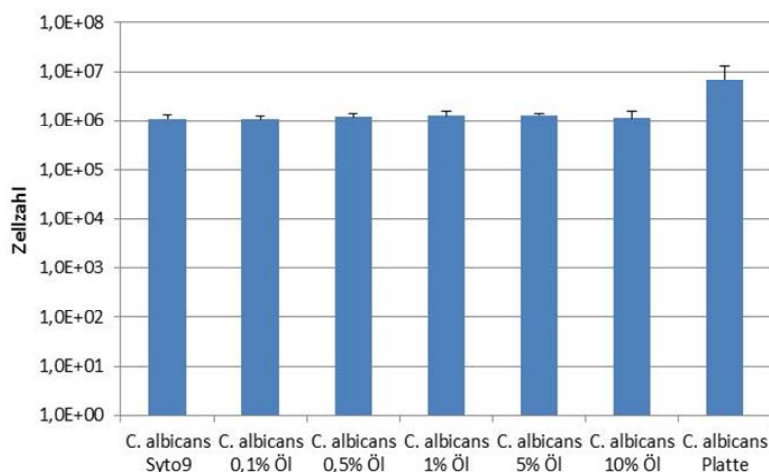


Abbildung 80: Diagramm der *C. albicans*-Zellzahlen in Anwesenheit von unterschiedlichen Ölkonzentrationen. (Fehlerbalken: SD, n=3).

Die Ölrreste hatten keinen Einfluss auf die detektierbare Mikroorganismenzahl. In Abbildung 81 sind Dotplots von 10^5 *C. albicans*-Zellen sowohl mit als auch ohne An-schmutzung mit Öl dargestellt. Lebende Zellen (grün) als auch toten Zellen (rot) waren eindeutig identifizierbar. Das Öl hatte demnach keinen signifikanten negativen Effekt auf die Färbung mit SYTO9[®] und Propidiumiodid und die anschließende Messung mit dem Durchflusszytometer.

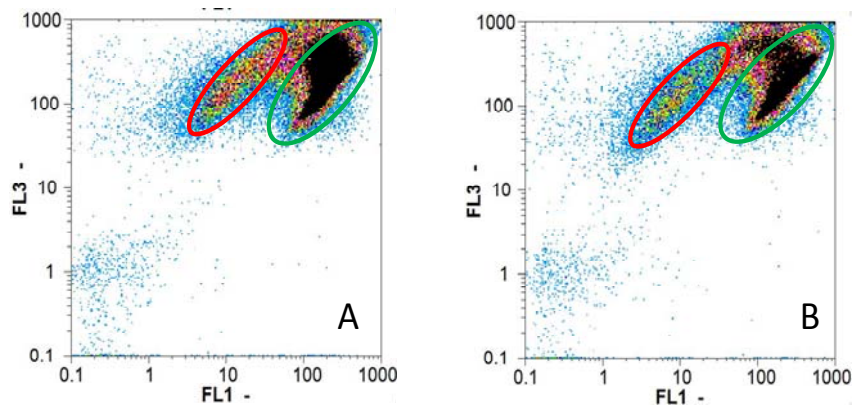


Abbildung 81: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von *C. albicans* (10^5 Zellen) ohne Öl-Zusatz (A) und mit 0,1 % Öl in der Probe (B).

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen.

Für die Quantifizierung der mit dem Durchflusszytometer gemessenen Suspensionen wurde im Vergleich zur Zellzahlbestimmung mittels klassisch mikrobiologischer Auszählung eine Reduktion der Zahl teilungsfähiger Zellen um etwa $0,8 \log_{10}$ -Stufen beobachtet. Dies wurde mutmaßlich durch die Inkubation der Zellen in partikelfreiem VE-Wasser ohne Puffersalze und Nährstoffe verursacht. Es handelt sich somit um einen systematischen Fehler der durch das experimentelle Design verursacht wurde und keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Einfluss von Blut- und Ölschmutzungen auf die Antikörperfärbung

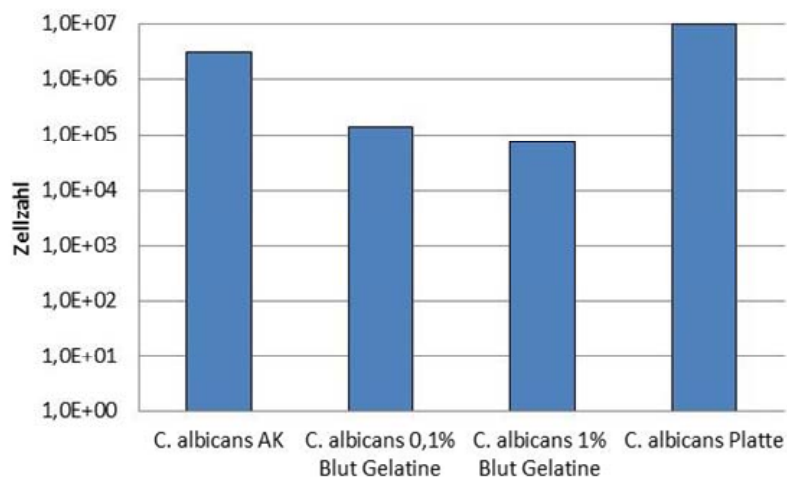
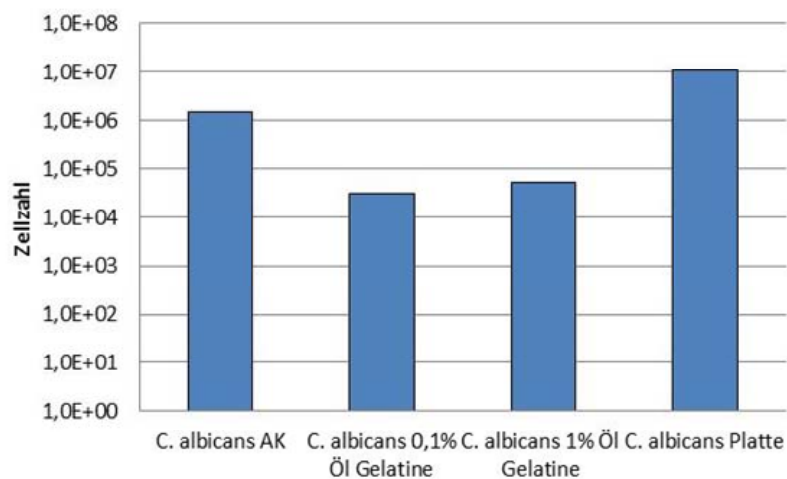
In einem weiteren Versuch wurde überprüft, inwiefern Blut- und Ölrückstände die Färbung bzw. den Nachweis der Mikroorganismen durch Antikörper beeinflussen können. Dazu wurde eine Mikroorganismensuspension mit verschiedenen Blut- und Ölschmutzungen (0,1 und 1 %) auf eine Edstahlfläche aufgebracht, mit einem Gelatineschaumpad aufgenommen und nach der Aufbereitung mit FITC-gelabelten *S. aureus*- und *C. albicans*-Antikörpern markiert.

Blutanschmutzung:

Es trat eine deutliche Reduktion der quantifizierbaren Mikroorganismenzahl nach der Anschmutzung mit Blut in den Konzentrationen 0,1 und 1 % im Vergleich zu Testansätzen ohne Blutzusatz auf (Abbildung 82). Die nachgewiesenen Zellzahlen lagen ca. $1,5 \log_{10}$ -Stufen unter den Zellzahlen, die ohne Blutanschmutzung per Antikörperfärbung ermittelt wurden, und zwei \log_{10} -Stufen unter der Zellzahl der Ausgangslösung, die mit dem Plattenverfahren nachgewiesen wurden.

Ölschmutzung:

Auch in Gegenwart einer Ölschmutzung wurden deutliche Unterschiede zu den normalen Antikörperfärbungen beobachtet (Abbildung 83). Durch den Zusatz von Öl mit den Konzentrationen von 0,1 % und 1 % zeigte sich eine deutliche Reduktion der detektierbaren Mikroorganismenzahl. Diese lag im Schnitt um ca. $1,5 \log_{10}$ -Stufen niedriger als die der normalen Antikörperfärbung ohne Anschmutzung, und bei fast $2,5 \log_{10}$ -Stufen unter der Ausgangszellzahl, bestimmt mittels Ausplattierung.

Abbildung 82: Einfluss von Blut auf die Antikörperfärbung von *C. albicans*.Abbildung 83: Einfluss von Öl auf die Antikörperfärbung von *C. albicans*.

Bei mit Blut und Öl angeschnitzten Oberflächen zeigte die Quantifizierung von Mikroorganismen per Antikörperfärbung falsch-negative Ergebnisse, sodass die Anzahl der Mikroorganismen unterschätzt wurde. Dieses Phänomen wurde auch bei der Färbung mit dem *S. aureus*-Antikörper beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine solche Reduktion in der nachweisbaren Zellzahl wurde bei der Lebend/Tot-Färbung mit SYTO9® und Propidiumiodid in Anwesenheit unterschiedlicher Blut- oder Ölrückstände, nicht beobachtet.

8.6.5 Einbindung in Gelatinematrixes (indirekte Probenahme)

8.6.5.1 Probenahme durch Aufnahme von Mikroorganismen in Gelatinematrixes

Die indirekte Probenahme von Keimen mit Hilfe eines Gelatineschaumpads stellte einen substantiellen Teil des Hygienemonitoring-Verfahrens dar. Es wurden insgesamt drei verschiedene Gelatinematrixes für dieses Probenahme-Verfahren eingesetzt. Zwei unterschiedliche Schaumpads wurden von der FS 3 (DIL) entwickelt. Dabei hatten beide Gelatinematerialien einen Bloomwert von 250. Der Bloomwert beschreibt die Ge-

lierkraft einer Gelatine. Im Allgemeinen kann ausgesagt werden, dass je höher der Bloomwert einer Gelatine ist, desto größer ist auch die Gelierkraft eines Gels. Dabei hängt die Gelfestigkeit einer Gelatine aber nicht nur von dem Bloomwert, sondern auch von seiner Konzentration ab. Die Bloomwerte handelsüblicher Gelatinen liegen dabei meist zwischen 60 und 300 Bloom. Ein dritter Schaumpad-Typ wurde von der Industrie (Gelita AG, Gelita Spon®) als vorhabenbezogene Aufwendung der Wirtschaft zur Verfügung gestellt.

8.6.5.2 Verflüssigung der Gelatinematrix und Einfluss von Proteinase K

Zur Untersuchung von Methoden zur Verflüssigung der Gelatinematrix wurde zunächst untersucht, ob die Gelatineschaumpads durch Erwärmen aufgelöst werden konnten. Der Auflöseprozess sollte bei Temperaturen von höchstens 40 °C durchgeführt werden, um eingebundene Mikroorganismen nicht thermisch zu inaktivieren. Bei einer Temperatur von 40 °C und einer Inkubationszeit von drei Stunden konnte keine vollständige Auflösung der Gelatineschaumpads herbeigeführt werden. Daher wurde eine enzymatische Auflösung der Schaummatrices mittels Proteinase K durchgeführt. Durch Zugabe einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml; etwa 20 µl Proteinase K-Lösung pro cm³ Gelmatrix) konnten die eingesetzten Schaumpads innerhalb von 30 bis 90 Minuten komplett verflüssigt und im Durchflusszytometer analysiert werden.

In einer Vorversuchsserie wurde überprüft, ob der Einsatz von Proteinase K möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen hatte. Es wurden fünf Mikroorganismen, *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. atrophaeus* und *L. lactis* getestet. Dazu wurde je 1 ml der entsprechenden Mikroorganismenkultur in autoklaviertem und demineralisiertem Wasser mit 25 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ml) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Aus der Suspension wurde in zwei Verdünnungen die Zellzahl über Ausplattierung bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Mikroorganismenkulturen ebenso für 2 h bei 37 °C inkubiert, eine Verdünnungsreihe hergestellt und ebenfalls auf Platten ausgestrichen und inkubiert.

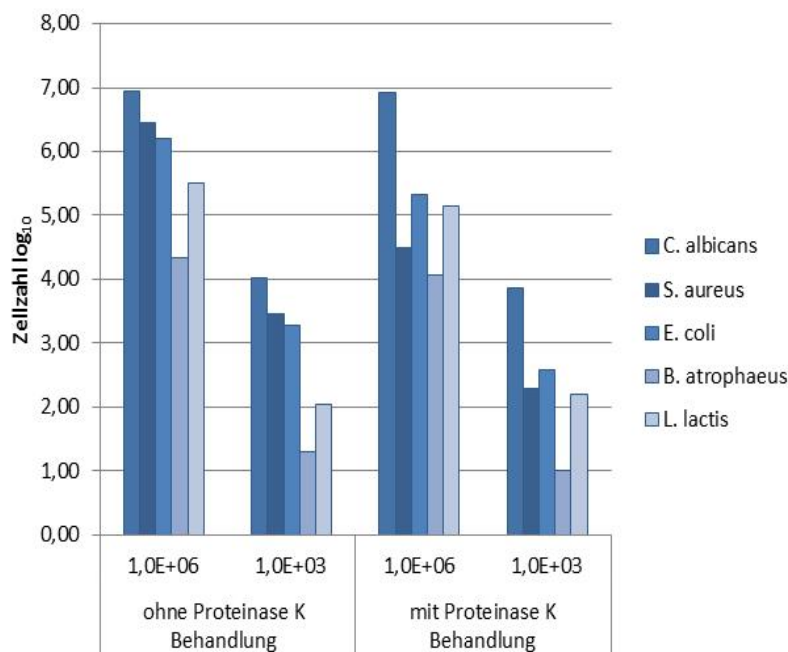


Abbildung 84: Einfluss von Proteinase K (20 mg/ml) auf fünf ausgewählte Mikroorganismen (*C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. atrophaeus* und *L. lactis*).

Die Zugabe von Proteinase K hatte mit Ausnahme von *S. aureus* und *E. coli* keinen Einfluss auf das Überleben der Mikroorganismen (Abbildung 84). Die Zellzahlen bei den Ansätzen mit und ohne Proteinase K-Behandlung unterschieden sich bei *S. aureus* und *E. coli*. Hier lagen die Werte nach einer Behandlung mit Proteinase K um teilweise mehr als eine \log_{10} -Stufe unter der Zellzahl der Mikroorganismen ohne Proteinase K-Behandlung. Trotz dieser für lediglich einige Keimarten beobachteten Reduktion von überlebenden Zellen bleibt die Behandlung mit Proteinase K die beste verfügbare Methode zur Auflösung von Gelatinematrizes. Anders als bei den klassisch mikrobiologischen Kultivierungsverfahren zur Keimzahlbestimmung können die ggf. abgetöteten Zellen mittels Durchflusszytometrie zumindest in den Populationen tot oder mit unbekanntem Vitalitätsstatus detektiert werden.

8.6.5.3 Mikrofiltration zur Trennung von Gelatinebestandteilen und Mikroorganismen

Die durch Proteinase K-Zugabe verflüssigte Gelatine mit den eingebundenen Mikroorganismen wurde zunächst unfiltriert mit dem Durchflusszytometer analysiert. Hier zeigte sich, dass das starke Hintergrundrauschen („Interferenz“-Signale) der eingesetzten Gelatineschaumpads bzw. deren Bestandteile eine Auswertung der zytometrischen Daten sehr schwierig machte (Daten nicht gezeigt).

Die verflüssigte Gelatine wurde daher vor der durchflusszytometrischen Messung noch einmal filtriert, um für die nachfolgende Messung störende Gelatinebestandteile zu entfernen. Dazu wurde ein Celluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm verwendet. Cellulose besitzt eine sehr geringe Proteinbindungseigenschaft, so dass die gelösten Gelatinebestandteile leicht durch den Filter dringen konnten. Mikroorganismen, die in der Regel größer als 0,2 μm sind, wurden auf der Filteroberfläche zurückgehalten. Zur Filtration wurde ein Spritzen-Filtervorsatz gewählt, bei dem beliebige Filtermaterialien eingelegt werden konnten. Um mögliche Gelatinerückstände quantitativ zu entfernen, wurde der Filter mit 30 ml einer 37°C warmen 0,85 %-igen NaCl-Lösung gespült. Der Filter wurde daraufhin in dem Filterhalter gewendet und die restlichen, auf dem Filter verbliebenen Mikroorganismen mit 1 ml 0,85 %-iger NaCl-Lösung abgespült (eluiert). Die so erhaltenen Zellen wurden entweder durchflusszytometrisch oder klassisch mikrobiologisch quantifiziert.

Um zu überprüfen, ob sich die Anzahl der Mikroorganismen durch die Filtration reduzierte, wurden Filtrationsversuche mit den fünf verwendeten Mikroorganismen (*S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *B. atrophaeus* und *L. lactis*) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden jeweils fünf Mikroorganismensuspensionen definierter Zellzahl hergestellt, davon eine Hälfte wie oben beschrieben filtriert und die Eluate auf Platten ausgestrichen. Zur Kontrolle wurden die andere Hälfte der Mikroorganismensuspensionen unfiltriert in geeigneten Verdünnungen ausplattiert und die Zellzahl bestimmt.

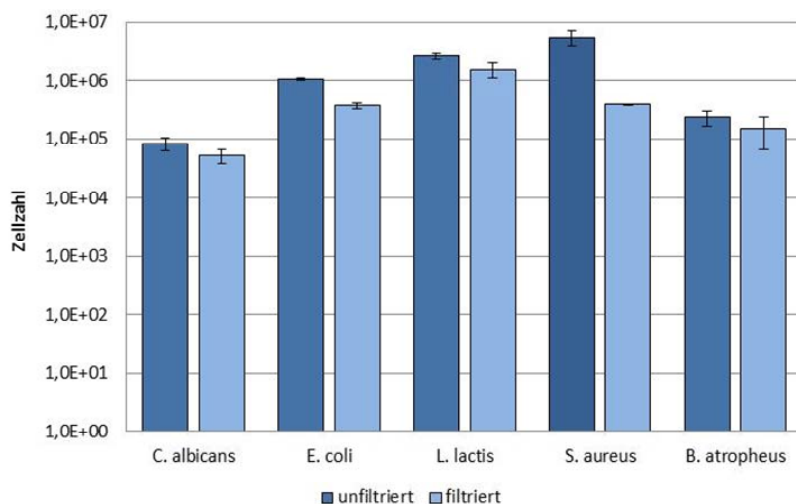


Abbildung 85: Anzahl der koloniebildenden Einheiten der fünf getesteten Mikroorganismen nach Filtration durch einen Celluloseacetatfilter im Vergleich zur direkten Zellzahlbestimmung der eingesetzten Suspensionen.

Quantifizierung mittels klassisch mikrobiologischer Ausplattierung. (Fehlerbalken: SD, n=3).

Es wurden nur geringe Verluste lebender Zellen durch den Filtrationsprozess ermittelt (Abbildung 85). Die Zellverluste von *C. albicans*, *E. coli*, *L. lactis* und *B. atropheus* lagen im Schnitt zwischen 0,2 und 0,5 \log_{10} -Stufen. Lediglich *S. aureus* hatte mit einer Reduktion der Zellzahl von etwas über einer \log_{10} -Stufe, einen etwas abweichenden Wert. Dieser negative Effekt wird jedoch durch die bessere Auswertbarkeit der durchflusszytometrischen Datensätze kompensiert und stellt eine geeignete Vorbehandlungsmethode dar.

8.6.5.4 Versuche zur Einbindung in Gelatinematrices

In einem ersten Versuch mit den neuen Gelatinematrices wurde das Einbindevermögen der Matrices für Mikroorganismen getestet. Dazu wurde eine definierte Anzahl der beiden Mikroorganismen *C. albicans* und *S. aureus* in Suspension auf eine Edelstahloberfläche aufgebracht und anschließend direkt mittels Aufdrücken eines Gelatineschaumpad beprobt („sampling“). Das Schaumpad wurde durch den Zusatz von Proteinase K verflüssigt, filtriert und mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen SYTO9[®] und PI gefärbt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die mit dem Durchflusszytometer analysiert wurde. Zur Kontrolle wurde ein gleiches Volumen der entsprechenden Mikroorganismensuspension direkt gefärbt und mit dem Durchflusszytometer vermessen (Ausgangslösung). In Abbildung 86 sind drei Dotplots der *C. albicans*-Probenahme mit einem Schaumpad mit anschließender Aufbereitung und Färbung mit SYTO9[®] und Propidiumiodid dargestellt. Die toten und lebenden *C. albicans*-Populationen sind im rechten oberen Quadranten gut zu erkennen. Im linken Quadranten liegt ein Hintergrundrauschen, verursacht durch die Gelatinebestandteile und ungebundenen Farbstoffe. Anscheinend waren bei der Mikrofiltration Gelatinebestandteile im Filtergerüst hängengeblieben, die dann zusammen mit den Mikroorganismen abgespült und der Analyse im Durchflusszytometer unterzogen wurden. Diese Matrixeffekte hatten jedoch keinen störenden Einfluss auf die Analyse.

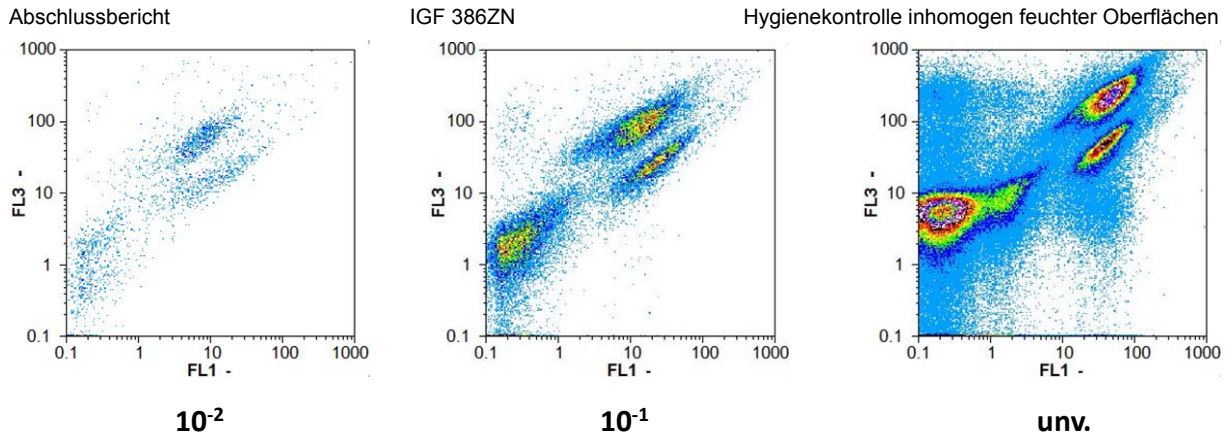


Abbildung 86: Dotplots der Lebend/Tot-Färbung einer per Schaumpad aufgenommenen *C. albicans*-Probe (10^6 Zellen/ml) nach Verflüssigung mit Proteinase K und Mikrofiltration. Aufgetragen ist die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1). Es ist die unverdünnte Probe, sowie eine 1:10 und 1:100 Verdünnung dargestellt.

Wie das Diagramm in Abbildung 87 zeigt, kam es durch die Einbindung der Mikroorganismen in das Schaumpad und die Probenvorbereitung (Verflüssigung der Gelatinematrix mit Proteinase K und Mikrofiltration) zu einer Reduktion der detektierbaren Zellzahlen. Insgesamt wurde, sowohl für *C. albicans* als auch für *S. aureus* eine um etwa eine \log_{10} -Stufe niedrigere Mikroorganismenzahl im Durchflusszytometer nachgewiesen. Eine solche Reduktion wird aber ebenfalls bei einer Beprobung mittels Abklatschplatten oder Tupfern beobachtet, hier liegen Wiederfindungsraten in der Regel zwischen 1 und 50 Prozent, so dass die Probenahme mit einer Gelatinematrix für das angestrebte neue Beprobungsverfahren äquivalent geeignet ist.

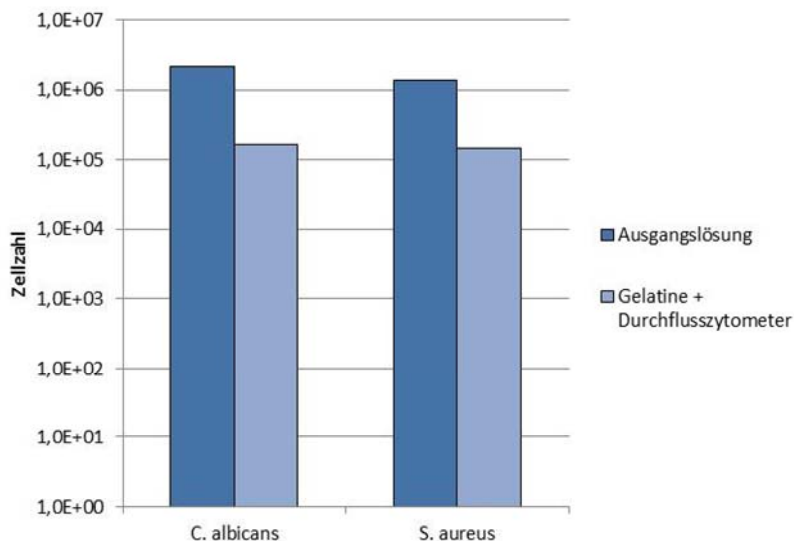


Abbildung 87: Mikroorganismenverlust durch Einbindung in eine Gelatinematrix, Behandlung mit Proteinase K und Mikrofiltration; Analyse im Durchflusszytometer im Vergleich zur direkten Analyse der Ausgangssuspension.

8.6.5.5 Einfluss von Gewicht/Druck auf die Probenahme mit einer Gelatinematrix

Es wurde untersucht, ob durch das Aufdrücken eines Gewichts eine bessere Mikroorganismeneinbindung erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurden erneut Edel-

stahloberflächen mit einer *C. albicans*-Suspension versetzt und mit Gelatinematrices beprobt. Dabei wurde eine Kraft von 5 N auf den Schaumpad ausgeübt und für 4 min inkubiert. Als Kontrolle wurde das Schaumpad für 4 min ohne zusätzliche Kraftwirkung auf die zu beprobende Fläche aufgebracht. Nach der Schaumpad-Aufbereitung (Verflüssigung und Filtration) wurden die Proben einmal gefärbt und per Durchflusszytometer untersucht und einmal direkt in geeigneten Verdünnungsstufen ausplattiert.

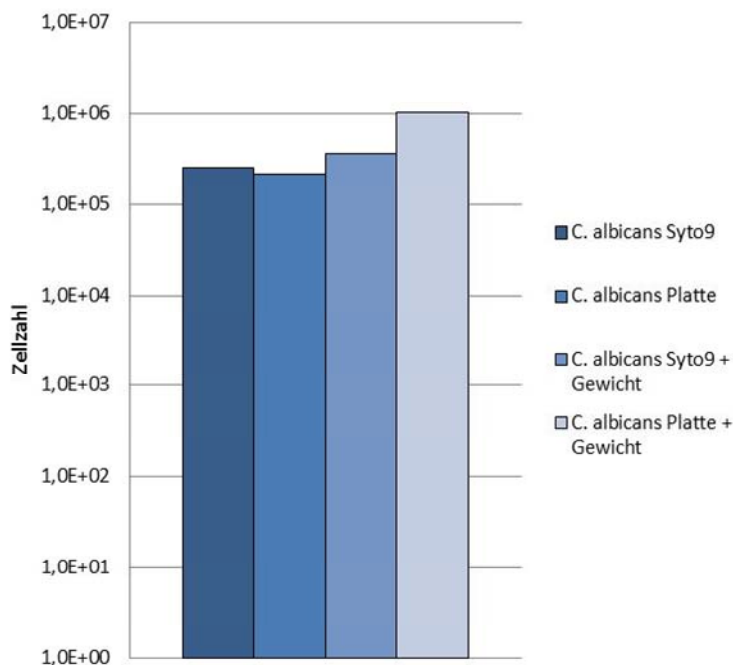


Abbildung 88: Vergleich der Einbindung von *C. albicans* in eine Gelatinematrix, mit und ohne Andruckkraft (5 N).

Durch die Applikation der Andruckkraft auf das Schaumpad konnte die Anzahl der eingebundenen Mikroorganismen lediglich unwesentlich erhöht werden (Abbildung 88). Der gleiche Versuch mit dem Bakterium *S. aureus* zeigte mit Andruckkraft ebenfalls eine etwas bessere Einbindung des Mikroorganismus in das Gelatineschaumpad als ohne (Daten nicht gezeigt). Ein Nachteil der langen Probenahme unter Druck war jedoch, dass sich bei der Beprobung von besonders feuchten und nassen Oberflächen das Schaumpad Matrixbestandteile verlieren kann, und somit Reste des Schaumes und der Flüssigkeiten auf der Oberfläche zurückblieben (Abbildung 89). Trotzdem konnte bei der Probenahme unter Druck eine bessere Wiederfindungsrate erreicht werden als ohne.

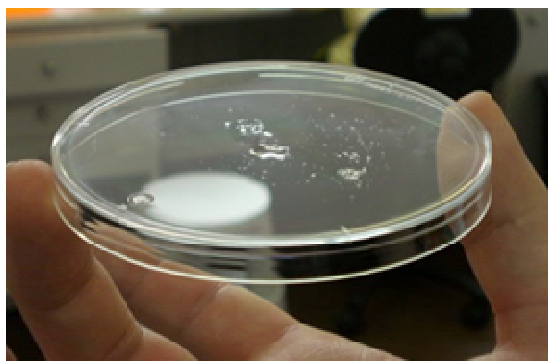


Abbildung 89: Reste von Flüssigkeiten und Gelatine bleiben nach der Probenahme auf der beprobten Oberfläche zurück.

8.6.5.6 Probenahme von angetrockneten Mikroorganismen von Edelstahl- und Kunststoffoberflächen

Da die Probenahme von flüssigen Mikroorganismenproben mittels Schaumpad zu guten Ergebnissen geführt hat, sollte ebenfalls überprüft werden, inwiefern diese Probenahme-Methode geeignet ist, bereits angetrocknete Mikroorganismen erfolgreich aufzunehmen und per Durchflusszytometrie zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden eine Kunststoff- und eine Edelstahloberfläche mit 100 µl Mikroorganismensuspension mit 10^7 Zellen (*S. aureus* und *C. albicans*) angeschmutzt und für 30 min unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde 1 ml steriles demineralisiertes Wasser als Spülflüssigkeit auf die angeschmutzte Stelle gegeben und mit einem Schaumpad (Maße 3 x 3 x 1 cm) unter leichtem Aufdrücken und Bewegen aufgesaugt. Nach Auflösen der Gelatineschaumpad mit Proteinase K und anschließender Filtration wurden die Proben entweder mit SYTO9® und Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch vermessen, oder zum Vergleich direkt auf Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die Daten dieses Versuchs sind in Abbildung 90 und Abbildung 91 zusammengefasst.

Antrocknungsversuch mit *S. aureus* auf Kunststoff und Edelstahl

Abbildung 91 zeigt, dass durch die Trocknung und die Probenahme mit dem Gelatineschaumpad eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* im Vergleich mit der Ausgangslösung von gut ein bis zwei \log_{10} -Stufen verursacht wurde. Per Plattenverfahren konnten etwas weniger Keime nachgewiesen werden als mit der durchflusszytometrischen Methode (bis zu einer \log_{10} -Stufe). Möglicherweise konnten nach der Trocknung Zellen angefärbt werden, die zwar noch lebend, aber auf den Nährmedien nicht mehr reproduktionsfähig und anzüchtbar waren. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Probenahme von *S. aureus* von einer Edelstahl- und einer Kunststoffoberfläche konnte nicht festgestellt werden. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten lag für beide Oberflächen in einem ähnlichen Bereich.

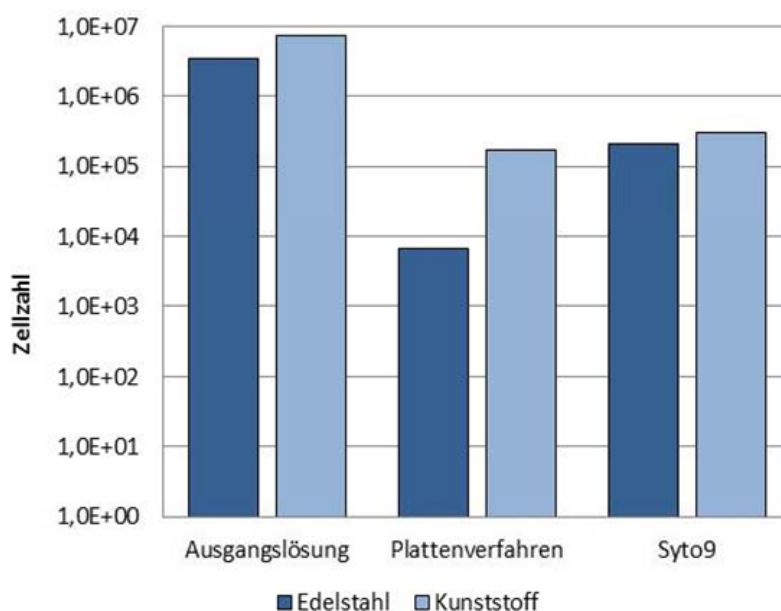


Abbildung 90: Antrocknungsversuch mit *S. aureus* auf Kunststoff und Edelstahl

Antrocknungsversuch mit *C. albicans* auf Kunststoff und Edelstahl

Der gleiche Versuch wurde ebenfalls mit dem Mikroorganismus *C. albicans* durchgeführt. Die Durchführung verlief analog zum vorherigen Trocknungsversuch mit *S. aureus*.

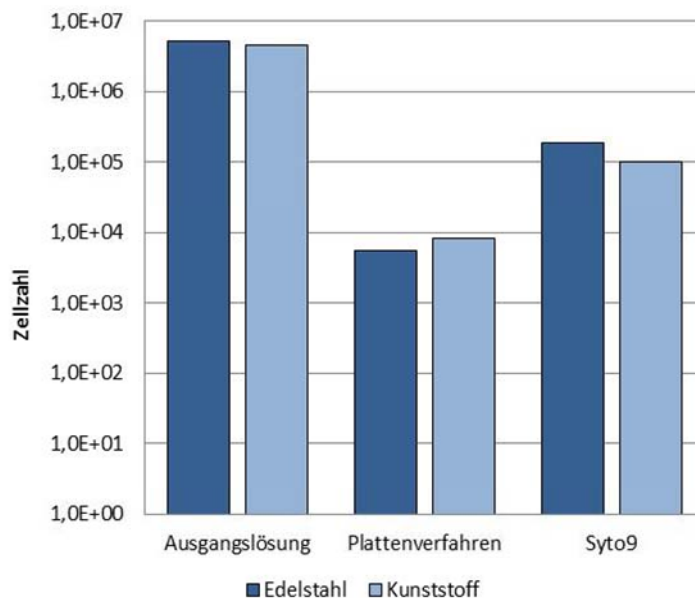


Abbildung 91: Antrocknungsversuch mit *C. albicans* auf Kunststoff und Edelstahl.

Auch bei *C. albicans* konnte eine deutliche Verringerung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach der Trocknung beobachtet werden (Abbildung 91). Hier lag die Keimreduktion bei 1,5 bis 3 \log_{10} -Stufen. Ursächlich scheint, dass *C. albicans* gegenüber Eintrocknung empfindlicher ist als *S. aureus*. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der detektierbaren Mikroorganismenzahl von Edelstahl- und von Kunststoffoberflächen.

8.7 Arbeitspaket 6: Vergleich der neu entwickelten Verfahren mit etablierten Beprobungsverfahren

Um das neu entwickelte Hygienemonitoring-Verfahren mittels Gelatinematrix und der anschließenden Analyse per Durchflusszytometer im Vergleich zu den praxisetablierten Methoden einordnen zu können, wurden komparative Versuchsserien durchgeführt. Es wurde die Beprobung einer feuchten Anschmutzung untersucht und die Resultate für das neu entwickelte Verfahren den Ergebnissen des konventionellen Abklatschverfahrens mit RODAC-Platten und der Tupfermethode gegenüber gestellt.

Beide konventionelle Verfahren werden seit vielen Jahren in zahlreichen Bereichen, wie z. B. in der Lebensmittelindustrie, im Gesundheitssektor oder auch bei professionellen Reinigungsdienstleistern zur Überprüfung von durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, bzw. zur allgemeinen Beurteilung eines Hygienezustandes eingesetzt. Das Probenahme-Verfahren mittels Abklatschplatten eignet sich dabei besonders für die Beprobung von trockenen und glatten bzw. planen Oberflächen. Bei dem Abklatschverfahren werden Nähragarmedien (sog. RODAC-Platten; Replicate Organism Detection and Counting) eingesetzt, die auf die zu beprobende Fläche aufgedrückt und sofort mit einem Deckel verschlossen werden.

Bei dem Tupfer-Verfahren wird die ausgewählte Fläche, je nach Untergrund, mittels eines trockenen oder feuchten Tupfers beprobt. Der mit der Mikroorganismensuspension beladene Tupfer wird in einem sterilen, mit einer Nährlösung gefüllten WhirlPak[®] ausgeschüttelt. Die so erhaltenen Bakteriensuspensionen werden dann wiederum auf Agar-Platten ausgestrichen und die Zellzahl bestimmt.

8.7.1 Probenahme mit Tupfer und Gelatineschaumpad

Für die vergleichenden Versuche der Probenahme mit einem sterilem Tupfer und einem Schaumpad wurden unterschiedliche Oberflächen (Kunststoff und Edelstahl) mit einer definierten Anzahl von verschiedenen Mikroorganismen (*C. albicans* und *S. aureus*) angeschmutzt. Insgesamt wurde die Oberfläche mit 1 ml einer Bakteriensuspension mit ca. 10^6 Zellen angeschmutzt. Die Beprobung erfolgte parallel sowohl mit dem Tupfer als auch mit einem Gelatineschaumpad.

Bei der Probenahme mit dem Tupfer wurde so viel Flüssigkeit wie möglich gesammelt, der Tupfer in ein steriles WhirlPak[®] überführt, mit 1 ml steriler NaCl-Lösung versetzt und ausgewalkt. Anschließend erfolgte unmittelbar die Zugabe der Fluoreszenzfarbstoffe und Analyse im Durchflusszytometer. Als Kontrolle diente eine in einem zweiten Ansatz gleich behandelte Probe. Diese wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Platten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt.

Die Probenahme mit dem Schaumpad erfolgte analog zu den vorhergehenden Versuchen, indem angeschmutzte Oberflächen mit einem Schaumpad für ca. 60 Sekunden beprobt wurden. Das Schaumpad wurde nachfolgend durch eine Proteinase K-Behandlung verflüssigt und durch einen 0,2 µm Celluloseacetatfilter filtriert. Die erhaltene Probe wurde dann mit dem Lebendfarbstoff SYTO9[®] gefärbt, im Durchflusszytometer vermessen und analysiert. Auch hier erfolgte neben der Messung mit dem Durchflusszytometer die Kontrolluntersuchung einer identisch behandelten Probe (Verflüssigung und Filtration) gemäß obiger Darstellung.

Die ermittelten Lebend-Zellzahlen von *C. albicans* dieses Versuchs sind in Abbildung 92 dargestellt. Der Vergleich mit der Ausgangslösung zeigte, dass die Anzahl der detektierbaren lebenden, bzw. anzüchtbaren Mikroorganismen nach der Probenahme von einer Edelstahloberfläche sowohl mit einem sterilen Tupfer als auch mit einem Schaumpad um ca. eine \log_{10} -Stufe niedriger war. Ein Ansatz zur Erklärung der gemessenen Reduktion der Keimzahlen bei der Probenahme mit dem Tupfer besteht darin, dass der Tupfer nicht die komplette Flüssigkeit von der Oberfläche aufnehmen konnte, bzw. dass nach dem Auswalken noch Mikroorganismen im Tupfer selbst und in dem WhirlPak[®] verbleiben. Bei der Probenahme mit dem Schaumpad ist der Verlust einer \log_{10} -Stufe durch die Behandlung mit Proteinase K und die anschließende Filtration zu erklären. Dieser Versuch mit *C. albicans*-Zellen wurde parallel auf einer Kunststoffoberfläche durchgeführt. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zu der Beprobung einer Edelstahloberfläche.

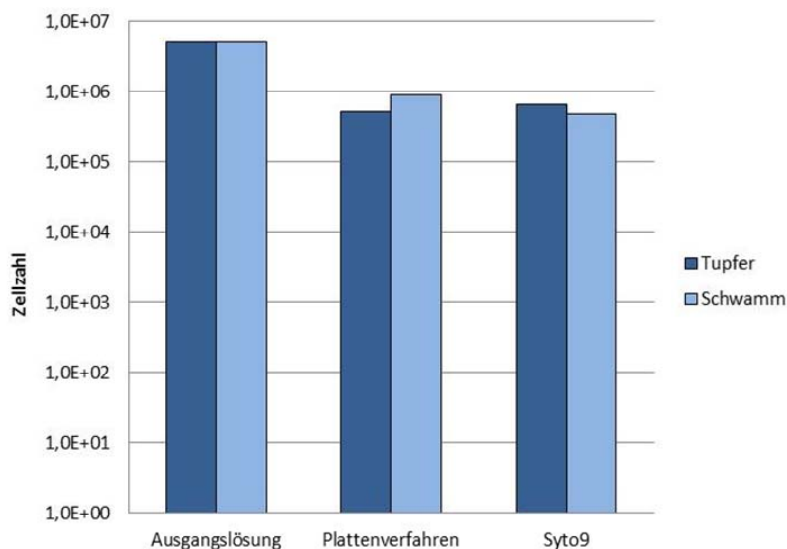


Abbildung 92: Vergleich der Probenahme von *C. albicans* von einer Edelstahloberfläche mittels Tupfer und mittels Schaumpad
Analyse per Durchflusszytometer (SYTO9[®]) und per Plattenverfahren.

Analog zu der Probenahme von *C. albicans* wurde der Versuch mit dem Bakterium *S. aureus* durchgeführt (Abbildung 93). Die Durchführung des Experiments unterschied sich lediglich durch die Wahl des Testorganismus. Auch hier wurden sowohl eine Edelstahl- als auch eine Kunststoffoberfläche mittels Tupfer und mittels Schaumpad beprobt.

Bei dem Vergleich der Wiederfindungsraten von *S. aureus* mit dem Tupfer und dem Schaumpad zeigten sich Unterschiede von maximal 0,6 \log_{10} -Stufen. Die geringste Zellzahl wurde für eine Beprobung mit dem Schaumpad und eine nachfolgende Quantifizierung mittels Ausplattieren (Plattenverfahren) ermittelt, da die Behandlung mit Proteinase K die Teilungsfähigkeit der Zellen reduzierte. Dieser Effekt wurde bei der Analyse im Durchflusszytometer nicht beobachtet. Bei beiden Beprobungs- und Quantifizierungsmethoden lag die Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro ml gut eine \log_{10} -Stufe unter den Werten der Ausgangslösung bei ca. 10^5 lebenden Zellen pro ml. Auch hier gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Probenahme von einer Edelstahl- oder einer Kunststoffoberfläche.

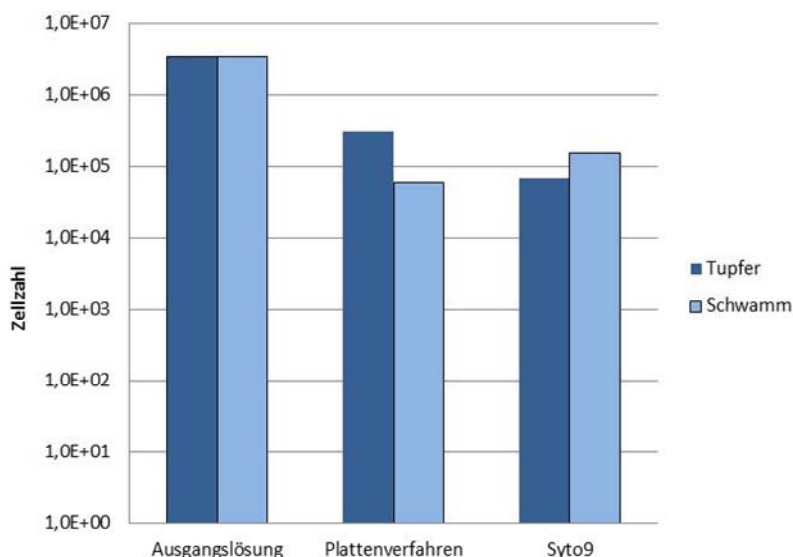


Abbildung 93: Vergleich der Probenahme von *S. aureus* von einer Edelstahloberfläche mittels Tupfer und mittels Gelatineschaumpad
Analyse per Durchflusszytometer (SYTO9®) und per Plattenverfahren.

Bei der Probenahme mit dem Tupfer und einer anschließenden Analyse im Durchflusszytometer wurde ein starkes Hintergrundrauschen beobachtet (siehe Abbildung 94). Wahrscheinlich konnten sich beim Auswalken des sterilen Tupfers kleine Partikel lösen, die die Messung im Durchflusszytometer beeinträchtigten. Dieses Hintergrundrauschen lag sehr ungünstig in der Mitte des Dotplots und kann dadurch mögliche Bakterienpopulationen verdecken. Besonders bei der Analyse von niedrigen Zellzahlen (10^2 bis 10^4) war eine Identifikation der gesuchten Zellpopulation und deren Auswertung nahezu unmöglich.

Auch die Gelatinestereste aus den hydrolysierten Schaumpad-Matrices interagierten mit den Farbstoffen und hatten ein Hintergrundrauschen in den Dotplots zur Folge. Hier liegen die störenden Matrixeffekte aber vor allem im unteren linken Quadranten (Abbildung 95), so dass eine Identifizierung und Analyse von Zellpopulationen einfacher möglich war.

Die suspendierten Tupfer-Partikel hatten jedoch keinen Einfluss auf das Zellwachstum nach Ausplattieren auf einer Platte, weshalb bei Anwendung dieser Methodik die höchsten Zellzahlen nachgewiesen werden konnten.

Bei einem Vergleich der beprobten Oberflächen (Kunststoff und Edelstahl) zeigten sich in den Dotplots keine systematischen Unterschiede oder Abweichungen.

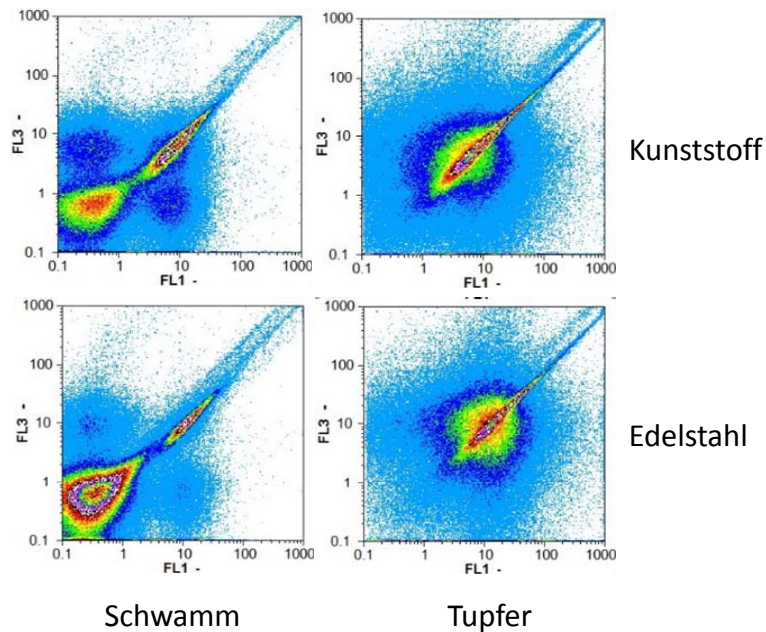


Abbildung 94: Vergleich der Dotplots nach Probenahme von *S. aureus* mit Tupfer oder Schaumpad von einer Kunststoff oder einer Edelstahloberfläche
In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen.

8.7.2 Probenahme von *C. albicans* und *S. aureus* mittels RODAC-Platten

Zur Bestimmung der Wiederfindung von Mikroorganismen von feuchten Oberflächen mittels klassischer RODAC-Abklatschplatten, wurden Proben von den beiden Mikroorganismen *C. albicans* und *S. aureus* auf einer Edelstahloberfläche genommen. Es wurden Oberflächen (25 cm²) mit jeweils 10⁶, 10⁴ und 10² Mikroorganismenzellen angeschmutzt und mit handelsüblichen RODAC-Platten aufgenommen. Nach Bebrütung bei 37 °C über Nacht im Inkubator wurden die Zellen auf den Platten ausgezählt und mit der Anzahl der zur Anschmutzung verwendeten suspendierten Zellen verglichen. Die Ergebnisse des Versuchs mit einer aufgetragenen Zellzahl von 10²/25 cm² sind in dem Diagramm von Abbildung 95 dargestellt. Höhere zur Anschmutzung verwendete Zellzahlen konnten nicht ausgewertet werden.

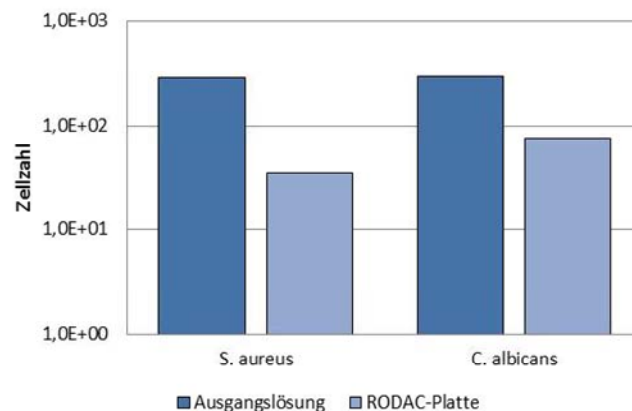


Abbildung 95: Probenahme von *S. aureus* und *C. albicans* von einer feuchten Oberfläche mittels RODAC-Abklatschplatten.

Durch die Probenahme mit den RODAC-Platten wurden für die Zahlen der koloniebildenden Einheiten von *S. aureus* und *C. albicans* ein Wert ermittelt, der ca. eine \log_{10} -Stufe unter der Anzahl der aufgetragenen Mikroorganismen lag. Die Reduktion um eine \log_{10} -Stufe liegt in einem ähnlichen Bereich wie bei der Probenahme mit Tupfer und mit Schaumpad.

8.7.3 Probenahme mit einem Hydrozyklon

Neben der indirekten Probenahme durch das Andrücken eines Schaumpads mit definierter Größe auf die zu beprobende Oberfläche, wurde als Alternative ein direktes Probenahme-Verfahren von Forschungsstelle 1 (IUTA) entwickelt und zusammen mit Forschungsstelle 2 (wfk) getestet. Dazu entwickelte Forschungsstelle 1 (IUTA) ein Probenahme-System, das mit Hilfe einer Zweistoffdüse und einem Hydrozyklon in der Lage ist, auch angetrocknete Mikroorganismen und Partikel von unterschiedlich feuchten und ggf. auch trockenen Oberflächen zu spülen und aufzunehmen. Dabei wurde zunächst die zu beprobende Fläche ausgewählt und mit einem Edelstahlring abgegrenzt. Mit der Zweistoffdüse wurde unter Druck eine definierte Menge Spülflüssigkeit auf das zu beprobende Areal gesprüht, um Mikroorganismen von der Oberfläche abzulösen und zu suspendieren. Die Mikroorganismensuspension wurde nachfolgend mit dem Hydrozyklon aufgesaugt, gesammelt und nach der Färbung direkt per Durchflusszytometrie untersucht.

Ein Vorteil der direkten Probenahme war, dass kein Gelatineschaumpad, und daher auch keine Probenaufbereitung benötigt wurde. Bei der indirekten Probenahme gab es, u. a. bedingt durch die Proteinase K-Behandlung und die Filtration, eine Reduktion der Mikroorganismenzahl von etwa einer \log_{10} -Stufe. Auch das während der Messung beobachtete Hintergrundrauschen bedingt durch hydrolysierte Schaumpad-Bestandteile entfiel bei der durchflusszytometrischen Analyse nach direkter Probenahme. Ein systembedingter Nachteil der direkten Probenahme lag darin, dass Teile des aufgesaugten Fluids mit Probenmaterial (Mikroorganismenzellen) in den Schläuchen zurückbleiben und somit nicht vermessen werden konnten. Somit würden weniger Zellen nachgewiesen, als tatsächlich vorhanden waren und es könnten falsch negative Ergebnisse erhalten werden.

Eine Probenahme mit einem Minizyklon kann theoretisch auch indirekt erfolgen, wobei die aufgesaugte Flüssigkeit sogleich durch ein Schaumpad gesaugt, und so enthaltene Mikroorganismen festgehalten und gesammelt werden können (sog. Kartuschenmethode). Bei diesem Verfahren müsste das beprobte Schaumpad im Anschluss aber ebenfalls mit Proteinase K verflüssigt und anschließend filtriert werden, so dass es hierbei wieder zu den zuvor spezifizierten Keimverlusten kommen würde. Aufgrund des instrumentellen Aufwands wurde eine solche Beprobungsmethode nicht weiter verfolgt.

Zur Untersuchung der Beprobung mittels Hydrozyklon wurde eine Fläche mit den Maßen 3 x 3 cm markiert, auf die im Anschluss 100 μ l einer Mikroorganismensuspension mit 10^6 Zellen/ml unter der Sterilbank aufgetragen wurden. Es wurde für 10 min inkubiert, um eine inhomogen feuchte Oberflächenanschmutzung zu erzielen. Nach der Inkubation wurde der Edelstahlring erneut über die markierte angeschmutzte Fläche gelegt. Mit Hilfe einer Zweistoffdüse wurden unter Druck ca. 2 ml Spülflüssigkeit aufgesprüht, um möglichst alle Keime in das Spülfluid zu überführen. Anschließend wurde die Flüssigphase mit dem Hydrozyklon quantitativ aufgesaugt, wobei die Spülflüssigkeit mit den suspendierten Mikroorganismen im Flüssigkeitsabscheider aufgefangen wurde.

Es folgte eine Anfärbung mit SYTO9® und Propidiumiodid und die Auswertung mittels Durchflusszytometer. Parallel zur Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen und der durchflusszytometrischen Messung wurde ein Aliquot der aufgefangenen Probe zum Vergleich in verschiedenen Verdünnungen auf Platten ausgestrichen, über Nacht kultiviert und die Zellzahl bestimmt. Für die Untersuchung wurden zwei verschiedene Edelstahloberflächen (poliert und gebürstet) getestet und als Testmikroorganismus der Hefepilz *C. albicans* verwendet (Abbildung 96).

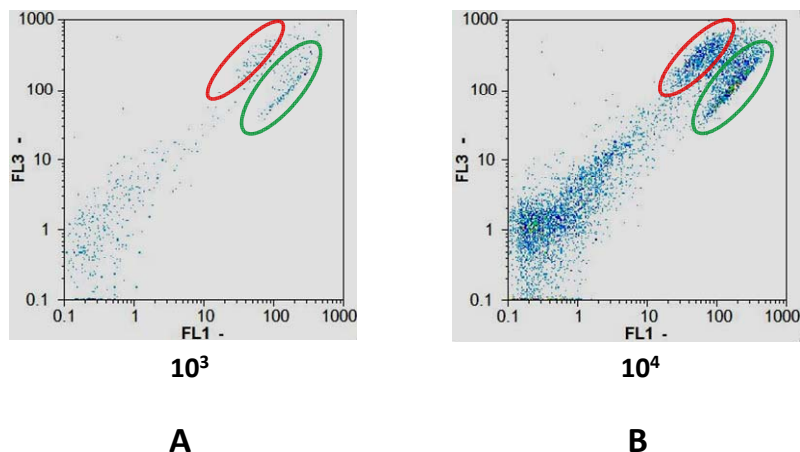


Abbildung 96: Dotplots der Probenahme von *C. albicans* mittels Hydrozyklon von einer Edelstahloberfläche (9 cm², poliert).

In den Dotplots wurde die rote Fluoreszenz (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A) *C. albicans*-Anzahl 10³ (B) *C. albicans*-Anzahl ~10⁴; rot eingekreist: die tote *C. albicans*-Population, grün eingekreist: die lebende *C. albicans*-Population.

Die Dotplots von Abbildung 96 zeigen die Probenahme und Färbung von *C. albicans*-Zellen mit dem Hydrozyklon. In den gezeigten Verdünnungsstufen kann deutlich eine tote (rot eingekreist) und eine lebende (grün eingekreist) *C. albicans*-Population unterschieden werden.

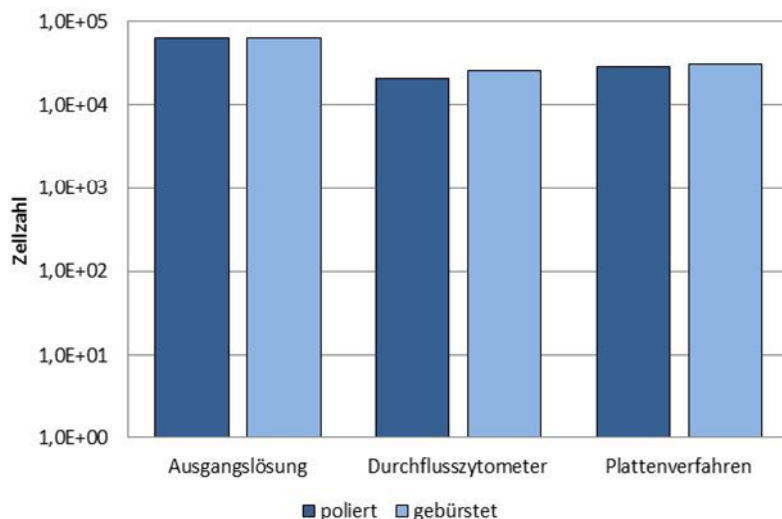


Abbildung 97: Probenahme von *C. albicans* mittels Hydrozyklon von zwei verschiedenen Edelstahloberflächen (poliert und gebürstet). Analyse mittels Durchflusszytometer und per Plattenverfahren.

Das Diagramm in Abbildung 97 zeigt, dass mittels des Zyklon eine fast quantitative Aufnahme der *C. albicans* Zellen erzielt werden konnte. Die Unterschiede zur initial zur Anschmutzung verwendeten Zellzahl lagen bei weniger als einer halben \log_{10} -Stufe. Es wurden keine Unterschiede für polierte oder gebürstete Edelstahloberflächen hinsichtlich der Wiederfindung ermittelt.

8.7.4 Vergleich der Probenahmen mittels Hydrozyklon und Schaumpad

In weiteren Untersuchungen erfolgte eine vergleichende Bewertung der Effektivität der direkten Probenahme mittels Hydrozyklon und der indirekten Probenahme mittels Schaumpad. Dazu wurden jeweils 100 μl einer *C. albicans*-Suspension mit 10^7 Zellen/ml auf poliertem Edelstahl aufgebracht und für 10 Minuten angetrocknet. Die Probenahme erfolgte durch Zugabe zusätzlicher Spülflüssigkeit auf die kontaminierte Fläche und anschließende Aufnahme des Oberflächenfluids entweder mit dem Hydrozyklon oder mit einem Schaumpad (Maße 3 x 3 x 1 cm). Bei der Probenahme mit dem Schaumpad wurde 160 μl demineralisiertes Wasser auf die angeschmutzte Fläche pipettiert und mit dem Schaumpad durch kurzes Andrücken aufgenommen. Bei der Probenahme mit dem Hydrozyklon umfasste die mittels Zweistoffdüse aufgesprühte Wassermenge 2 ml. Das mit dem Zyklon gesammelte Fluid wurde nach einer Lebend/Tot-Färbung mit SYTO9[®] und Propidiumiodid direkt mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 98 B). Das Schaumpad wurde wie zuvor beschrieben mittels Proteinase K Zugabe bei 37 °C verflüssigt, die Suspension filtriert, angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 98 A). Von den mittels Zyklon und mittels Schaumpad erhaltenen Suspensionen wurde vor der Anfärbung ein Aliquot abgenommen und die Anzahl überlebender Zellen klassisch mikrobiologisch durch Ausplattierung und Auszählung bestimmt. Um die Effektivität der Probenahme zu testen, erfolgte nach der Beprobung (Zyklon oder Schaumpad) eine Kontrolle der auf der Fläche zurück gebliebenen Zellen mittels Abklatsch/RODAC-Platte. Hierbei wurde für beide Beprobungsmethoden eine vergleichbare Anzahl verbliebener Zellen (~ 200 Zellen/25 cm^2) ermittelt.

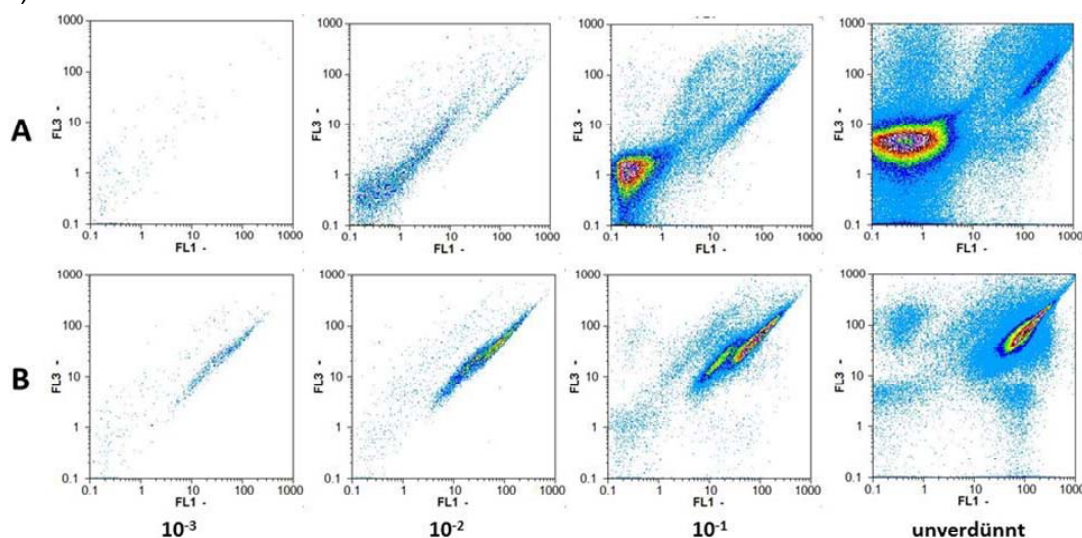


Abbildung 98: Dotplots der Probenahme von 10^6 *C. albicans*-Zellen mittels Schaumpad und mittels Hydrozyklon von polierten Edelstahloberflächen.

In den Dotplots wurden die rote (FL3) gegen die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen. (A) Probenahme mit Schaumpad (B) Probenahme mit Hydrozyklon. Es sind Dotplots der *C. albicans*-Zellsuspensionen von 100 - 10^{-3} verdünnt (bezogen auf die Probenahmesuspension) abgebildet.

Die Auswertung der ermittelten Zellzahlen zeigte, dass durch die direkte Probenahme mit dem Zyklon eine bessere Mikroorganismenaufnahme erreicht wurde als bei der indirekten Methode mit dem Schaumpad; dies bestätigt vorhergehende Ergebnisse. Wie Abbildung 99 zu entnehmen ist, lag die mittels Zyklon ermittelte Lebendkeimzahl etwa eine halbe \log_{10} -Stufe unter dem Wert der aufgetragenen Keimzahl. Die mit dem Schaumpad ermittelten Werte lagen dagegen mehr als eine \log_{10} -Stufe darunter. Bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurde eine Reduktion der Zellzahl um $\sim 1,5 \log_{10}$ -Stufen ermittelt. Im Vergleich zu vorhergehenden Experimenten ($\sim 1 \log_{10}$ -Stufe) ergab sich die vergleichsweise erhöhte Reduktion durch eine Verringerung der aufgetragenen Elutionslösung (160 μl statt 1 ml). Bei der klassisch mikrobiologischen Quantifizierung ergab sich eine Reduktion der Zellzahl um $\sim 2,4 \log_{10}$ -Stufen, bedingt durch die notwendige Proteinase K-Behandlung. Offensichtlich war eine zusätzlich Schädigung der *C. albicans*-Zellen eingetreten, die zu einer deutlich verminderten Kultivierungsfähigkeit führte, jedoch immer noch eine ausreichend hohe Markierung mit SYTO9[®] erlaubte, sodass die Zellen durchflusszytometrisch als lebende Zellen detektiert wurden. Dies erklärt die starke Zellzahlreduktion, ermittelt durch Plattenkultivierung, die auch schon bei den vorherigen Antrocknungsversuchen beobachtet wurde. Die allgemein niedrigeren Wiederfindungswerte für *C. albicans* bei der indirekten Probenahme wurden anscheinend durch die Reduktion der Spülflüssigkeitszugabe sowie die reduzierte Probenahmezeit verursacht.

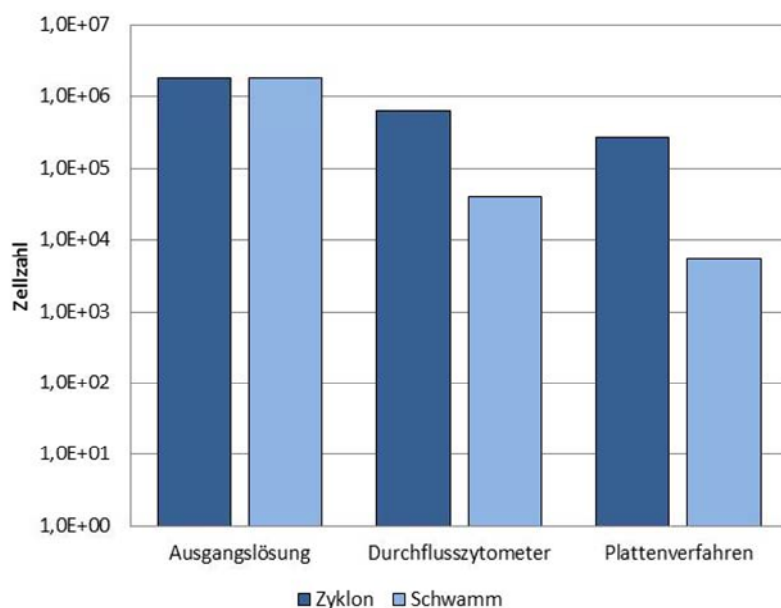


Abbildung 99: Vergleich der Probenahme von *C. albicans* mittels Hydrozyklon und Schaumpad von einer polierten Stahloberfläche. Analyse mittels Durchflusszytometer und per Plattenverfahren.

8.8 Arbeitspaket 7: Anwendungstests

Die Untersuchungen sollen orientierende Informationen insbesondere zu erforderlichen minimalen Abmessungen der Probeflächen, der praktischen Zugänglichkeit der Areale, Anforderungen an die Geometrie der Probenahmegeräte sowie zur Einbindung und zum Nachweis der auftretenden Kontamination liefern.

8.8.1 Anwendungstests – Industrie: Fleischverarbeitung und Flaschenabfüllanlagen

8.8.1.1 Probenahme

Um das entwickelte Probenahme- und Keimquantifizierungs-System in der Praxis zu testen, wurden in einem fleischverarbeitenden Betrieb und bei einem Getränkehersteller Proben an verschiedenen Stellen der Produktion und in der Produktionsumgebung sowohl vor als auch nach der Reinigung genommen. Die Probenahme wurde mit einem Gelatineschaumpad mit den Maßen 6 x 3 x 1 cm durchgeführt. Mit dem Schaumpad wurde insgesamt eine Fläche von 100 cm² mit der Wischtechnik beprobt. Dabei wurden nicht nur ebene Flächen, sondern auch abgerundete Areale wie z. B. Würzpfannen und Treppengeländer beprobt, vgl. die nachfolgenden Photos.

Die Oberflächen wurden jeweils einmal mit Sterilschwämmen von „3M“ und unter Anwendung der im Projekt entwickelten Gelatineschaumpads beprobt. Die genommenen Proben wurden auf Eis gelagert und am nächsten Tag im Labor untersucht. Ein Teil der Proben wurde im DIL nach den klassischen mikrobiologischen Methoden auf Gesamtkeime überprüft, ein anderer Teil wurde vom wfk unter Anwendung der Durchflusszytometrie untersucht.

Es hat sich herausgestellt, dass die erste Charge der Schaumpads eine geringe Grundverkeimung aufwies, die bei der mikrobiologischen Analyse mit nachgewiesen wurde. Für die Untersuchungen in der betrieblichen Praxis wurden daher neue Gelatineschaumpads hergestellt.

8.8.1.2 Probenaufbereitung zur Durchflusszytometrie

Die Gelatineschaumpads wurden für die Vermessung mit Proteinase K (10 ml CyFlow-Wasser + 100 µl Proteinase K) verflüssigt. Anschließend wurden die Proben filtriert und die auf dem Filter zurückgehaltenen Mikroorganismen mit 1 ml autoklaviertem VE-Wasser abgespült. 50 µl der so erhaltenen Proben wurden vor der Färbung mit SYTO9[®] und Propidiumiodid ausplattiert, um parallel per Plattenverfahren mögliche Mikroorganismen nachzuweisen. Die übrige Suspension wurde für 30 min im Dunkeln mit SYTO9[®] und Propidiumiodid gefärbt und anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Durchflusszytometer vermessen.



Abbildung 100: Podestkante, während der Produktion (Schlachtbetrieb)



Abbildung 101: Schürzenwaschkabinett, während der Produktion (Schlachtbetrieb)



Abbildung 102: Geländer, während der Produktion (Schlachtbetrieb)



Abbildung 103: Edelstahlwand, während der Produktion (Schlachtbetrieb)



Abbildung 104: Probenahmeort Würzepfanne (Brauerei)



Abbildung 105: Probenahmeort Würzepfanne, Rand (Brauerei)

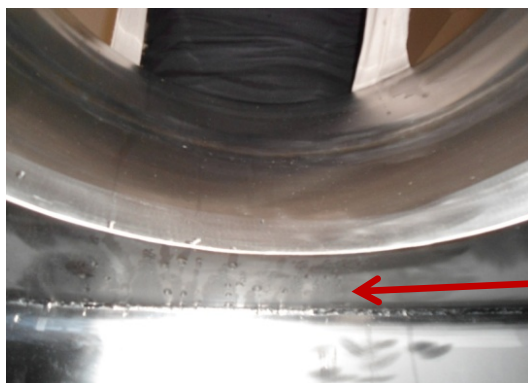


Abbildung 106: Probenahmeort Würzepfanne, Deckel (Brauerei)

8.8.1.3 Ergebnisse der Probenahme

Vergleich von Gelatineschaummatrices

Nachfolgende Tabellen fassen die Ergebnisse der klassischen mikrobiologischen Nachweismethoden mit den verschiedenen schwammartigen Materialien zusammen. Demnach liefert die klassische Auswertemethode ähnliche Zellzahlen für die neu entwickelten Gelatinepads wie für klassische Schwammprodukte. Dies zeigt sich unabhängig von der untersuchten Betriebsart.

Tabelle 23: Ergebnisse der Probenahme in einem Schlachtbetrieb (GKZ/100 cm²)

Nr.	Probenahmeort	Probenahmematrix	
		Schwamm „3M“	Gelatinepad DIL
1	Podestkante während der Produktion	$1,0 \times 10^4$	$3,9 \times 10^5$
2	Podestkante während der Produktion	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$
3	Podestkante während der Produktion	--	6×10^2
4	Podestkante während der Produktion	--	$6,6 \times 10^2$
5	Schürzenwaschkabinett während der Produktion	$4,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^3$
6	Schürzenwaschkabinett während der Produktion	$1,6 \times 10^4$	$4,6 \times 10^3$
7	Schürzenwaschkabinett während der Produktion	--	$2,6 \times 10^2$

Nr.	Probenahmeort	Probenahmematrix	
		Schwamm „3M“	Gelatinepad DIL
8	Schürzenwaschkabinett während der Produktion	--	$1,8 \times 10^2$
9	Geländer während der Produktion	$4,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$
10	Geländer während der Produktion	--	2×10^2
11	Wand ungereinigt während der Produktion	$2,3 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$
12	Wand ungereinigt während der Produktion	--	$1,6 \times 10^2$

Tabelle 24: Ergebnisse der Probenahme in einer Brauerei (GKZ / 100 cm²)

Nr.	Probenahmeort	Probenahmematrix	
		Schwamm „3M“	Gelatinepad DIL
13	Würzefanne, Rand	$3,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$
14	Würzefanne, Rand	$< 1,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^2$
15	Würzefanne, Rand		4×10^1
16	Würzefanne, Rand		2×10^1
17	Würzefanne, innen (Decke)	$4,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^2$
18	Würzefanne, innen (Decke)		2×10^1
19	Würzefanne, Rand mit Verschmutzung	$5,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$
20	Würzefanne, Rand mit Verschmutzung		4×10^1
21	Würzefanne, Rand mit Verschmutzung	$1,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^2$
22	Würzefanne, Rand mit Verschmutzung		0

Durchflusszytometrische Untersuchungen

Auf den Platten waren verschiedene Mikroorganismenspezies gewachsen. Die durchschnittliche Mikroorganismenanzahl belief sich (nach Berücksichtigung aller Verdünnungen) auf 180 - 660 Zellen/100 cm² Beprobungsfläche. Die Auswertung der Dotplots ergab ein starkes Hintergrundsignal des Schaumpads, welches sich vom unteren linken Quadranten aus in den rechten, oberen Teil des Quadranten zog. Aufgrund der Stärke des Hintergrundsignals musste eine Verdünnung der Suspensionen vor der durchflusszytometrischen Vermessung vorgenommen werden. Distinkte Mikroorganismenpopulationen konnten aufgrund der Verdünnung nicht detektiert werden (Abbildung 107). Somit erwiesen sich Gelatineschaum-Matrices mit der eingesetzten Größe von 18 cm² als ungeeignet zur Beprobung von Flächen von 100 cm².

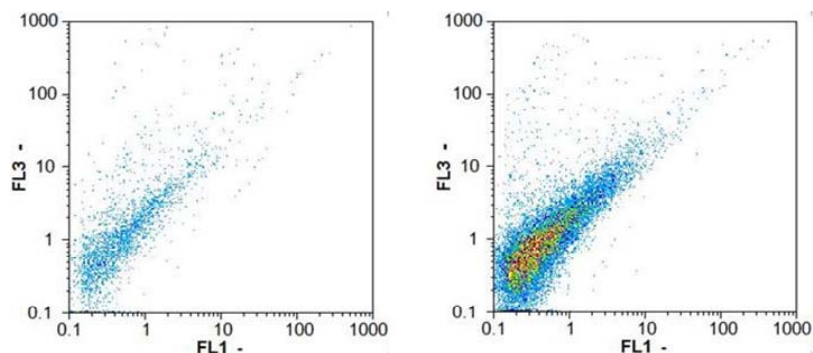


Abbildung 107: Dotplots der Probenahme aus einem fleischverarbeitendem Betrieb.

Die eingesetzten Gelatinematerialien hatten eine Größe von 18 cm^3 und ergaben ein starkes Hintergrundsignal, dargestellt ist hier die Verdünnungsstufe 10^{-3} , in der keine Mikroorganismen mehr nachweisbar waren. Links Probe 3, rechts Probe 7.

8.8.2 Weitere Anwendungstests, Durchflusszytometrie

Aufgrund der starken Hintergrundsignale bei Probenahme mit den großen Gelatinematerialien wurden zusätzliche Praxisversuche mit kleineren Gelatineschaumpads durchgeführt. Dabei konnten verschiedene Stellen eines Küchen- und Essbereichs in einem privatwirtschaftlichem Betrieb beprobt werden. Die Probenahme wurde mit einem Schaumpads mit den Maßen $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}$ durchgeführt. Dabei wurden inhomogen feuchte Oberflächen mit einer Fläche von 100 cm^2 mit der Wischtechnik beprobt.

Für die Vermessung im Durchflusszytometer wurden die Gelatineschäume mit Proteinase K (1 ml CyFlow-Wasser + $20 \mu\text{l}$ Proteinase K) verflüssigt. Anschließend wurden die Proben filtriert und die auf dem Filter verbliebenen Mikroorganismen mit 1 ml autoklaviertem VE-Wasser abgespült. $50 \mu\text{l}$ der so erhaltenen Proben wurden ausplattiert, um Mikroorganismen mittels Plattenverfahren nachzuweisen. Die restliche Suspension wurde nach der Färbung in unterschiedlichen Verdünnungen mit dem Durchflusszytometer vermessen. Stellvertretend werden hier die Probenahmen von einem Edelstahl-Waschbecken (A) und einem Kühlschrank (Wareneingang) (B) dargestellt.

Mittels Plattenverfahren konnten verschiedene Mikroorganismenspezies nachgewiesen werden. Für die Waschbeckenprobe wurde eine Gesamtmikroorganismenzahl von $2,4 \times 10^2$ Zellen/ 100 cm^2 Beprobungsfläche ermittelt. Die Probe des Kühlschranks zeigte starken Bewuchs, sodass keine Quantifizierung der Mikroorganismen vorgenommen werden konnte ($> 2 \times 10^4$ Zellen/ 100 cm^2 Beprobungsfläche).

In Abbildung 108 sind Dotplots der beiden Probenahmen dargestellt (A: Waschbecken; B: Kühlschrank). Die Auswertung zeigte neben den Hintergrundsignalen des Gelmateri als nach Beprobung des Kühlschranks (B) auch mindestens zwei Mikroorganismenpopulationen. Hier konnte eine deutliche Mikroorganismenpopulation in der Mitte der Dotplots detektiert werden (blauer Pfeil), hierbei handelte es sich mutmaßlich um lebende Zellen. Eine weitere, kleinere Mikroorganismenpopulation lag etwas höher und links dazu versetzt (oranger Pfeil), mutmaßlich handelte es sich um tote Zellen. Für die blau markierte Mikroorganismenpopulation wurde eine Anzahl von $1,3 \times 10^5$ Zellen/ 100 cm^2 Beprobungsfläche und für die orange markierte Population eine Anzahl von $8,0 \times 10^3$ Zellen/ 100 cm^2 Beprobungsfläche ermittelt. Im Vergleich dazu konnte in den Dotplots der Waschbeckenbeprobung (A) mittels durchflusszytometrischer Analyse $7,3 \times 10^3$ Zellen/ 100 cm^2 Beprobungsfläche detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem neu entwickelten Probenahme-Verfahren auch in praktischen Anwendungen Mikroorganismen nachgewiesen und quantifiziert werden können. Durch die Verwendung kleinerer Gelatinematrices konnten störende Hintergrundsignale deutlich reduziert und so eine Verbesserung der Auswertung durchflusszytometrischer Daten erreicht werden.

Die Anwendung der Gelatinepads setzt allerdings voraus, dass keine Querkontamination durch Vorverkeimung der Matrix gegeben ist. Eine diesbezügliche Dekontamination der Gelatineschaumpads nach Herstellung/Konfektionierung ist nach dem Stand der Technik mit Gammastrahlen in geeigneter Weise möglich.

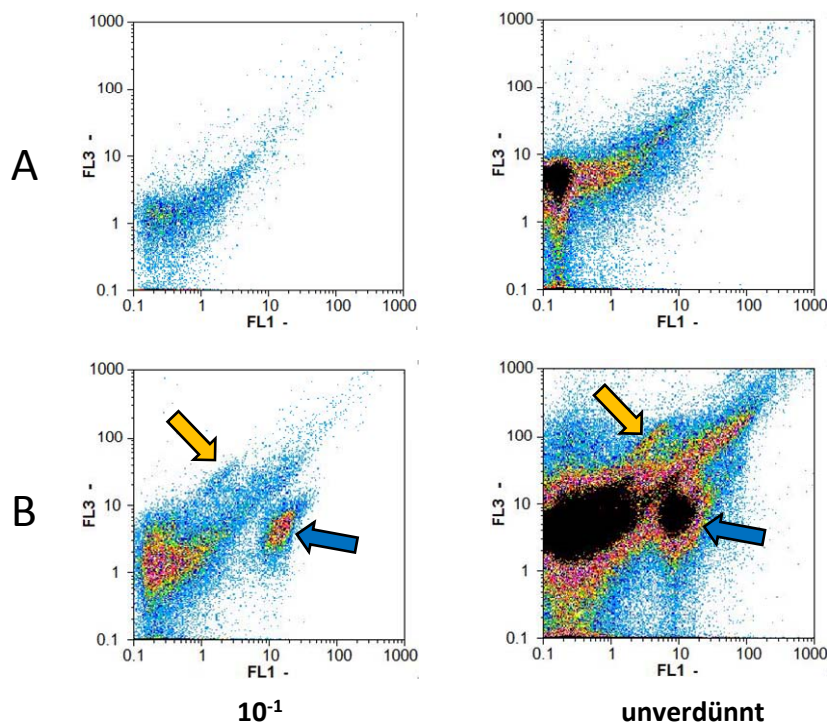


Abbildung 108: Dotplots der Probenahmen: A) Waschbecken B) Kühlschrank.

Die eingesetzten Schaumpad-Matrices hatten eine Größe von 1 cm³, dargestellt sind die Dotplots der Verdünnungsstufe 10⁻¹ und der unverdünnten Probe, Mikroorganismenpopulationen sind mit Pfeilen markiert.

9 Veröffentlichte bzw. zur Veröffentlichung vorbereitete Arbeiten im Zusammenhang mit dem IGF-Vorhaben

Fuchs, V.; Kolbe, S.; Bohnen, J. Hugo, A.; Haep, S.; Steinkamp, H.; Heinz, V.:

Quick detection of microbial contaminations on inhomogeneous wet surfaces with flow cytometry and liquefiable sampling matrix. 46th International Detergency Conference (IDC), 9.-11. April 2013, Düsseldorf

Rationell Reinigen, Gebäudedienste - Hygiene - Ausgabe 4/2014:

Mikrobielle Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen - Hygiene-Schnellnachweis. Holzmann Medien GmbH & Co. KG, 2014

<http://www.rationell-reinigen.de/hygiene-schnellnachweis/150/9197/222507/>,
abgerufen 2014-05-14

Rationell Reinigen, Gebäudedienste - Hygiene - Ausgabe 6/2013:

Mikrobielle Kontaminationen auf feuchten Oberflächen - Schaumpads und Hightech-Analytik für schnelle Kontrolle. Holzmann Medien GmbH & Co. KG, 2013

IUTA-Tätigkeitsbericht 2012:

Schnellnachweis mikrobieller Kontaminationen auf inhomogenen feuchten Oberflächen mittels Durchflusszytometrie und verflüssigbarer Probenahme-Matrix. Duisburg, Juni 2013

Wfk-News, Ausgabe 5/2012 :

Rapid detection of microbial contaminations on inhomogeneously wet surfaces. Schnellnachweis mikrobieller Kontaminationen auf inhomogen feuchten Oberflächen. Krefeld, 2012

10 Gewerbliche Schutzrechte, soweit erworben oder zu erwerben beabsichtigt

Schutzrechte wurden bislang nicht erworben bzw. werden derzeit nicht angestrebt.

11 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielte Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihr innovativer Beitrag und industrielle Anwendungsmöglichkeiten

11.1 Wissenschaftlich-technischer und wirtschaftlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

Die entwickelte Probenahmetechnik ermöglicht die schnelle Identifikation hygienischer Problembereiche im Gesundheits-, Lebensmittelbereich sowie bei Reinigungsdienstleistungen. Insbesondere lassen sich produktschädliche Oberflächen-Anhaftungen im Bereich der Getränkeindustrie (Abfüllung, Produktion) in adäquater Zeit identifizieren. Weitere Anwendungen sind Reinigungskontrollen im Bereich der Sanitärhygiene. Hier wird der dokumentierbare, schnelle Nachweis des Reinigungserfolges einer vorgenommenen Nass-Routinereinigung (ggf. auch einer zu entwickelnden neuen Reinigungstechnologie) angestrebt.

Nach den vorliegenden Erfahrungen aus dem Vorläuferprojekt sind mit dem innovativen Verfahren keine wesentlich höheren laufenden Materialkosten gegenüber etablierten Nachweisverfahren verbunden. Die Reinigungskontrolle ist betriebsintern ohne größeren Zeitverzug mit mobilen Geräten durchführbar, externe Personal- und Laborkosten können weitgehend verringert werden. Mit der Möglichkeit der Eigenkontrolle bei Einsatz der neuen Technik steigt die Wertschöpfung im eigenen Unternehmen zusätzlich.

Eine zuverlässige und einfache Eigenüberwachung anstelle externer aufwändiger Laboranalytik bedeutet für die betreffenden Unternehmen unmittelbar eine Möglichkeit zur Senkung von Kosten verbunden mit Verbesserungen im Betriebsablauf.

Durch die Kontrolle des Reinigungs- und Desinfektionseffektes anhand von Methoden, die eine erhöhte Sicherheit gewährleisten, wobei auch schwer zugängliche Stellen un-

ter speziellen Umgebungsbedingungen wie bspw. Feuchtigkeit beprobt werden können, kann das Gesundheitsrisiko deutlich verringern und die Kosten für Rückrufaktionen, Fehlchargen im Lebensmittelbereich sowie Folgekosten im medizinischen Bereich deutlich senken.

Hygieneprobleme bzw. unerwünschte mikrobiologische Kontaminationen von Produkten stellen ein hohes Gesundheitsrisiko dar und verursachen zudem sehr hohe wirtschaftliche Schäden. Immer wieder werden Lebensmittel aus dem Handel zurückgerufen oder vor dem Verlassen der Produktionsstätte verworfen, weil der hygienische Status nicht korrekt eingehalten wurde. Neben den hohen Aufwendungen von Rückrufaktionen kommt es zu deutlichen Imageverlusten. Die Kosten für eine solche Aktion belaufen sich im internationalen Vergleich durchschnittlich auf 540.000 US-\$, hinzu kommt der Imageschaden, der zusätzlich Kosten in Höhe von ca. 10.000 – 7 Mio. US-\$ verursacht (AFC Consultants International GmbH 2007).

Weltweit, auch in entwickelten Industrienationen, belasten nosokomiale (im Krankenhaus oder einer medizinischen Einrichtung erworbener) Infektionen den Erfolg medizinischer Maßnahmen. In Deutschland treten nach aktuellen Schätzungen ca. 400.000 bis 600.000 nosokomiale Infektionen jährlich auf (Gastmeier P. und Geffers C. 2008). Busley und Popp gehen sogar von 800.000 im Krankenhaus erworbenen Infektionen aus (Busley, A. und Popp, W. 2009). Etwa 40.000 bis 70.000 dieser Infektionen enden tödlich (Gastmeier, P.; C. Geffers, D. Sohr et al. 2003).

Schätzungen zufolge infizieren sich jährlich 20.000 Menschen in Deutschland mit MRSA (Bundesärztekammer 2009), was alleine Schäden in Höhe von 100 bis 200 Mio. € verursacht (Korczak D. und Schöffmann C. 2010) (MRSA: Sammelbezeichnung für alle antibiotikaresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme, in der Regel als Multiresistenz gegen verschiedene Antibiotika-Gruppen ausgebildet).

Eine Analyse mit der Durchflusszytometrie inklusive Probenahme mittels Gel, der Verpackung usw. kostet weniger als drei Euro. Ein Durchflusszytometer, wie es für diese Zwecke nach Adaption in geringem Umfang bereitgestellt werden muss, kostet etwa 15.000 € und kann innerbetrieblich bei ca. 5 Minuten pro Untersuchung mit hoher Auslastung genutzt werden. Der Preis liegt deutlich niedriger als die oben angeführten Kosten für allein eine einzige Rückrufaktion, ohne Berücksichtigung des damit verbundenen Imageschadens.

Die aus den Hygieneuntersuchungen resultierenden Kosten werden im Reinigungsgewerbe durch die zu erwartende Umsatzsteigerung bei weitem überkompensiert. Des Weiteren werden auch die Krankenhäuser und die Lebensmittelindustrie finanziell entlastet. Durch vermehrte Eigenkontrollen bei Wegfall externer Laborkontrollen werden letztendlich Aufwendungen reduziert: Studien belegen, dass Präventivmaßnahmen vor allem hinsichtlich Vorbeugung nosokomialer Infektionen unverzichtbar sind und zusätzlich kostensenkend wirken: Sie kosten weniger als die Eradikation derjenigen Infektionsausbrüche, die sie verhindern (Arnold, S. 2002; Chaix, C.; I. Durand-Zaleski, C. Alberti et al. 1999; Dott, W.; M. Exner und L. Krizek 1981; Papia, G.; M. Louie, A. Tralla et al. 1999).

11.2 Innovativer Beitrag der erzielte Ergebnisse

Der innovative Beitrag des Vorhabens liegt in der reproduzierbaren und zeitnahen Kontrolle des hygienischen Zustandes von inhomogen feuchten und nassen Oberflächen,

Anlagenbauteilen, Einrichtungsgegenständen und Hilfsmitteln, wie sie in verschiedenen Wirtschaftszweigen nach erfolgten Reinigungsprozessen vorliegen. Eine Vermeidung zusätzlicher Matrixeffekte ist dabei insbesondere beim Probenahmenverfahren durch Spülfluidauftrag und direkter Fluidfassung zur Durchflussszytometrie gegeben. Die Durchflussszytometrie ist in der Lage, als untere Nachweisgrenze 10^{-2} Zellen/ml zuverlässig nachzuweisen (vgl. Abschnitt 8.6.2.3). In Anwendungstests in der Praxis konnten mit der Kombination von dynamischer Schaumpad-Methode und Durchflussszytometrie 10^3 Zellen/100cm² detektiert werden (vgl. Abschnitt 8.8.2). Die Ergebnisse von Probenahme und Zellzahlbestimmung mit den neuen Verfahren sind vergleichbar zu mit Plattenverfahren erzielten Resultaten (Abschnitt 8.7.4).

Das Wesentliche der Innovation liegt darin, dass damit ein Verfahren zur Überwachung der Keimbelastung auf Oberflächen nach Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zur Verfügung steht, welches nach entsprechender Einarbeitung ohne externes Fachpersonal und ohne zeitliche Verzögerung den hygienischen Zustand auch von nassen und feuchten Oberflächen zu bewerten gestattet.

11.3 Gewerblich-industrielle Anwendungsmöglichkeiten der erzielte Ergebnisse

Die Probenahme mittels Hydrokolloid-Produkten (Gelatineschaumpads) im Bereich der Reinigungskontrolle feuchter Oberflächen stellt einen interessanten Markt dar, da es sich zum einen im Bereich der Getränke- und Fleischindustrie insbesondere um die Produktion von Massenwaren handelt und zum anderen die im Gesundheitswesen ständig steigenden Anforderungen im zunehmendem Maße Kontrollaufgaben erfordern. Seitens der Hersteller von derartigen Produkten besteht daher großes Interesse an der Erschließung neuer Märkte für den Produktabsatz.

Im Bereich der Getränkeindustrie findet zwar seit einigen Jahren im Massengeschäft eine Marktkonzentrierung auf wenige große Anbieter statt, andererseits nimmt aber die Zahl kleinerer Brauereien und Anbieter von regionalen Spezialitäten weiter zu. So erhöhte sich - trotz leicht rückläufiger Absatzmengen - die Zahl der Braustätten von 1.298 im Jahr 2000 auf 1.349 im Jahr 2013 (Deutscher Brauer-Bund 2014).

Neben den Einsparungen im Lebensmittel- und Gesundheitsbereich profitieren außerdem die externen Reinigungsdienstleister der genannten Bereiche. Bundesweit waren in 2012 etwa 20.097 Betriebe im Gebäudereiniger-Handwerk tätig, die in 2011 etwa 585.000 Beschäftigten tariflich abgedeckte Arbeitsplätze bieten. Hinzu kommen Kleinst- und Einmann-Betriebe. Das sind zwei Prozent aller Beschäftigten in Deutschland. Der Umsatz der Branche betrug im Jahr 2012 annähernd 13,2 Milliarden Euro (Bundesinnungsverband des Gebäudereiniger-Handwerks e. V. (BIV) 2013 auf Basis von Daten des stat. Bundesamtes). Laut Brancheninformationen beläuft sich dabei der Anteil von Gebäuden im Lebensmittel- und im Gesundheitsbereich auf schätzungsweise 40 %, wobei etwa 50 % der Gebäudeoberflächen desinfizierend gereinigt werden. In den letzten Jahren wurden bei den Kunden der Reinigungsdienstleister Qualitätsmanagement- und Qualitätssicherungssysteme verstärkt. Damit einhergehend werden vor allem zur Senkung des Produkthaftungsrisikos immer mehr Monitoring-Maßnahmen durchgeführt. Bedingt durch den hohen Aufwand der Hygieneüberwachung ist die Auslagerung von Hygienesdienstleistungen in den Bereich der Reinigungsunternehmen aus wirtschaftlicher Sicht attraktiver. Geht man von der vorsichtigen Schätzung aus, dass

aufgrund der verbesserten Qualitätssicherung durch eine Schnellmethode der Anteil der Gebäudereinigungsunternehmen an der Reinigung / Desinfektion im Lebensmittel- und im Gesundheitsbereich um fünf Prozent erhöht werden kann, so entspricht dies einer Umsatzsteigerung der Gebäudereinigungsbranche allein in diesen Bereichen von etwa 150 Mio. € pro Jahr. Außerdem werden in der Regel in einem Objekt durch den Reinigungsdienstleister wöchentlich etwa 20 Endkontrollen á etwa fünf Euro pro Stück mittels Abklatschproben durchgeführt. Bei etwa 50.000 Objekten im Hygienebereich entstehen dadurch Kosten von etwa 240 Mio. € pro Jahr. Bei der vorsichtigen Annahme, dass ein Drittel der Endkontrollen eingespart werden könnte, werden die Kosten um 80 Mio. € reduziert.

12 Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und ggf. aktualisierten Transferkonzeptes

Das Vorliegen positiver Anwendungsuntersuchungen stellt eine wesentliche Voraussetzung einer Umsetzung der Forschungsergebnisse in den Unternehmen dar. Weiter ist die Anerkennung der Methode in Fachkreisen als äquivalent zu praktizierten Standardmethoden wichtige Voraussetzung für ihre weitere Verbreitung.

Aufgrund der Vorteile, die eine Schnellmethode ohne erhebliche Kostensteigerung gegenüber den etablierten Methoden bietet, ist dann mit einer raschen Etablierung am Markt zu rechnen. Daher wird in der Umsetzung der F&E-Ergebnisse insbesondere die Anerkennung des Probenahmeverfahrens als standardisierte Methode betrieben.

In verschiedenen Industriebereichen, z. B. der Brauindustrie und bei der Milchverarbeitung, wird die Durchflussszytometrie bereits zur Zählung von Zellen in Flüssigkeiten eingesetzt. Diese Geräte lassen sich zur Durchführung der neu entwickelten Methode zur Eigenkontrolle nutzen, weshalb in diesen Wirtschaftszweigen keine Investitionskosten für Messgeräte notwendig werden und die Akzeptanz der Methode zu erwarten ist.

Das vorgeschlagene Transferkonzept setzt diesbezüglich auf eine intensive Präsentation der Projektarbeiten sowohl bei Unternehmen der Wirtschaft als auch bei, als mögliche Multiplikatoren wirkenden, Verbänden und Fachgremien. Auch nach Abschluss des Vorhabens wird dieses Konzept als zielführend erachtet, um die Schnellmethode zur Hygienekontrolle inhomogen feuchter Oberflächen als standardisierte Methode zu etablieren.

Im Anschluss kann die Entwicklung eines marktfähigen Probenahme- und Analysesystems auf Basis der direkten Probenahmemethode und dynamischen Schaumpadmethode in durch interessierte Anbieter bzw. Nutzer erfolgen, wobei dabei die Empfehlungen aus Abschnitt 8.2 zur Modifikation des direkten Verfahrens Berücksichtigung finden sollten bzw. die Gelatineschaumpad-Größe bei der dynamischen Methode möglichst klein gewählt werden sollte.

Nachfolgend ist das zum Projektabschluss aktualisierte Transferkonzept wiedergegeben.

Transfermaßnah-	Ziel	Rahmen	Datum/Zeitraum
Information der PA-Mitglieder	Information der PA-Mitglieder, Multiplikatoreneffekt	PA-Sitzung	22. Februar 2012 17. Februar 2013 19. Dezember 2013

Transfermaßnah-	Ziel	Rahmen	Datum/Zeitraum
Publikation der Projektergebnisse	Information interessierter Fachkreise	wfk-news	5-2012 geplant für 2014
wfk homepage	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung des Projektes	Juli 2011
Publikation der Projektergebnisse	Information interessierter Fachkreise	IUTA-Tätigkeitsbericht	Juni 2012 Juni 2013 geplant für Juni 2014
Publikation der Projektergebnisse	Information interessierter Fachkreise	IUTA aktuell (Hauszeitschrift von IUTA)	geplant für Juni 2014
Publikation der Projektergebnisse	Information interessierter Fachkreise	Internet-Präsentation der Forschungsvereinigung FRT und Umwelttechnik	Projektinformationen 2011-2013 Sachbericht geplant Juni 2014
Publikation der Projektergebnisse	Information interessierter Fachkreise	Verbreitung in Fachzeitschriften: „Rationell Reinigen“; „Chemie-Ingenieur-Technik“; „Lebensmitteltechnik-Online“; „International Food Hygiene“; „Umweltmedizin in Forschung und Praxis“	6-2013, 4-2014 geplant 2014
Vortrag, Posterpräsentation Demonstrator	Information interessierter Fachkreise, Verbreitung der Forschungsergebnisse	Innovationstag des BMWi	geplant für 2015
Projektpräsentation bei der Effizienzagentur NRW, Duisburg	Transfer in die Wirtschaft	Vorstellung des Projektes	Februar 2012
Betreuung studentischer Arbeiten	Akademische Lehre oder berufliche Weiterbildung	Studentische Arbeit Applikationstechniken	Projektarbeit 2013, Bachelor-Arbeit 2014
International Detergency Conference (IDC)	Ergebnistransfer in die Wirtschaft	Vorstellung der ersten Ergebnisse	April 2013 geplant Mai 2015
Beratung von Unternehmen	Multiplikatoren-Gewinnung, Verbreitung der Forschungsergebnisse	Hilfestellung beim Handling spezifischer produktionstypischer Organismen/Hefen in der Durchflusszytometrie	Nach Bedarf
Funktionsmuster	Demonstrator-Verfügbarkeit zur Information	Bereitstellung typischer Testflächen und Schaumpads zur Applikationsanwendung (Demonstrator)	Nach Abschluss des Vorhabens
Informationsschriften von Firmen des PA	Information von Fachpublikum, Multiplikatoren-gewinnung, Know-How-Transfer	Erstellung von Informationsbroschüren, die über die PA-Mitglieder vertrieben werden	Nach Abschluss des Vorhabens

13 Literatur

- AFC Consultants International GmbH (2007): Internetseite (03.04.07), from <http://www.lebensmittelindustrie.org/leben/internationalervergleich/index.html>
- Arnold, S. (2002): "Infektionen aus dem Wischeimer?" *Reinigung kompakt* 3((2002), 40 – 41)
- Bobe, U. (2008): Die Reinigbarkeit technischer Oberflächen im immmergierten System. München, Techn. Univ. München. Dissertation
- Borcherding, K. (2004): Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen. Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät. Kiel, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
- Bundesärztekammer (2009): "Multiresistente Erreger bereiten enorme Probleme in der Patientenversorgung." (Mitteilung, 08.01.2009)
- Bundesinnungsverband des Gebäudereinigerhandwerks e. V. (BIV) (2013). Daten und Fakten zum Gebäudereiniger-Handwerk. Presseinformation des BIV, BIV Bonn
- Busley A. und W. Popp (2009): Hygienefehler im Krankenhaus. *Krankenhaus-Report 2010*. Krankenhausversorgung in der Krise 223-238
- Buttner, M. P.; L. Patricia Cruz; L. D. Stetzenbach et al. (2004): "Evaluation of the Biological Sampling Kit (BiSKit) for Large-Area Surface Sampling." *Appl Environ Microbiol.* 2004 December; 70(12) 7040–7045
- Chaix, C.; I. Durand-Zaleski; C. Alberti et al. (1999): "Control of endemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a cost-benefit analysis in an intensive care unit." *JAMA* 282(18): 1745-1751
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D. (1992): *Lebensmittelproteine: Biochemie - Funktionelle Eigenschaften - Ernährungsphysiologie - Chemische Modifizierung*, 1. Aufl., Hamburg: B. Behr 's Verlag
- Deutscher Brauer-Bund (2014): *Deutsche Brauwirtschaft in Zahlen*. Berlin, Deutscher Brauer-Bund.
- DIL; IUTA und wfk (2010): Entwicklung verbesserter Probenahmeverfahren zur Überprüfung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen im Rahmen der Eigenkontrolle in hygienisch anspruchsvollen Bereichen. IGF-Forschungsvorhaben 276 ZN. Quakenbrück, Duisburg, Krefeld, Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V. (DIL), Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA), wfk - Forschungsinstitut für Reinigungstechnologie e. V
- Dörfler, H.-D- (2002): *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, 1. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, S. 357-358.
- Dott, W.; M. Exner und L. Krizek (1981): "Bakterien aus Desinfektionsmittel-Lösungen und deren Empfindlichkeit im Suspensionstest." *Zbl Bakt Hyg B* 174 (1981), 314–324
- Figura, L. (2004): *Lebensmittelphysik*, 1. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag S. 35.
- Gastmeier P. und Geffers C. (2008): "Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? Eine Schätzung für das Jahr 2006." *Dtsch. Med. Wochenschr.* 133: 1111–1115
- Gelita AG. (2010): "Produktbroschüre Gelita-Spon, Flüssigkeitsresorbierender, absorbierbarer Gelatine-Schwamm." 2010, from <http://www.gelitamedical.com/pdf/gel.ds.standard.pdf>

- IUTA, ILK, IMT (2004): Realitätsnahe Prüfmethode von Zytostatika- und Sicherheitswerkbanken. AiF-Forschungsbericht 12500N, Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA), Duisburg, Institut für Luft- und Kältetechnik gGmbH (ILK), Fachbereich Umwelttechnik, Dresden; Institut für Medizintechnik Dresden e.V. (IMT), Radebeul
- IUTA; DIL und wfk (2010): Entwicklung verbesserter Probenahmeverfahren zur Überprüfung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen im Rahmen der Eigenkontrolle in hygienisch anspruchsvollen Bereichen. AiF-Forschungsbericht IGF 276ZN, Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA), Duisburg, Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e. V. (DIL), Quakenbrück, wfk The Cleaning Technology Institute e. V., Krefeld
- Korczak D. und C. Schöffmann (2010): Medizinische Wirksamkeit und Kosten-Effektivität von Präventions- und Kontrollmaßnahmen gegen Methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Infektionen im Krankenhaus. Schriftenreihe Health Technology Assessment. Köln, Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI)
- Lemmen, S.; H. Häfner; D. Zolldann et al. (2001): "Comparison of two sampling methods for the detection of gram-positive and gram-negative bacteria in the environment: moistened swabs versus Rodac plates." *Int J Hyg Environ Health Mar*; 203(3): 245-8
- Mauermann, M. et al. (2012): Reinigbarkeit von Oberflächen in der Lebensmittelindustrie durch Flüssigkeitsstrahlen. *Chemie Ingenieur Technik* 2012, 84, No. 9, 1-8
- Metrohm AG. (2010): "ProfIC Hyphenated systems - PILS, Particle Into Liquid Sampler." from <http://products.metrohm.com/prod-21360400.aspx>
- Oberhäuser, (2004): Vergleich von Aufgießverfahren und Nasstupfverfahren zur Beurteilung der Desinfizierbarkeit von Oberflächenmaterialien in einem Zoologischen Garten. *Journal* 2840; Dissertation, Freie Universität Berlin, 2004
- Orsini, D. A.; Y. Ma; A. Sullivan et al. (2003): "Refinements to the particle-into-liquid sampler (PILS) for ground and airborne measurements of water soluble aerosol composition." *Atmospheric Environment* 37 (2003) 1243–1259
- Otten, (2005): Praktische Umsetzung der Entscheidung 2001/471/EG zur Hygienekontrolle in einem mittelständischen Direktvermarkterbetrieb. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, 2005
- Papia, G.; M. Louie; A. Tralla et al. (1999): "Screening high-risk patients for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on admission to the hospital: is it cost effective?" *Infect Control Hosp Epidemiol* 20(7): 473-477
- Poletti, L.; Pasquarella C; Pitzurra M et al. (1999): "Comparative efficiency of nitrocellulose membranes versus RODAC plates in microbial sampling on surfaces." *J Hosp Infect Mar*;41(3):195-201
- Reuter, A. (1980): Method and apparatus for the determination of the number of germs on a surface. EP 0008808 A1, Patentanmeldung 19.03.1980
- Schmidt, M.; M. K. Houfar; S. Nicol et al. (2006): "FACS Technology used in a new rapid bacterial detection method." *Transfus. Med.* Oct 2006(16(5)): 355-361
- Schrieber, R., Gareis, H. (2007): *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*, 1. Aufl., Weinheim: Wiley-VCH Verlag
- Shapiro, H. M. (2003): *Practical Flow Cytometry*. Wiley & Sons
- Ströbel, D. A. B., (2007): Schaumbildungseigenschaften von Milchproteinfraktionen und -hydrolysaten, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, S.11-13

Trautsch, M. (2003): Eignung eines neuen Schnelltests zur Prüfung der Oberflächenreinheit im Rahmen betrieblicher Eigenkontrollen in Lebensmittelbetrieben. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München 2003

Tyrell, (2010): Reinigungspraxis in der Brauindustrie und bei der Flaschenabfüllung. Persönliche Auskunft Th. Tyrell, Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei, Berlin (VLB) gegenüber IUTA e. V.

Ultrawaves (2010): "[<http://www.ultrawaves.de/de/technologie.htm>]." from [<http://www.ultrawaves.de/de/technologie.htm>]

Vescia, N.; D. D'Alessandro, J.F. Osborn et al. (2008): "Development of an innovative method for the evaluation of fungal contamination of surfaces." Ann Ig. Jan-Feb; 20(1):3-8

Weigl, B. (2004): Trennkräfte zwischen Mikroorganismen, Partikeln und Oberflächen. Lehrstuhl für Maschinen- und Apparatekunde. München, Technische Universität München. Dissertation

Westphal, G., Gerber, G., Lipke, B. (2003): Proteine-nutritive und funktionelle Eigenschaften, 1. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, S.168-172