

Standardisierte Herstellung von biologischen Indikatoren für die Beurteilung der Oberflächenentkeimung mit Wasserstoffperoxid und Minimierung ihrer Varianz

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Technische Universität München Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL) Abt. Technologie, Freising Prof. Dr. Ulrich Kulozik/M. Sc. Philipp Stier
Industriegruppen:	VDMA-Fachverband Nahrungsmittel- und Verpackungsmaschinen e.V., Frankfurt Vereinigung zur Förderung der Milchwissenschaftlichen For- schung an der Technischen Universität München e. V., Freising
	Projektkoordinator: Dr. Tim Steinhauer KHS GmbH, Bad Kreuznach
Laufzeit:	2017 - 2020
Zuwendungssumme:	€ 248.550,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Biologische Indikatoren sind definierte Testkulturen und für die Überprüfung von aseptischen Entkeimungsanlagen oder Entkeimungsmethoden von zentraler Bedeutung. Sie werden im Rahmen der Abnahme neu installierter Maschinen zum Nachweis der Leistungsfähigkeit in Challengetesten eingesetzt. Die Testkulturen müssen für die unterschiedlichen Entkeimungsverfahren geeignet und mit gleicher Ausgangsresistenz hergestellt sein. Nur so kann eine Validierung bei Inbetriebnahme von Abfüllanlagen bzw. in allen aseptisch arbeitenden Bereichen der Lebensmittel- und Pharmaindustrie gelingen. Auch für das Testen von Apparaten im Rahmen von EHEDG-Prüfungen auf hygienisches, d. h. reinig- und sterilisierbares Design werden Testkulturen eingesetzt. Ebenso ist es im laufenden Betrieb üblich und z. T. unerlässlich, die Zuverlässigkeit des jeweils angewandten Dekontaminationsverfahrens periodisch zu überprüfen.

Sowohl für Hersteller von Entkeimungsanlagen als auch für deren Betreiber bzw.

Anwender ist es von größter Bedeutung, bei der Validierung der Effekte mit Challengetesten wiederholbar korrekte und aussagefähige Ergebnisse zu erhalten. Falsch-positive Befunde sorgen dafür, dass eine vermeintlich zu geringe Inaktivierung mit der Verschärfung der Dekontaminationsparameter beantwortet wird. Falsch-negative Befunde hingegen haben zur Folge, dass einer Anlage fälschlicherweise eine zuverlässige Entkeimung zugeschrieben wird. Beide Situationen führen zu Konflikten, hoher Betriebsunsicherheit und vermeidbaren Kosten.

Um kostenintensive Fehlschläge dieser Art zu vermeiden, muss der eingesetzte Biologische Indikator eine konstante und vorhersagbare Resistenz gegenüber dem angewandten Dekontaminationsverfahren aufweisen. Hiermit ist die Grundresistenz gegenüber einem bestimmten Entkeimungsverfahren, ausgedrückt als D-Wert bei definierten Parametern, gemeint. Zurzeit wird dies wegen unzureichenden Erfolgen bei der standardisierten Herstellung und Anwendung in Frage gestellt.

Eine zusammenhängende Aufklärung von Variabilitätsursachen für die Resistenz ist bisher noch nicht gelungen. Zwar belegen frühere IGF-Projekte der Forschungsstelle (z. B. AiF 17721 N) die Bedeutung einer konsistenten Herstellung der Testkulturen, jedoch ist unklar, wie sich im Zusammenhang damit die Aufbereitung, Lagerung und Anwendung der Testkulturen vor Ort auf die Resistenz auswirkt, wenn diese nicht direkt am Herstellungsort der Testkulturen eingesetzt werden. Ziel des Forschungsvorhabens war es, diese Wissenslücke zu schließen.

Forschungsergebnis:

Um die Einflussfaktoren auf die Resistenz bei der Herstellung zu untersuchen, wurden für *Bacillus atrophaeus* (etablierter biologischer Indikator im Bereich Lebensmittelherstellung) und für *Geobacillus stearothermophilus* (biologischer Indikator für den Bereich pharmazeutische Produktion) Methoden zur reproduzierbaren submersen Produktion im Bioreaktor und zur Produktion im Solid-State-Verfahren auf Agarplatten entwickelt und Sporen bei unterschiedlichen Sporulationsbedingungen hergestellt. Zur Bestimmung der Resistenz der hergestellten Sporen wurde ein praktikabler Test mit flüssigem Wasserstoffperoxid als Inaktivierungsgagens entwickelt, der die Inaktivierungskinetik der Sporen über die dezimale Reduktionszeit als Maß für die Resistenz bestimmt bzw. definiert. Die Temperatur und der pH-Wert während der Sporulation wurden als die maßgeblichen Einflussgrößen auf die Resistenz der Sporen identifiziert, während sich die Sauerstoffsättigung bei der submersen Sporenerstellung als nicht relevant erwies. Darüber hinaus ist es möglich, die Änderung der Resistenz als Verlauf in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur darzustellen und Interaktionen der Einflussgrößen in ihren Effekten auf die Resistenz sichtbar zu machen. Damit kann der Einfluss bestimmter Herstellungsbedingungen auf die Resistenzausbildung der Sporen besser beurteilt und im Endergebnis auch standardisiert werden.

Des Weiteren zeigt sich, dass sich die Sporenresistenz abhängig vom Lagermedium und von der Lagerdauer signifikant verändern

kann. In 70 %igem Ethanol sowie MilliQ-Wasser als Lagermedium bleibt die Resistenz dagegen über mindestens 22 Monate unverändert.

Da bakterielle Sporen für die Verwendung als Bioindikatoren bei der Sterilisation mit gasförmigem Wasserstoffperoxid häufig auf Trägermaterialien immobilisiert werden, wurden Applikationsmedien und -methoden auf deren Eignung für die Immobilisierung von Sporen untersucht, da auch die Übertragung der biologischen Indikatoren auf eine feste Unterlage eine Variabilitätsursache sein kann. Mit der am besten geeigneten Methode wurden die Sporen schließlich in einer Pilotanlage zur Inaktivierung mit gasförmigem Wasserstoffperoxid behandelt. Durch die Bestimmung der Resistenz der Sporen gegenüber gasförmigem Wasserstoffperoxid wurden Abhängigkeiten der Behandlungsparameter auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit der Sporen ermittelt. Diese Abhängigkeiten wurden in ähnlichem Maß bei der Inaktivierung mit flüssigem Wasserstoffperoxid gefunden, wenngleich die Inaktivierungsmechanismen beider Methoden unterschiedlich sind.

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine Standardisierung der Herstellung biologischer Indikatoren auf Grundlage dieser Daten möglich ist und die Varianz der Resistenzen der Bioindikatoren stark minimiert werden kann.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse des Vorhabens dienen dazu, die bisher schon als Grundlage für die Validierung von Entkeimungsprozessen verwendete VDMA-Richtlinie weiterzuentwickeln. Damit werden künftig Inkonsistenzen bei der Validierung von Entkeimungsprozessen und Unsicherheiten bei der Interpretation von Testergebnissen sowie damit verbundene wirtschaftliche Schäden vermieden.

Die Ergebnisse des Vorhabens sind für eine Vielzahl von Firmen der Lebensmittel- und Pharmaindustrie sowie des Maschinen- und Anlagenbaus, insbesondere für viele kleine und mittelständische Unternehmen, von Relevanz. Die weiterentwickelte VDMA-Richt-

linie kann darüber hinaus als verbesserte Basis für die Kooperation zwischen Herstellern und Betreibern von Anlagen und Apparaten mit Entkeimungsfunktion genutzt werden.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2020.
2. Stier, P.: Einfluss der Produktionsbedingungen bakterieller Sporen auf die Eignung zur Verwendung als biologische Indikatoren für die Beurteilung der Oberflächenentkeimung mit Wasserstoffperoxid. Jahresber. Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-947492-10-7, 55-57 (2018).
3. Stier, P.: Standardisierte Herstellung von biologischen Indikatoren für die Beurteilung der Oberflächenentkeimung mit Wasserstoffperoxid und Minimierung ihrer Varianz. Jahresber. Milchwiss. Forsch. ZIEL, ISBN 978-3-947492-00-8, 51-53 (2017).

Weiteres Informationsmaterial:

Technische Universität München
Zentralinstitut für Ernährungs- und
Lebensmittelforschung (ZIEL)
Abt. Technologie
Weihenstephaner Berg 1, 85354 Freising
Tel.: +49 8161 71-3535
Fax: +49 8161 71-4384
E-Mail: ulrich.kulozik@tum.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde 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.