

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der  
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches  
Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Martin Wagner, Dipl. ECVPH)

# **Hygieneindikatoren und Vorkommen von *Listeria* *spp.* in einer Teigproduktionslinie**

## **Bachelorarbeit**

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B.Sc.)

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Vorgelegt von

Iris Dobernig

Wien, Juli 2021

**Betreuerin**

Dr. med. vet. Martina Ludewig, Dipl. ECVPH

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Abteilung für Lebensmittelmikrobiologie

Institut für Lebensmittelsicherheit, Lebensmitteltechnologie und Öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin

**Begutachter**

Dr. rer. nat. Tom Grunert

Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Funktionelle Mikrobiologie

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Problemstellung.....	1
1.2	Mikrobiologische Belastung von Mehl und Teigwaren.....	2
1.2.1	Verzehrgewohnheiten der KonsumentInnen.....	4
1.3	Vorkommen von Zoonoseerregern in Mehl und Teigwaren.....	4
1.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>L. monocytogenes</i> ).....	5
1.3.2	<i>Bacillus cereus</i> ( <i>B. cereus</i> ).....	6
1.3.3	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	7
1.4	Ziel der Untersuchungen.....	8
2	Material und Methode.....	9
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	9
2.2	Studiendesign und Probenahme.....	11
2.3	Untersuchungsmethoden.....	13
2.3.1	Multiplex-PCR.....	16
2.3.2	Bestätigung ausgewählter <i>Bacillus</i> - und Gram-negativer Isolate mit API 20 NE-System (bioMérieux, Österreich).....	17
3	Ergebnisse.....	19
3.1	Mikrobiologische Belastung und Vorkommen von <i>Listeria spp.</i> im Produktionsumfeld.....	19
3.2	Mikrobiologische Belastung und Nachweis von <i>Listeria spp.</i> in den Teigen.....	24
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	29
4	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	31
4.1	Diskussion.....	31
4.2	Schlussfolgerungen.....	33
5	Zusammenfassung.....	34
6	Summary.....	35
7	Abkürzungsverzeichnis.....	36
8	Literaturverzeichnis.....	37

9	Abbildungsverzeichnis.....	43
10	Tabellenverzeichnis.....	45

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Österreichs Landwirtschaft produzierte im Wirtschaftsjahr 2019/20 rund 5,4 Millionen Tonnen Getreide. Mit 1,5 Millionen Tonnen war Weizen (Weichweizen) die bedeutendste Getreidesorte. Der pro Kopf Verbrauch der ÖsterreicherInnen lag im Wirtschaftsjahr 2019/20 bei 92,78 kg (Tab. 1, Statistik Austria 2021). Im Vergleich zu dem Wirtschaftsjahr 2014/15 zeigt sich im Wirtschaftsjahr 2019/20 ein Anstieg des pro Kopf Verbrauchs an Getreide um 3,8 kg (Abb. 1, Statistik Austria 2021).

Tab. 1: Bilanz des Verbrauchs an Getreide in Österreich im Wirtschaftsjahr 2019/20 in Tonnen\*.

Versorgungsbilanz für Getreide 2019/20 in Tonnen							
	Weichweizen	Hartweizen	Roggen	Gerste	Hafer	Körnermais	Getreide insgesamt
<b>Erzeugung</b>	1.523.930	80.712	200.841	832.971	77.805	2.298.882	5.416.925
<b>Inlandsverwendung</b>	1.750.505	78.681	178.162	970.701	90.204	2.723.475	6.184.684
<b>Futter</b>	534.829	633	57.692	687.625	59.826	1.292.556	2.933.469
<b>Nahrungsverbrauch (brutto)</b>	651.656	72.885	105.289	8.431	24.396	200.391	1.077.536
<b>Pro Kopf in kg</b>	59,7	5,8	9,2	0,7	2,1	14,0	92,8
<b>Selbstversorgungsgrad in %</b>	87	103	113	86	86	84	88

\* Daten; Statistik Austria 2021

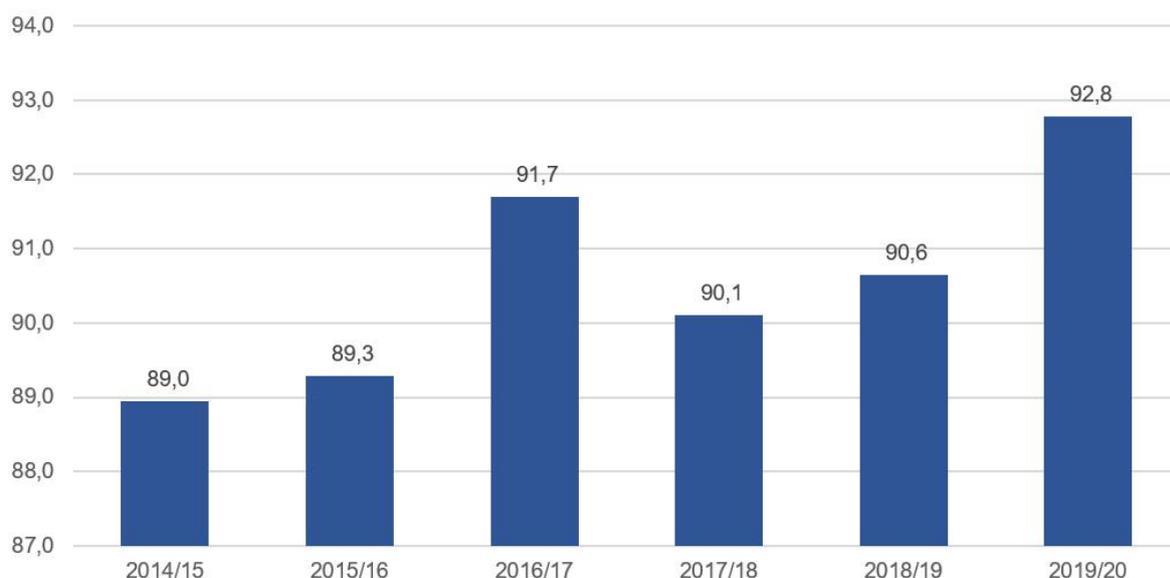


Abb. 1: Pro Kopf Verbrauch in kg (Getreide insgesamt) von den Wirtschaftsjahren 2014/15 bis 2019/20 (Daten: Statistik Austria 2021).

Ein wesentlicher Teil dieses Getreides wird für die Mehlherstellung verwendet, um dann in weiterer Folge zu Teigwaren für die humane Ernährung verarbeitet zu werden. Grundsätzlich können Naturprodukte, wie Mehl immer mit pathogenen Mikroorganismen wie *Salmonella*, pathogenen *Escherichia coli* oder anderen pathogenen Mikroorganismen kontaminiert sein (Myoda et al. 2019). Daher ist es besonders wichtig, dass während des gesamten Verarbeitungsprozesses von der Ernte, der Mehlgewinnung bis hin zur Teigherstellung auf eine gute Verarbeitungshygiene geachtet wird. Lebensmittelproduzierende Betriebe müssen sich deshalb, um die Anforderungen zu erfüllen, an die gesetzlichen Vorgaben zur Einhaltung der Hygienevorschriften und zur Anwendung des HACCP-Konzepts (Hazard Analysis and Critical Control Point) halten. Dies ist in der EU-Verordnung (Verordnung (EG) 852/2004) geregelt. Dieses Konzept verfolgt das Ziel die Lebensmittelsicherheit und –qualität der Produkte zu überwachen und beinhaltet unter anderem Vorgaben zur Bestimmung von kritischen Kontrollpunkten, Festlegung von Grenzwerten, rechtzeitigen Durchführung von Korrekturmaßnahmen und verpflichtet die Betriebe zur Dokumentation der Ergebnisse. Ein weiterer Aspekt in diesem System sind Vorgaben für die Personalhygiene und Personalgesundheit (Österreichisches Lebensmittelbuch 2018).

Ebenso sind die Lebensmittelproduzenten verpflichtet, die in der EU-Verordnung (Verordnung (EG) 2073/2005) festgelegten Kriterien für Mikroorganismen (Lebensmittelsicherheits- & Prozesshygienekriterien) einzuhalten und diese, im Rahmen der gesetzlich festgelegten Eigenkontrollpflicht zu überprüfen. Danach sind alle verzehrfertigen Lebensmittel in diesem Rahmen, auf *Listeria monocytogenes* zu untersuchen. Weiterhin liegen Richt- und Warnwerte für rohe trockene Tiefkühlbackwaren der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM 2018) vor, die u. a. Warnwerte für präsumtive *Bacillus cereus* ( $> 3,0 \log \text{KbE/g}$ ). Ziel ist es, die KonsumentInnen vor Infektionen mit lebensmittelassoziierten Mikroorganismen und Toxinen zu schützen. Im Rahmen der betrieblichen Eigenkontrolle wurden in einem österreichischen Teigverarbeitungsbetrieb Abweichungen festgestellt. Aufgrund dessen, sollte in dieser Bachelorarbeit die mikrobielle Belastung einer Teigproduktionslinie während der laufenden Produktion und nach der Reinigung und Desinfektion analysiert werden. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Verbreitung von *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* auf lebensmittelberührenden Flächen und in Restteigproben gelegt.

## 1.2 Mikrobiologische Belastung von Mehl und Teigwaren

Hauptzutat von Teigen ist Mehl. Dieses wird durch verschiedene Prozesse aus Getreide gewonnen, welches während der Wachstumsperiode unterschiedlichen

Kontaminationsquellen ausgesetzt wird. Tiere können durch ihren Kot dieses Getreide mit pathogenen Keimen verunreinigen (Laca et al. 2006). Jedoch auch bei der Ernte, der Lagerung und der anschließenden Bearbeitung können Kontaminationen mit Krankheitserregern nicht ausgeschlossen werden (Sabillón und Bianchini 2016).

Bei der Lagerung weist Getreide einen Feuchtigkeitsgehalt von 8 – 12 % auf. Um Mehl zu erzeugen, müssen die Getreidekörner gereinigt und gescheuert werden, um Steine und andere Nicht-Weizenprodukte zu entfernen. Nach der ersten Reinigung wird Wasser zugegeben, um die Feuchtigkeit auf 14 – 15 % zu erhöhen. Dies ist notwendig, damit die Plastizität der äußeren Schicht des Getreides erhöht wird und es verhindert, dass es während des Fräsprozesses zerbricht. Bei weiteren Schleif- und Siebvorgängen wird zunächst Grieß und im weiteren Prozess Mehl produziert. Diese Vorgänge erzeugen Wärme und dies führt zu einer Kondensation von Feuchtigkeit in den Maschinen. Zusätzlich sammeln sich Mehlrückstände an, was dazu führt, dass sich Mikroorganismen etablieren und es in folgenden Prozessen zu Kontaminationen kommt (Berghofer et al. 2003).

Normalerweise ist Mehl aufgrund seines geringen Wassergehaltes kein gutes Wachstumsmedium für Mikroorganismen. Dieser soll bei Schrot, Grieß und Mehl einen Höchstwert zwischen 14,5 und 15,8 % nicht überschreiten (Österreichisches Lebensmittelbuch 2018). Jedoch können pathogene Bakterien in diesen Produkten gut überleben, um dann bei der Weiterverarbeitung in das Endprodukt übertragen zu werden (Rose et al. 2012). Neben unterschiedlichen Pilz- und Hefearten können sich unter anderem *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae* oder auch *Listeriaceae* ansiedeln (Laca et al. 2006, Taylor et al. 2018). In Australien wurden mehrere Getreidemöhlen in einem Zeitraum von zwei Jahren beprobt, um die Kontamination von Getreide zu ermitteln. Die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl lag zwischen 2,0 log und 5,0 log KbE/g und die meisten Proben enthielten Coliforme (bis 1,0 log MPN/g (most probable number/g)) und *Bacillus spp.* (bis 4,0 log/g) (Berghofer et al. 2003).

In einer anderen Studie aus der Türkei wurden auch mehrere Mehlproben von verschiedenen Standorten entnommen und auf pathogene Mikroorganismen untersucht. Hier lag die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl zwischen 2,0 log und 8,0 log KbE/g. Zudem wurden *E. coli*-Keimzahlen bis 1,4 log MPN/g ermittelt (Aydin et al. 2009).

### 1.2.1 Verzehrgewohnheiten der KonsumentInnen

Eine Studie auf Basis einer Online-Umfrage zum KonsumentInnenverhalten und -wissen zur Lebensmittelsicherheit von Mehl hat ergeben, dass 66 % der befragten KonsumentInnen, rohen mit Mehl hergestellten Teig essen (Feng und Archila-Godínez 2021). Nur für 26 – 56 % der StudienteilnehmerInnen stellt der Verzehr der verschiedenen Rohteige (Gebäck-, Brot-, Nudelteige) ein mikrobiell bedingtes Erkrankungsrisiko dar. Insgesamt wussten 85 % der Befragten nichts über lebensmittelbedingte Ausbrüche die mit mehlhaltigen Produkten in Verbindung gebracht werden konnten. Im Vergleich dazu wussten 70 % der Befragten, dass rohes Fleisch oder Eier eine Infektionsquelle für lebensmittelbedingte Erkrankungen sind. Demzufolge wird bei der Küchenarbeit mehr auf die Hygiene geachtet.

Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, dass man das Bewusstsein für die Risiken, die von Rohmehl bzw. für Rohteigen ausgehen verbessert und die Herstellerangaben bei der Zubereitung von Teigwaren (z. B. Koch- und Backzeiten) beachtet werden. Dazu hat z. B. die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und das Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Empfehlungen veröffentlicht, damit sich die Verbraucher der Risiken bewusst werden, stärker auf Hygiene bei der Verarbeitung achten und die empfohlenen Erhitzungstemperaturen einhalten (CDC-1 2019, FDA 2017).

### 1.3 Vorkommen von Zoonoseerregern in Mehl und Teigwaren

Lebensmittelbedingte Zoonosen können zu schweren Erkrankungen bis hin zum Tod führen. Besonders gefährlich ist der Trend, rohen Keksteig zu essen. Aufgrund der ungebackenen Zutaten kann es zur Aufnahme von verschiedensten, z. T. auch pathogenen Keimen kommen. Besonders häufig waren *Listeria spp.*, *B. cereus* und pathogene *E. coli* in kontaminiertem Weizenmehl oder daraus verarbeiteten Produkten, Ursache für Ausbrüche von lebensmittelbedingten Infektionen (Myoda et al. 2019). In den letzten Jahren gab es in den USA vermehrt Ausbrüche bedingt durch pathogene *E. coli*, welche auf kontaminiertes Mehl und den Verzehr von daraus hergestellten rohem Fertigkeksteig zurückzuführen waren (Myoda et al. 2019, Neil et al. 2012, CDC-2 2019).

In Kanada kam es ebenso zu einem Ausbruch von EHEC durch kontaminiertes Mehl (Public Health Agency of Canada 2017). Nach dem Verzehr von Nudelteig verstarb eine Person durch eine *B. cereus*-Intoxikation (Naranjo et al. 2011). In Deutschland und Österreich kam es im Jahr 2019 zu einem Rückruf eines Mürbteiges aufgrund einer Kontamination mit Verotoxin bildenden *E. coli* (VTEC) (eFoodAlert 2019).

### 1.3.1 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

*L. monocytogenes* ist ein Gram-positives, nicht sporenbildendes, fakultativ anaerobes Stäbchen. Zur Gattung *Listeria* gehören sechs Spezies wobei nur *L. monocytogenes* für den Menschen pathogen ist (Gasarov et al. 2005).

*L. monocytogenes* kommt in der Natur verbreitet vor, beispielsweise in Abwässern, in der Erde oder in Pflanzen. Aber auch Lebensmitteln aus tierischer Herkunft können oft mit dem Keim kontaminiert sein (Messelhäußer et al. 2017). Eine Studie aus Portugal untersuchte mehrere Lebensmittel auf das Vorhandensein von *L. monocytogenes*. In fünf Mehlproben (18,5 %, n=27) wurde *L. monocytogenes* gefunden (Mena et al. 2004). Bei optimalen Wachstumsbedingungen kann es sich bei Temperaturen von 4 °C bis 45 °C vermehren. Das bedeutet, dass sich der Keim auch im Kühlschrank weiter vermehren kann (Mena et al. 2004). Jedoch hält es auch wiederkehrende Frost- und Kälteperioden problemlos aus. Es zeigt außerdem eine sehr hohe Osmotoleranz und kann in Medien mit bis zu 14 % NaCl wachsen (Shabala et al. 2008). Auch auf Arbeitsflächen von Lebensmittelproduktionsstätten kann das Bakterium mehrere Tage überleben, da es Biofilme bildet, welche auf Oberflächen von vielen Materialien wie Kunststoff, Glas oder Edelstahl anheften (Winkelströter et al. 2015). In diesen Biofilmen ist *L. monocytogenes* vor verschiedenen Umweltfaktoren wie z. B. Säuren und UV-Strahlung geschützt und verträgt höhere Konzentrationen von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln (Da Silva und De Martinis 2013).

Im Mehl konnte *L. monocytogenes* bei Raumtemperatur gelagert bis zu 210 Tagen überleben und aufgrund der geringen Produktfeuchte wurden höhere Erhitzungstemperaturen von bis zu 80 °C toleriert (Taylor et al. 2018). Bei der Verarbeitung von Mehl zu Teig kann sich der Keim wieder vermehren und bei unzureichender Erhitzung oder Rohverzehr von Teigen kann eine Infektion mit *L. monocytogenes* nicht ausgeschlossen werden (Unger et al. 2021). Eine zuverlässige Abtötung geschieht während des Backvorganges bei Temperaturen von mind. 160 °C und über 25 min, welche haushaltstypische Backöfen auf jeden Fall erreichen (Unger et al. 2021).

Weiterhin war *L. monocytogenes* gegen zahlreiche Antibiotika resistent, wobei bei 14 von 18 geprüften Wirkstoffen Resistenzen auftraten. Dies war am häufigsten bei Tetracyclin, Ciprofloxacin und Streptomycin der Fall (Yan et al. 2010). Damit ist es höchst widerstandsfähig und kann deshalb als human pathogener Keim sehr gefährlich werden, sollte es zu einer Infektion mit Listeriose kommen.

### 1.3.2 *Bacillus cereus* (*B. cereus*)

*B. cereus* ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium. Es gehört ebenso wie *B. anthracis* und *B. thuringiensis*, u. a. zur *B. cereus* Gruppe (Rasko et al. 2005, Okinaka und Keim 2016, Ehling-Schulz et al. 2019). Es bildet zwei Toxine, welche zu zwei Arten von Lebensmittelvergiftungen führen können: dem Durchfall- und dem Erbrechen Syndrom. Auslöser für das Erbrechen Syndrom ist das emetische Toxin Cereulid (Naranjo et al. 2011). Für das Durchfallsyndrom sind mehrere Proteinenterotoxine verantwortlich (Stenfors Arnesen et al. 2008).

Der Wachstumsbereich von *B. cereus* liegt zwischen 4 °C und 55 °C. Während der Ernte, des Verarbeitungsprozesses oder durch unsachgemäße Lagerung kann Mehl mit *B. cereus* kontaminiert werden. In einer Studie in Australien wurden verschiedene Getreideproben untersucht und auf unterschiedliche Keime analysiert, unter anderem auf *B. cereus*. In 81 % der Weizenproben wurde dieser Erreger nachgewiesen (Berghofer et al. 2003). Zudem war *B. cereus* in allen Phasen des Mahlprozesses des Getreides vorhanden und nach der finalen Verarbeitung zu Mehl waren mehr Proben (93 % im Mehl) im Vergleich zum Produktionsstart mit dem *Bacillus* kontaminiert (Berghofer et al. 2003). Als Ursache dafür wurde die Anreicherung von *Bacillus*-Sporen in den Mahlanlagen und die darauffolgende Kontamination des Mahlgutes diskutiert.

Die in der Literatur für Mehl publizierten *B. cereus*-Keimzahlen lagen überwiegend unter dem üblichen Warnwert von 3,0 log KbE/g. *B. cereus*-Keimzahlen, ermittelt in Australien, Brasilien und der Türkei, lagen bei maximal 0,1 log MPN/g bzw. zwischen 1,0 log bis 3,0 log KbE/g (Berghofer et al. 2003, Rossi et al. 2021, Aydin et al. 2009).

Unter dem Einfluss von Stress bildet *B. cereus* Sporen aus, die resistent gegenüber Hitze, Strahlung, Einfrieren und Trocknen sind (Bottone 2010). Vor allem die Resistenz gegenüber Hitze, z. B. Pasteurisation führt in der Lebensmittelindustrie zu Problemen, da Sporenverunreinigungen produktberührender Bereiche nur sehr schwer entfernt werden können (Daelman et al. 2013). *B. cereus* hat außerdem die Fähigkeit einen Biofilm zu bilden, welcher das Bakterium vor Reinigungs- und Desinfektionsmitteln schützt (Ryu und Beuchat 2005).

Die natürlichen *B. cereus*-Kontaminationen von Mehlen gelangen bei der Verarbeitung auch in den Teig, wo aufgrund von weiteren Zutaten der Schutz der Sporen noch verstärkt wird (Rossi et al, 2021). Vergleichende Untersuchungen zur Hitzestabilität (96 °C) von *B. cereus*

in Wasser und in Teig zeigten, dass im Teig nach der Erhitzung höhere *B. cereus*-Keimzahlen (5.0 log KbE/g zu 2,0 log KbE/g im Teig) nachweisbar waren. Zudem wurde festgestellt, dass die Sporen Backtemperaturen von 180 °C überstehen können und es bei anschließender Lagerung bei Raumtemperatur zu einer Vermehrung von *B. cereus* kommt (Rossi et al. 2021).

Um ein erneutes Auskeimen der Sporen zu verhindern, ist es für die Lebensmittelsicherheit von großer Wichtigkeit, eine durchgehende Kühlkette bei der Lagerung der Produkte einzuhalten (Webb et al. 2019).

### 1.3.3 *Escherichia coli* (*E. coli*)

*E. coli* ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium, welches zur normalen Darmflora bei Menschen und Tieren gehört. Es kann sich bei Temperaturen von 8 – 45 °C und somit auch bei üblichen Kühlschrankschranktemperaturen vermehren (BfR 2020). Im Normalfall ist *E. coli* nicht pathogen. Jedoch gibt es Gruppen, die pathogene Eigenschaften besitzen und Krankheiten beim Menschen verursachen können (Kaper et al. 2004). Für eine dieser Gruppen ist die Bildung von so genannten Shiga- oder Vero-Toxinen charakteristisch. Sie werden deshalb als Shiga-Toxin bildende *E. coli* (STEC) oder Vero-Toxin bildende *E. coli* (VTEC) bezeichnet. Wiederkäuer und hier vor allem Rinder gelten hier als primäres Reservoir für diese *E. coli*-Gruppe (Oporto et al. 2019). Verursachen diese *E. coli* beim Menschen das klinische Bild einer enterohämorrhagischen Colitis, so werde sie auch als *Enterohämorrhagische E. coli* (EHEC) bezeichnet. In Mehl wurde immer wieder EHEC (STEC). In den USA wurden 5.176 Weizenproben auf EHEC untersucht. In 0,44 % der Proben konnte der Erreger nachgewiesen werden (Myoda et al. 2019). In deutschen Mehlproben waren 19,0 % (total n=51) der Proben mit STEC kontaminiert (Mäde et al. 2017). In mit EHEC (8,0 log KbE/g) beimpften Weizenmehl gelang nach 16 Tagen kein quantitativer Nachweis mehr. Allerdings konnten alle getesteten EHEC-Serovare bis zu einem Jahr nach selektiver Anreicherung in den Mehlproben nachgewiesen werden (Forghani et al. 2019).

Der Trend Teigprodukte ohne Erhitzung zu essen, sowie der generelle Verzehr von rohem Teig, stellt ein Risiko für EHEC-Infektionen dar. In den USA gaben 53 % der Studierenden an, regelmäßig rohe Teige zu konsumieren (Wu et al. 2017). Zudem kann es durch das Bestauben mit purem Mehl, z. B. von Oberflächen bei der Teigbehandlung zu einer Kontamination mit EHEC kommen oder der Erreger überlebt den Erhitzungsprozess bei dicken Teigstücken (Gieraltowski et al. 2017).

In künstlich kontaminiertem Weizenmehl (8,0 log KbE/g) wurde nach Erhitzung bei 70 °C für 60 min. eine Reduktionsrate von 4,0 log KbE/g erreicht (Forghani et al. 2019). Das deutsche Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) empfiehlt zu Teig verarbeitete Mehle auf mindestens 70 °C für 2 min. zu erhitzen (BfR 2020).

In Teigen, z. B. Keksteig, mit höheren Fettgehalten und niedriger Wasseraktivität (Gehalt an freiem Wasser) könnte eine höhere Hitzeresistenz der *E. coli* gegeben sein (Wu et al. 2017). Es ist generell bekannt, dass in fetthaltigen Lebensmitteln (z. B. Schokolade) die Überlebensrate von Mikroorganismen unter Hitzeeinwirkung zunimmt (Van Asselt und Zwietering 2006).

#### 1.4 Ziel der Untersuchungen

Ziel der Untersuchungen war es, den Kontaminationsgrad von produktberührenden Flächen einer Teigverarbeitungslinie während der Produktion zu ermitteln. Zudem wurden Restteigproben, die während des Produktionsprozesses anfallen mikrobiologisch untersucht. Nach Auswertung dieser Ergebnisse und Durchführung einer Reinigungs- und Desinfektion der gesamten Anlage sollten die mikrobielle Belastung der gleichen Probenahmestellen erneut geprüft werden, um die Effektivität der Maßnahme zu kontrollieren. Neben der Gesamtkeimzahl wurden Hygieneindikatoren (*Enterobacteriaceae*), präsumtive *B. cereus* und *Listeria spp.* in die Untersuchungen einbezogen.

Hierzu wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Auf den teigberührenden Kontaktflächen werden während der Produktion überwiegend *Bacillus spp.* nachgewiesen.
- *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* können in Restteigen und im Produktionsumfeld (Lebensmittelkontaktflächen) festgestellt werden.
- Im Zuge der Reinigung und Desinfektion gelingt es, *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* auf den Kontaktflächen zu eliminieren.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Für die Untersuchungen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

**Tab. 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Nährmedien	
ALOA-Agar	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar (VRBG)	
Rapid L. Mono-Medium	
MacConkey (MCK)-Agar	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Mannitol-Eigelb-Polymyxin (MYP)-Agar	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
Trypto-Casein-Soja-Agar mit 0,6 % Hefeextrakt (TSAYE)	Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich
Sterile Ringerlösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Halbfraser-Bouillon	Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich
Fraser-Bouillon	bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Frankreich
gepuffertes Peptonwasser (BPW)	Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich
ChromoSelect-Agar	
Geräte	
Brutschrank 30 °C Ehret RS232	Ehret GmbH Life Science Solutions, Freiburg, Deutschland
Brutschrank 37 °C Ehret RS232	Ehret GmbH Life Science Solutions, Freiburg, Deutschland
IKA Vortex Genius 3 Schüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Schuett phoenix II standard Sicherheits-Bunsenbrenner	Schuett-biotec GmbH, Göttingen, Deutschland
Stomacher Lab-Blender 400	Seward Ltd., Worthing, Vereinigtes Königreich
Eppendorf Tischzentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Nikon Alphaphot YS-2	Nikon, Tokyo, Japan
T100 Thermocycler	Biorad, Hercules, CA, USA
GelDoc 2000 75S/03005	Biorad, Hercules, CA, USA
Elektrophorese PowerPac Universal Power Supply	Biorad, Hercules, CA, USA
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heizblock MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
Hilfsmittel	
Thermo Scientific Finnpipett F2 Pipette mit variablem Volumen 10- 100 µl	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Thermo Scientific Finnpipett F2 Pipette mit variablem Volumen 100- 1000 µl	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

Pipettenspitzen 1250 µl	
Pipettenspitzen 100 µl	
Parafilm M 4 in. x 250 ft	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sarstedt Impfschlinge 10 µl blau	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt Impfschlinge 1 µl weiß	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland
Raucotupf Stieltupfer	Goodwood Medical Care Ltd., Jinzhou district, Dalian, China
Schülke mikrozyd AF liquid Flächendesinfektionsmittel	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Interscience Bag Filter P	Interscience, Saint Nom, Frankreich
Interscience Bag Open Taschenöffner	Interscience, Saint Nom, Frankreich
Pasteurpipetten Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Messzylinder, Silberbrand, Klasse B, Boro 3.3	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Maximum Recovery Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-Lock-Tubes 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon™ Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Thermo Scientific Objektträger Menzel, geschnitten	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Unilab, Innsbruck, Österreich
Multiply® PCR plates	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tanita Waage KD321	Tanita Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Hartmann Peha-soft nitrile fino puderfrei Untersuchungshandschuhe Gr. S	Paul Hartmann GmbH, Wiener Neudorf, Österreich
<b>Reagenzien</b>	
Cytochrom-Oxidase-Reagenz	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Kalium-Hydroxid (KOH; 3 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nigrosin-Färbelösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chelex® 100 Resin Lösung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Diethylpyrocarbonate Wasser (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
peqGREEN DNA Gelfärbung	VWR International, Radnor, USA
Tris-Borate-EDTA Puffer	VWR International, Radnor, USA
Tris-HCl Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Loading Dye Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Buffer	
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PeqGold-Agarose	VWR International, Radnor, USA
Siwi2 [5-TAACTGAGGTAGCGAGCGAA-3]	
Ino2 [5-ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC-3]	

MonoA [5-CAAAGTCTAACACAGCTACT-3]	
MugraI	
Lis1B [5'-TTATACGCGACCACCGAAGCCAAC-3']	
API 20 NE Testkit	bioMérieux Austria GmbH, Wien, Österreich
API 10 S Testkit	bioMérieux Austria GmbH, Wien, Österreich

## 2.2 Studiendesign und Probenahme

Insgesamt wurden von 57 Proben (produktberührende Flächen der Verarbeitungslinie) die Gesamtkeimzahl, die Anzahl der *Enterobacteriaceae* und präsumtiven *B. cereus* ermittelt. Zudem wurden diese Punkte, sowie neun weitere Umfeldproben auf *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* untersucht.

Die Entnahme der Umfeldproben erfolgte jeweils (Tab. 3) von im Vorfeld festgelegten Bereichen (Lebensmittelkontaktflächen und Bereiche, die nicht mit Lebensmitteln in Berührung kommen) entlang der Verarbeitungslinie mittels Schwamm und Bürste (dreimal während der Produktion, einmal unmittelbar nach Reinigung und Desinfektion) (Abb. 2). Gleichzeitig wurden Restteigproben (n=16), die im Produktionsprozess anfallen für die mikrobiologische Untersuchung entnommen. Nach Reinigung und Desinfektion wurden die gleichen Untersuchungspunkte und zusätzlich an schwer zugänglichen Lebensmittelkontaktflächen beprobt. Alle Proben wurden gekühlt (7 °C) zum Labor transportiert und am Tag der Probenahme analysiert. Teigproben standen nach Reinigung und Desinfektion nicht zur Verfügung.

Tab. 3: Tag der Probenahme während der Produktion und nach Reinigung und Desinfektion.

Probenahmetag	Datum
A	09.02.2021
B	16.02.2021
C	04.03.2021
D	24.03.2021

A/B/C: während der Produktion, D: nach Reinigung und Desinfektion.

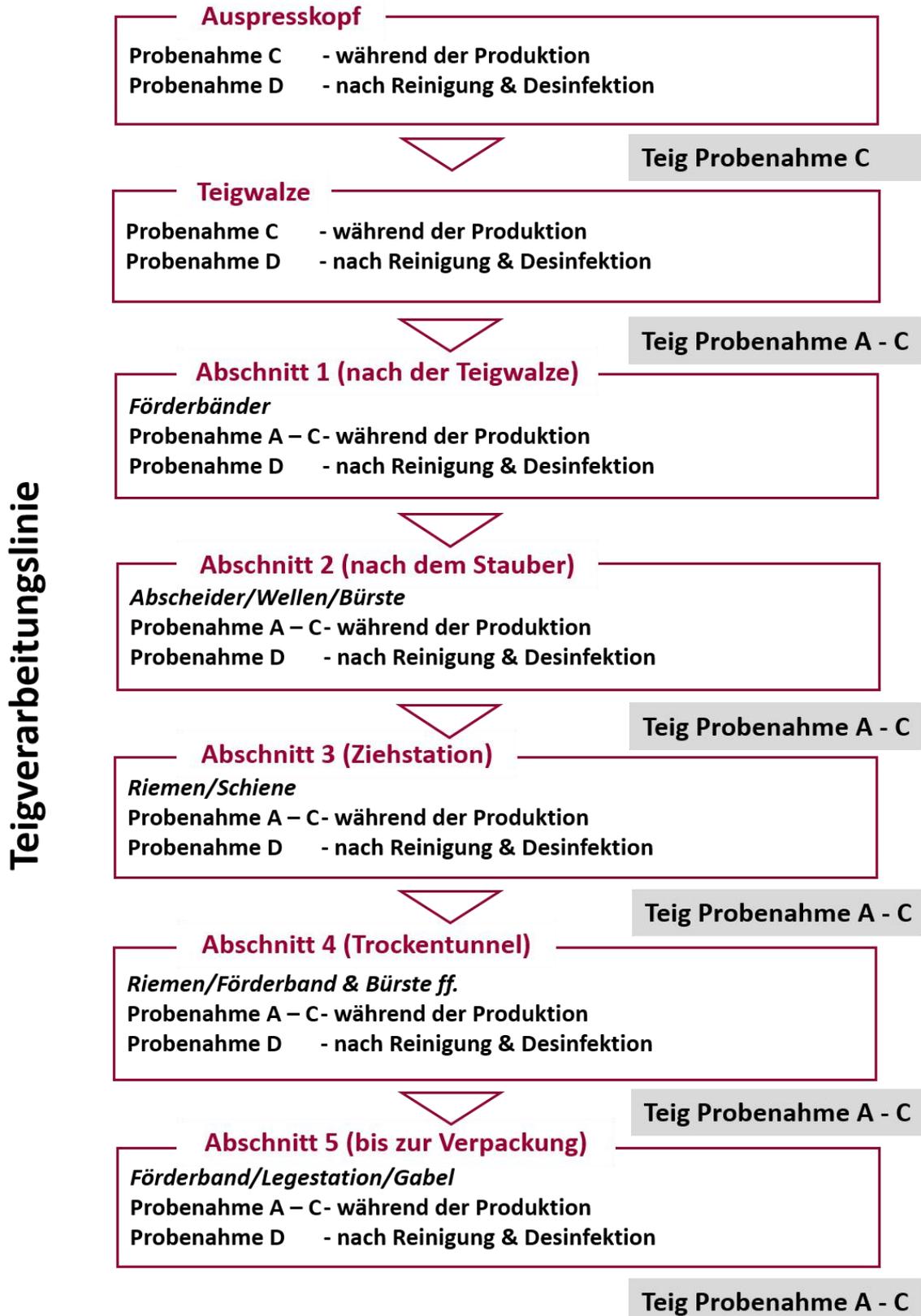


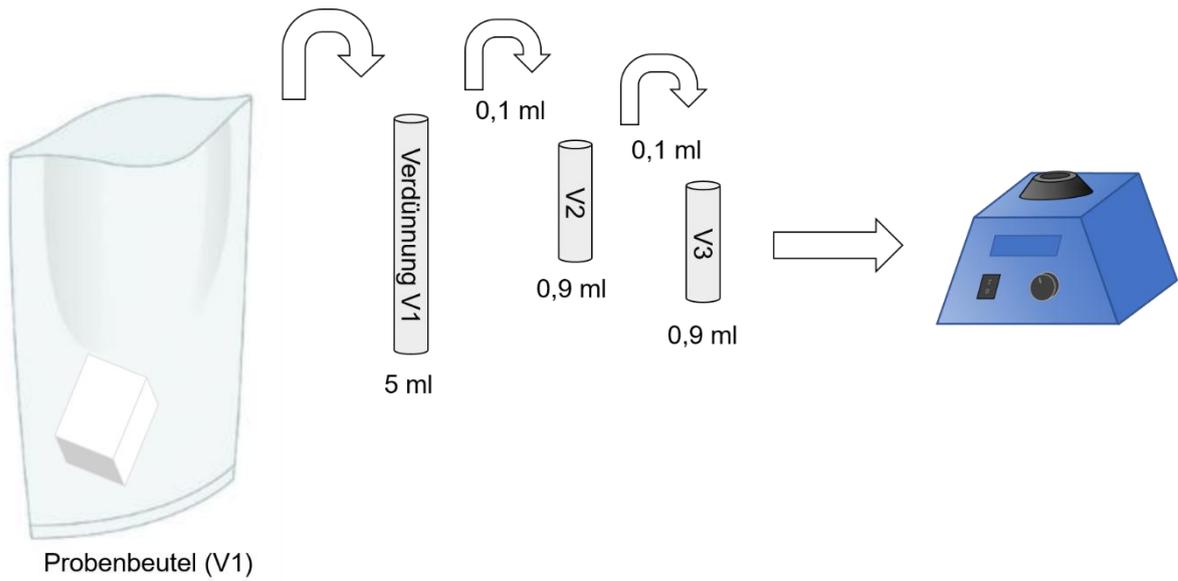
Abb. 2: Probeentnahmestellen (Auspresskopf, Teigwalze und Abschnitte 1 bis 5) während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).

## 2.3 Untersuchungsmethoden

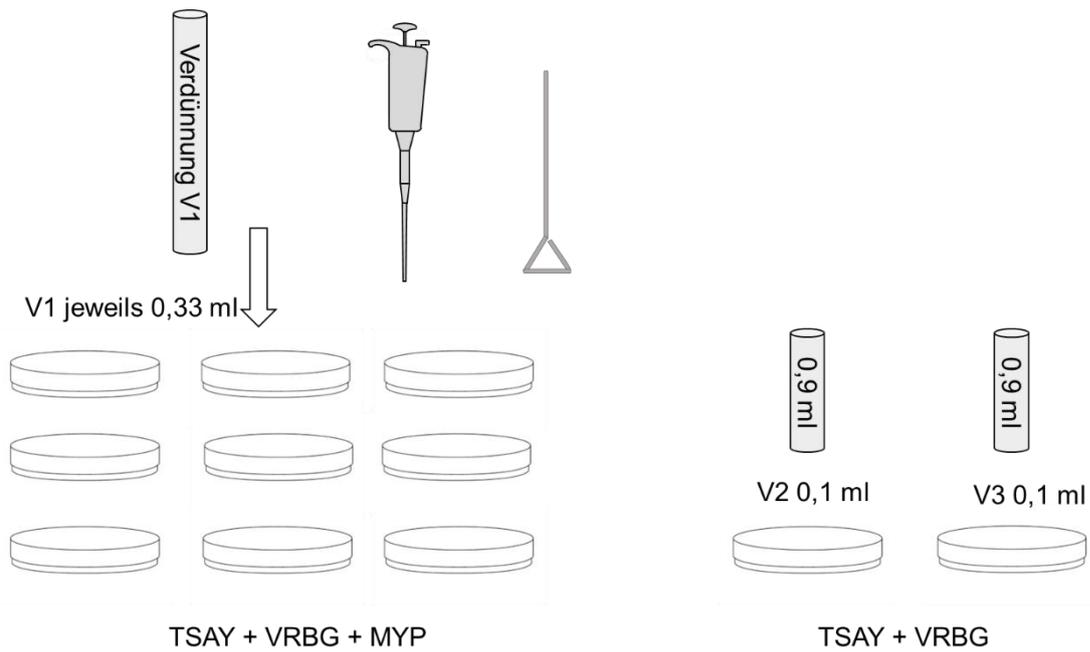
Für die quantitativen Untersuchungen wurden die Schwämme und Bürstchen gemeinsam in die Probenbeutel gegeben und mit 50 ml gepufferten Peptonwasser (BPW) (Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich) aufgefüllt und anschließend 1 min. kräftig mit der Hand durchgeknetet. Für die Analyse der Teigproben wurden 25 g in einen Stomacherbeutel eingewogen, danach 225 ml BPW dazugegeben und alles für 30 Sekunden in einem Stomacher (Stomacher Lab Blender 400) (Seward Ltd., Worthing, Vereinigtes Königreich) zerkleinert und gemischt. Anschließend wurden 5 ml dieser V1-Verdünnung in ein separates Röhrchen pipettiert und aus jeder Verdünnungsstufe (V1 bis V3) 0,1 ml in 0,9 ml Ringerlösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) überführt (Abb. 3). Die verdünnten Proben wurden dem Schema in Abb. 4 und Abb. 5 folgend auf das entsprechende Nährmedium pipettiert und mittels Spatel gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der Nähragarplatten erfolgte nach den Vorgaben der Hersteller (siehe Tab. 4).

Die Differenzierung der auf TSAY- und VRBG-Agar (Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich) gewachsenen Kolonien erfolgte nach einer Subkultivierung (TSAY, 24 h, 37 °C) (Ehret GmbH Life Science Solutions, Freiburg, Deutschland) mittels Oxidase- (bioMérieux, Deutschland) und KOH-Test (Merck KGaA). Isolate, die KOH-positiv reagieren sind Gram-negativ. Mit dem Oxidase-Test wurden Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (Oxidase-negativ) von anderen Gram-negativen, aber Oxidase-positiven Isolaten unterschieden. Bei der Berechnung der *Enterobacteriaceae*-Keimzahl wurden nur die Oxidase-negativen Kolonien berücksichtigt.

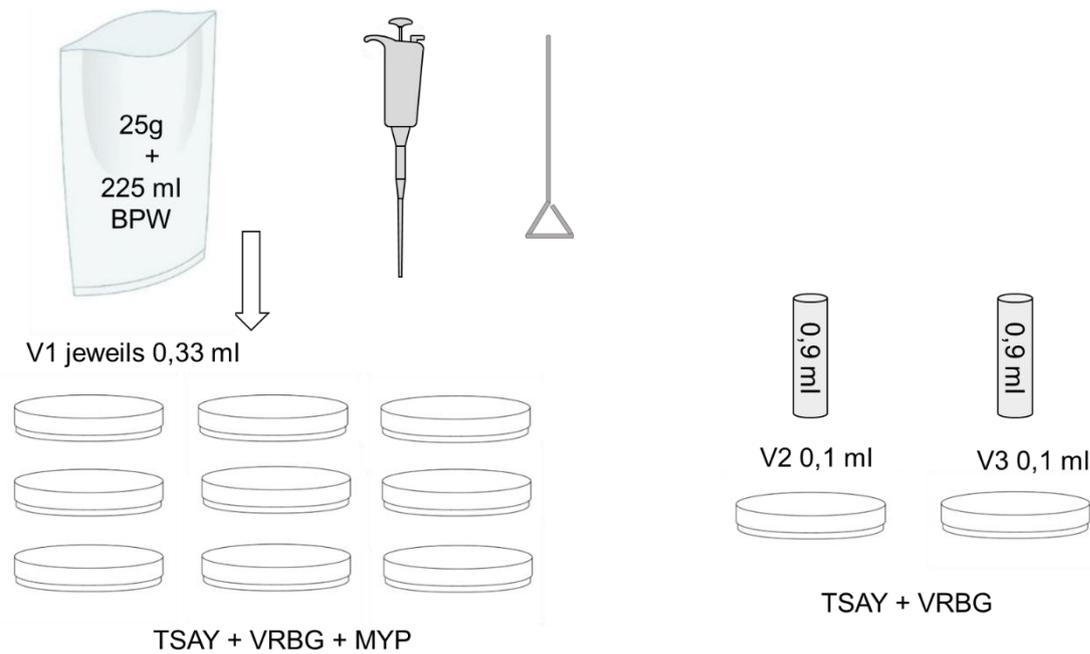
Für den Nachweis von *Listeria spp.* wurden in die Probenbeutel mit Schwamm und Bürstchen 70 ml bzw. zu 25 g Teig 225 ml Halbfraserbouillon (Biokar, Group Solabia, Pantin Cedex, Frankreich) dazugegeben. Die Probenbeutel mit Schwamm und Bürstchen wurden wieder mit der Hand geknetet und die Teigproben wie oben beschrieben im Stomacher bearbeitet. Die Proben wurden für 24 h bei 30 °C vorangereichert und danach eine volle 0,01 ml Impfschlinge (Sarstedt AG&Co, Nürnberg, Deutschland) fraktioniert auf eine ALOA-Agar-Platte (bioMérieux, Frankreich) ausgestrichen und bei 37 °C für 24 – 48 h bebrütet. Zudem wurden 0,1 ml der Halbfraser-Bouillon in Vollfraseröhrchen (bioMérieux, Frankreich) pipettiert und für 48 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte wiederum der Ausstrich auf ALOA-Agar. Die Bestätigung verdächtiger Kolonien von *Listeria spp.* und von *L. monocytogenes* erfolgte mittels Multiplex-PCR (Bubert et al. 1999).



**Abb. 3: Herstellung der dezimalen Verdünnungsreihe V1 bis V3 für die Bestimmung der Keimzahl im Produktionsumfeld und im Teig.**



**Abb. 4: Quantitative Untersuchung der Umfeldproben – Pipettierschema für die einzelnen Nähragarplatten.**



**Abb. 5: Quantitative Untersuchung der Teigproben – Pipettierschema für die einzelnen Nähragarplatten.**

**Tab. 4: Inkubationszeit und –temperatur der verwendeten Nähr- und Anreicherungsmedien.**

Nährmedium	Inkubations-Parameter
ALOA-Agar	24 h bei 37 °C
Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar (VRBG)	24 – 48 h bei 37 °C
Mannitol-Eigelb-Polymyxin (MYP)-Agar	24 h bei 30 °C
Trypto-Casein-Soja-Agar mit 0,6 % Hefeextrakt (TSAY)	24 – 72 h bei 30 °C
Halbfraser-Bouillon (selektive Voranreicherung)	24 h bei 30 °C
Fraser-Bouillon (selektive Anreicherung)	48 h bei 37 °C

Für die Berechnung der quantitativen Ergebnisse wurden Keimzahlen ab zehn bis maximal 300 Kolonien pro Agarplatte berücksichtigt. Bei den Umfeldproben wurde die zugegebene Verdünnungsmenge (50 ml) bei der Berechnung berücksichtigt und die Keimzahl in koloniebildende Einheiten pro Fläche (KbE/f) angegeben. Die Keimzahlen der Teige beziehen sich auf koloniebildende Einheiten pro Gramm (KBE/g). Die Berechnung der Keimzahlen erfolgte nach ISO 7218:2014-04 nach der Formel in Abb. 6. Für die Auswertung wurden die Keimzahlen logarithmiert und in Excel (Microsoft Excel 2019) eine deskriptive statistische Auswertung (mittlere Keimzahlen, Standardabweichung, Minimum- und Maximumwerte) durchgeführt.

$$KZ = \bar{c} \cdot v \cdot \frac{1}{10^{-n}} \quad \Rightarrow \quad \bar{c} = \frac{\Sigma c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$$

Abkürzungen:

KZ= Keimzahl

$\bar{c}$  = gewichteter Mittelwert gezählter Kolonien

$\Sigma c$  = Summe der Kolonien aller ausgezählter Platten

$n_1$  = Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren

Verdünnungsstufe

$n_2$  = Anzahl der Platten der nächsthöheren Verdünnungsstufe

$10^{-n}$  = niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe

$v$  = Verdünnungsfaktor

**Abb. 6: Berechnung der Keimzahl in Umfeld- und Teigproben.**

### 2.3.1 Multiplex-PCR

Für die Bestätigung von *L. monocytogenes*-verdächtigen Kolonien wurde eine Multiplex-PCR zum Nachweis von *iap*-Gen durchgeführt (Bubert et al. 1999).

Dafür erfolgte zuerst eine DNA-Extraktion mittels Plattenabschwemmung. Diese wurde von allen ALOA-Platten durchgeführt, auf denen nach Anreicherung im Halb- oder Vollfraser *Listeria*-verdächtige Kolonien (Tab. 4) in Mischkulturen gewachsen waren. Für diese Plattenabschwemmung wurde pro Probe in ein 2 ml Eppendorftube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) 1 ml Tris HCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gegeben. Danach wurden mit einer 10  $\mu$ l Impfschlinge alle Kolonien abgetragen und in das Tube überführt und anschließend auf dem Vortexer (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 8.000 ref) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde der Überstand abgegossen und das Pellet mit 100  $\mu$ l HCl resuspendiert sowie mit 400  $\mu$ l Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) vermengt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß für 10 min bei 100 °C in einen Heizblock (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) gestellt und nach dieser Zeit für 5 s bei 15.000 ref zentrifugiert. 100  $\mu$ l vom Überstand wurden dann in ein 1,5 ml MR-Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert und im Kühlschrank bei 4 °C zwischengelagert.

Weiterhin wurde eine Isolat-PCR durchgeführt, wenn auf ALOA-Agar gut sichtbare *Listeria*-verdächtige Einzelkolonien gewachsen waren. Diese wurden dann zunächst auf ALOA-Agar subkultiviert (Inkubation 24 h, 37 °C) und als Reinkultur für die PCR verwendet.

Für die Extraktion der DNA aus dem Isolat wurden in ein 2 ml Eppendorftube 100 µl Tris HCl gegeben. Anschließend wurden mit einer 10 µl Impfschlinge einzelne Kolonien abgenommen und in das Tube eingebracht. 400 µl Chelex wurden dann sofort dazugegeben und alles auf dem Vortexer vermischt. Das Tube wurde wieder bei 100 °C für 10 min erwärmt und direkt im Anschluss für 5 s bei 15.000 ref zentrifugiert. Der Überstand wurde auch in ein 1,5 ml MR-Tube pipettiert und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Für die PCR-Amplifikation wurde ein Mastermix aus den folgenden Produkten hergestellt: DEPC H<sub>2</sub>O, 10 x PCR Buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 128 nM Siwi2, 128 nM InoA, 128 nM MonoA, 128 nM Mugral, 128 nM Lis1B, 200 µM dNTP's und 1,5 U Taq pol.

Der Mastermix wurde in PCR-Tubes gegeben und die extrahierte DNA dazu pipettiert. Außerdem wurden Positiv-, Negativ- und Leerkontrollen bei jedem PCR-Lauf mitgeführt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte im Thermocycler (T100 Thermocycler) (Biorad, Hercules, CA, USA) (Einstellung Tab. 5). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für 30 min.

**Tab. 5: Einstellung des Thermocyclers bei der Durchführung der *iap*-PCR zum Nachweis von *Listeria spp.* und *L. monocytogenes*.**

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturation	94	120	
Denaturation	94	30	30
Annealing	56	30	
Elongation	72	30	
Final Elongation	72	300	

### 2.3.2 Bestätigung ausgewählter *Bacillus*- und Gram-negativer Isolate mit API 20 NE-System (bioMérieux, Österreich)

Kolonien die auf MYP-Agar typische pinke Kolonien (Mannit-negativ) und eine deutliche Lezithinasereaktion zeigten, wurden als präsumtive *B. cereus* gezählt. Für eine weitere Bestätigung wurden diese Kolonien auf TSAY-Agar subkultiviert und auf *Bacillus*-ChromoSelect-Agar (Merck KGaA) mit Eigelb (Oxoid) ausgestrichen und bei 30 °C für 24 – 48 h bebrütet. Hellblau flach wachsende Isolate mit blauem Zentrum (β-Glucosidasereaktion) und trüben Präzipitationshof (Lezithinase-positiv) wurden der *B. cereus*-Gruppe zugeordnet.

Gram-negative Koloniemorphologien, die sowohl in Teig- als auch in Umfeldproben häufig vorkamen, wurden mit dem API 10 S- bzw. dem API 20 NE-Testkit (bioMérieux, Österreich) weiter differenziert. Die Durchführung der Tests erfolgte exakt nach Herstellervorschrift. Die Ablesung der API 10 S-Ergebnisse wurde nach 24 h (Inkubation 37 °C) vorgenommen. Der API 20 NE-Testkit ist insbesondere für die Differenzierung von Gram-negativen, Oxidase-positiven Isolaten geeignet. Nach der Befüllung der Teststreifen wurde dieser bei 30 °C zunächst für 24 h, bei zweifelhaften Ergebnissen für weitere 24 h bebrütet. Für die Auswertung der Ableseergebnisse wurde die Software APIWEB (bioMérieux) verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikrobiologische Belastung und Vorkommen von *Listeria spp.* im Produktionsumfeld

Für die übersichtliche Darstellung wurden die Probenahmestellen in Abschnitte unterteilt, auf deren Basis dann auch die Auswertung vorgenommen wurde (Abb. 2). Während der Produktion lagen die mittleren Gesamtkeimzahlen zwischen 1,9 und 5,8 log KbE/f. Die Kontamination (4,5 log KbE/f) der Teigwalze war an allen Probenahmetagen gleichbleibend hoch (Tab. 6).

**Tab. 6: Mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl bei Probenahme vor (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D) im Produktionsumfeld.**

Abschnitt	Probenahmestelle	Mittlere Gesamtkeimzahl log <sub>10</sub> KbE/f Min. - Max.	Keimzahl log <sub>10</sub> KbE/f n. R & D
	Mischkessel Teigproduktion	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup> (A/B/C)	-
	<b>Teigwalze</b>	4,5 ± 0,0 <sup>a</sup> (A/B/C)	0,3 (D)
1	Förderband bei den Teigwalzen	2,6 ± 0,2 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,5 - 2,8	3,1 (D)
1	Förderband Oberseite, Anfang der Linie	2,8 ± 0,5 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,3 - 3,3	3,0 (D)
1	Förderband Unterseite, Anfang der Linie	3,7 ± 0,5 <sup>a</sup> (A/B/C) 3,1 - 4,0	3,1 (D)
2	große Welle 1, Abscheider	4,4 ± 3,1 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,6 - 8,0	3,6 (D)
2	Welle nach Stauber (groß Edelstahl)	1,9 ± 1,4 <sup>a</sup> (A/B/C) 0,3 - 2,8	2,1 (D)
2	Bürste 1 Band	3,1 ± 0,4 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,7 - 3,6	2,8 (D)
3	Rad / Riemen Ziehstation	3,3 ± 0,7 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,8 - 4,1	3,7 (D)
4	Trockentunnel Förderband Riemen	5,8 ± 1,9 <sup>a</sup> (A/B/C) 4,5 - 8,0	3,5 (D)
4	Bürste nach Trockentunnel	3,0 ± 0,3 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,8 - 3,2	2,7 (D)
4	Förderband nach Trockentunnel	4,4 ± 0,8 <sup>a</sup> (A/B/C) 3,8 - 5,3	3,3 (D)
5	Förderband Legestation	2,7 ± 0,6 <sup>a</sup> (A/B/C) 2,3 - 3,4	3,2 (D)

KbE/f: Koloniebildende Einheit pro Fläche, n. R & D: nach Reinigung und Desinfektion, A/B/C: Probenahme während der Produktion, D: Probenahme nach Reinigung und Desinfektion, a: Standardabweichung, Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert.

Die höchste mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl fand sich in Abschnitt 4 (Trockentunnel Förderband Riemen). Dort lag der Wert zwischen 4,5 log KbE/f und 8,0 log KbE/f. Nach Reinigung und Desinfektion reduzierte sich die mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl auf 3,5 log KbE/f (Tab. 6).

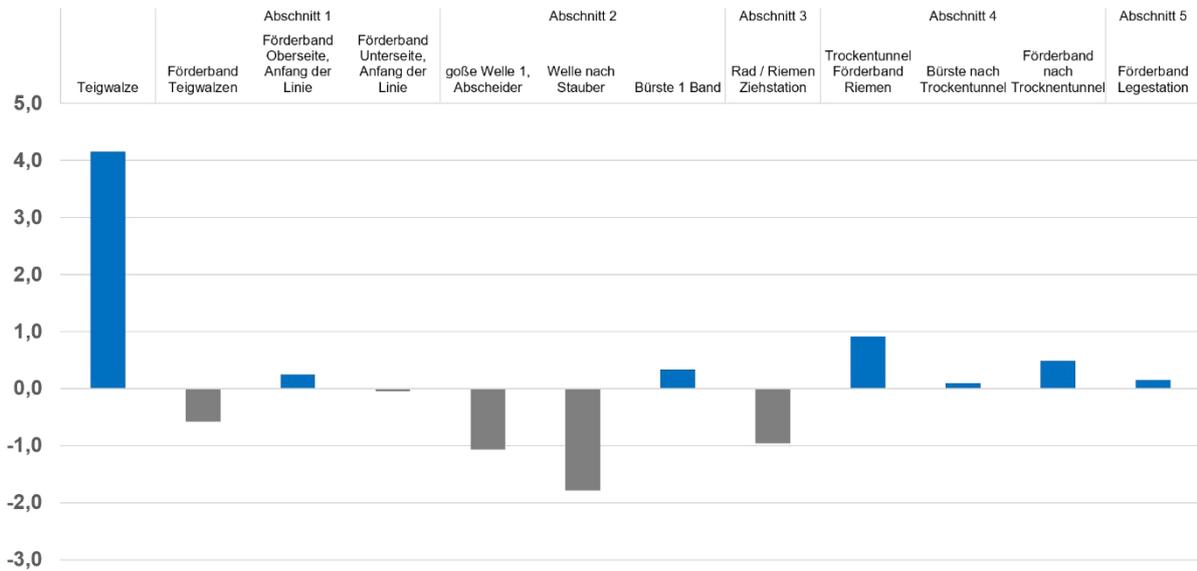
**Tab. 7: Keimzahl von Gram-negativen, Oxidase-positiven Stäbchenbakterien bei Probenahme vor (A oder B) und nach Reinigung und Desinfektion (D) im Produktionsumfeld.**

Abschnitt	Probenahmestelle	Keimzahl log <sub>10</sub> KbE/f	Keimzahl log <sub>10</sub> KbE/f n. R & D
2	Bürste 1 Band	2,3 (B)	0,3 (D)
4	Trockentunnel Förderband Riemen	4,3 (A)	2,3 (D)
4	Förderband nach Trockentunnel	2,9 (B)	0,3 (D)

**KbE/f: Koloniebildende Einheit pro Fläche, n. R & D: nach Reinigung und Desinfektion, A/B: Probenahme während der Produktion, D: Probenahme nach Reinigung und Desinfektion.**

In 5,3 % (n=3/57) der Proben konnten Gram-negative Stäbchenbakterien nachgewiesen werden. In allen anderen Proben lag die Keimzahl unter der Nachweisgrenze von 1,0 log KbE/f (Tab. 7). Man erkennt, dass sich der höchste Wert wieder bei Abschnitt 4 (Trockentunnel Förderband Riemen) befand und 4,3 log KbE/f betrug. Nach Reinigung und Desinfektion reduzierte sich dieser Wert auf 2,3 log KbE/f.

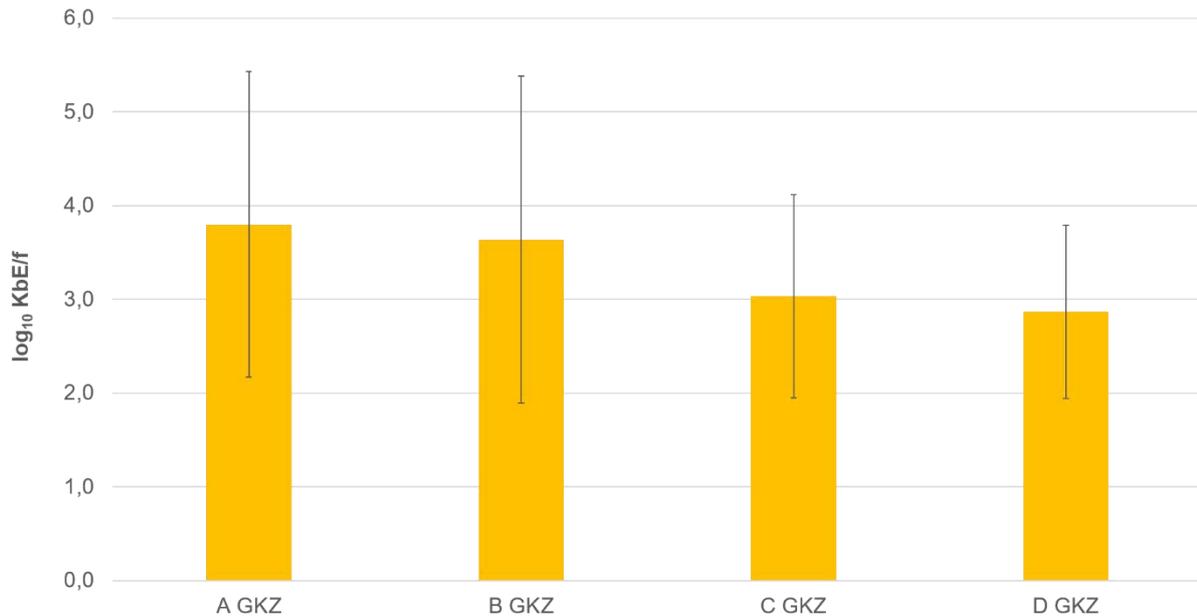
In Abb. 7 ist die erreichte Reduktionsrate (log KbE/f) nach Reinigung und Desinfektion im Vergleich zur Probenahme C dargestellt.



**Abb. 7: Reduktionsraten der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (log KbE/f) nach Reinigung und Desinfektion (D) an einzelnen produktberührenden Probenahmepunkten der Verarbeitungslinie im Vergleich zur Keimbelastung während der Produktion (C). Blaue Balken (positive Werte) zeigen eine Reduktion der Keimzahlen, graue Balken (negative Werte) zeigen eine Zunahme der Keimzahlen.**

Die größte Keimreduktion fand im Bereich der Teigwalze statt. Dort wurde eine Reduktionsrate von 4,2 log KbE/f erreicht (Abb. 7). An dieser Stelle waren nach Reinigung und Desinfektion keine Keime mehr nachweisbar ( $<$  Nachweisgrenze, 0,3 log KbE/f). An vier Probenahme-stellen (Abschnitt 1, 2 und 3) wurde eine deutliche Zunahme der Keimbelastung (-0,6 bis -1,8 KbE/f) beobachtet. Im Abschnitt 2 (Welle nach Stauber) wurde nach der Reinigung und Desinfektion mit -1,8 KbE/f die höchste negative Reduktionsrate (Probenahme C: 0,3 log KbE/f, D: 2,1 log KbE/f) festgestellt (Abb. 7).

Abb. 8 zeigt den Verlauf der mittleren aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl aller Probenahmestellen, die an den Probenahmetagen (A – C) während der Produktion und am Tag (D) nach Reinigung und Desinfektion untersucht wurden. Die mittlere Keimzahl reduzierte sich kontinuierlich von 3,8 log KbE/f am Probenahmetag A, auf 2,9 log KbE/f am Probenahmetag D.



**Abb. 8:** Mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl ( $\pm$  Standardabweichung) von allen lebensmittelassoziierten Umfeldproben während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D). GKZ: Gesamtkeimzahl, KbE/f: Koloniebildende Einheit pro Fläche.

Insgesamt wurden 67 Proben auf *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* untersucht. Dabei entfielen während der Produktion (Probenahme A – C) 43 Proben auf lebensmittelassoziierte Flächen und fünf Proben auf Kontrollstellen im Produktionsumfeld (Abfluss und Bürste Schuhreinigung Hygieneschleuse). Am Probenahmetag C wurde *L. innocua* (*Listeria spp.*) an vier verschiedenen lebensmittelassoziierten Stellen nachgewiesen (Tab. 8 & Abb. 14). Im Abfluss war *L. monocytogenes* und *L. innocua* an zwei Probenahmetagen und *L. innocua* einmal im Schuhreiniger der Hygieneschleuse nachweisbar. Nach Reinigung und Desinfektion (Probenahme D) wurden 19 Proben aus dem produktberührenden Umfeld und je eine Probe aus dem Abfluss und aus dem Schuhreiniger der Hygieneschleuse auf *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* geprüft. Aus diesen Proben wurde weder *Listeria spp.* noch *L. monocytogenes* isoliert (Tab. 8 & Abb. 14).

Tab. 8: Belastung des Produktionsumfeldes durch *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* in den verschiedenen Probenahmestellen während der Produktion (A/B/C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).

	Während der Produktion (A - C)	Nach R & D (D)
Probenahmestelle	<i>Listeria spp.</i>	
Auspresskopf	<i>L. innocua</i> (C)	n. n.
Teigwalze	<i>L. innocua</i> (C)	n. n.
Abschnitt 2	n. n.	n. n.
Abschnitt 3	<i>L. innocua</i> (C)	n. n.
Abschnitt 4	n. n.	n. n.
Abschnitt 5	<i>L. innocua</i> (C)	n. n.
Abfluss (Gully)	<i>L. monocytogenes</i> / <i>L. innocua</i> (B, C)	n. n.
Bürste Hygieneschleuse	<i>L. innocua</i> (C)	n. n.

R & D: Reinigung und Desinfektion, A/B/C: während der Produktion, D: Nach Reinigung und Desinfektion, spp.: Spezies. n. n.: nicht nachgewiesen.

Des Weiteren wurden in verschiedenen Abschnitten im Produktionsumfeld insgesamt fünf Proben gefunden, die mit Keimen der *B. cereus*-Gruppe kontaminiert (< 2,0 log KbE/f). Davon waren zwei bei Probenahme A, während der Produktion und drei bei Probenahme D, nach Reinigung und Desinfektion positiv (Tab. 9).

Tab. 9: Vorkommen von präsumtiven *B. cereus* (< 2,0 log KbE/f) im Produktionsumfeld während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).

Probenahmestelle	Während der Produktion (A - C)	n. R & D (D)
Auspresskopf	n. n.	n. n.
Teigwalze	n. n.	(D)
Abschnitt 1	(A)	(D)
Abschnitt 2	n. n.	(D)
Abschnitt 3	(A)	n. n.
Abschnitt 4	n. n.	n. n.
Abschnitt 5	n. n.	n. n.

A/B/C: Probenahme während der Produktion, D: Probenahme nach Reinigung und Desinfektion. n. n.: nicht nachgewiesen.

Abb. 9 zeigt einen Ausstrich auf *Bacillus*-ChromoSelect-Agar (Merck KGaA) mit Eigelb (Oxid). Wie in Kapitel 2.3.2 bereits beschrieben weisen hellblau flach wachsende Isolate mit blauem Zentrum ( $\beta$ -Glucosidasereaktion) und trübem Präzipitationshof (Lezithinase-positiv) auf einen Vertreter der *B. cereus*-Gruppe hin.



**Abb. 9:** Ausstrich auf *Bacillus-ChromoSelect-Agar* (Merck KGaA) mit *Eigelb* (Oxoid) mit hellblau flach wachsenden Isolaten mit blauem Zentrum und trüben Präzipitationshof.

### **3.2 Mikrobiologische Belastung und Nachweis von *Listeria spp.* in den Teigen**

Die mittlere aerobe Gesamtkeimzahl der Restteige (n=16) lag bezogen auf die einzelnen Untersuchungsabschnitte zwischen 2,6 log und 3,8 log KbE/g. Für die mittlere Keimzahl der Gram-negativen, Oxidase-positiven Bakterien wurden Werte von 1,8 log bis 3,0 log KbE/g ermittelt (Tab. 10).

Tab. 10: Mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl während der Produktion und mittlere logarithmische Keimzahl von Gram-negativen, Oxidase-positiven Keimen an verschiedenen Probenahmestellen (Probenahme A – C) in Teigen (n=16).

Abschnitt	Probenahmestelle	mittlere Gesamtkeimzahl $\log_{10}$ KbE/g Min. - Max.	mittlere Keimzahl Gram-negativ $\log_{10}$ KbE/g Min. - Max.
nach Teigwalze	Teigrest Teigwalze	$3,6 \pm 0,2^a$ (A/B/C) 3,48 - 3,78	$2,3 \pm 0,1^a$ (A/B/C) 2,2 - 2,4
nach Abschnitt 2	Teigrest nach Bürste	$3,6 \pm 0,3^a$ (A/B/C) 3,30 - 3,85	$1,8 \pm 1,3^a$ (A/B/C) 0,3 - 2,8
nach Abschnitt 3	Teigrest nach Ziehstation	$3,8 \pm 0,2^a$ (A/B/C) 3,60 - 3,90	$2,8 \pm 0,2^a$ (A/B/C) 2,6 - 2,9
nach Abschnitt 4	Teigrest nach Trockentunnel	$3,8 \pm 0,2^a$ (A/B/C) 3,70 - 4,00	$3,0 \pm 0,4^a$ (A/B/C) 2,7 - 3,5
nach Abschnitt 5	Teigrest vor Legestation	$2,6 \pm 2,0^a$ (A/B/C) 0,30 - 3,85	$1,9 \pm 1,4^a$ (A/B/C) 0,3 - 2,8

KbE/g: Koloniebildende Einheit pro Gramm, A/B/C: Probenahme während der Produktion, a: Standardabweichung, Min.: Minimalwert, Max.: Maximalwert.

Die Mittelwerte der Gesamtkeimzahl und der Gram-negativen, Oxidase-positiven Stäbchenbakterien aus allen Probenahmeabschnitten an den verschiedenen Tagen (A – C) werden in Abb. 10 dargestellt. Am Probenahmetag B wurde mit 3,7 log KbE/g die höchste Gesamtkeimzahl festgestellt. Die Anzahl Gram-negativer Bakterien lag zwischen 1,8 log und 2,6 log KbE/g.

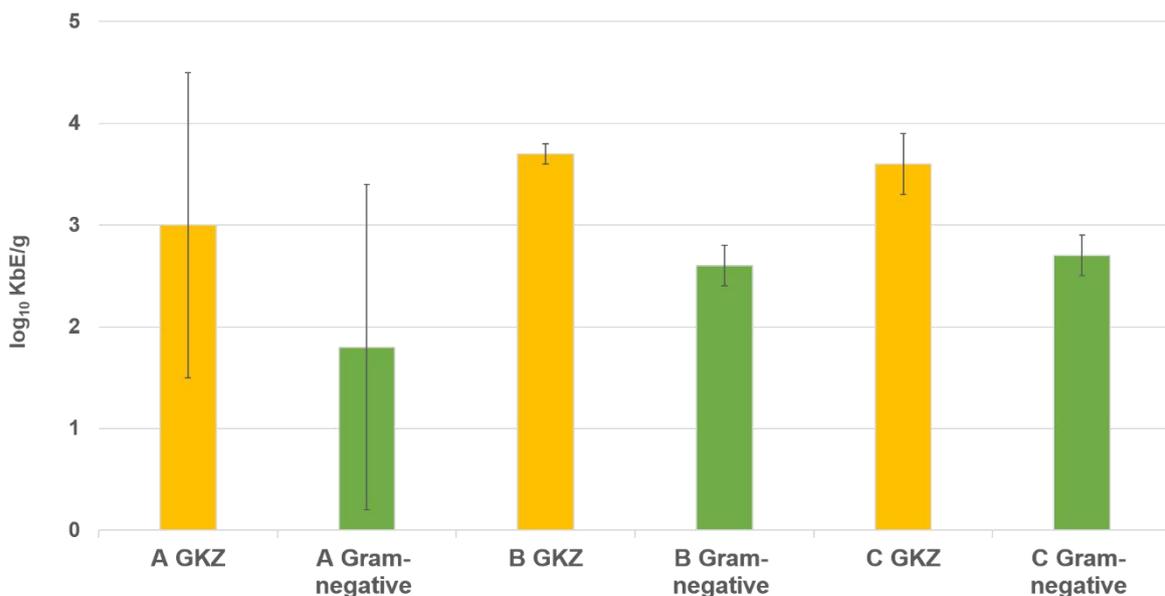
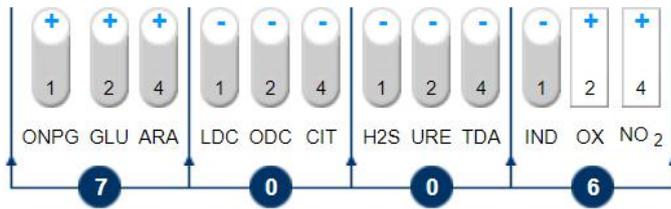


Abb. 10: Mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (gelb) und mittlere Keimzahl Gram-negativer Bakterien (grün) von während der Produktion (A – C) entnommenen Teigresten (n=16) ( $\pm$ )



## API 10S V4.0



REFERENZ            DATUM  
 KOMMENTAR        27.07.21

## GUTE IDENTIFIZIERUNG

Streifen	API 10S V4.0		
Profil	7 0 0 6		
Hinweis			
Signifikante Taxa	% ID	T-Wert	Widersprechende Tests
<i>Aeromonas hydrophila</i>	92.1	0.82	IND 85%

Abb. 12: Beispiel eines Messergebnisses aus dem API 10 S (oben) und Auswertung aus APIWEB für die Identifikation von Gram-negativen Isolaten (unten). ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside, GLU: D-Glukose, ARA: L-Arabinose, LDC: Lysin, ODC: Ornithin, CIT: Trinatriumcitrat, URE: Urea, TDA: Tryptophan (Tryptophandesaminase), IND: Tryptophan (Indolproduktion), ID: Identifikation.

Bei den Auswertungen mittels API-Software (bioMérieux APIWEB) wurde bei allen Isolaten eine gute Identifizierung erreicht (92,1 % Wahrscheinlichkeit *Aeromonas hydrophila*). Jedoch zeigte die Schlüsselreaktion Tryptophan (Indolproduktion) eine Abweichung von 85 %, so dass die Speziesangabe nicht plausibel ist (Abb. 12/Abb. 11). Zusätzlich wurden die Isolate mittels API 20 NE System analysiert (bioMérieux, Österreich). Ein Beispiel ist in Abb. 13 zu sehen.

## API 20 NE V8.0



REFERENZ            DATUM  
                                  24.07.21  
 KOMMENTAR

## GUTE IDENTIFIZIERUNG

Streifen	API 20 NE V8.0		
Profil	1 4 7 7 4 4		
Hinweis			
Signifikante Taxa	% ID	T-Wert	Widersprechende Tests
<i>Rhizobium radiobacter</i>	98.9	0.63	GEL 1%

Abb. 13: Beispiel eines Messergebnisses aus dem API 20 NE (oben) und Auswertung aus APIWEB für die Identifikation von Gram-negativen Isolaten (unten). TRP: L-Tryptophan, GLU: D-Glukose, ADH: L-Arginin, URE: Urea, ESC; Aesculin Eisen Citrat, GEL: Gelatine, PNG: 4-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, GLU: D-Glukose, ARA: L-Arabinose, MNE: D-Mannose, MAN: D-Mannitol, NAG: N-Acetyl-Glucosamin, MAL: D-Maltose, GNT: Kaliumgloconat, CAP: Caprinsäure, ADI: Adipinsäure, MLT: Apfelsäure, CIT: Trinatriumcitrat, PAC: Phemylessigsäure, OX: Oxidase, ID: Identifikation.

Laut dieser Auswertungen mittels API-Software (bioMérieux APIWEB) waren alle Isolate zu 98,9 % *Rhizobium radiobacter*. Die Gelatinereaktion war abweichend, was zu einer Abweichung von 1 % GEL führte. In 31,3 % (n=5/16) der Teigproben wurde dieses *R. radiobacter* nachgewiesen.

Zudem wurden in 18,8 % der Proben (n=3/16) Kontaminationen (< 2,0 log KbE/g) mit präsumtiven *B. cereus* beobachtet: Probenahme B: Teigwalze, Restteig Legestation; Probenahme C: Restteig nach Ziehstation.

Alle Restteigproben wurden auf *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* untersucht. *Listeria spp.* wurden an allen Probenahmetagen (A – C) aus den Restteigproben (n=7/16) isoliert (Tab. 11 & Abb. 14). Dabei fällt auf, dass am Probenahmetag B in fast allen (83,3 %, n=5/6) Proben *Listeria spp.* nachgewiesen wurde. In einer Probe (Teigwalze) wurde *L. monocytogenes* (Probenahme B) detektiert (Tab. 11 & Abb. 14).

Tab. 11: Belastung der Restteige durch *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* an den verschiedenen Probenahmestellen während der Produktion.

Probenahmestelle	Während der Produktion (A - C)	
	<i>Listeria spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>
nach Auspresskopf	n. n.	n. n.
nach Teigwalze	n. n.	(B)
nach Abschnitt 2	<i>L. innocua</i> (A/B)	n. n.
nach Abschnitt 3	<i>L. innocua</i> (B)	n. n.
nach Abschnitt 4	<i>L. innocua</i> (B)	n. n.
nach Abschnitt 5	<i>L. innocua, welshimeri, seeligeri</i> (B/C)	n. n.

A/B/C: Probenahme während der Produktion, *spp.*: Spezies.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Einen zusammenfassenden Überblick der Ergebnisse, sowohl für das Produktionsumfeld, als auch für die Teigproben ist in Abb. 14 zu sehen. Es zeigen sich an diversen Abschnitten der Teigverarbeitungslinie Kontaminationen mit *Listeria spp.* und *L. monocytogenes*. Nach Reinigung und Desinfektion konnten weder *Listeria spp.* noch *L. monocytogenes* im lebensmittelassoziierten Umfeld isoliert werden.

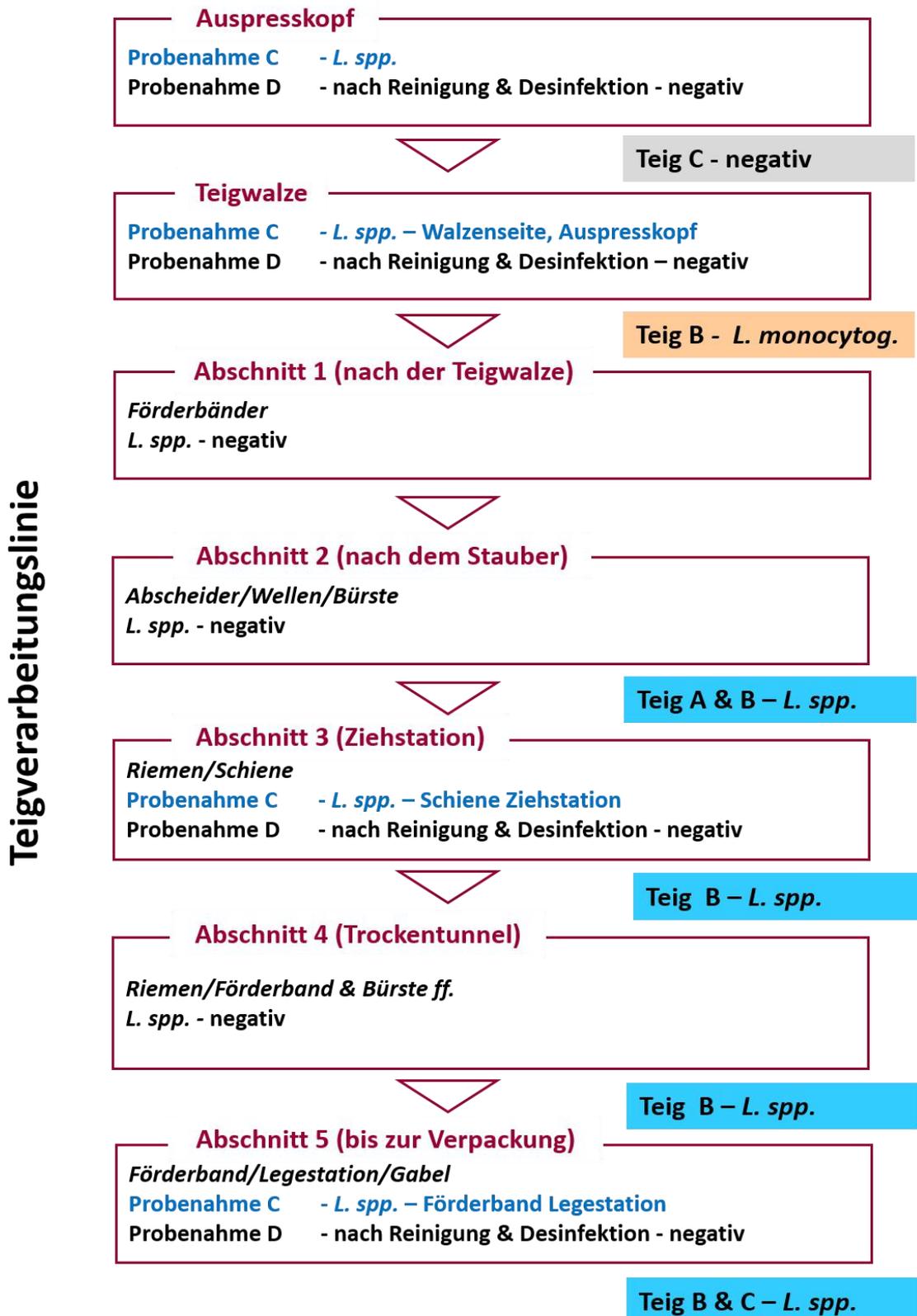


Abb. 14: Übersicht des Vorkommens von *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* an den verschiedenen Probenahmestellen im Produktionsumfeld und in den Teigen. Proben mit *Listeria spp.* wurden in blau und Proben mit *L. monocytogenes* in orange markiert. Die Probenahmen A – C wurden während der Produktion und Probenahme D nach Reinigung und Desinfektion durchgeführt. *L. spp.*: *Listeria* Spezies, *monocytog.*: *monocytogenes*.

## 4 Diskussion und Schlussfolgerungen

### 4.1 Diskussion

In den vergangenen Jahren gab es in den USA, Kanada und Belgien Erkrankungsfälle und Ausbrüche, die durch Rohverzehr von mehllhaltigen Teigen, die mit STEC oder toxinbildenden *B. cereus* kontaminiert waren (Myoda et al. 2019, Neil et al. 2012, CDC-2 2019, Public Health Agency of Canada 2017, Naranjo et al. 2011). Zudem wurde im Jahr 2019 ein mit STEC kontaminierter Fertigteig in Deutschland und Österreich zurückgerufen (eFoodAlert 2019).

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Fragestellung, welche mikrobiellen Kontaminationen auf lebensmittelassoziierten Flächen einer teigverarbeitenden Produktionslinie vorkommen und wie hoch die Keimbelastung in Restteigen war. Zudem wurde die Verbreitung von *Listeria spp.* und präsumtiven *B. cereus* im Produktionsumfeld und in den Teigen untersucht. Zusätzlich wurde geprüft, ob diese Keimbelastung auf den Flächen durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen verringert wurde.

Die Probenahmen während der Produktion (A – C) ergaben an produktberührenden Stellen mittlere Gesamtkeimzahlen von 1,9 log bis 5,8 log KbE/f. Diese Werte können während der laufenden Lebensmittelproduktion erwartet werden. Allerdings fiel auf, dass zur Beprobung A an bestimmten Flächen (Abschnitt 2 große Welle 1 Abscheider und Abschnitt 4: Trockentunnel Förderband Riemen) mit 8,0 log KbE/f sehr hohe Keimbelastungen auftraten. Die Anlage wurde nach jeder Probenahme außerplanmäßig gereinigt und desinfiziert, so dass die mittlere Keimbelastung der produktberührenden Flächen während der Produktion im Verlauf um 0,7 log KbE/f reduziert werden konnte. *Enterobacteriaceae*, die als wichtige Hygieneindikatoren in der Lebensmittelverarbeitung gelten, wurden mit den angewendeten Nachweisverfahren nicht nachgewiesen. Lediglich drei Kontaktstellen waren mit anderen Gram-negativen Bakterien und zwei mit präsumtiven *B. cereus* (< 2,0 log KbE/f) kontaminiert.

Während der Probenahme C konnte im Bereich des Auspresskopfes, der daran folgenden Teigwalze, der Ziehstation und dem Förderband der Legestation *L. innocua* nachgewiesen werden. Diese nicht pathogene Listerienart gilt ebenfalls als Hygieneindikator.

Vor der Probenahme D wurde eine planmäßige Generalreinigung der Anlage mit anschließender Desinfektion durchgeführt. Eine wesentliche Keimreduktion im Vergleich zur Probenahme C war vor allem im Bereich der Teigwalze, des Trockentunnels und den daran folgenden Förderbändern zu beobachten (Abb. 7). Gram-negative Bakterien wurden an keiner Stelle nachgewiesen. Präsumtive *B. cereus* konnten noch an drei Flächen

(> 2,0 log KbE/f) isoliert werden. Ein Grund dafür könnte auf die Anwesenheit eines gebildeten Biofilms zurückgeführt werden, da dieser gegen Reinigungs- und Desinfektionsmittel einen höheren Widerstand bietet (Ryu und Beuchat 2005). Ebenso ist es denkbar, dass sich widerstandsfähige *Bacillus*-Sporen im Produktionsumfeld angesiedelt haben. Diese Situation wurde in einer australischen Studie diskutiert, in diesem Fall reicherten sich *B. cereus*-Sporen in einer Mahlanlage an und die daraufhin hergestellten Produkte wurden zunehmend verunreinigt (Berghofer et al. 2003). *Listeria spp.* waren nach Reinigung und Desinfektion weder in der Produktionsanlage noch im Abfluss bzw. in der Schuhbürste der Hygieneschleuse nachweisbar.

Die Analyse der Teigproben (Restteige, die während der Produktion anfallen) ergab mittlere Gesamtkeimzahlen von 3,0 log bis 3,7 log KbE/g. Ähnliche aerobe mesophile Keimzahlen (3,0 log KbE/g) wurden publiziert (Sabillón et al. 2016). Im Gegensatz zu dieser Studie konnten in den hier untersuchten Teigen keine *Enterobacteriaceae* bzw. coliforme Bakterien festgestellt werden. Eine Verunreinigung durch präsumtive *B. cereus* in den Teigen wurde nur am Probenahmetag B an zwei Stellen festgestellt. Die nachgewiesenen Keimzahlen waren sehr niedrig (< 2,0 log KbE/g) und lagen deutlich unter den für diese Produktgruppe publizierten Warnwerten von > 3,0 log KbE/g (DGHM 2018). Die Ursprungsquelle könnte auf mit *B. cereus* verunreinigte Mehle zurückzuführen sein (Berghofer et al. 2003). Am Probenahmetag B wurde in einer Restteigprobe *L. monocytogenes* nach dem Auspresskopf/Teigwalze nachgewiesen. Von produktberührenden Flächen konnte *L. monocytogenes* bzw. andere *Listeria spp.* zum Zeitpunkt dieser Probenahme nicht isoliert werden. Allerdings wurde bei der Probenahme C in allen Teigproben *L. innocua* nachgewiesen. Eine Übereinstimmung mit produktberührenden Flächen konnte festgestellt werden (Abb. 14).

Die Analyse mittels API 20 NE System (bioMérieux, Österreich) ergab bei 10 Isolaten mit 98,9 % Wahrscheinlichkeit *Rhizobium radiobacter*. Dies ist ein Gram-negatives, Oxidase-positives aerob wachsendes, nicht sporenbildendes Bakterium (Lai et al. 2004). *R. radiobacter* ist grundsätzlich pflanzenpathogen und in der Umwelt weit verbreitet. Es hat die Fähigkeit große funktionelle Plasmide oder Megaplasmide zu inkorporieren und dadurch Hypertrophien in Pflanzen als sogenannte pathogene Tumore oder symbiotische stickstofffixierende Knöllchen zu bilden (Young et al. 2001). Bestimmte nicht pathogene *R. radiobacter*-Stämme werden aber auch als sogenannte Biofertilisatoren genutzt, um den Ertrag von z. B. Weizen zu steigern. Entsprechende Präparate sind beispielsweise in Russland zugelassen (Hadide et al. 2019). Aus diesem Grund ist es nicht überraschend, dass dieses Bakterium in den Restteigproben gefunden wurde.

## 4.2 Schlussfolgerungen

Mehl ist natürlicherweise mit diversen Mikroorganismen kontaminiert (Aydin et al. 2009, Berghofer et al. 2003, Laca et al. 2006, Mäde et al. 2017, Mena et al. 2004, Myoda et al. 2019, Rossi et al. 2021, Taylor et al. 2018.). Umso wichtiger ist es die Anreicherung insbesondere mit pathogenen Mikroorganismen (z. B. pathogene *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*) in den Getreidemöhlen und Teigverarbeitungslinien, durch ein regelmäßiges Prozessmonitoring zu vermeiden. Ein wesentlicher Schwerpunkt ist es, den Erfolg von Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zu kontrollieren. Diese Erfolgskontrollen müssen neben der Bestimmung der Keimgehalte auch den gezielten Nachweis von pathogenen Bakterien (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *B. cereus*) beinhalten. Zudem ist es zu empfehlen Teigreste, die während der Produktion anfallen, regelmäßig auf *L. monocytogenes* und STEC zu untersuchen. Dadurch kann der Produktionsprozess kontinuierlich überwacht und können Rückrufe oder Erkrankungen von Menschen vermieden werden.

Im Ergebnis der Studie sollten die Reinigungs- und Desinfektionsintervalle der Teigproduktionsanlage und der Hygieneschleuse in kürzeren Abständen durchgeführt werden. Es ist zu empfehlen, die Ergebnisse mit den Mitarbeitern zu besprechen und mit ihnen gemeinsam Lösungsansätze für eine verbesserte Reinigung von kritischen Schwachstellen zu erarbeiten.

## 5 Zusammenfassung

Bakterielle Mikroorganismen u. a. *Listeria spp.* oder *Bacillus spp.* finden sich regelmäßig in trockenen Lebensmitteln, zum Beispiel in Mehl. Das können auch pathogene Spezies wie *L. monocytogenes* oder *B. cereus* sein. Bei der Verarbeitung zu Teig, steigt der Wassergehalt an und diese Mikroorganismen können sich vermehren und sich sowohl auf Lebensmittelkontaktflächen (z. B. Förderbänder, Walzen) als auch in Bereichen, die nicht mit den Lebensmitteln in Berührung kommen (Fußboden, Wände, Abfluss), ansiedeln.

Ziel der Untersuchungen war es, den Kontaminationsgrad von produktberührenden Flächen einer Teigverarbeitungslinie während der Produktion zu ermitteln. Zudem wurden Restteigproben, die während des Produktionsprozesses anfallen mikrobiologisch untersucht. Nach Auswertung dieser Ergebnisse und Durchführung einer Reinigungs- und Desinfektion der gesamten Anlage sollten die mikrobielle Belastung der gleichen Probenahmestellen erneut geprüft werden, um die Effektivität der Maßnahme zu kontrollieren. Im Einzelnen wurde die aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (GKZ), die *Enterobacteriaceae*- und *B. cereus*-Zahl sowie *Listeria spp.* analysiert. Die Bestimmung der *Listeria*-Spezies erfolgte mittels Multiplex-PCR (Bubert 1999).

Auf den produktberührenden Oberflächen lag die mittlere Gesamtkeimzahl zwischen 1,9 log und 5,8 log KbE/Fläche bzw. bei den Gram-negativen, Oxidase-positiven Keimen zwischen 2,3 log und 4,3 log KbE/f. In den Restteigen lag die mittlere Gesamtkeimzahl zwischen 2,6 log und 3,8 log KbE/g und bei den Gram-negativen, Oxidase-positiven Keimen zwischen 1,8 log und 3,0 log KbE/g. *Enterobacteriaceae* konnten weder auf den Oberflächen noch in den Teigen gefunden werden. *B. cereus* (< 2,0 log KbE/f bzw. KbE/g) wurden in zwei Oberflächen- und drei Teigproben festgestellt. Zudem konnten in Restteigen und im Produktionsumfeld *Listeria spp.* nachgewiesen werden. Eine Restteigprobe war *L. monocytogenes*-positiv.

Nach der Reinigung und Desinfektion konnte an einigen Stellen der Produktionsanlage eine deutliche Reduktion der Keimbelastung beobachtet werden. Weiterhin gelang es, die Kontaminationen mit *Listeria spp.* zu beseitigen. Allerdings war es nicht möglich, präsumtive *B. cereus* vollständig von den Oberflächen zu eliminieren. Im Ergebnis der Studie sollten die Restteige regelmäßig auf pathogene Bakterien und der Erfolg der Reinigung und Desinfektion geprüft werden.

## 6 Summary

Bacterial microorganisms such as *Listeria spp.* or *Bacillus spp.* are regularly found in dry foods, for example in flour. These can also be pathogenic species such as *L. monocytogenes* or *B. cereus*. During processing into dough, the water content increases and these microorganisms can multiply and colonize both on food contact surfaces (e.g. conveyor belts, rollers) and in areas not in contact with the food (floors, walls, drains).

The aim of the study was to determine the level of contamination of product-contact surfaces on a dough processing line during production. In addition, residual dough samples produced during the production process were subjected to microbiological analysis. After evaluating these results and performing a cleaning and disinfection of the entire line, the microbial contamination of the same sampling points was to be tested again to check the effectiveness of the measure. Specifically, the total aerobic mesophilic bacterial count (TBC), *Enterobacteriaceae* and *B. cereus* counts and *Listeria spp.* were analyzed. *Listeria* species were determined by multiplex PCR (Bubert 1999).

On the surfaces in contact with the product, the mean total bacterial count was between 1.9 log and 5.8 log CFU/area and between 2.3 log and 4.3 log CFU/a for the Gram-negative, oxidase-positive bacteria, respectively. In the residual doughs the mean total bacterial count was between 2.6 log and 3.8 log CFU/g and between 1.8 log and 3.0 log CFU/g. *Enterobacteriaceae* could not be found on the surfaces or in the doughs. *B. cereus* (< 2.0 log CFU/a or CFU/g) were detected in two surface and three dough samples. In addition, *Listeria spp.* were detected in residual doughs and in the production environment. One residual dough sample was *L. monocytogenes* positive.

After cleaning and disinfection, a significant reduction in bacterial contamination was observed in some areas of the production line. Furthermore, it was possible to eliminate the contamination with *Listeria spp.* However, it was not possible to completely eliminate presumptive *B. cereus* from the surfaces. As a result of the study, the residual doughs should be regularly checked for pathogenic bacteria and the success of cleaning and disinfection.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADH: L-Arginin.....	28
ADI: Adipinsäure.....	28
ALOA: Agar Listeria nach Ottaviani & Agosti.....	9, 13, 15, 16, 17
API: Analytischen-Profil-Index.....	11, 17, 18, 26, 27, 28, 32
ARA: L-Arabinose.....	26, 27, 28
BPW: gepuffertes Peptonwasser.....	9, 13
CAP: Caprinsäure.....	28
CDC: Centers for Disease Control and Prevention.....	4
CIT: Trinatriumcitrat.....	26, 27, 28
E. coli: Escherichia coli.....	7
EHEC: enterohämorrhagische Escherichia coli.....	4, 7
ESC: Aesculin Eisen Citrat.....	28
FDA: Food and Drug Administration.....	4
GEL: Gelatine.....	28
GKZ: Gesamtkeimzahl.....	22, 26
GLU: D-Glukose.....	26, 27, 28
GNT: Kaliumgloconat.....	28
HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point.....	2
iap: Invasion-associated protein.....	16, 17
ID: Identifikation.....	27, 28
IND: Tryptophan (Indolproduktion).....	26, 27
LDC: Lysin.....	26, 27
MAL: D-Maltose.....	28
MAN: D-Mannitol.....	28
MCK: MacConkey.....	9
MLT: Apfelsäure.....	28
MNE: D-Mannose.....	28
MPN: most probable number/g.....	6
MPN/g: most probable number/g.....	3
MYP: Mannitol-Eigelb-Polymyxin.....	9, 14, 15, 17
NAG: N-Acetyl-Glucosamin.....	28
ODC: Ornithin.....	26, 27
ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside.....	26, 27
OX: Oxidase.....	28
PAC: Phemylessigsäure.....	28
PNG: 4-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid.....	28
spp.: Spezies.....	1, 2, 3, 4, 8, 11, 13, 17, 19, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 34, 37, 38
STEC: Shiga-Toxin bildende Escherichia coli.....	7, 31, 33
TDA: Tryptophan (Tryptophandesaminase).....	26, 27
TRP: L-Tryptophan.....	28
TSAY: Trypto-Casein-Soja-Agar mit Hefeextrakt.....	13, 14, 15, 17
TSAYE: Trypto-Casein-Soja- Agar mit 0,6 % Hefeextrakt.....	9
URE: Urea.....	26, 27, 28
VRBG: Kristallviolett-Galle-Glukose-Agar.....	9, 13, 14, 15
VTEC: Vero-Toxin bildende Escherichia coli.....	4, 7

## 8 Literaturverzeichnis

Aydin, A., Paulsen, P. & Smulders, F. J. M. (2009). The physico-chemical and microbiological properties of wheat flour in Thrace. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 33(5), 445-454.

Berghofer, L. K., Hocking, A. D., Miskelly, D. & Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 137-149.

BfR. (2020). *Escherichia coli* in Mehl - Quellen, Risiken und Vorbeugung. Stellungnahme Nr. 004/2020 des Bundesinstitut für Risikobewertung. <https://www.bfr.bund.de/cm/343/escherichia-coli-in-mehl-quellen-risiken-und-vorbeugung.pdf> (Zugriff 29.07.2021).

bioMérieux APIWEB. (2021). <https://apiweb.biomerieux.com/> (Zugriff 29.07.2021).

Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382-398.

Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. & Wagner, M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4688-4692.

CDC-1. (2019). Say no to raw dough. <https://www.cdc.gov/features/no-raw-dough/index.html> (Zugriff 20.07.2021). Centers for Disease Control and Prevention.

CDC-2. (2019). Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Flour. 2019 Outbreaks. <https://www.cdc.gov/ecoli/2019/flour-05-19/index.html> (Zugriff 20.07.2021). Centers for Disease Control and Prevention.

Daelman, J., Vermeulen, A., Willemyns, T., Ongenaert, R., Jacxsens, L., Uyttendaele, M. & Devlieghere, F. (2013). Growth/no growth models for heat-treated psychrotrophic *Bacillus cereus* spores under cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 161(1), 7-15.

Da Silva, E. P. & De Martinis, E. C. P. (2013). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 957-968.

DGHM. (2018). 9.3 Richt- und Warnwerte für rohe/teilgegarnte Tiefkühl-Backwaren, die vor dem Verzehr einer Erhitzung unterzogen werden. <https://www.dghm-richt-warnwerte.de/de/> (Zugriff 20.07.2021). Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie.

eFoodAlert. (2019). Recalls and Alerts: November 17 – 20, 2019. <https://efoodalert.com/2019/11/20/recalls-and-alerts-november-17-20-2019/> (Zugriff 20.07.2021).

Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus species* with pathogenic potential. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 7-3.

FDA. (2017). Raw Dough's a Raw Deal and Could Make You Sick. <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/raw-doughs-raw-deal-and-could-make-you-sick/> (Zugriff 20.07.2021). U.S. Food & Drug Administration.

Feng, Y. & Archila-Godinez, J. C. (2021). Consumer knowledge and behaviors regarding food safety risks associated with wheat flour. *Journal of Food Protection*, 84(4), 628-638.

Forghani, F., den Bakker, M., Liao, J. Y., Payton, A. S., Futral, A. N. & Diez-Gonzalez, F. (2019). *Salmonella* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroups O45, O121, O145 in wheat flour: effects of long-term storage and thermal treatments. *Frontiers in Microbiology*, 10, 323.

Gasarov, U., Hughes, D. & Hansbro, P. M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 851-875.

Gieraltowski, L., Schwensohn, C., Meyer, S., Eikmeier, D., Medus, C., Sorenson, A., Forstner, M., Madad, A., Blankenship, J., Feng, P. & Williams, I. (2017). Notes from the field: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections linked to dough mix – United States, 2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66(3), 88-89.

Hadide, S. T. E., Moussa, L. A. & El-Gharbawy, H. M. (2019). Effect of biofertilizers rates on yield, physicochemical and technological characteristics of wheat. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 8(3), 928-936.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.

Laca, A., Mousia, Z., Díaz, M., Webb, C. & Pandiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, 72(4), 332-338.

- Lai, C. C., Teng, L. J., Hsueh, P. R., Yuan, A., Tsai, K. C., Tang, J. L. & Tien, H. F. (2004). Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(1), 149-153.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213-216.
- Messelhäußer, U., Rampp, A., Zechel, P., Schönberger, K., Hörmansdorfer, S., Busch, U. & Wallner, P. (2017). *Listeria monocytogenes* entlang der Lebensmittelkette: Relevanz in fleischverarbeitenden Betrieben. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12(1), 37-40.
- Myoda, S. P., Gilbreth, S., Akins-Lewenthal, D., Davidson, S. K. & Samadpour, M. (2019). Occurrence and levels of *Salmonella*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria* in raw wheat. *Journal of Food Protection*, 82(6), 1022-1027.
- Mäde, D., Geuthner, A. C., Imming, R. & Wicke, A. (2017). Detection and isolation of Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* in flour in Germany between 2014 and 2017. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 12(3), 245-253.
- Naranjo, M., Denayer, S., Botteldoorn, N., Delbrassinne, L., Veys, J., Waegenaere, J., Sirtaine, N., Driesen, R. B., Sipido, K. R. Mahillon, J. & Dierick, K. (2011). Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4379-4381.
- Neil, K. P., Biggerstaff, G., MacDonald, J. K., Trees, E., Medus, C., Musser, K. A., Stroika, S. G., Zink, D. & Sotir, M. J. (2012). A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157: H7 to humans: multistate outbreak of *E. coli* O157: H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough – United States, 2009. *Clinical Infectious Diseases*, 54(4), 511-518.
- Oporto, B., Ocejo, M., Alkorta, M., Marimón, J. M., Montes, M. & Hurtado, A. (2019). Zoonotic approach to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: integrated analysis of virulence and antimicrobial resistance in ruminants and humans. *Epidemiology & Infection*, 147.
- Okinaka, R. T. & Keim, P. (2016). The phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *Microbiology Spectrum*, 4(1), 4-1.

Österreichisches Lebensmittelbuch. Austriacus C. A. (2018). Codexkapitel/B 20/Mahl- und Schälprodukte. IV. Auflage. Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. <https://www.lebensmittelbuch.at/lebensmittelbuch/b-20-mahl-und-schaelprodukte.html/> (Zugriff 21.07.2021).

Public Health Agency of Canada. (2017). Public health notice – outbreak of *E. coli* infections linked to various flours and flour products. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/public-health-notices/2017/public-health-notice-outbreak-e-coli-infections-linked-various-flours-flour-products.html/> (Zugriff 29.07.2021).

Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. & Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 303-329.

Rose, D. J., Bianchini, A., Martinez, B. & Flores, R. A. (2012). Methods for reducing microbial contamination of wheat flour and effects on functionality. *Cereal Foods World*, 57(3), 104.

Rossi, E. M., Mahl, S. C., Spaniol, A. C., Honorato, J. F. B. & Rocha, T. (2021). Evaluating the thermoresistance of *Bacillus cereus* strains isolated from wheat flour. *Research, Society and Development*, 10(6), e2510615268.

Ryu, J. H. & Beuchat, L. R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2614-2622.

Sabillón, L. & Bianchini, A. (2016). From field to table: A review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. *Cereal Chemistry*, 93(2), 105-115.

Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P. & Ross, T. O. M. (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71(6), 1169-1177.

Statistik Austria. (2021). Versorgungsbilanz für Getreide 2014/15 bis 2019/20. 6. [https://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/wirtschaft/land\\_und\\_forstwirtschaft/preise\\_bilanz\\_n/versorgungsbilanzen/index.html/](https://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/preise_bilanz_n/versorgungsbilanzen/index.html/) (Zugriff 21.07.2021).

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579-606.

Taylor, M. H., Tsai, H. C., Rasco, B., Tang, J. & Zhu, M. J. (2018). Stability of *Listeria monocytogenes* in wheat flour during extended storage and isothermal treatment. *Food Control*, 91, 434-439.

Unger, P., Channaiah, L. H., Singh, A., Singh Sekhon, A., Babb, M., Yang, Y. & Michael, M. (2021). Validation of brownie baking step for controlling *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1574-1583.

Van Asselt, E. D. & Zwietering, M. H. (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 73-82.

Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene. (2004). *Amtsblatt der Europäischen Union L 2004/139*.

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel. (2005). *Amtsblatt der Europäischen Union L 2005/338*.

Webb, M. D., Barker, G. C., Goodburn, K. E. & Peck, M. W. (2019). Risk presented to minimally processed chilled foods by psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 94-105.

Winkelströter, L. K. & De Martinis, E. C. (2015). Different methods to quantify *Listeria monocytogenes* biofilms cells showed different profile in their viability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 231-235.

Wu, S., Ricke, S. C., Schneider, K. R. & Ahn, S. (2017). Food safety hazards associated with ready-to-bake cookie dough and its ingredients. *Food Control*, 73, 986-993.

Yan, H., Neogi, S. B., Mo, Z., Guan, W., Shen, Z., Zhang, S., Li, L., Yamasaki, S., Shi, L. & Zhong, N. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005 – 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 310-316.

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pro Kopf Verbrauch in kg (Getreide insgesamt) von den Wirtschaftsjahren 2014/15 bis 2019/20 (Daten: Statistik Austria 2021).....	1
Abb. 2: Probeentnahmestellen (Auspresskopf, Teigwalze und Abschnitte 1 bis 5) während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).....	12
Abb. 3: Herstellung der dezimalen Verdünnungsreihe V1 bis V3 für die Bestimmung der Keimzahl im Produktionsumfeld und im Teig.....	14
Abb. 4: Quantitative Untersuchung der Umfeldproben – Pipettierschema für die einzelnen Nähragarplatten.....	14
Abb. 5: Quantitative Untersuchung der Teigproben – Pipettierschema für die einzelnen Nähragarplatten.....	15
Abb. 6: Berechnung der Keimzahl in Umfeld- und Teigproben.....	16
Abb. 7: Reduktionsraten der aeroben mesophilen Gesamtkeimzahl (log KbE/f) nach Reinigung und Desinfektion (D) an einzelnen produktberührenden Probenahmepunkten der Verarbeitungslinie im Vergleich zur Keimbelastung während der Produktion (C). Blaue Balken (positive Werte) zeigen eine Reduktion der Keimzahlen, graue Balken (negative Werte) zeigen eine Zunahme der Keimzahlen.....	21
Abb. 8: Mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl ( $\pm$ Standardabweichung) von allen lebensmittelassoziierten Umfeldproben während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D). GKZ: Gesamtkeimzahl, KbE/f: Koloniebildende Einheit pro Fläche.....	22
Abb. 9: Ausstrich auf <i>Bacillus-ChromoSelect-Agar</i> (Merck KGaA) mit <i>Eiglob</i> (Oxoid) mit hellblau flach wachsenden Isolaten mit blauem Zentrum und trüben Präzipitationshof.....	24
Abb. 10: Mittlere aerobe mesophile Gesamtkeimzahl (gelb) und mittlere Keimzahl Gram-negativer Bakterien (grün) von während der Produktion (A – C) entnommenen Teigresten (n=16) ( $\pm$ Standardabweichung) aller Abschnitte. GKZ: Gesamtkeimzahl, KbE/g: Koloniebildende Einheit pro Gramm.....	25
Abb. 11: Beispiel eines API 10 S Teststreifens. ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside, GLU: D-Glukose, ARA: L-Arabinose, LDC: Lysin, ODC: Ornithin, CIT: Trinatriumcitrat, URE: Urea, TDA: Tryptophan (Tryptophandesaminase), IND: Tryptophan (Indolproduktion).....	26
Abb. 12: Beispiel eines Messergebnisses aus dem API 10 S (oben) und Auswertung aus APIWEB für die Identifikation von Gram-negativen Isolaten (unten). ONPG: Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside, GLU: D-Glukose, ARA: L-Arabinose, LDC: Lysin, ODC: Ornithin, CIT:	

Trinatriumcitrat, URE: Urea, TDA: Tryptophan (Tryptophandesaminase), IND: Tryptophan (Indolproduktion), ID: Identifikation.....27

Abb. 13: Beispiel eines Messergebnisses aus dem API 20 NE (oben) und Auswertung aus APIWEB für die Identifikation von Gram-negativen Isolaten (unten). TRP: L-Tryptophan, GLU: D-Glukose, ADH: L-Arginin, URE: Urea, ESC; Aesculin Eisen Citrat, GEL: Gelatine, PNG: 4-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid, GLU: D-Glukose, ARA: L-Arabinose, MNE: D-Mannose, MAN: D-Mannitol, NAG: N-Acetyl-Glucosamin, MAL: D-Maltose, GNT: Kaliumgloconat, CAP: Caprinsäure, ADI: Adipinsäure, MLT: Apfelsäure, CIT: Trinatriumcitrat, PAC: Phemylessigsäure, OX: Oxidase, ID: Identifikation..... 28

Abb. 14: Übersicht des Vorkommens von *Listeria spp.* und *L. monocytogenes* an den verschiedenen Probenahmestellen im Produktionsumfeld und in den Teigen. Proben mit *Listeria spp.* wurden in blau und Proben mit *L. monocytogenes* in orange markiert. Die Probenahmen A – C wurden während der Produktion und Probenahme D nach Reinigung und Desinfektion durchgeführt. *L. spp.*: *Listeria* Spezies, monocytog.: monocytogenes..... 30

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Bilanz des Verbrauchs an Getreide in Österreich im Wirtschaftsjahr 2019/20 in Tonnen* .....	1
Tab. 2: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	9
Tab. 3: Tag der Probenahme während der Produktion und nach Reinigung und Desinfektion. ....	11
Tab. 4: Inkubationszeit und –temperatur der verwendeten Nähr- und Anreicherungsmedien. ....	15
Tab. 5: Einstellung des Thermocyclers bei der Durchführung der <i>iap</i> -PCR zum Nachweis von <i>Listeria spp.</i> und <i>L. monocytogenes</i> .....	17
Tab. 6: Mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl bei Probenahme vor (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D) im Produktionsumfeld.....	19
Tab. 7: Keimzahl von Gram-negativen, Oxidase-positiven Stäbchenbakterien bei Probenahme vor (A oder B) und nach Reinigung und Desinfektion (D) im Produktionsumfeld. ....	20
Tab. 8: Belastung des Produktionsumfeldes durch <i>Listeria spp.</i> und <i>L. monocytogenes</i> in den verschiedenen Probenahmestellen während der Produktion (A/B/C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).....	23
Tab. 9: Vorkommen von präsumtiven <i>B. cereus</i> (< 2,0 log KbE/f) im Produktionsumfeld während der Produktion (A – C) und nach Reinigung und Desinfektion (D).....	23
Tab. 10: Mittlere logarithmische Gesamtkeimzahl während der Produktion und mittlere logarithmische Keimzahl von Gram-negativen, Oxidase-positiven Keimen an verschiedenen Probenahmestellen (Probenahme A – C) in Teigen (n=16).....	25
Tab. 11: Belastung der Restteige durch <i>Listeria spp.</i> und <i>L. monocytogenes</i> an den verschiedenen Probenahmestellen während der Produktion.....	29