

Reduktion von Bakterien auf Schlachthühnern in der Lebensmittelkette

L.Winkelmayer¹, K. Rathhammer¹, T. Requat¹, P. Jäger², S. Lindiger¹, D. Ljuhar², S. Richter¹, C. Plaza¹, M. Matt¹, M. D. Mansfeld³, H. Schildorfer¹, N. Schmoll¹, F. Bauer⁴, K.M. Hellemann⁵, A. Leidwein¹, G.G. Duscher¹

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, lisa.winkelmayer@ages.at

² Braincon GmbH & Co KG, d.ljuhar@bct.co.at;

³ ILV Kärnten, Veterinärmedizinische Untersuchungen, michael.MANSFELD@ktn.gv.at

⁴ TBB Bauer & Bauer GmbH, office@tbb-gmbh.at

⁵ HOSAN® GmbH, office@hosan.at

HINTERGRUND

Während der Schlachtung von Hühnern kann es zu verschiedenen Arten von Schlachtkörperkontaminationen kommen, die die Lebensmittelsicherheit beeinträchtigen können. Zu den Kontaminationsarten zählen unter anderem Verunreinigungen mit gesundheitsschädlichen Keimen wie *Salmonella*, *Campylobacter* oder *E. coli* [1] [2] [3]. Derzeit gibt es in der Schlachthofkette keine Möglichkeit, Kontaminationen zu bekämpfen, außer der herkömmlichen Vermeidungsstrategie mit Hygienemaßnahmen bzw. beim Auftreten von positiven *Salmonella*-Schlachtkörpern, diese nicht mehr in den Verzehr zu bringen. In diesem Projekt wird ein innovativer Ansatz zur Keimreduktion getestet, und zwar mithilfe von H₂O₂- und Bakteriophagen-Verneblung sowie einer UVC-Lichtbehandlung am Schlachtkörper, also unmittelbar vor der Verpackung. Dadurch soll der Eintrag der Pathogene zukünftig in die Nahrungskette des Menschen verhindert werden.

METHODE

Zur Testung der drei Methoden wurden jeweils feste Nährkulturmedien (Lysogen Broth-Agarplatten) und Hühnerhautstücke (1 cm x 1 cm) hinsichtlich ihrer Bakterienreduktion analysiert. Für die Versuche wurde *Salmonella infantis* (*S. infantis*) mit einer OD₆₀₀ von ca. 0,2 seriell weiter verdünnt (was einer Konzentration von etwa 10E8 entspricht). Die LB Agarplatten wurden mit jeweils 100 µl inokuliert und die Hühnerhaut mit jeweils 10 µl. Die inokulierten Proben wurden jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, je nach Methoden behandelt und über Nacht inkubiert. Die Hühnerhaut wurde nach der Behandlung noch homogenisiert (mittels Stomacher), ausplattiert und ebenfalls über Nacht inkubiert. Zur Auswertung wurden nur Platten mit koloniebildenden Einheiten (KBE) von 300 bis 10 herangezogen bzw. 300 Kolonien als Maximum herangenommen.

H₂O₂-Vernebelung

Unter Einsatz des Ultraschallschwingers der DCX-Technologie (Braincon GmbH & Co KG) wurde 7,5%iges Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei einer relativen Raumluftfeuchte von 90 % vernebelt (>0,3µm). Die Vernebelungsprozedur wurde sowohl für einen Zeitraum von 60 Minuten (3 Versuchsansätze in Duplikaten) als auch für 120 Minuten (2 Versuchsansätze in Duplikaten) durchgeführt.



Abbildung 1 : A. DCX- Gerät B. Die Wirksamkeit der Desinfektion mit H₂O₂ Vernebelung.

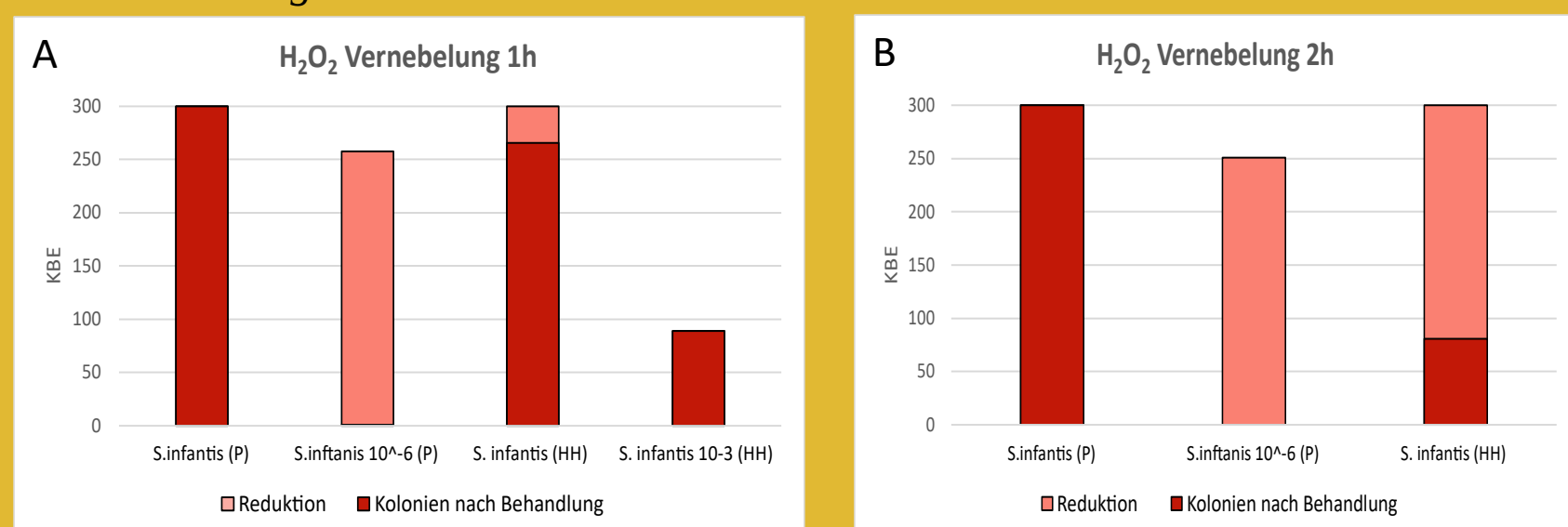


Abbildung 2 : Ergebnisse des Bakterienkolonie (Gold) und -reduktion (Hellgold) nach 1h (A) und 2h (B) H₂O₂ – Vernebelung

Die Auswertung der Lysogen Broth (LB)-Agarplatten zeigte, dass im Zentrum der Petrischale eine signifikante Desinfektion erzielt wurde. Jedoch konnte aufgrund der intensiven bakteriellen Vermehrung am Plattenrand keine quantitative Auswertung durchgeführt werden (Abb.1). Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine erhebliche Variabilität in den Koloniezahlen auf der Hühnerhaut. Selbst nach zweistündiger Behandlung konnte keine Verbesserung hinsichtlich der Reduktion von *S. infantis* festgestellt werden (Abb.2).

Bakteriophagen-Vernebelung

Die Bakteriophagen in einer Peptonlösung (10E8) wurden ebenfalls mithilfe der DCX-Technologie vernebelt. Hierzu wurde ein eigens entwickelter Inkubator verwendet, und das DCXpro-Gerät wurde entsprechend baulich adaptiert. Die Bakteriophagen, welche spezifisch gegen den Stamm *S. infantis* sind, wurden bei einer relativen Raumluftfeuchte von 90 % in den Inkubator eingeleitet und über einen Zeitraum von 120 Minuten vernebelt. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag darin festzustellen, ob die Bakteriophagen erfolgreich und aktiv in Tröpfchenform überführt werden können, trotz der mechanischen Belastung des Ultraschallschwingers.

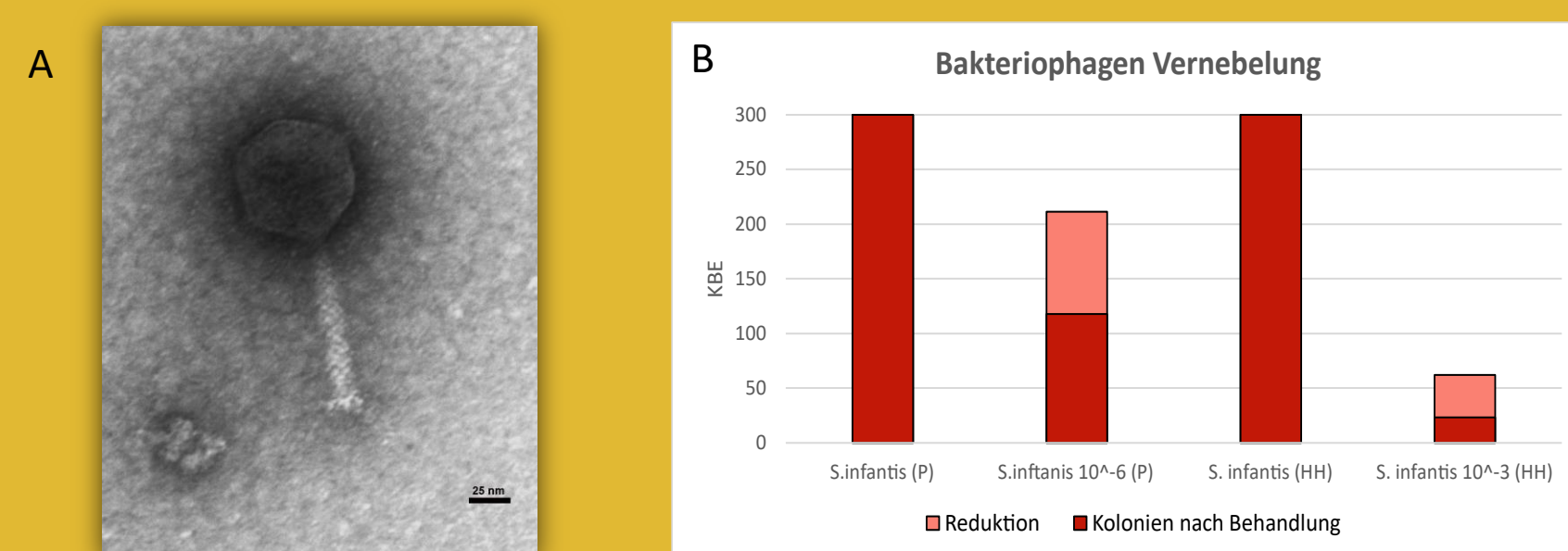


Abbildung 3 : A TEM Abbildung Bakteriophage der Familie Myoviridae, B Wirksamkeit der Bakteriophagen-Vernebelung

Durch die Verwendung von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bildern sowie qualitativer Reduktionstests konnten wir nachweisen, dass die Bakteriophagen der Familie *Myoviridae* (Abb.3) erfolgreich und strukturell unverändert in Form von Trockennebel in die Luft gebracht wurde. Diese Aktivitäten wurden durch die nachweisbare Reduktion auf den Agarplatten, auf der Hühnerhaut und zusätzlich in flüssigen Kulturmedien bestätigt.

UVC-Lichtbehandlung

Das UVC-Licht mit einer Wellenlänge von 222 nm wurde mit einer Dosis von 6 mJ/cm² eingesetzt. Dies wurde durch Einhaltung eines Abstands von 4 cm und einer Proben-Behandlungsdauer von 45 Sekunden erreicht. Zusätzlich wurde eine Kombination mit manuell aufgetragenen Bakteriophagen getestet. Die Bakteriophagen wurden für eine Stunde auf die bereits inokulierten *S. infantis*-Proben bei Raumtemperatur inkubiert und diese anschließend mit UVC-Licht behandelt.

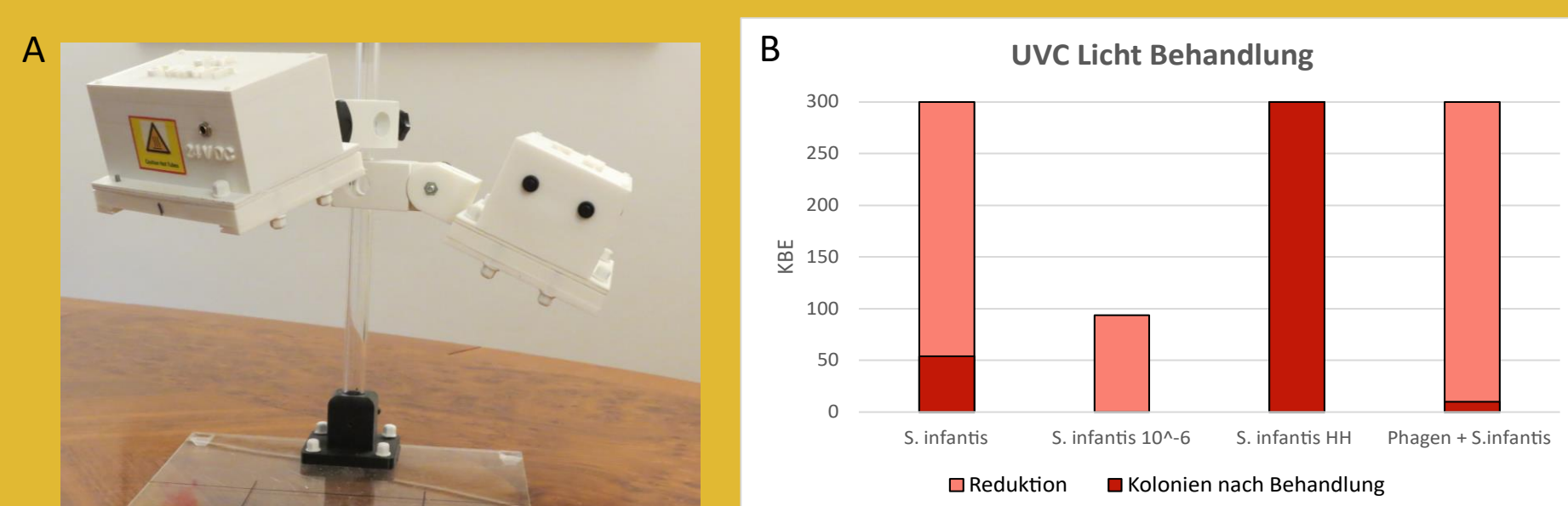


Abbildung 4 : A. UVC Konstruktion B. Die Wirksamkeit der Desinfektion mit UVC-Licht mit einer Wellenlänge von 222 nm.

Die Anwendung der UVC-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Bakterienanzahl auf den LB-Agarplatten (Abb. 4). Ein verstärkter Effekt wurde beobachtet, wenn zuvor eine Vorbehandlung mit Bakteriophagen erfolgte. Allerdings konnte auf der Hühnerhaut keine quantitative Reduktion durch das UVC-Licht nachgewiesen werden.

DISKUSSION

Aufgrund der gesundheitlichen Risiken für den Konsumenten müssen Kontaminationen mit Pathogenen sowohl in der Primärproduktion als auch in der Lebensmittelkette vermieden werden [4]. Aufgrund der steigenden Antibiotikaresistenz werden innovative Ansätze in allen Lebensbereichen immer mehr gefordert. Die im Projekt entwickelten Methoden zeigen eine qualitative Bakterienreduktion. Die Behandlung einer Bakterienkonzentration von 10E8 (unverdünnt) konnte keine vollständige Desinfektion erzielen. Allerdings entspricht diese Bakterienkonzentration keiner natürlichen Kontamination. Daher ist davon auszugehen, dass die Methoden eine unterstützende Rolle bei der Desinfektion spielen können.

- Die H₂O₂ Behandlung zeigte eine sehr starke Wirkung hinsichtlich der Bakterienreduktion. Allerdings dürfte das H₂O₂ mit dem Material der Petrischale reagieren und somit eine Agarplatte nicht vollständig mit dem Trockennebel benetzen. Dennoch konnte eine gute Reduktion mit der herkömmlichen DCX-Technologie erreicht werden, die bereits aus anderen Studien zur Raumdesinfektion bekannt ist [5].
- In weiteren Versuchen konnten wir eine erfolgreiche Bakteriophagen-Vernebelung nachweisen, bei der die Nutzung des Ultraschallschwingers der DCX-Technologie zu keiner oder nur geringfügiger Schädigung der Bakteriophagen führte. Der Bakteriophagenschwanz der Familie *Myoviridae* gilt als fragile Struktur, die bei mechanischem Stress leicht abreißt [6]. Diese Erkenntnis könnte die Bakteriophagentherapie in vielen Bereichen erweitern, indem Vor- und Nachteile gezielt analysiert werden.
- Das UVC-Licht mit einer Wellenlänge von 222 nm wurde in Studien bereits als weniger destruktiv für die Zellen beschrieben [7] und erzielte in dieser Studie signifikante Ergebnisse.

In allen Versuchen stellte die Hühnerhaut die größte Herausforderung dar. Aufgrund des natürlichen Biofilms der Haut und Tiefe der Poren ist eine Desinfektion auf dieser Matrix erschwert, da sie als Schutz bzw. als Versteck für Bakterien dienen kann [8]. Um eine erhöhte Bakterienreduktion auf Hühnerhaut zu erreichen, sind weitere Analysen notwendig. Alle drei innovativen Ansätze müssen im Detail weiter untersucht werden, und es sollten Optimierungen sowohl am DCX-Gerät als auch an den derzeitigen Parametern vorgenommen werden, um eine effektivere Wirkung auf Oberflächen und Gewebematerial zu erzielen.

REFERENZEN

- [1] Shang K, Wei B, Jang H-K, Kang M. Phenotypic characteristics and genotypic correlation of antimicrobial resistant (AMR) *Salmonella* isolates from a poultry slaughterhouse and its downstream retail markets. Food Control. 2019; 100: 35–45.
- [2] Rasschaert G, Houf K, Godard C, Wildemaunee C, Pastuszczak-Frak M, De Zutter L. Contamination of carcasses with *Salmonella* during poultry slaughter. Journal of Food Protection. 2008; 71(1):46–52. PMID: 18236675
- [3] EFSA J. 16:1–262. EFSA and ECDC. 2019. The European union one health 2018 zoonoses report. EFSA J. 17:1–276
- [4] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal. 9(4): 2105.
- [5] Rathhammer, Kristin, Winkelmayer, Lisa, Bauer, Friedrich, Hellemann, Karl, Jäger, Philippe, Leidwein, Alois & Lindinger, Sarah & Ljuhar, David & Mansfeld, Michael & Requat, Theres & Schildorfer, Hermann & Schmoll, Nikolaus & Duscher, Georg. (2022). Disinfection with vaporized hydrogen peroxide fluid in different environments and its applications and advantages in crisis management. 10.35011/IDIMT-2022-161.
- [6] Sharon Shai Yee Leung, Nicholas B. Carrigy, Reinhard Vehringer, Warren H. Finley, Sandra Morales, Elizabeth A. Carter, Warwick J. Britton, Elizabeth Kuter, Hak-Kim Chan (2019). Jet nebulization of bacteriophages with different tail morphologies – Structural effects. International Journal of Pharmaceutics, Volume 554:Pages 322–336, ISSN 0378-5173.
- [7] Hessler, M., Haag, R., Sieber, N., & Vatter, P. (2021). The impact of far-UVC radiation (200–230 nm) on pathogens, cells, skin, and eyes—a collection and analysis of a hundred years of data. GMS hygiene and infection control. 16.
- [8] Pannu Kumar Roy, Angeli Ji-Won Ho, Md. Furkanur Rahman Mizan, Md. Iqbal Hossain, Md. Ashrafudoulla, Sazzad Hossen Toussik, Shamsun Nahar, Yu Kyung Kim, Sang-Do Ha. (2021) Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. Poultry Science, Volume 100, Issue 7, ISSN 0032-5791



effizient.
innovativ.
sicher.
schnell.



wirtschafts
agentur
wien

Gefördert durch die
Wirtschaftsagentur Wien. Ein
Fonds der Stadt Wien.