

Abschlussbericht OptiHyg

Zuwendungsempfänger:
Hochschule Geisenheim

Förderer:
QS-Wissenschaftsfonds

Vorhabensbezeichnung:

Optimierung von Hygieneschleusen zur Vermeidung mikrobiologischer Risiken in der Gemüseproduktion und -verarbeitung

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.2023 - 31.10.2024

1. Aufgabenstellung/Zielsetzung

Bisher sind nur sehr wenige fundierte Studien auf dem Gebiet der Validierungen zum Einsatz und zur Effektivität von Hygieneschleusen zur Sohlenreinigung in Betrieben der Gemüseproduktion und der Gemüseverarbeitung (Lebensmittelindustrie) vorhanden. Das Projekt OptiHyg zielte deshalb darauf ab, im Rahmen von fundierten und reproduzierbaren Untersuchungen diese Lücke zu schließen und sowohl Herstellern von Hygieneschleusen sowie von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln, den Anwendern und letztendlich auch dem Gesetzgeber Handlungsempfehlungen geben zu können. In diesem Zusammenhang stand die Entwicklung eines standardisierten Testverfahrens für Hygieneschleusen im Fokus. Darauf aufbauend sollte ermittelt werden, ob eine handelsübliche Hygieneschleuse eine ausreichende Reinigungs- und Desinfektionsleistung aufweist und welche Parameter (z. B. Behandlungsdauer, Art des Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittels, mechanische Reinigung) für den Reinigungserfolg verantwortlich sind und gegebenenfalls optimiert werden können. Wichtig erschien es, insbesondere die Wechselwirkung zwischen der mechanischen Reinigungswirkung der Hygieneschleuse in Kombination mit den chemischen Produkten zur Reinigung bzw. Desinfektion genauer zu untersuchen und zu validieren. Weiterhin sollten Versuche zur Optimierung der Hygieneleistung durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen sollten Empfehlungen als Standardmethode (SOP, *Standard Operation Procedure*) für Hersteller und Anwender von Hygieneschleusen erarbeitet werden, die wesentlich zur Minimierung des Übertragungsrisikos relevanter Mikroorganismen in Produktion und Verarbeitung von Gemüse beitragen können.

Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Für die Versuche stellte die Firma Mohn GmbH (Meinerzhagen) eine Hygieneschleuse (Modell: Clean-Check 1500 L Highline) zur Verfügung. Die Firma Heute Maschinenfabrik GmbH & Co. KG vermietete 8 ProfilGate® i55 1x1 GO Gitterroste für die Projektlaufzeit.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

AP1: Wirksamkeit einer handelsüblichen Hygieneschleuse zur Eliminierung relevanter Mikroorganismen von Schuhsohlen unter Schmutzbelastung

In AP1 sollte die Wirksamkeit der Hygieneschleuse (Modell: Clean-Check 1500 L Highline der Firma Mohn GmbH) mit rotierenden Bürsten zur Sohlenreinigung (s. Abb. 1) unter Verwendung verschiedener Reinigungs- und Desinfektionsmittel evaluiert werden. Wegen technischer Probleme bei der Durchführung der entsprechenden Versuche zu AP1 wurden Teile der Aufgabenstellung in AP2 integriert, da dort ohnehin jeweils Varianten enthalten sind, die Aussagen über die alleinige Wirkung der Hygieneschleuse zulassen.



Abb. 1: Schuhreinigung und -desinfektion mit rotierenden Bürsten in der Hygieneschleuse

Entscheidend für eine standardisierte Prüfung der Hygieneschleuse war die Entwicklung einer Standardverschmutzung (StV), die sowohl die Bedingungen in der Produktion als auch Verarbeitung und Vermarktung von Gemüse abbildet. Auf der Basis entsprechender Vorversuche und einem internen Forschungsprojekt der Hochschule Geisenheim zur Validierung von Hygieneschleusen (ValiHyg; 2021-2022) wurde eine StV entwickelt, mit der sich durch einfache Variation spezifische Praxisbedingungen simulieren lassen (siehe Tab 1). In AP1 wurde die Wirkung der Hygieneschleuse an Arbeitsschuhen mit stark profilierter Sohle in zwei Teilversuchen geprüft. Detaillierte Angaben zu Material und Methoden sind der SOP (standard operation procedure) im Anhang zu entnehmen. Abweichungen von der SOP sind im Folgenden beschrieben.

Tab. 1: Zusammensetzung der Standardverschmutzung (StV)

Komponente *)	Masse
Weißtorf mit CaCO ₃ (max. 1 mm; pH 5-6)	15 g
Palmfett (Pulver)	10 g
Erbsenprotein	5 g
Tomatenblätter (Teilchen max. 1 mm)	2 g
Bentonit	10 g
Ringerlösung (c=1/8) **)	65 ml
Quarzsand (max. 1 mm)	35 g

*) vor Zugabe der Ringerlösung werden die Komponenten autoklaviert (verhindert Fremdkontamination.)

***) zur Kontamination werden der Ringerlösung 2 ml einer Keimsuspension zugesetzt

AP1a: Versuche mit angetrockneter, stark haftender Standardverschmutzung

Mit der Absicht, die Haftung zu verbessern, wurden im ersten Teilversuch der Standardverschmutzung Methylzellulose beigemischt. Die StV wurde vor dem Aufbringen mit *Escherichia coli* kontaminiert. Die Behandlung von jeweils 4 Schuhen erfolgte dann nach einer Trockenzeit (Raumtemperatur) von 24 Stunden. Neben Leitungswasser wurde ein saurer Reiniger (Renolit Citrus, 5 %), ein Neutralreiniger (WECO Neutralreiniger, 1 %) oder ein alkalischer Reiniger (Hortisept Clean, 3 %) eingesetzt.

AP1b: Versuche mit Standardverschmutzung ohne Methylzellulose und ohne langer Antrockenzeit

Aufgrund der Erfahrungen im ersten Durchgang wurden die Versuchsparameter im zweiten Teilversuch angepasst (StV ohne Methylzellulose und ohne 24-stündiger Antrockenzeit). Die StV wurde mit einem Rifamycin resistenten Stamm von *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* kontaminiert. Die Behandlungen erfolgten mit VE-Wasser, einem Desinfektionsmittel (MENNO Florades, 3 %), einem Neutralreiniger (P3-Topax 990, 3 %) oder einem alkalischen Reiniger (Hortisept Clean Plus, 3 %).

AP2: Optimierung einer Hygieneschleuse durch zusätzliche Reinigungs- bzw. Desinfektionsmatten

Im Rahmen dieses Arbeitspaketes wurde die Reinigungsleistung der o.a. Hygieneschleuse in Verbindung mit ProfilGate® i55 go Gitterrosten mit Bürstenleisten (HEUTE Maschinenfabrik GmbH & Co. KG.) getestet. Jeweils vier Gitterroste in Stahlwannen wurden unmittelbar vor und nach der Hygieneschleuse platziert (Abb. 2).



Abb. 2: Aufbau der mit ProfilGate® i55 go Gitterrosten mit Bürstenleisten erweiterten Hygieneschleuse sowie Schrittfolge auf den vorderen Gitterrosten bei den Versuchen

Die erste Matte diente der Vorreinigung und die zweite Matte der Desinfektion bzw. Verlängerung der Einwirkungszeit des in der Schleuse verwendeten Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittels. Die Untersuchungen wurden in zwei Teilversuchen (AP2a, AP2b) durchgeführt. In Tabelle 2 sind die verschiedenen Kombinationen für beide Teilversuche dargestellt. Detaillierte Angaben zu Material und Methoden sind der SOP (standard operation procedure) im Angang zu entnehmen. Abweichungen von der SOP sind im Folgenden beschrieben.

Tab. 2: Beschreibung der Kombinationen zur Testung der Hygieneschleuse mit und ohne Gitterroste

Kurzform	Rost vor Schleuse	in Schleuse	Rost nach Schleuse
xDx	ohne	MENNO-Florades	ohne
xR2x	ohne	P3-Topax 990	ohne
xWx	ohne	Wasser	ohne
WWW	Wasser	Wasser	Wasser
WWD	Wasser	Wasser	MENNO-Florades
WDW	Wasser	MENNO-Florades	Wasser
WDD	Wasser	MENNO-Florades	MENNO-Florades
R1WW	Hortisept Clean Plus	Wasser	Wasser
R1WD	Hortisept Clean Plus	Wasser	MENNO-Florades
R2WW	P3-Topax 990	Wasser	Wasser
R2WD	P3-Topax 990	Wasser	MENNO-Florades

Erkl.: W = VE-Wasser, D = Desinfektionsmittel MENNO-Florades (3%), R1 = Reiniger P3-Topax 990 (3 %), R2 = Hortisept Clean Plus (3 %), x = keine Behandlung; die Behandlungen erfolgten in der Reihenfolge der Buchstaben in der Kurzform

AP2a: Versuche zur Wirkung der Hygieneschleuse in Kombination mit Gitterrosten (ohne Einzelwirkung)

Diese Versuche wurden im Rahmen einer Master-Thesis (Hildebrandt, 2023) durchgeführt. Es wurden Kombinationen von VE-Wasser, einem Desinfektionsmittel (MENNO-Florades) und zwei Reinigern (R1 = Hortisept Clean Plus, R2 = P3-Topax 990) geprüft.

AP2b: Versuche zur Wirkung der Hygieneschleuse alleine und in Kombination mit Gitterrosten

Für die weiterführenden Versuche in AP2b wurden neben VE-Wasser nur noch der Neutralreiniger (P3-Topax 990) und das Desinfektionsmittel (MENNO-Florades) verwendet. Weiterhin wurden auch Desinfektionsstiefel mit glatten Sohlen in die Versuche mit einbezogen. Als Testkeime kamen neben *X. hortorum* pv. *pelargonii* auch *Escherichia coli* und in begrenztem Umfang *Salmonella subterranea* sowie *Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis* zur Anwendung. Aufgrund der Ergebnisse der Master-Thesis (s.o.) wurde die Hygieneschleuse zur Verringerung der Streuung und besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse modifiziert (seitliche Stoppschiene und Markierung des Auftrittsbereichs).

AP3: Parameteranpassung

Teilweise erfolgte während der Versuche zu AP1 und AP2 bereits eine Anpassung einzelner Parameter. Aus zeitlichen Gründen konnten keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

AP4: Standardmethode zur Validierung von Hygieneschleusen

Die während der Versuche gewonnenen Erkenntnisse und Erfahrungen zur Testmethodik wurden zur Erstellung der SOP (standard operation procedure) verwendet (siehe Anlage 1). Damit ist es möglich, Anfragen von Anwendern oder Anbietern von Hygieneschleusen nach einem standardisierten Verfahren zu validieren.

3. Zusammenarbeit/Kooperationen

Projektmeeting: am 29.06.23 in Geisenheim

Teilnehmende: Christian Pieroth (MOHN GmbH), Alexander Schumacher (HEUTE Maschinenfabrik GmbH & Co. KG), Walter Wohanka, Simone Loos-Theisen, Teresa-Maria Schinabeck, Yvonne Rondot

Abschlussmeeting: am 28.10.24 in Geisenheim

Teilnehmende: Christian Pieroth (MOHN GmbH), Malte Ottmann (HEUTE Maschinenfabrik GmbH & Co. KG), Walter Wohanka, Christian Demmelmaier (Biofa), Hubertus Fehres (HGU), Anniko Walter (HGU) Teresa-Maria Schinabeck (HGU), Yvonne Rondot (HGU)

Weitere **HGU-interne Meetings** am 14.03.23, 19.09.23, 22.01.24, 16.04.24, 22.05.24, 29.07.24 und 30.09.24

4. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse

4.1 AP1: Wirksamkeit einer handelsüblichen Hygieneschleuse unter Schmutzbelastung

AP1a: Versuche mit angetrockneter, stark haftender Standardverschmutzung:

Im ersten Teilversuch wurde die Wirkung der Hygieneschleuse bei Verwendung von drei Reinigern (Renolit Citrus, 5 %; WECO Neutralreiniger, 1 %; Venno Hortisept Clean, 3 %) im Vergleich zu Leitungswasser an Arbeitsschuhen mit stark profilierter Sohle geprüft. Die nach den verschiedenen Behandlungen in allen Fällen noch vorhandene und deutlich sichtbare Restverschmutzung (siehe Abbildung 3) zeigt, dass die Reinigungsleistung der Hygieneschleuse alleine auch bei Verwendung von Reinigungsmitteln unzureichend war. Weder bei der optischen Bewertung noch bei den Resultaten der ATP-Messung (organische Substanz) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen bzw. der Kontrolle nachgewiesen werden. Auf eine aufwändige Bestimmung der Restkeimzahlen (*E. coli*) wurde aufgrund der starken Restverschmutzungen, die keine Unterschiede zwischen den Behandlungen erkennen ließen, verzichtet. Es wird vermutet, dass die schlechte Reinigungsleistung durch die sehr harten Prüfbedingungen bewirkt wurde (Zusatz von Methylzellulose zur StV und 24 Stunden Antrocknungszeit). Für die folgenden Versuche wurde deshalb auf Methylzellulose in der StV und eine längere Antrocknungszeit verzichtet.



Abb. 3: Mit Standardverschmutzung kontaminierte Arbeitsschuhe vor (links) und nach (rechts) der Behandlung in der Hygieneschleuse

AP1b: Versuche mit Standardverschmutzung ohne Methylzellulose und ohne lange Antrocknungszeit

Auch mit der angepassten Standardverschmutzung und ohne längere Antrocknungszeit konnte für alle Behandlungen keine ausreichende Reinigungsleistung erzielt werden. Die mit der bildverarbeitenden Software Image J bestimmte Reduzierung der Sohlenfläche mit Restverschmutzung lag je nach Behandlung im Bereich von ca. 50 – 80% (siehe Abb. 4).

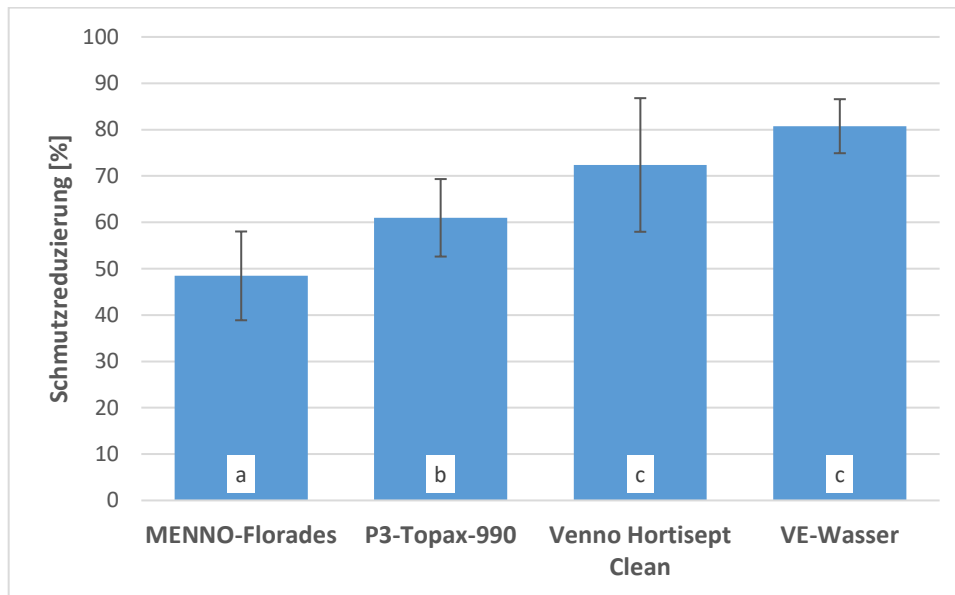


Abb. 4: Prozentuale Reduzierung der verschmutzten Schuhflächen (Werte aus Image J) in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=5) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (TukeysHSD-Test, $p < 0,05$).

Als Testkeim wurde in diesem Teilversuch ausschließlich *X. hortorum* pv. *pelargonii* verwendet. Wegen eines technischen Defektes konnten für die Variante "Venno Hortisept Clean" keine Keimzahlen bestimmt werden. Die übrigen Behandlungen führten nur zu einer sehr geringen log-Reduktion der Keimzahlen je Schuhsohle im Bereich von 0,4 – 0,7, die unter Praxisbedingungen nicht ausreichend ist.

4.2 AP2 Optimierung einer Hygieneschleuse durch zusätzliche Reinigungs- bzw. Desinfektionsmatten

In AP2 wurde die Wirkung verschiedener Kombinationen von Schleuse und Gitterrosten sowie Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittel geprüft (siehe Tabelle 2). Die Ergebnisse der Behandlungen xDx, xR2x und xWx (Schleuse ohne Gitterroste) sind auch als Ergänzung zu AP1 zu sehen.

AP2a: Versuche zur Wirkung der Hygieneschleuse in Kombination mit Gitterrosten (ohne Einzelwirkung)

Im Rahmen der o.a. Master-Thesis ergab die Bewertung der schmutzreduzierenden Wirkung mittels bildverarbeitender Software (Canopeo-App.) an profilierten Schuhsohlen eine durchschnittliche Schmutzreduktion von ca. 90 % in allen geprüften Kombinationen (s. Abb. 5). Zwischen den verschiedenen Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Kombination der Hygieneschleuse mit Reinigungsmatten führte damit zu einer deutlichen Verbesserung der Reinigungsleistung.

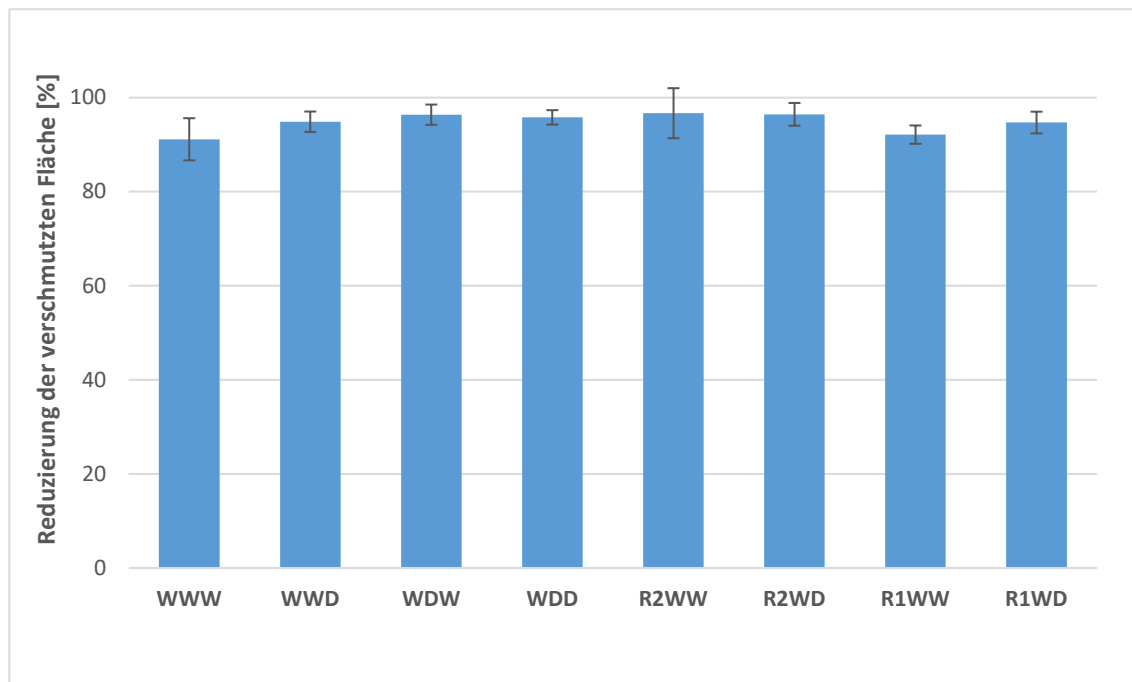


Abb. 5: Prozentuale Reduzierung der verschmutzten Flächen profilierter Schuhsohlen (Werte aus Canopeo-App) in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Die Mittelwerte (n=6) sind nicht signifikant verschieden (ANOVA, $p < 0,05$).

Die Reduzierung der Restverkeimung wurde im Rahmen der o.a. Master-Thesis ausschließlich für *X. hortorum* pv. *pelargonii* untersucht. Aus der Differenz zwischen Ausgangs- und Restverkeimung der StV wurden die jeweiligen log-Reduktionen berechnet. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse ergab, dass ein signifikanter Unterschied zwischen rechtem und linkem Schuh bestand und die Kombinationen mit Reiniger 2 (P3-Topax 990) die höchsten log-Reduzierungen (ca. 3 - 4) aufwiesen (siehe Abb. 6). Für weitere Untersuchungen (AP2b) wurde deshalb ausschließlich dieser Reiniger verwendet.

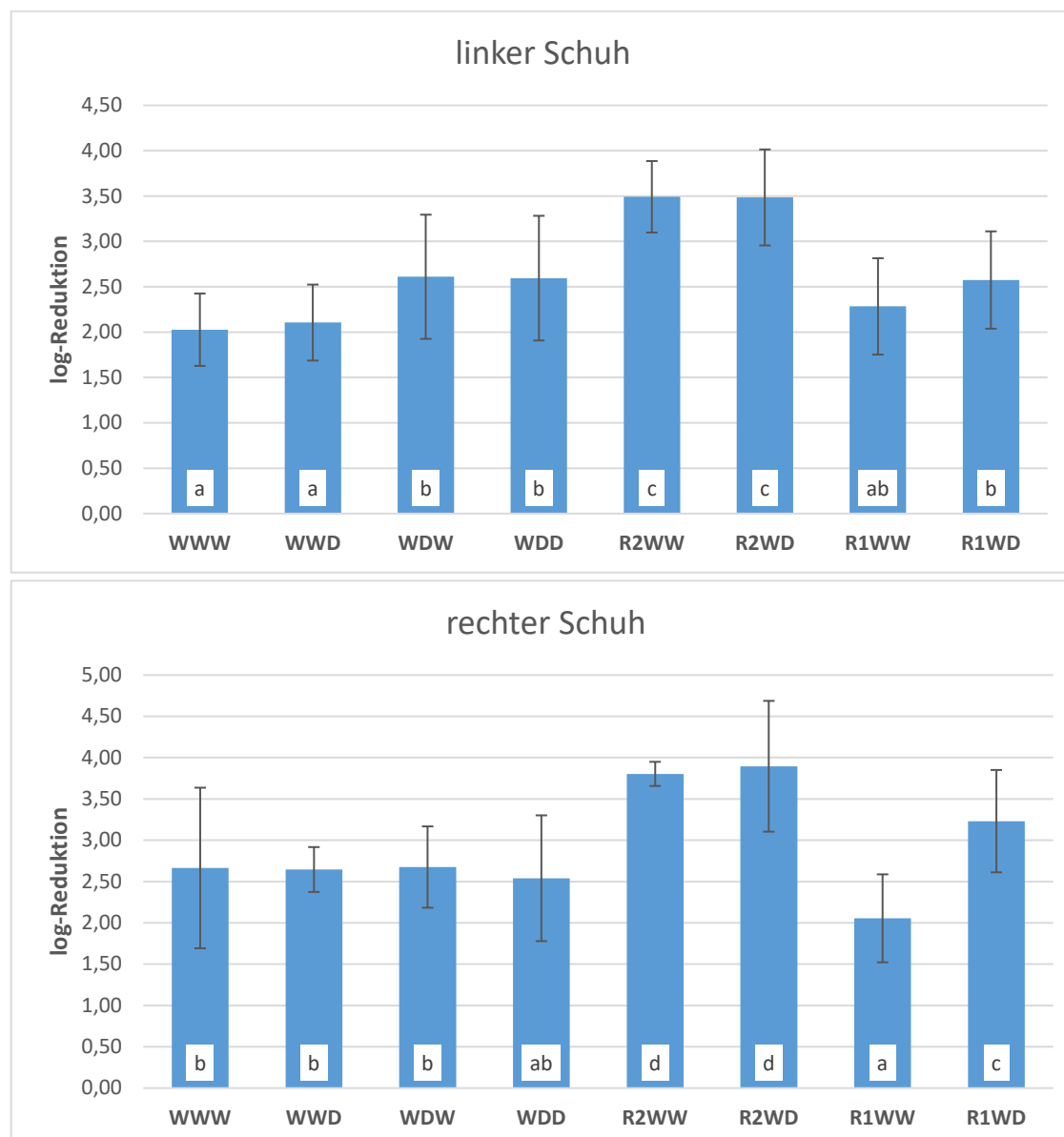


Abb. 6: log-Reduktion von *X. hortorum* pv. *pelargonii* durch unterschiedliche Behandlungen in der Reinigungsanlage. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=30) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$).

AP2b: Versuche zur Wirkung der Hygieneschleuse alleine und in Kombination mit Gitterrosten

Die optische Bewertung der Restverschmutzung profilierter Schuhsohlen mittels Image J (s. Abb. 7) zeigte, dass die Kombinationen mit Gitterrosten (RWD und WWW) die beste Wirkung aufwiesen (Schmutzreduzierung: 95,6 bzw. 95,8 %). Die geringste Wirkung zeigte die Variante xRx mit lediglich 72,8 %. Im Falle der glatten Schuhsohlen lag die Schmutzreduzierung (Image J) bei allen Varianten über 90 % (s. Abb. 8). Aufgrund der optimierten Versuchsanstellung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen linkem und rechtem Schuh feststellbar.

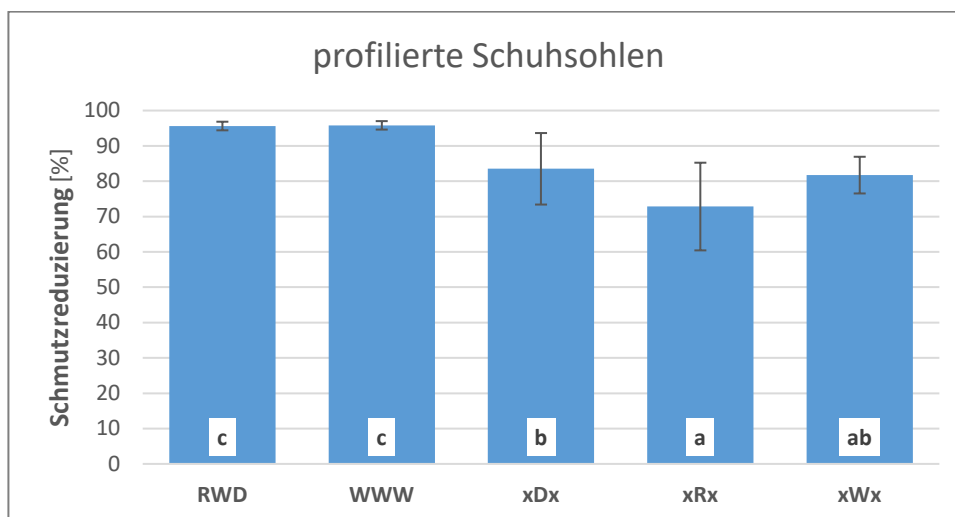


Abb. 7: Prozentuale Reduzierung der Verschmutzung profilierter Schuhsohlen (Werte aus Image J) in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$)

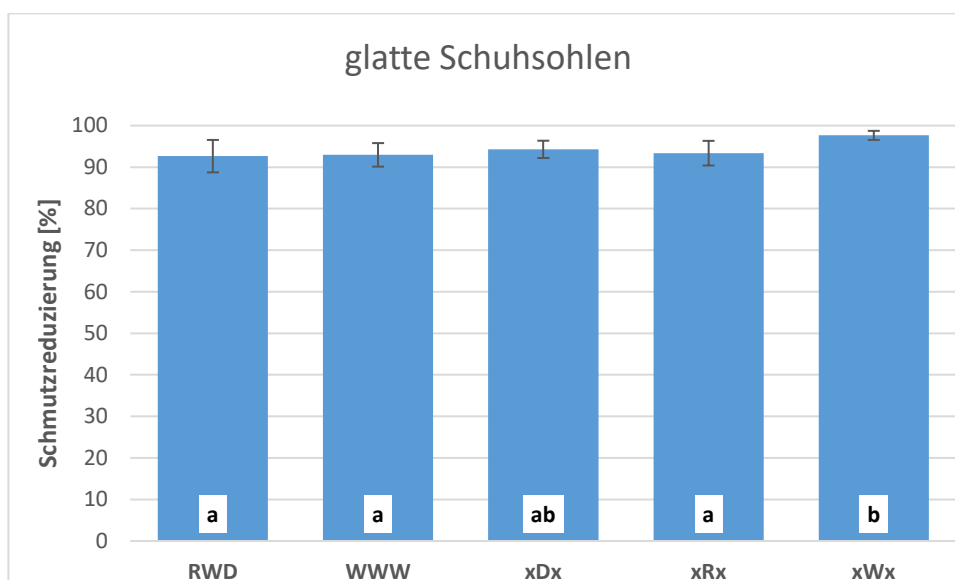


Abb. 8: Prozentuale Reduzierung der Verschmutzung glatter Schuhsohlen (Werte aus Image J) in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$)

Die Abb. 9 und 10 zeigen die log-Reduktion der Keimzahlen für *X. hortorum* pv. *pelargonii* und *E. coli* bei Verwendung profilierter Schuhsohlen und die Abb. 11 und 12 bei Verwendung glatter Schuhsohlen (Desinfektionsstiefel). Während an den profilierten Sohlen stets eine Restverkeimung nachweisbar war, konnte von den glatten Sohlen der Varianten WWW und RWD keiner der Testkeime reisoliert werden. Die entsprechende log-Reduktion war stets >5 . Von den Behandlungen glatter Schuhsohlen ohne Verwendung der Gitterroste zeigte lediglich die Variante xDx eine vergleichbare Wirkung (log-Reduktion >5).

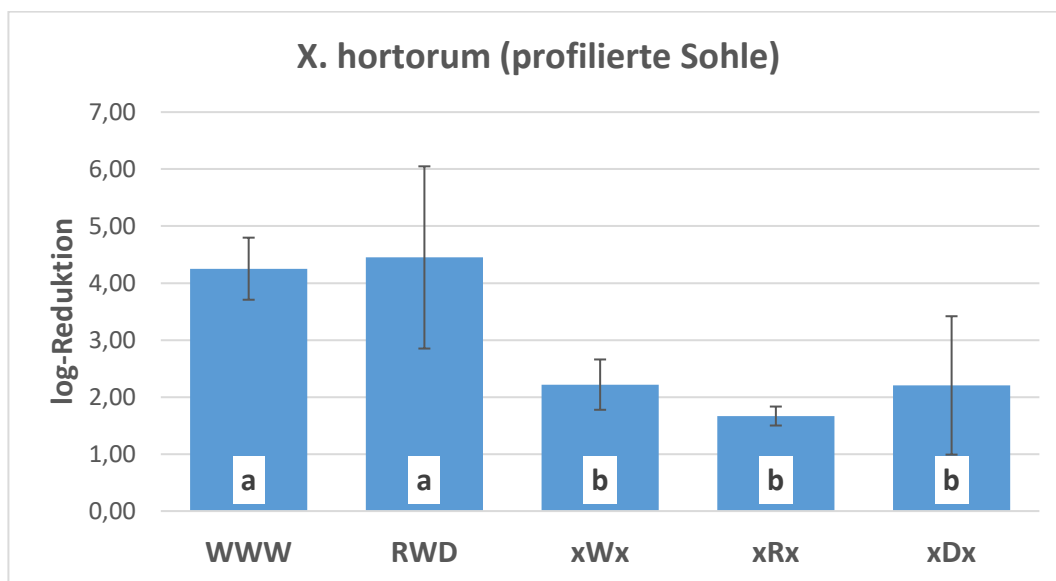


Abb. 9: log-Reduktion von *X. hortorum* pv. *pelargonii* durch unterschiedliche Behandlungen profilierter Schuhsohlen in der Reinigungsanlage. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$).

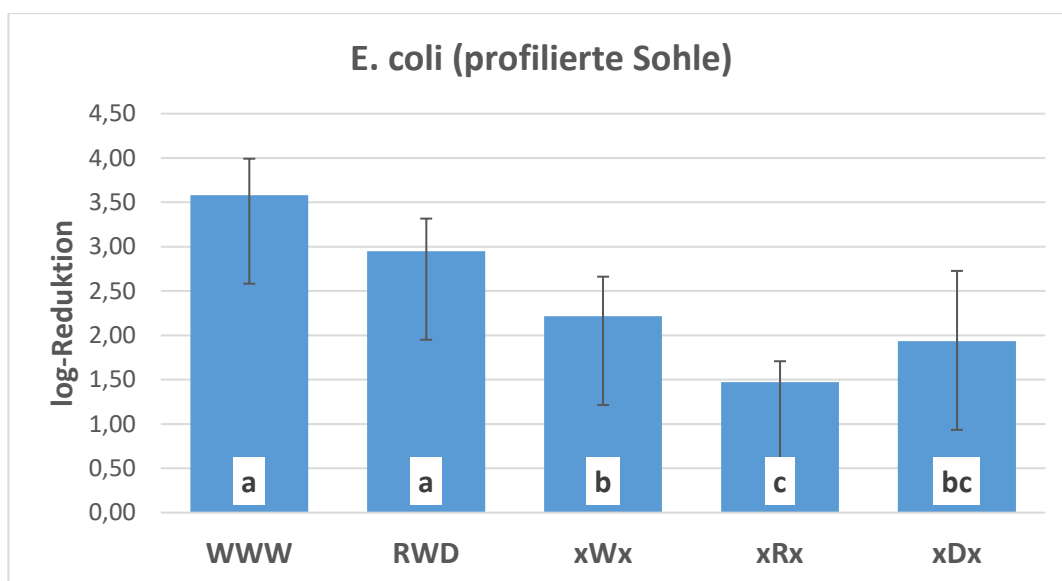


Abb. 10: log-Reduktion von *E. coli* durch unterschiedliche Behandlungen profilierter Schuhsohlen in der Reinigungsanlage. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$).

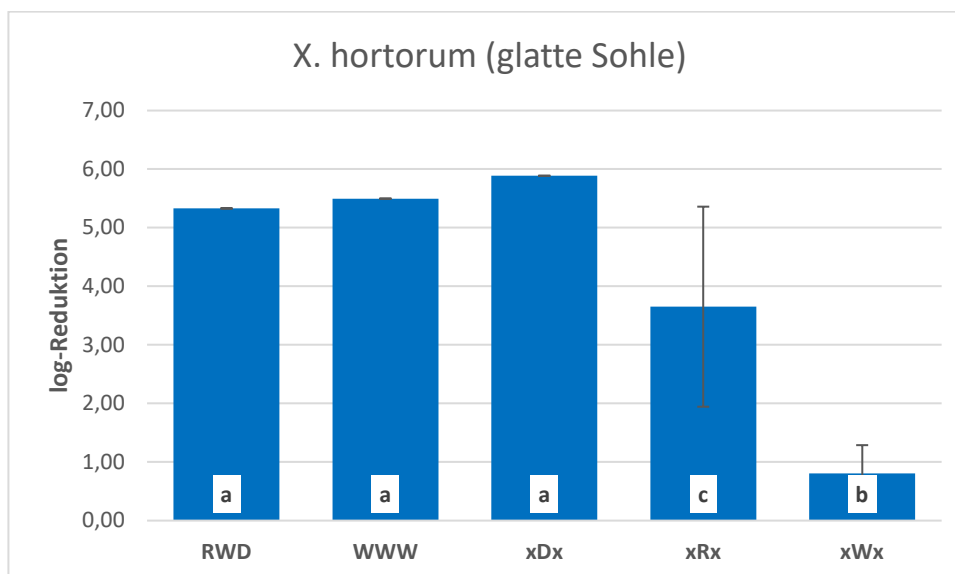


Abb. 11: log-Reduktion von *X. hortorum* pv. *pelargonii* durch unterschiedliche Behandlungen glatter Schuhsohlen in der Reinigungsanlage. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$).

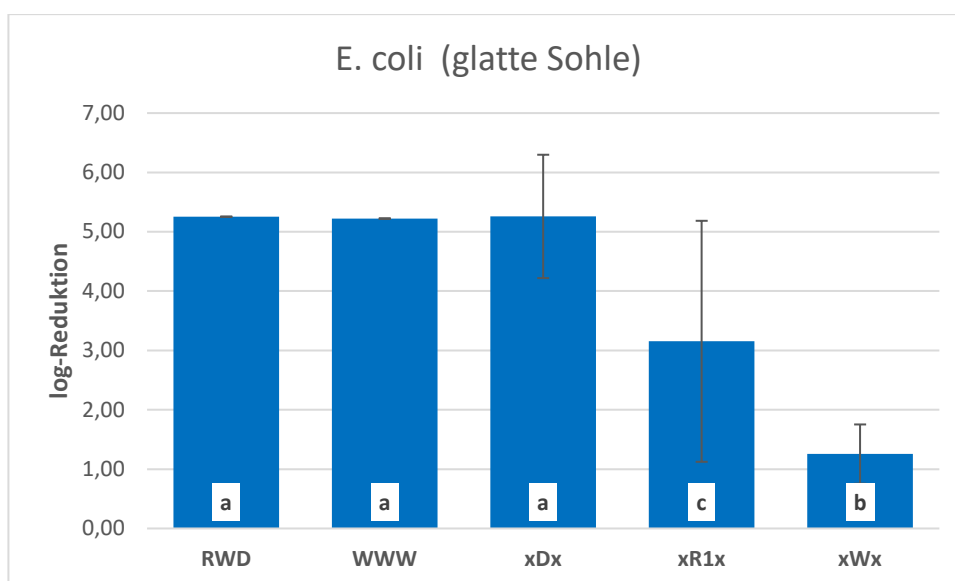


Abb. 12: log-Reduktion von *E. coli* durch unterschiedliche Behandlungen glatter Schuhsohlen in der Reinigungsanlage. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Die ATP-Messungen zur Detektion organischer Substanz (ausschließlich glatte Sohlen) ergaben lediglich für die Variante xRx hohe Werte von durchschnittlich ca. 25.000 RLU. Nur dieser Wert war von allen übrigen signifikant verschieden (s. Abb. 13). Die niedrigsten Mittelwerte von 1032 bzw. 726 RLU zeigten die Varianten RWD bzw. WWW. Allerdings waren diese von denen der Varianten xDx und xWx (2205 bzw. 4247 RLU) nicht signifikant verschieden.

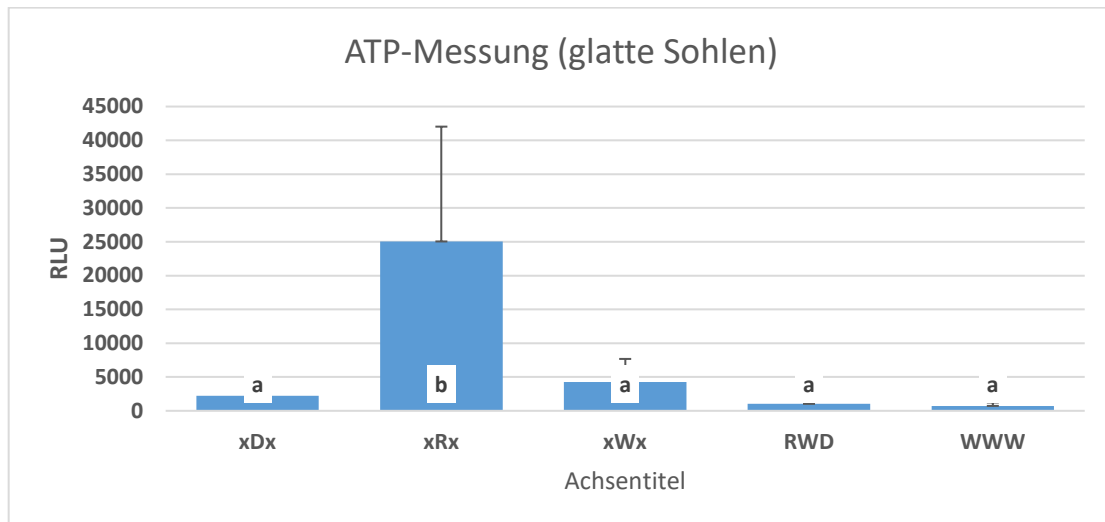


Abb. 13: RLU-Werte glatter Schuhsohlen in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) der Säulen mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$)

Aufgrund der o.a. Versuche mit *X. hortorum* pv. *pelargonii* und *E. coli* wurden gegen *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* und *S. subterranea* nur noch die "besten" Varianten WWW und RWD geprüft. In beiden Fällen waren Schmutzreduzierungen im Bereich von 94 bis 96 % feststellbar. Die optische Auswertung der Restverschmutzung ergab sowohl bei profilierten als auch glatten Schuhsohlen eine hohe Reinigungsleistung der Hygieneschleuse in Kombination mit Gitterrosten. Die mit Image J ermittelten Schmutzreduzierungen lagen im Bereich von 93 bis 95 % (s. Abb. 14). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den verschiedenen Behandlungen waren nicht festzustellen.

Der Testkeim *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* war bei glatten Sohlen in beiden Varianten (WWW und RWD) nicht mehr nachweisbar, d.h. die log-Reduktion lag bei >6 (s. Tab. 3). *S. subterranea* konnte lediglich bei der Variante WWW in sehr geringen Mengen (< 10 KBE/Sohle) reisoliert werden, entsprechend einer log-Reduktion von >6 . Bei profilierten Sohlen konnten mit der RWD-Behandlung lediglich log-Reduktionen von 4,0 für *S. subterranea* und 3,5 für *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* erzielt werden, wobei die log-Reduktionen für an glatten Sohlen signifikant höher war.

Die ATP-Messungen ergaben an den profilierten Sohlen stets höhere RLU-Werte als an den glatten Sohlen (siehe Tab. 4) und die RLU-Werte der Variante RWD waren höher als die der Variante WWW.

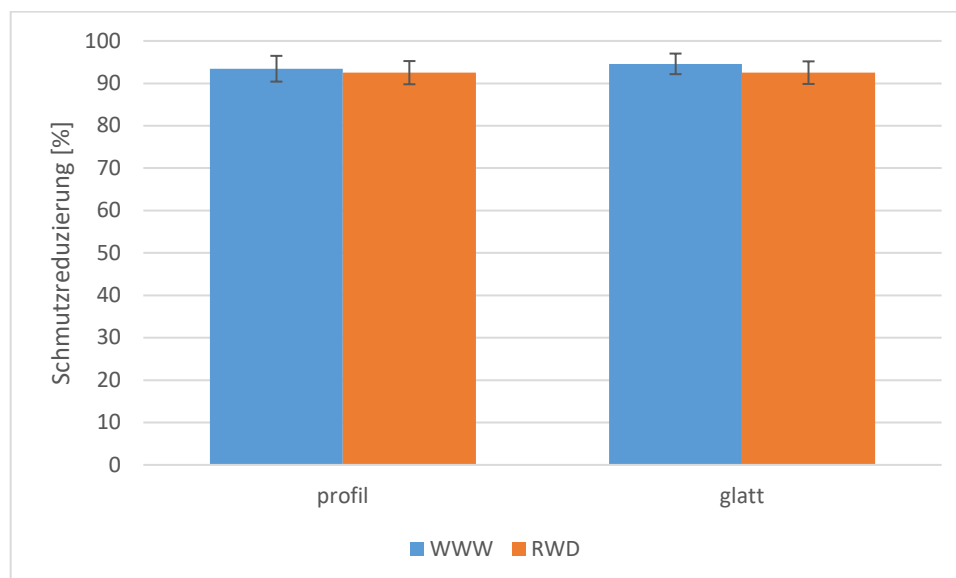


Abb. 14: Prozentuale Reduzierung der Verschmutzung profilierter und glatter Schuhsohlen (Werte aus Image J) in Abhängigkeit von den Behandlungen. Die Fehlerindikatoren entsprechen der Standardabweichung. Mittelwerte (n=10) sind nicht signifikant verschieden (Tukey HSD, $p < 0,05$)

Tab. 3.: log-Reduktionen von *F. oxysporum* f.sp. *cyclaminis* und *S. subterranea* bei glatten und profilierten Schuhsohlen in Abhängigkeit von den Behandlungen

Sohle	Keim	Behandlung	log-Red.
glatt	Salmonella	WWW	>6
glatt	Salmonella	RWD	>6
glatt	Fusarium	WWW	>6
glatt	Fusarium	RWD	>6
profil	Salmonella	WWW	4,49
profil	Salmonella	RWD	4,00
profil	Fusarium	WWW	4,79
profil	Fusarium	RWD	3,54

Tab. 4: RLU-Werte an glatten und profilierten Sohlen in Abhängigkeit von den Behandlungen RWD und WWW

Sohle	Behandlung	Mittelwert	Stabw
glatt	RWD	1032	879
	WWW	726	533
profil	RWD	7807	3187
	WWW	3208	1101

4.3 Weitere gesammelte Erfahrungen

Bei den Versuchen auf der Hygieneschleuse ist aufgefallen, dass der durch die Bürsten abgetragene Schmutz in die nähere Umgebung (u.a. auch die Hosenbeine) gespritzt wird (Abb. 15). Dieser Effekt ist unabhängig von der Bürstenart und dem Düsenstab zu beobachten. Der Splash-Effekt hat eine Auswirkung auf das innerbetriebliche Hygienierisiko in Betrieben und sollte bei der Bewertung der Reinigungsleistung nicht außer Betracht gelassen werden. Teilweise sind bauliche Anpassung zur Verringerung des Effektes denkbar.

Da die Schuhe beim Auftreten auf die rotierenden Bürsten unterschiedlich seitlich abrutschen können, wurden seitliche Stopschienen angebracht, die zu einer wesentlichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und einer geringeren Streuung der Messergebnisse führten.

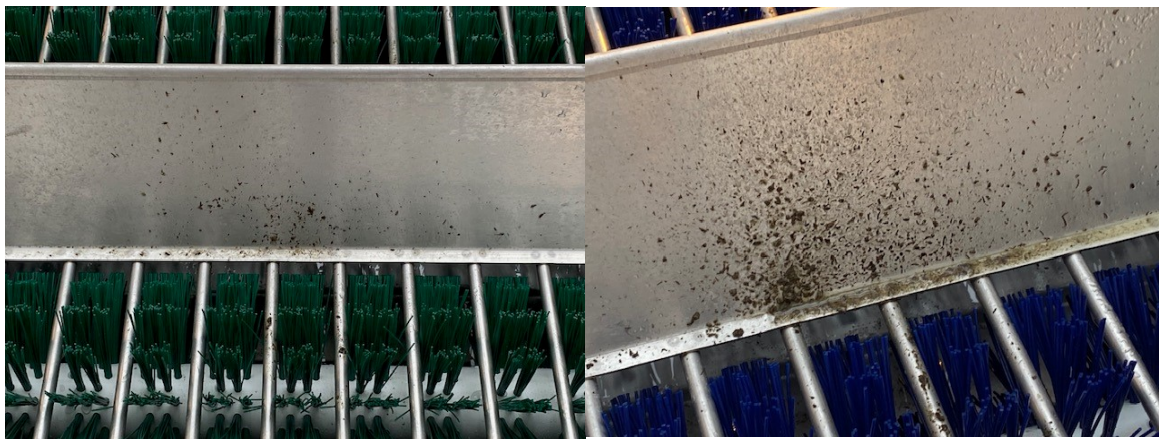


Abb. 15: Verteilung der Verschmutzung durch die rotierenden Bürsten in der näheren Umgebung der Hygieneschleuse

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Arbeitsgruppe der Humboldt Universität Berlin untersuchte in den letzten Jahren Hygienemaßnahmen im Zusammenhang mit dem Quarantänerreger *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV). Dabei konnte gezeigt werden, dass ToBRFV kontaminierte Schuhsohlen durch intensives Abtreten auf Desinfektionsmatten mechanisch abgereinigt werden und innerhalb der mit Desinfektionsmittel gefüllten Matten eine Virusinaktivierung erfolgt (Ehlers et. al. 2022). Im Unterschied zu den Arbeiten in Geisenheim wurden jedoch keine stark profilierten Schuhsohlen verwendet, sondern Keimträger aus leicht profilierten Gummimatten, die auf Schuhsohlen (in Plastiküberzieher) aufgeklebt waren.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Dekontamination von mit ToBRFV kontaminierten Rädern von Pflanzenwägen mit Hilfe von ProfilGate Matten und Menno Florades (Brandte 2024). Hierbei ergab sich eine starke Variation der Viruslast sowohl vor als auch nach der Behandlung. Im Allgemeinen schwanke die Reduktion an nekrotischen Läsionen an den Nachweispflanzen durch die Behandlung zwischen 80.9 to 98.9%.

In beiden Untersuchungen wurde lediglich mit Pflanzensäften gearbeitet und nicht mit einer („erdigen“) Verschmutzung. Es ist bekannt, dass die Wirksamkeit vieler Desinfektionsmittel durch die Anwesenheit von Verschmutzung stark nachlässt.

Ehlers, J., Nourinejhad Zarghani, S., Kroschewski, B., Büttner, C., & Bandte, M. (2022). Decontamination of Tomato Brown Rugose Fruit Virus-Contaminated Shoe Soles under Practical Conditions. *Horticulturae*, <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121210>.

Bandte, M.; Ehlers, J.; Nourinejhad Zarghani, S.; Büttner, C. (2024). A Combined Cleaning and Disinfection Measure to Decontaminate Tire Treads from Tomato Brown Rugose Fruit Virus. *Hygiene*, 4, 269–281. <https://doi.org/10.3390/hygiene4030022>

6. Voraussichtlicher Nutzen

Die Verwertungsstrategie für das Projekt zielte darauf ab, die im Rahmen der Versuche gewonnenen Erkenntnisse zur Testmethodik in eine standardisierte Vorgehensweise zu überführen. Durch die Erstellung einer Standard Operation Procedure (SOP) wird es möglich, die Validierung von Hygieneschleusen einheitlich und effizient zu gestalten. Diese erstellte SOP fungiert damit als wertvolle Entscheidungshilfe für Anwender und Anbieter, indem sie klare Richtlinien für die sachgerechte Validierung bietet und somit das Vertrauen in diese Technologien stärkt.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt liegt in der Bereitstellung von konkreten Handlungsempfehlungen, die direkt in die Arbeitsabläufe der Anwender integriert werden können. Die enge Kooperation mit Herstellern von Hygieneschleusen sowie Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sorgt dafür, dass die erarbeiteten Ergebnisse einen hohen Praxisbezug aufweisen und erfolgreich in die Praxis implementiert werden können. Darüber hinaus sollen die Erkenntnisse und Ergebnisse Beratern aus den Pflanzenschutzdiensten zur Verfügung gestellt werden. Zudem fließen die Ergebnisse der Untersuchungen in die Lehre an der Hochschule Geisenheim ein, wodurch Studierende praxisnahe Kenntnisse erwerben und ein Bewusstsein für Hygienemaßnahmen in der Lebensmittelproduktion entwickeln.

Die gewonnenen Erkenntnisse sind nicht nur auf den Gemüsebau beschränkt, sondern lassen sich auch auf andere Bereiche wie den Kartoffelbau, den Zierpflanzenbau und die Produktion von Jungpflanzen übertragen. Dies erweitert den Anwendungsbereich der SOP erheblich und steigert deren Relevanz.

Insgesamt trägt das Projekt wesentlich zur Minimierung des Übertragungsrisikos relevanter Mikroorganismen in der Produktion und Verarbeitung von Gemüse bei, was sowohl der Lebensmittelsicherheit als auch dem Verbraucherschutz zugutekommt. Die Verwertungsstrategie fokussiert sich auf die Standardisierung und praxisnahe Implementierung der SOP zur Erhöhung der Wirksamkeit von Hygieneanlagen im Praxiseinsatz.

Geplante Veröffentlichungen:

Fachzeitschriften: Gemüse, Deutscher Gartenbau und/oder GartenbauProfi

Sowie eine wissenschaftliche Veröffentlichung

7. Anhang/Anlage

SOP: Standardmethode zur Testung der Hygienewirkung (Bakterien, Pilze) von Reinigungs- und Desinfektionsanlagen für Schuhsohlen

Angefertigte Qualifikationsarbeiten:

MSc-Thesis Yvonne Hildebrandt „Bewertung der Reinigungsleistung einer Hygieneschleuse unter Verwendung einer Standardverschmutzung“, Geisenheim
15.09.2023

Fachbeiträge auf Fachkonferenzen:

„Validierung und Optimierung von Hygieneschleusen zur Sohlenreinigung im Gartenbau“
Vortrag auf der 55. Gartenbauwissenschaftliche Jahrestagung DGG und BHGL, 01.-
04.03.2023, Osnabrück

Präsentation des Projektes im Rahmen der Führung des Bund- Länderarbeitskreises
Diagnose der Pflanzenschutzdienste

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	1 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

Standardmethode zur Testung der Hygienewirkung (Bakterien, Pilze) von Reinigungs- und Desinfektionsanlagen für Schuhsohlen

SOP: Testung Hygieneschleusen

Inhalt

1. Einführung	2
2. Technische Daten der Testanlage und Prozessbeschreibung	2
3. Standardverschmutzung	2
4. Testkeime und Kontamination	4
4.1 Bakterien	4
4.2 Pilze	4
4.3 Kontamination von Testschuhen mit profilierten Sohlen	5
4.4 Kontamination von profillosen Testschuhen	5
5. Behandlung	6
6. Probenahmen und Nachweisverfahren	7
6.1 Optische Bewertungen der Restverschmutzung	7
6.2 ATP-Nachweise mit den ATP-Pens	9
6.3 Mikrobiologischer Nachweis	10
7. Statistik	10
8. Dokumentation	11

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	2 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

1. Einführung

In Betrieben der Gemüseproduktion und der Gemüseverarbeitung (Lebensmittelindustrie) besteht eine erhebliche Gefahr, dass mit Arbeitskleidung und Arbeitsschuhen Erreger von Pflanzenkrankheiten übertragen werden. Eine gründliche Reinigung und Desinfektion ist deshalb ein wichtiger Baustein im Hygienemanagement. Neben einfachen Desinfektionsmatten finden zunehmend automatisierte Anlagen in Form von Hygieneschleusen zur maschinellen Durchführung der Sohlenreinigung Eingang in die Praxis. Die vorliegende SOP beschreibt Verfahren zur Prüfung der Wirksamkeit des Reinigungs- und Desinfektionsprozesses gegen verschiedene Krankheitserreger (Pilze, Bakterien).

Grundsätzlich sollen sich die Tests an der Richtlinie PP 1/261 (1) disinfection in plant production (2008, OEPP/EPPO Bulletin, **38**, 311–315) orientieren. Sämtliche Daten werden in einem Trial Notebook (TN) dokumentiert.

2. Technische Daten der Testanlage und Prozessbeschreibung

Folgende Daten der Testanlage sind zu erfassen:

- Bezeichnung der Anlage (z.B. Produktname, Typ, Hersteller etc.)
- Abmessungen
- Schematische Darstellung des Prozessablaufs als Grafik, ggf. Foto
- Insbesondere sind zu erfassen: Trittpositionen, Verweildauer, Wasch- und Desinfektionsmittel (Anzahl, Druck, Wasserkreisläufe, etc.), Art der Dosierung von Reinigungs- und Desinfektionsmittel (Messung, Steuerung etc.). Die Einwirkzeit des Desinfektionsmittels (Zeitraum zwischen Behandlungsende und Inaktivierung zum Nachweis des Testkeims)
- Soll- und Ist-Daten der verwendeten Lösungen, des Ausgangswassers und des Abwassers (pH, EC, °dH, Temperatur), Konzentrationen der verwendeten Reinigungs- und Desinfektionsmittel.
- Wasserverbrauch (Vorreinigung, Reinigung, Desinfektion)

Inbetriebnahme der Schleuse und Vorbereitung der Lösungen

Die Anlage sollte vor dem Durchgang mit verschmutzten Testschuhen bereits einige Zeit in Betrieb sein, d.h. eine entsprechende Menge an Mittel die Maschine durchlaufen haben. Sie sollte 3-5-mal vorher benutzt werden, dabei am Ausfluss die Konzentration der Reinigungs- bzw. Desinfektionsmittel kontrollieren.

3. Standardverschmutzung

Als Keimträger dient eine standardisierte Verschmutzung (= Standardverschmutzung StV) welche auf die Schuhsohlen aufgetragen und mit dem jeweiligen Testkeim kontaminiert wird.

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	3 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

Basis-Rezeptur:

1.	Weißtorf (1 mm) aufgekalkt (5,8 g/l CaCO ₃)	15 g
2.	Palmfett (Pulver)	10 g
3.	Erbsenprotein	5 g
4.	Bentonit	10 g
5.	Quarzsand (1 mm)	35 g
6.	getrocknete Tomatenblätter	2 g

Zur Herstellung der Standardverschmutzung (StV) werden die Zutaten 1-6 mittels Pulvertrichter in eine 500 ml-Laborflasche mit Silikondichtung im Deckel eingewogen, gut durchmischt und bei 121°C für 20 min autoklaviert. (2 Laborlöffel, die durch die Öffnung passen mit autoklavieren). Nach dem Abkühlen (< 30°C) kann die StV mit Keimen versetzt werden. Die Mischung der Basis-Rezeptur kann bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung und Benutzung einige Wochen gelagert werden.

Kontrolle = Ansatz ohne Keim

Der Mischung der Basis-Rezeptur 67 ml Ringerlösung (c = 1/8) zugeben.

Dieser Ansatz ist ausreichend für 10 Paar Schuhe und 2 Paar in Reserve.

Standardverschmutzung (StV) mit einem Keim/Erreger

Ansatz mit Bakterien

65 ml Ringerlösung (c = 1/8) und 2 ml Bakteriensuspension (OD₅₉₀ = 60 %) vermischen und mit sterilem Löffel langsam unter die Masse der Basisrezeptur (77 g) StV mischen bis eine homogene Paste entsteht.

Ansatz mit Pilzen

Siehe Testkeime und Kontamination 4.2 Pilze.

Standardverschmutzung (StV) mit zwei Keimen herstellen

Es ist möglich mit zwei Erreger gleichzeitig der StV beizumischen. In diesem Fall ist vorher zu testen, ob eine Auftrennung mittels Selektivmedium möglich ist. Gemischt werden können z.B. B265 *Escherichia coli* (EndoAgar) und B259 *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (RGHAgar) oder B289 *Salmonella subterranea* (EndoAgar) und F045 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (KOMDA-Medium). In diesem Fall werden 63 ml Ringerlösung (c=1/8) mit jeweils 2 ml der entsprechenden Keimsuspension vermischt (Bakteriensuspensionen OD₅₉₀ = 60 % $\hat{=}$ ca. 10⁸ KBE/ml; Pilzsporensuspension ca. 10⁸ KBE/ml). Die weitere Verarbeitung erfolgt wie oben angegeben.

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	4 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

Nach dem Mischen werden je Schuh 4,5 g der Inokulationspaste in eine neue 5 cm-Petrischale abgewogen. Vor Verwendung bzw. Lagerung wird der Inokulationspaste der Wassergehalt (%) mittels Feuchtemessgerät (z.B. MBT 62L von VWR) ermittelt und eine Probe (0,5 g in 10 ml Ringerlösung) zur Vitalitätsprüfung mittels KBE-Bestimmung entnommen. Bei Lagerung der kontaminierten StV werden Messung und KBE-Bestimmung tagesfrisch wiederholt.

Haltbarkeit bei Lagerung

Wurde die Mischung mit Bakterien oder Pilzen angesetzt, kann die Mischung im Kühlschrank bei 5°C über eine Nacht gelagert werden und so an zwei aufeinanderfolgenden Tagen verwendet werden. Am zweiten Tag wird erneut die Keimzahl (KBE/g) ermittelt und die StV weiterverwendet. Dieser Vorgang muss für jeden Erreger vorher getestet werden, um sicherzustellen, dass die Keimkonzentration (KBE/g) nach Lagerung ausreicht.

4. Testkeime und Kontamination

4.1 Bakterien

Im Regelfall wird ein Rifamycin resistenter Stamm von **B259 *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*** (B259) als Standardkeim verwendet. Die Anzucht erfolgt in diesem Fall auf YDC-Agar (yeast dextrose calcium carbonate) bei **27 °C**.

Mit einem sterilem Wattestäbchen wird mit einer rollenden Bewegung Bakterien Schleim einer **48 h** alten Kultur aufgenommen und in steriler Ringerlösung $c=1/8$ suspendiert. In einem BIOLOG-Turbidimeter wird bei $\lambda=590$ nm, die optische Dichte (OD_{590}) auf 60% Transmission eingestellt. Dies entspricht normalerweise mindestens einer Keimzahl von 10^8 KBE/ml.

Bei ***Escherichia coli*** (B265) und ***Salmonella subterranea*** (B289) wird zur Anzucht TSA-Medium verwendet. Darauf werden die Bakterien im Quadranten-Ausstrich ausgestrichen und bei **27°C** für **24 h** inkubiert. Die Herstellung der entsprechenden Suspensionen und Einstellung der OD erfolgt wie oben beschrieben.

Falls andere bakterielle Testkeime verwendet werden sollen, ist zu prüfen, ob Antibiotika-resistente Stämme zur Verfügung stehen oder hergestellt werden können. Diese sind dann bevorzugt zu verwenden. Andernfalls sind möglichst selektive Nachweismedien zu verwenden. Die Anzucht- und Lagerbedingungen für den jeweiligen Testkeim sind entsprechend anzupassen.

4.2 Pilze

Im Regelfall wird ein auf Vitalität geprüfter Stamm von ***Fusarium oxysporum* f.sp. *cyclaminis*** (F045) als Standardkeim verwendet. Die Anzucht erfolgt auf Aussaatplatten mit PDA dil (diluted potato dextrose agar) bei **24 °C**. Nach ausreichender Produktion von Mikro-

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	5 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

und Makrokonidien meist nach **2- 3 Wochen**, wird mittels Abschwemmen von 3-4 PDA-dil Platten mit 10 ml Ringerlösung, sowie anschließendem Filtrieren durch zwei Edelstahlsiebe (MW 0,5 mm) eine Konidiensuspension hergestellt.

Diese Suspension wird 30 Minuten bei 8000 U/min. zentrifugiert, der Überstand wird bis auf 5 ml entsorgt, das Pellet darin suspendiert, diese Suspension um den Faktor 100 verdünnt und in der Thomakammer die Anzahl Konidien je ml ermittelt.

Angestrebt wird eine Konidiendichte von ca. 10^8 Konidien/ml.

Alternativ können andere Schadpilze (z.B. *Fusarium solani*, *Colletotrichum coccodes*) verwendet werden. Die Herstellung des Inokulums und Art der Inokulation sind dann entsprechend anzupassen.

4.3 Kontamination von Testschuhen mit profilierten Sohlen

Die Schuhe werden vor dem Kontaminieren gewaschen (wenn möglich in der Spülmaschine), desinfiziert (Ethanol) und getrocknet.

Die Standardverschmutzung (StV) muss vor dem Auftragen erneut durchgemischt werden, da sich die Flüssigkeit absetzt.

Vor der Kontamination wird der betreffende Schuh auf die Haltevorrichtung mit der Sohle nach oben aufgesteckt (Rechtshänder beginnen mit dem linken Schuh). Anschließend werden 4,5 g StV mittels Wägespatels nach dem in Abb. 1 dargestellten Schema in die Profilrillen gefüllt. Eine darüberhinausgehende Verschmutzung ist möglichst zu vermeiden.



Abb. 1: Kontamination ausgewählter Profilrillen der profilierten Testschuhe mit 4,5 g Standardverschmutzung

4.4 Kontamination von profillosen Testschuhen

Die Schuhe werden vor dem Kontaminieren gewaschen, desinfiziert und getrocknet.

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	6 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

Rechten und linken Schuhe einspannen in die Halterung, auf beide Testschuhe StV-Schablone aufsetzen und auf korrekten Sitz kontrollieren.

4,5 g Standardverschmutzung (StV) mischen vor dem Auftragen, da sich die Flüssigkeit absetzt. Bei Rechtshänder mit dem linken Schuh beginnen.

Masse mittels 1-2 Wägespatel anfangs dünn auftragen, bis die 3 Streifen komplett gefüllt sind. Am Schluss die Schablone nach oben wegziehen.



Abb. 2: Kontamination ausgewählter Flächen auf glatten Sohlen. Links: Einspannen der Testschuhe auf der Halterung, Mitte: Aufsetzen der Schablone, Rechts: In drei Streifen aufgetragene Standardverschmutzung auf den glatten Sohlen

5. Behandlung

Nach dem die Schuhe kontaminiert wurden, werden sie ggf. einzeln für ein Vorher-Bild in einer Fotobox (ausgeliehen von der Bodenkunde, Beleuchtung 100 %) fotografiert.

Danach werden die Testschuhe **sofort** angezogen und der zu untersuchende Schleusenaufbau nach vorher festgelegtem Schrittplan passiert. Dabei sind folgende Aspekte zu beachten:

Beim Anziehen der Schuhe sitzt der Experimentator möglichst auf einem Hocker mit Rollen, mit dem Rücken zum Eintritt auf die Hygienematte und schiebt sich mit den Fersen der Schuhe (so dass die kontaminierten Stellen nicht den Boden berühren) nach hinten zum Eintritt.

Das Betreten bzw. Durchlaufen der Hygienematten und der Schleuse erfolgt immer nach dem gleichen Schrittmuster (Abb. 3).

Beim Überlaufen der Reinigungsmatten wird auf ein möglichst natürliches Laufverhalten mit einem normalen Abrollverhalten der Schuhe/Füße geachtet.

Das Schrittmuster in der Schleuse ist durch Aufkleber markiert, die nachfolgende Hygienematten werden mit dem gleichen Schrittmuster wie die vordere passiert (Abb. 3)

Bei diesem Versuch wird der Bereich der rotierenden Bürsten sofort betreten.

Bei den Varianten wo nur die Hygieneschleuse benutzt wurde, begann die Schrittreihenfolge mit rechts und es wurden zwei Schritte gemacht (Der Schritt auf die Bürsten drauf und ein

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	7 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

weiterer um durch das Drehkreuz zu kommen. Verweildauer in der Hygieneschleuse ca. 8 Sekunden).



Abb. 3: Festgelegter Schrittplan auf den Hygienematten (links) und der Hygieneschleuse (rechts)

Austritt:

Am Ende der Hygienematte (Ausgang/Austritt) wird ein ¼ Autoklaviersack auf dem Gewächshausboden oder die Trittstufe ausgelegt, auf dem die Testschuhe ausgezogen werden, (um die frisch desinfizierten Schuhe nicht neu zu kontaminieren). Dieser Autoklaviersack wird nach jedem Durchgang erneuert.

6. Probenahmen und Nachweisverfahren

Es stehen verschiedene Nachweis/Beurteilungsverfahren der Reinigungs- und Desinfektionsleistung zur Auswahl:

- Optische Auswertung mit Image J
- Optische Klassifizierung mit Boniturnoten
- ATP-Messung (nur möglich, wenn kein sichtbarer Schmutz anhaftet)
- Mikrobiologischer Nachweis durch KBE-Bestimmung

6.1 Optische Bewertungen der Restverschmutzung

Den frisch behandelten Schuh oder Stiefel in die Halterung in der Fotobox einspannen, nach vorne ziehen, so dass der Schuh optimal ausgeleuchtet ist (Abb. 4) und mit dem Mobiltelefon fotografieren. Darauf achten, dass der Abstand zur Kamera stets gleich groß ist und diese im rechten Winkel zur Sohle gehalten wird.

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	8 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

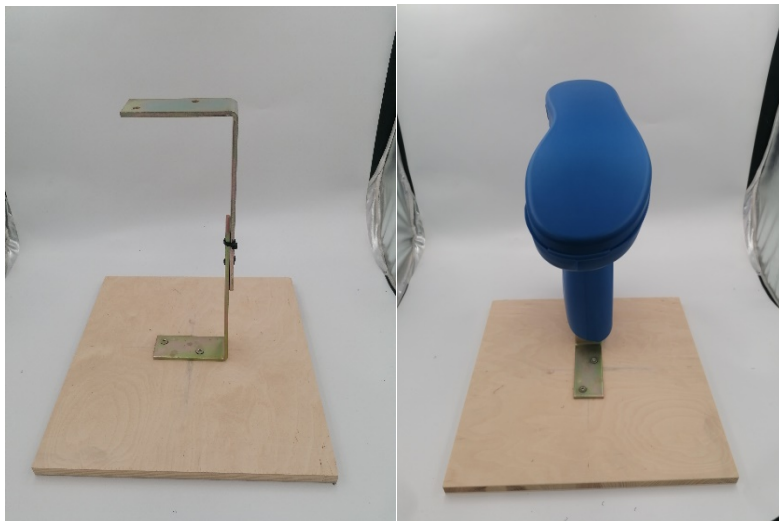


Abb. 4: Schuhhalterung in der Fotobox (links) mit eingespanntem Testschuh mit glatter Sohle (rechts)

Die Fotos werden mittels Image J bearbeitet. Dabei wird der Anteil der Restverschmutzung (Fläche) bestimmt und im Vergleich mit der Ausgangverschmutzung die Schmutzreduzierung in Prozent ermittelt (siehe Anlage: Anleitung zur Bildbearbeitung mit Image J).

Da teilweise (vor allem bei glatten Sohlen) optische Störeffekte bei der Auswertung mittels Software auftreten können, kann zusätzlich oder alternativ eine visuelle Bewertung der Sohlen (-bilder) mittels Bonitur vorgenommen werden (vgl. Abb. 3).

Profilsohlen					
glatte Sohlen					
Boniturnote	1	2	3	4	5
Beschreibung	ohne	sehr gering	gering	mäßig	stark

Abb. 5: Beschreibung der Boniturnoten für die visuelle Schätzung der Restverschmutzung

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	9 von 11
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

6.2 ATP-Nachweise mit den ATP-Pens

ATP-Messungen bieten einen schnellen und objektiven Ansatz zur Beurteilung der Reinigungseffizienz. Sie können größere Mengen organischer Kontaminationen auf augenscheinlich saubereren Flächen nachweisen.

Rechter und linker Teststiefel einspannen in die Halterung, ATP-Schablone aufsetzen.

Das Wattestäbchen aus dem ATP-Pen entnehmen, in sauberes frisches VE-Wasser eintauchen.

Die freigelassene Probenfläche der ATP-Schablone mit dem Wattestäbchen mit drehender Bewegung, im vorgegebenen Zickzack-Muster 2-mal abreiben, vor und zurück.

Das Wattestäbchen wieder in das Röhrchen des ATP-Pens stecken, nach unten durchdrücken und 10 Sekunden mit der Hand mischen.

Den **Lumitester** (Kikkoman) vorher starten und mit dem Mobiltelefon per App verbinden mittels Bluetooth.



Abb. 6: ATP-Lumitester von Kikkoman mit Teststäbchen (ATP-Pen) zum Beprobieren der Schuhsohlen

Den Deckel des Lumitester öffnen und das ATP-Pen in den Schacht stellen Deckel schließen. Messung in der App starten, 10 Sekunden warten und den Wert notieren, wird auch in der App gespeichert.

Nach dem ATP-Nachweis werden die ATP-Schablonen abgenommen, gereinigt und mit EtOH desinfiziert.

Zur passenden Auswahl der RLU-Levels (Relative Light Units-Levels), anhand derer eine Einstufung nach „Bestanden“, „Achtung“ und „Nicht bestanden“ vorgenommen werden kann, wird berechnet, in welchem Bereich 80 % der Ergebnisse nach der richtigen/gewünschten Reinigung liegen, diese haben „Bestanden“.

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	10 von
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

6.3 Mikrobiologischer Nachweis

Die zu beprobende Fläche der Schuhsole wird mit einem sterilen, trocknen Wattestäbchen, mit einer drehenden Bewegung in den vorher kontaminierten Bereichen abgerieben.

Danach in ein steriles Zentrifugen-Röhrchen mit 5 ml Extraktionspufferlösung (z.B. *Xanthomonas*-Puffer mit 0,05 % Tween 20) überführt, der überstehende Teil abgebrochen, das Röhrchen verschlossen.

Nach einer 30-minütigen Schüttelphase (Überkopfschüttler mit 60 U/Minuten) erfolgt eine 5-minütige Behandlung im Ultraschallbad (z.B. P 160/320 W, 35 kHz). Anschließend wird die Extraktionssuspension durch ein Stahlsieb mit 0,5 mm Maschenweite gefiltert.

Aliquote der Extraktionssuspension werden mittels Spiralplater auf die jeweiligen Selektivmedien plattiert (50 µl je Platte, 3 Platten je Probe).

ACHTUNG: Beim Spiralisieren unbedingt auf die korrekte Arbeitsweise des Spiralplatter achten. Sollte dieser inkorrekt arbeiten bzw. ist das Arbeitsbild auf den Platten nicht sauber sein, muss das Spiralisieren sofort abgebrochen werden, da sonst die Kolonien nachher nicht mehr richtig ausgezählt werden können.

Bakteriennachweis

Folgende Bakterienstämme aus der Sammlung-HGU wurden bisher mit den entsprechenden Selektivmedien verwendet:

B259 *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargoni* RGHA-Medium 72h/27°C

B265 *Escherichia coli* Endo Agar Firma Merck, 24-48h/27°C

B289 *Salmonella subterranea*, Endo Agar Firma Merck, 24-48h/27°C

Nach ca. zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 27 °C werden die typischen Kolonien gezählt bzw. ersatzweise das Wachstum qualitativ (+/-) bewertet.

Pilznachweis

Es wurden folgende Selektivmedien und Inkubationsparameter verwendet:

F045 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* KOMDA-Medium 96-120h/24°C

Die Agarplatten werden nach einer vier- bis fünftägigen Inkubation (24 °C) auf *Fusarium*bewuchs geprüft. Dies erfolgt durch Auszählen typischer Kolonien oder qualitativ (+/-).

7. Statistik

Die mittels Image J gewonnenen Prozentwerte der jeweiligen Schmutzreduzierung (Differenz der verschmutzten Fläche vor und nach der Behandlung) werden vor der weiteren Verrechnung transformiert ($x' = \arcsin(\sqrt{x})$). Die Keimzahlen (KBE/Sohle) werden logarithmisch

Hochschule Geisenheim Institut für Phytomedizin Von-Lade-Str. 1 65366 Geisenheim	Titel	SOP Testung Hygieneschleuse		Seite	11 von
	ID-Nr.	03-05-10			
	Autoren	Y. Rondot, H. Fehres, W. Wohanka			
	Druckdatum	31.10.20244	autorisiert	Dr. Yvonne Rondot	

transformiert ($x'=x+1$). Die Unterschiede zwischen den Zählungen vor und nach der Behandlung entsprechen den log-Reduktionen.

Sowohl die transformierten Schmutzreduktionen als auch die log-Reduktionen der Keimzahlen werden nach Prüfung von Normalverteilung und Varianzhomogenität diese statistisch mittels ANOVA und Tukey-HSD-Test ($p<0,05$) ausgewertet. Bei fehlenden Voraussetzungen für eine ANOVA können parameterfreie Verfahren (z.B. Kruskal-Wallis H-Test) angewandt werden. Parameterfreie Verfahren können auch für die statistische Auswertung der Boniturwerte der Restverschmutzung verwendet werden.

Für eine ausreichende Schmutzreduktion werden Werte von $> 90\%$ bzw. Mediane von <3 für Boniturwerte angenommen. Für eine ausreichende Keimreduzierung werden log-Reduktionen von mind. $>3,0$ angenommen.

8. Dokumentation

Sämtliche Daten werden in einem Trial Notebook (vgl. SOP LAB-00-01-01TrialNotebookGartenbau) erfasst.

Dies ist Basis für den zu erstellenden Testbericht und kann auf Nachfrage dem jeweiligen Auftraggeber zur Verfügung gestellt werden.