

Abschlussbericht

zum Projekt:

Reduzierung von pathogenen Keimen auf Schweine- schlachtkörpern durch strukturierte Laserapplikation

Projektlaufzeit: 1.7.2023-29.2.2024

Projektleitung: PD Dr. Merve Wollweber

Wiss. Mitarbeit: Minh Tanh Truc Nguyen

Laser Zentrum Hannover e.V.
Abteilung Industrielle und Biomedizinische Optik, Gruppe Food & Farming
Hollerithallee 8
30419 Hannover

Kontakt: m.wollweber@lzh.de

Kurzzusammenfassung

Nachhaltigkeit und Klimaneutralität sind Themen mit denen sich mittlerweile Betriebe in vielen Bereichen der Wirtschaft konkret auseinandersetzen. In der Schweinefleischproduktion werden im Schlachtbetrieb Flammöfen zur Entborstung und Entkeimung von Schlachtkörpern eingesetzt. Da die Flammöfen mit Gas betrieben werden, wird dabei CO₂ freigesetzt. Das Projekt *Reduzierung von pathogenen Keimen auf Schweineschlachtkörpern durch strukturierte Laserapplikation* ging der Frage nach, ob eine Entkeimung per Laserbehandlung eine Möglichkeit zur Reduktion des CO₂-Ausstoßes in diesem Bereich ist.

Für eine Entkeimung per Licht wird in der Regel UV-Strahlung eingesetzt. Im Projekt kam ein UVA-Laser zum Einsatz, der bereits für die Entkeimung von Geflügelfilets untersucht wurde und dort eine Log-Reduktion von 2 für *Campylobacter jejunii* erzielen konnte. In Absprache mit einem die Arbeiten beratend unterstützenden Schlachthof wurden die Bakterienstämme *Salmonella*, *Citrobacter rodentium* und *Eschericia coli* K12 für die Bestrahlungsversuche im von der QS-Stiftung geförderten Projekt ausgewählt. Bestrahlungsversuche wurden in Lösung und auf Schweineschwarte durchgeführt. Ziel war es, dabei zu einer ersten Einschätzung zu gelangen, ob eine für die hygienischen Anforderungen hinreichende Entkeimung möglich ist und erste wirtschaftliche Einschätzungen durchzuführen.

Die Versuche zeigten, dass mit der UVA-Laserbehandlung eine Keimreduktion möglich ist, wobei die Höhe der Keimreduktion von Prozessparametern (z.B. Scangeschwindigkeit, Probenbeschaffenheit) und dem Bakterienstamm abhängt. Die Hygieneanforderungen für das Inverkehrbringen von Fleischprodukten ist vom Bakterienstamm und dem geschlachteten Tier abhängig. Für *E.coli* und *Citrobacter rodentium* konnte unter Laborbedingungen die Keimbelastung unter den Grenzwert reduziert werden. Allerdings müssen zukünftige Versuche im Realumfeld zeigen, ob die Versuchsbedingungen hinsichtlich der Ausgangsbelastung und auch Oberflächenbeschaffenheit der Schwarte repräsentativ waren. Für *Salmonella* muss im Betrieb das Nichtvorkommen nachgewiesen werden, eine vollständige Abtötung von *Salmonella* war im Versuch jedoch nicht möglich.

Während die Dekontaminationsmethode durch UVA-Bestrahlung also nachweislich zu einer signifikanten Reduktion führte, steht dem Einsatz in Schlachtbetrieben allerdings insbesondere ein zu geringer erwartbarer Durchsatz entgegen. In diesem Forschungsvorhaben konnte gezeigt werden, dass 0,8 cm²/s per UVA-Laser dekontaminiert werden können. Eine Möglichkeit zur Verminderung der Behandlungszeit wäre gegeben, wenn die bakterielle Belastung auf dem Schlachtkörper individuell darstellbar und nachweisbar ist, um die UVA-Behandlung nur an diesen Stellen durchzuführen. Allerdings ist ein in-line Verfahren zur Detektion von bakterieller Kontamination auf individuellen Schlachtkörpern derzeit nicht in Aussicht

1 Motivation mit Projektziel

Ziel dieses Vorhabens ist es, die Nutzung einer strukturierten Laserapplikation im UV-A Wellenlängenbereich zur Reduzierung von typischen pathogenen Keimen auf Schweineschlachtkörpern zu evaluieren. Motivation ist der Wunsch und Bedarf an innovativen Lösungen zur Reduktion des CO₂-Ausstosses (durch Flammöfen) in Schlachtbetrieben.

In Deutschland liegt der Fleischverzehr nahezu konstant bei ca. 60 kg pro Person und Jahr, wovon Schweinefleisch etwa 31 kg ausmacht (BMEL Statistik 2021). Es gehört zudem zu den weltweit meistproduzierten Fleischarten neben Geflügelfleisch. Beim Umgang mit oder Verzehr von Schweinefleisch kann es zur Übertragung von bakteriellen Erkrankungen auf den Menschen kommen. Zur Vermeidung dieser Zoonosen werden in Schlachthöfen und verarbeitenden Betrieben entsprechende Hygienemaßnahmen umgesetzt. Dennoch war z.B. im Jahr 2018 die von *Yersinia (Y.) enterocolitica* verursachte Yersiniose mit 6699 gemeldeten Krankheitsfällen die vierthäufigste gemeldete Zoonose innerhalb der EU (EFSA 2019). Die Hauptinfektionsquelle hierfür war nicht durchgegartes bzw. kontaminiertes Schweinefleisch.

Zurzeit wird in der EU zur Dekontamination von Erzeugnissen tierischen Ursprungs vorzugsweise Trinkwasser verwendet. Beim Schlachtprozess von Schweinen dürfen auch Flammöfen zur Entkeimung genutzt werden. Die meisten Schlachthöfe verwenden dafür zwei Flammöfen. Der erste Flammofen dient zur Entfernung von Borsten, die beim Entborstungsprozess stehen geblieben sind, der zweite zur Desinfektion. Die Flammöfen werden mit Erdgas betrieben, sodass eine nachhaltige Alternative zur Desinfektion sinnvoll wäre. Die Einsparung des zweiten Flammofens hätte nach Auskunft eines mittelgroßen Schlacht- und Zerlegebetriebs, die mit einem Flammofen zur Desinfektion arbeiten, eine potentielle CO₂-Emissionsreduktion von 183 Tonnen jährlich zur Folge. Außerdem könnte zusätzlich die Abhängigkeit zu Erdgaslieferanten minimiert und so die Resilienz der Produktionskette erhöht werden. Am Laser Zentrum Hannover e.V. wird der Einsatz von Lasertechnik zur Keimreduktion auf Lebensmitteln erfolgreich erforscht. Wird ein Laser zur Desinfektion der Schlachtkörper eingesetzt, ist die Behandlung CO₂-neutral, wenn der Laser mit „grünem“ Strom betrieben wird.

Die schädigende Wirkung von elektromagnetischer Strahlung auf Bakterien ist bekannt und beruht auf unterschiedlichen Wirkprinzipien. Sie ist maßgeblich abhängig von der applizierten Wellenlänge, der Belichtungsintensität und –dauer. Für die Keimreduktion werden meist Wellenlängen im UV-Spektrum (200 bis 400 nm) genutzt und auch schon in den Bereichen der Desinfektion von Trink- und Abwasser sowie von Luftströmen in Form von UV-Leuchten angewendet. Ein großer Vorteil einer oberflächlichen Entkeimung durch Laserbehandlung ist, dass sie trocken, berührungslos und rückstandsfrei ist und deshalb ohne den Einsatz von Wasser und Chemikalien auskommt. Es entstehen keine biologischen oder kontaminierten Abfälle, die zusätzlich entsorgt werden müssen. Die Wahrscheinlichkeit einer verlässlichen Wirksamkeit der Entkeimung durch den Laser ist zudem größer als bei einem Flammofen, da der Laser bei der Bestrahlung auch punktuell eingesetzt werden kann, wenn einzelne Stellen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit der Kontamination bekannt sind. Gerade beim Flammofen kommt es häufiger dazu, dass die Zündung des Erdgases nicht verlässlich erfolgt, sodass trotz Verbrauch keine desinfizierende Wirkung erzielt werden kann.

2 Methodik

Versuchsablauf

Zu Beginn sollte das Potential der Laserquelle für das Abtöten der ausgewählten pathogenen Keime oder relevanter apathogener Surrogate ermittelt werden. Um den Parameterraum

(speziell Laserleistung und Bestrahlungsdauer) einzugrenzen, wurden die ersten Bestrahlungsversuche in Flüssigkeit ausgeführt. Das heißt, dass hierfür eine bekannte Zahl der ausgewählten Pathogenen in *Maximum Wiederbelebungslösung* (MRD) aufgelöst und bestrahlt werden. Dadurch sollte der Parameterraum für eine zuverlässige Entkeimung eingegrenzt werden. Aus Versuchen aus einem vorherigen Projekt (ODLAB – Minimierung mikrobieller Verunreinigung von Geflügelfleisch vor und nach der Zerlegung mittels strukturierter Oberflächen-dekontamination durch Laserapplikation und Bakteriophagen) ist bereits ein grober Parameterraum für eine effektive Bestrahlung von mehreren Pathogenen bekannt. Darauf aufbauend sollte mit Behandlungsversuchen an Schweineschwarte ein weiterer Schritt zur Annäherung an realistische Bedingungen für den Einsatz im Schlachthof gegangen werden, um weitere Informationen zur prinzipiellen Machbarkeit zu generieren.

In Absprache mit dem die Arbeiten beratend unterstützenden Schlachthof wurden die folgenden Bakterienstämme für die Bestrahlungsversuche ausgewählt:

- *Salmonella*
- *Citrobacter rodentium*
- *Escherichia coli* K12

Bestrahlungsversuche in Flüssigkeit (Maximal-Wiederbelebungs-Lösung – MRD)

Für die Bestrahlungsversuche wurden die Bakterien, die auf einer Agarplatte kultiviert worden sind, in MRD-Lösung aufgelöst. Die MRD-Lösung wurde ausgewählt, da sie eine maximale Rückgewinnung der Bakterien ermöglicht, dadurch dass sie Pepton enthält, welches die Vermehrung von Organismen in der Probe für eine bestimmte Zeit limitiert und somit eine genaue quantitative Ermittlung der Anzahl der lebenden Bakterien ermöglicht. Um die Reproduzierbarkeit der Bestrahlungsversuche in Hinsicht der Bakterienanzahl in der Lösung zu gewährleisten, wird eine optische Dichte von 0,5 für die Bakterienlösungen angestrebt. Die optische Dichte wird mit einem Photometer gemessen und gibt die Extinktion einer Lösung an. Der Wert der optischen Dichte bzw. der Trübheit der Lösung gibt Aufschluss über die Bakterienanzahl. Aus dieser Anfangslösung wurde 1 ml entnommen, in 9 ml einer 0,9 % MRD-Lösung pipettiert und zur Bestrahlung in eine Ø 60 mm Glas-Petrischale umgefüllt. Nach der Bestrahlung wurden die 10 ml Bakterien-MRD-Lösung verdünnt, um die Bakterienanzahl nach der Behandlung bestimmen zu können. Dafür wurden 1 ml aus der behandelten Lösung in einem Reagenzglas mit 9 ml MRD-Lösung gemischt. Aus dieser Lösung wurde wiederum 1 ml entnommen und in 9 ml MRD-Lösung verdünnt. Dies wurde insgesamt fünf Mal wiederholt, sodass eine Verdünnungsreihe von sechs verschiedenen Verdünnungsstufen um jeweils den Faktor 10 entstand. Jede Verdünnungsstufe wurde auf Agarplatten ausplattiert, für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und dann ausgezählt. In Abbildung 2 ist der Ablauf der Verdünnung sowie der Ausplattierung mit der *Miles & Misra Methode* [1] dargestellt. Für jeden Versuchsparameter wurden aus statistischen Gründen immer drei Bakterien-MRD-Lösungen bestrahlt sowie jeweils drei Mal ausplattiert.

Bestrahlungsversuche auf inokulierter Fleischmatrix (Schweineschwarte)

Für die Bestrahlungsversuche auf der Fleischmatrix wurden sowohl feuchte als auch trockene Bedingungen für die Bakterienreduktion untersucht. Weiterhin wurde in den Versuchsreihen faltige Oberflächenareale erzeugt, um auch diesen für die Dekontamination besonders herausfordernden Bereich an Schweinekarkassen zu simulieren.

Die Bakterien wurden, wie in den Vorversuchen, auf einer Agarplatte am Vortrag kultiviert (nicht älter als 24h) und in MRD-Lösung aufgelöst. Auch hier wurde eine optische Dichte von 0,5 für

die Bakterienlösungen angesetzt. Zur gleichmäßigen Inokulation der Proben wurde jede Probe mit 300 µl der jeweiligen MRD-Bakterienlösung besprüht. Daraufhin wurde der Bakteriensuspension eine Trockenzeit gegeben. Abhängig von der Versuchsgruppe betrug diese bei den Proben, die mit einer feuchten Oberfläche bestrahlt werden sollten, 10 Minuten und für die trockenen Proben 30 Minuten. Proben bei denen künstlich faltige Areale erzeugt worden sind, um die Schatteneffekte bei der Bestrahlung zu untersuchen, hatten eine Trockenzeit von 15-20 Minuten. Für die Untersuchung der Schatteneffekte wurden die Proben 10 Minuten nach der Inokulation an den Seiten zusammengedrückt, sodass sich mehrere Falten auf der Schweineschwartenoberfläche bildeten. Somit konnte ein Vergleich der Bestrahlung zu den Proben mit glatten Oberflächen und denen mit den faltigen Arealen in Hinsicht auf den Einfluss der Oberflächenstruktur vorgenommen werden.

Die Fleischproben wurden nach der Bestrahlung in Stomacherbeuteln mit MRD-Lösung (18 ml) für eine Minute gewaschen. Aus der gewaschenen Lösung wurde 1 ml entnommen, um daraus die Verdünnungsreihen zur Ausplattierung herzustellen. Hier wurde auch bis zur sechsten Verdünnungsstufe ausplattiert. Die Agarplatten wurden daraufhin für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und ausgezählt. Für jede Versuchsgruppe wurden drei Fleischproben präpariert, welche jeweils drei Mal mit der *Miles & Misra Methode* [1] ausplattiert wurden. Zudem wurden zu Beginn (K0) und zum Ende (K) der Versuchsreihen bzw. der Bestrahlung Kontrollgruppen zusätzlich ausplattiert, um eine Zunahme oder Abnahme der Bakterien während der Durchführung der Bestrahlungsversuche zu kontrollieren. In Abbildung 1 sind die inokulierten Proben zu sehen. Als Bestrahlungsparameter wurden basierend auf den Vorversuchen in Flüssigkeiten eine Laserleistung von 60 W und eine Scangeschwindigkeit von 80 mm/s ausgewählt, um eine gute Vergleichbarkeit herzustellen.



Abbildung 1: Inokulierte Proben. Schweineschwarte, die in gleich große Stücke geschnitten wurde und gleichmäßig mit einer Sprühflasche mit der jeweiligen Bakteriensuspension inokuliert wurde. Für jeden Bakterienstamm wurden die Proben in drei Versuchsgruppen, basierend auf dem Zustand ihrer Oberfläche aufgeteilt (feucht,

trocken, faltig

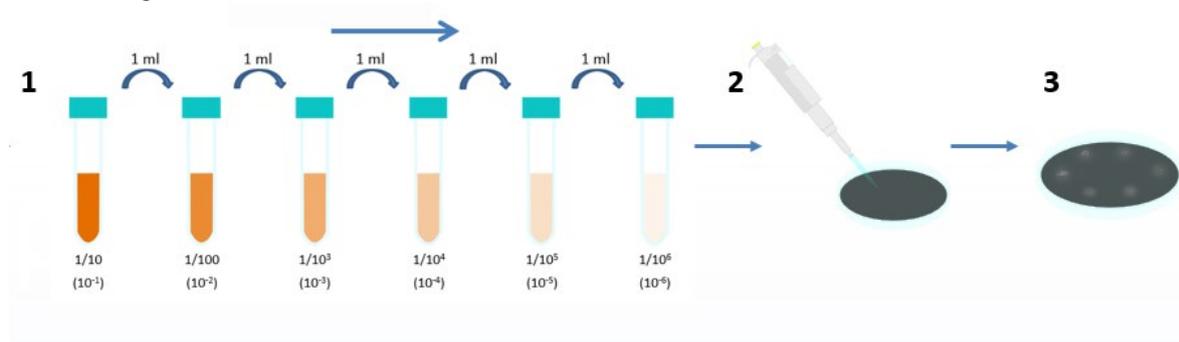


Abbildung 2: Ablauf der Verdünnung der Bakterienlösung mit der Miles & Misra Methode.

Versuchsaufbau

Die Bestrahlung erfolgte mit einem UV-A-Hochleistungslaser (TruMicro 8320, TRUMPF GmbH) mit einer Wellenlänge von 343 nm und einer maximal verfügbaren mittleren Leistung von 200 W. Um die Bakterienlösung bestrahlen zu können, wurde der Laserstrahl mittels Optiken zu einem Scanner (Elephant, Novanta GmbH) geführt, welcher den Laserstrahl über die gesamte Fläche der jeweiligen Probe lenkt. Dafür wird der Laserstrahl über zwei schwenkbare Spiegel in x- und y-Richtung bewegt. Für die Behandlung der Bakterien in den runden Petrischalen wurde ein Bestrahlungsmuster aus aneinander liegenden konzentrischen Kreisen gewählt, das die gesamte Petrischale möglichst gleichförmig abdeckt. Jede Probe wurde einmal komplett abgescannt. In den Abbildungen 3 und 4 ist der Versuchsaufbau zu sehen und in Abbildung 5 das Bestrahlungsmuster für die Bestrahlung in MRD. In Abbildung 6 ist die Bestrahlung für die rechteckigen Fleischproben dargestellt.

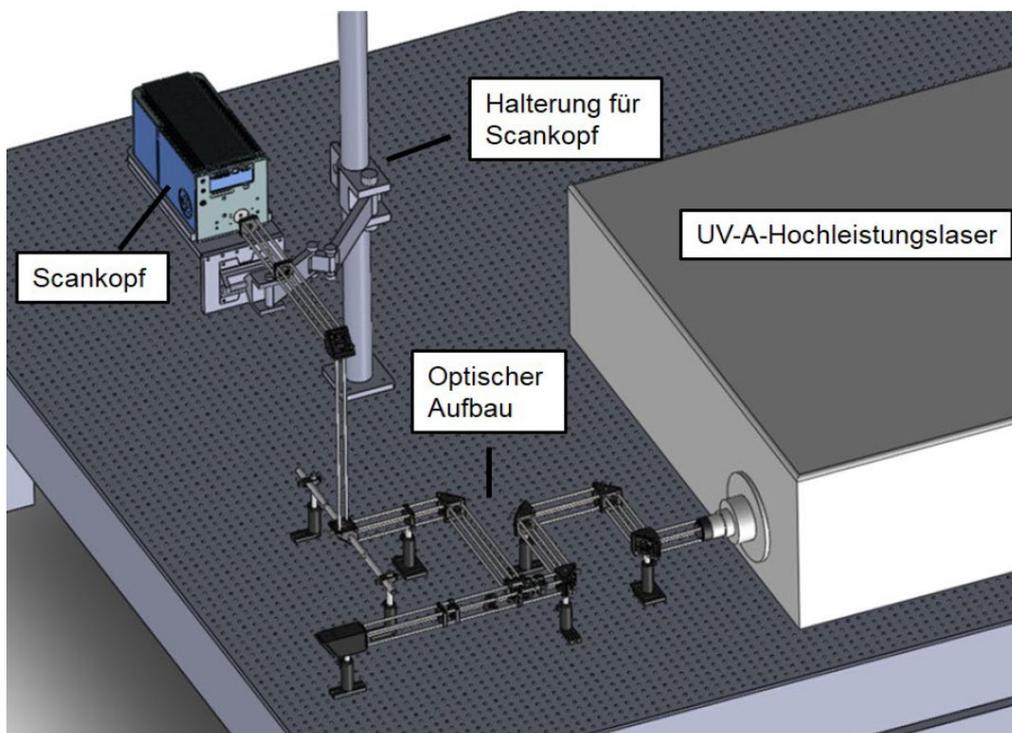


Abbildung 3: Versuchsaufbau mit dem UV-A-Hochleistungslaser (TruMicro8320) und dem Scanner (Elephant).

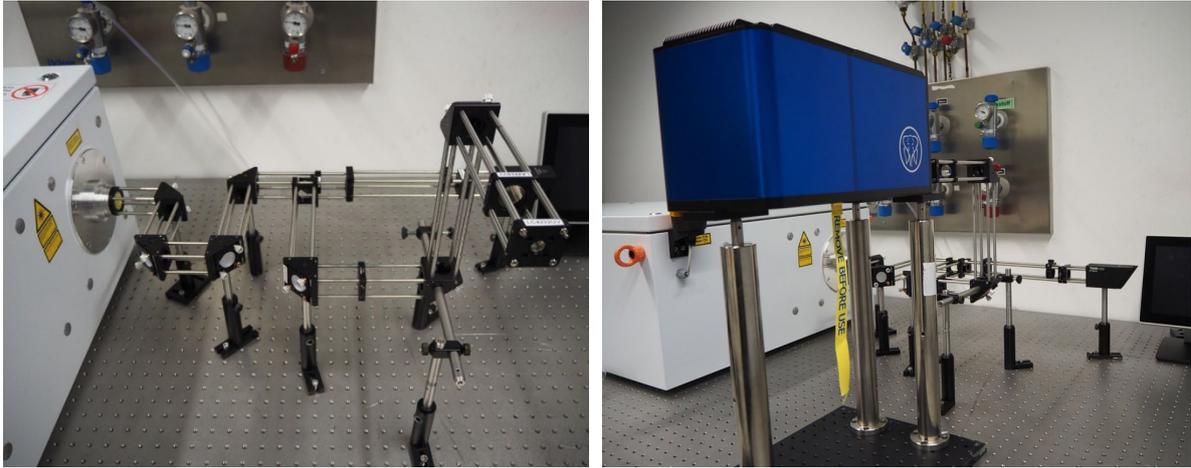


Abbildung 4: Versuchsaufbau mit dem TruMicro8320 und dem Elephant Scanner. Links ist die Strahlführung von Laserkopf bis zum Scanner zu sehen, der sich in der rechten Abbildung am Ende des Strahlweges befindet.

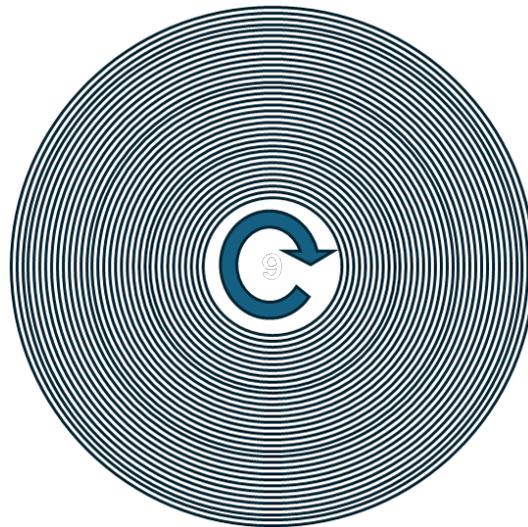


Abbildung 5: Lückenloses Bestrahlungsmuster für die Bestrahlung der Bakterienlösung in den Ø 60 mm Glas-Petrischale.



Abbildung 6: Lückenloses Bestrahlungsmuster für die Bestrahlung der inokulierten Fleischproben

Die zu untersuchenden Bestrahlungsparameter waren die Laserleistung sowie die Scangeschwindigkeit. Da jede Probe genau einmal mit der festgelegten Laserleistung abgescannt wurde, ergibt sich aus Laserleistung und Scangeschwindigkeit bzw. Bestrahlungsdauer für das vollständige Abscannen der Petrischale die applizierte Dosis zur Dekontamination. Die Parameter für die jeweiligen Bestrahlungsversuche wurden für jeden Bakterienstamm drei Mal wiederholt und die dazugehörigen Verdünnungsstufen wurden auch drei Mal ausplattiert.

3 Ergebnisse

Nach umfangreichen Vorversuchen wurden für die Untersuchungen der Behandlungseffektivität in Flüssigkeit mehrere Versuchsreihen mit den Laserleistungen 20 W und 60 W sowie den Scangeschwindigkeiten 20 mm/s, 40 mm/s, 80 mm/s, 100 mm/s und 120 mm/s durchgeführt. Als Startwerte wurden die langsamste Scangeschwindigkeit (20 mm/s) ausgewählt, bei der die Glaspetrischalen nicht springen sowie die geringste Laserleistung (20 W) bei der eine erkennbare Reduktion der Bakterien zu beobachten war. Zuletzt wurden Versuche auf inokulierten Fleischproben (Schweineschwarte) mit einer festgelegten Laserleistung von 60 W und einer Scangeschwindigkeit von 80 mm/s durchgeführt.

Für die Bakterien in MRD-Lösung konnte gezeigt werden, dass die Laser-UVA-Behandlung für alle ausgewählten im Schweineschlachthof relevanten Bakterien wirksam ist. Dies gilt zunächst für die Bakterien in Lösung. In den Abbildungen 7 und 8 sind die Ergebnisse zu den Versuchen mit den drei verschiedenen Bakterienstämmen dargestellt.

Abbildung 7 zeigt die Versuchsreihen mit der Leistung von 20 W und der dazugehörigen resultierenden Log-Reduktion der drei ausgewählten Bakterienstämme. Mit steigender Scangeschwindigkeit ist zu erkennen, dass die Log-Reduktion dazu neigt abzunehmen. Mit gleichbleibender Laserleistung und schnelleren Scangeschwindigkeiten nimmt die applizierte Dosis auf die Bakterien ab, da die Bestrahlungszeit geringer wird. Das heißt, dass erwartungsgemäß mit der Abnahme der applizierten Dosis auch eine geringere Reduzierung der Bakterien erzielt wurde. Eine Besonderheit wird bei einer Scangeschwindigkeit von 80 mm/s beobachtet. Dort konnte die höchste Reduzierung bei *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* erreicht werden.

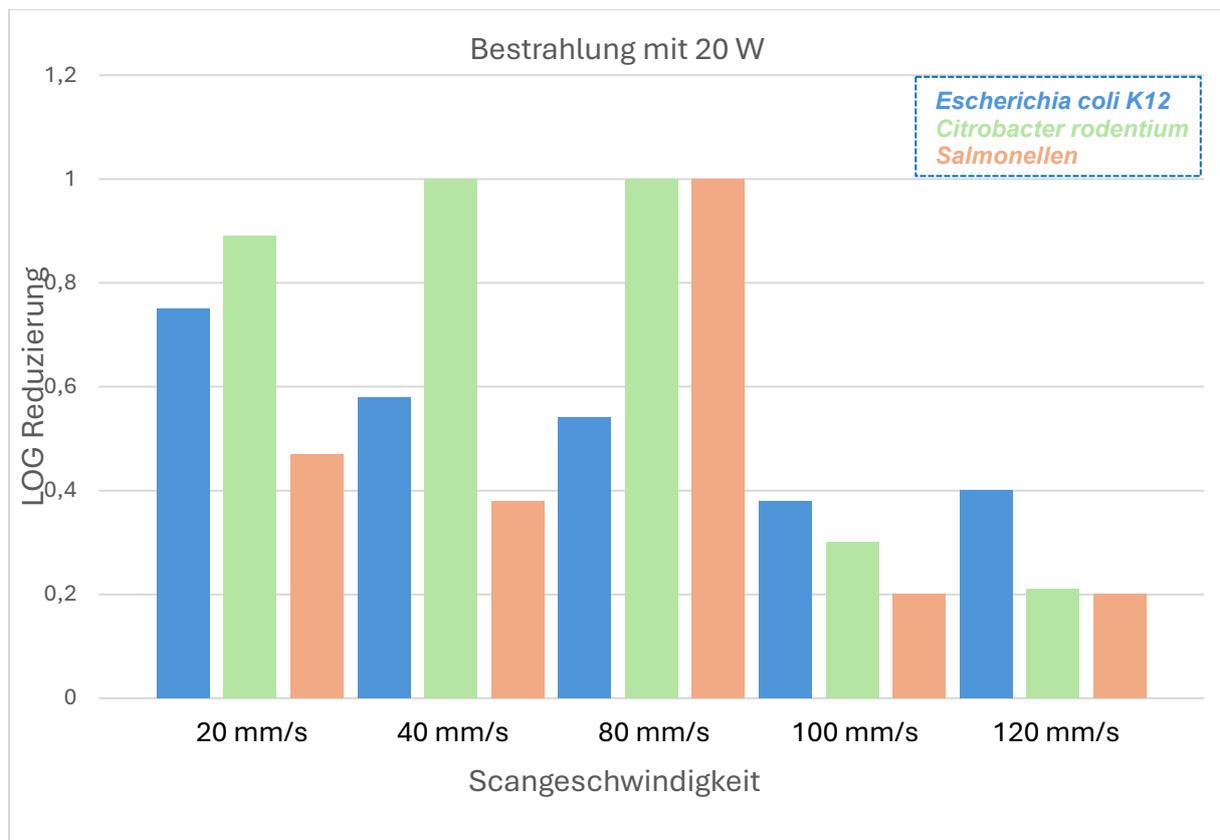


Abbildung 7: Versuchsreihen mit *Escherichia coli K12*, *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* in MRD-Lösung mit einer Bestrahlung von 20 W und verschiedenen Scangeschwindigkeiten von 20 mm/s, 40 mm/s, 80 mm/s, 100 mm/s und 120 mm/s.

In Abbildung 8 sind die Versuchsreihen mit der Leistung von 60 W dargestellt. Auch hier zeigt sich weitgehend wie erwartet eine dosisabhängige Log-Reduktion. So nimmt bei *Citrobacter rodentium* die Log-Reduktion kontinuierlich zu höheren Scan-Geschwindigkeiten – die mit geringeren Bestrahlungsdosen gleichzusetzen sind – hin ab. Bei *Escherichia coli* K12 kommt es hingegen bei einer Scangeschwindigkeit von 80 mm/s und mehr zu keiner signifikanten Änderung der Log-Reduktion mehr und bei *Salmonella* kann man ein lokales Minimum bei 80 mm/s feststellen. Bleibt die Log-Reduzierung wie bei *E.coli* und *Salmonella* bei gleicher Laserleistung auch für höhere Scan-Geschwindigkeiten auf demselben Niveau, ist dies für den Prozess im Schlachthof vorteilhaft, da die höhere Scangeschwindigkeit mit einer kürzeren Behandlungsdauer pro Fläche gleichzusetzen ist und damit einen höheren Durchsatz im Schlachthof ermöglicht. Wichtig ist hierbei natürlich auch, ob die damit erzielte Log-Reduktion für die Hygienemaßnahmen im Schlachthof relevant ist.

Aus Vorversuchen ist bekannt, dass die Auswirkungen der Scangeschwindigkeit nicht linear betrachtet werden können. Aufgrund dessen wurden bei den Versuchsreihen mit festen Laserleistungen, aber variierenden Scangeschwindigkeiten gearbeitet, um die optimalen Bestrahlungsparameter in Bezug auf eine schnelle Dekontamination zu untersuchen. Basierend auf den Ergebnissen kann anschließend eine festgelegte Scangeschwindigkeit mit variierenden Laserleistungen betrachtet werden. Sollten sich die höchste Log-Reduzierung sowie die Plateaus der verschiedenen Bakterienstämme nicht überschneiden oder sich in einem Bereich treffen, muss im späteren Verlauf der Versuche entschieden werden, welche Bakterienstämme die höchste Priorität in der Abtötung haben.

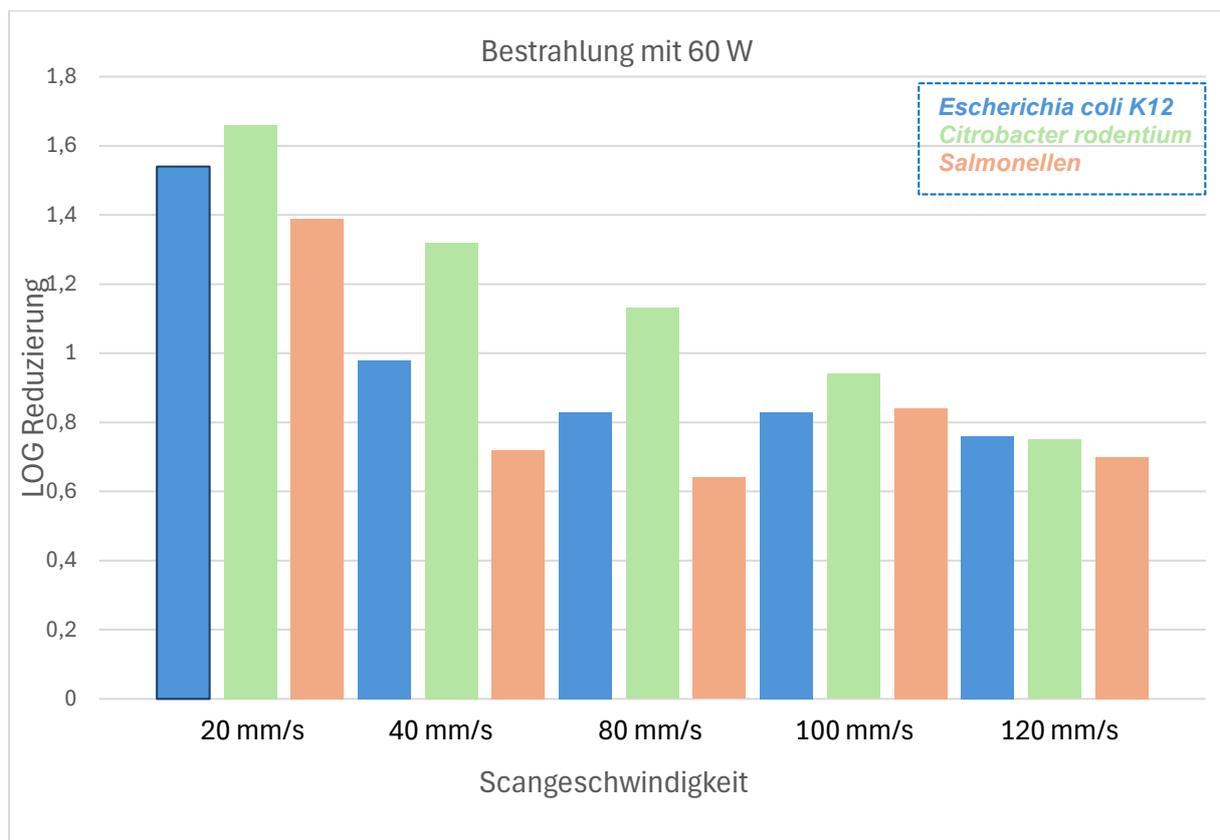


Abbildung 8: Versuchsreihen mit *Escherichia coli* K12, *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* in MRD-Lösung mit einer Bestrahlung von 60 W und verschiedenen Scangeschwindigkeiten von 20 mm/s, 40 mm/s, 80 mm/s, 100 mm/s und 120 mm/s.

Die weiterführenden Versuche auf den Fleischproben wurden auf Schweineschwarte durchgeführt. In den Abbildungen 9, 10 und 11 sind die Versuche mit einer Laserleistung von 60 W und 80 mm/s für die drei verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Die Bestrahlungsparameter wurden basierend aus den Ergebnissen der Vorversuche festgelegt.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse für die Bestrahlung der Schweineschwarte mit einer feuchten Oberfläche zu sehen. Die Proben hatten eine Trockenzeit von 10 Minuten und wurden daraufhin bestrahlt. Die größte Reduzierung bei gleicher Dosis wurde mit einer 1 log-Stufe bei *Salmonella* erzielt, während sie bei *E. coli K12* bei 0,6 und bei *Citrobacter rodentium* bei 0,5 log-Stufen liegt.

Die Versuchsreihe mit den künstlich erzeugten Falten, um die Schatteneffekte bei der Bestrahlung zu untersuchen, weisen keinen großen Unterschied in der Log-Reduzierung zu denen mit einer glatten Oberfläche – in dem Fall zu den Proben mit der feuchten Oberfläche – auf (siehe Abbildung 10). Die Keimreduktion scheint etwas geringer auszufallen (0,2 Log-Stufen), allerdings kann dies auch durch die natürliche Varianz der Ergebnisse erklärt werden und könnte nur durch eine größere Probenanzahl statistisch bestätigt werden.

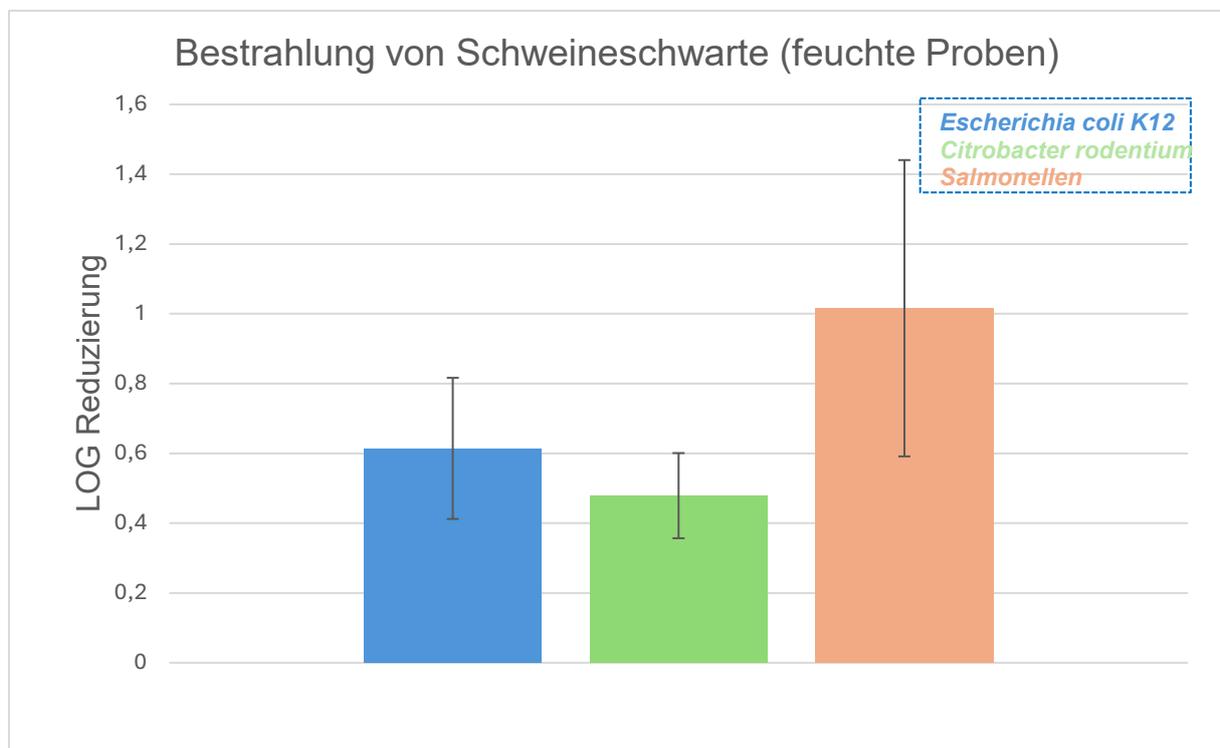


Abbildung 9: Versuchsreihen mit *Escherichia coli K12*, *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* auf Schweineschwarte mit feuchter Oberfläche.

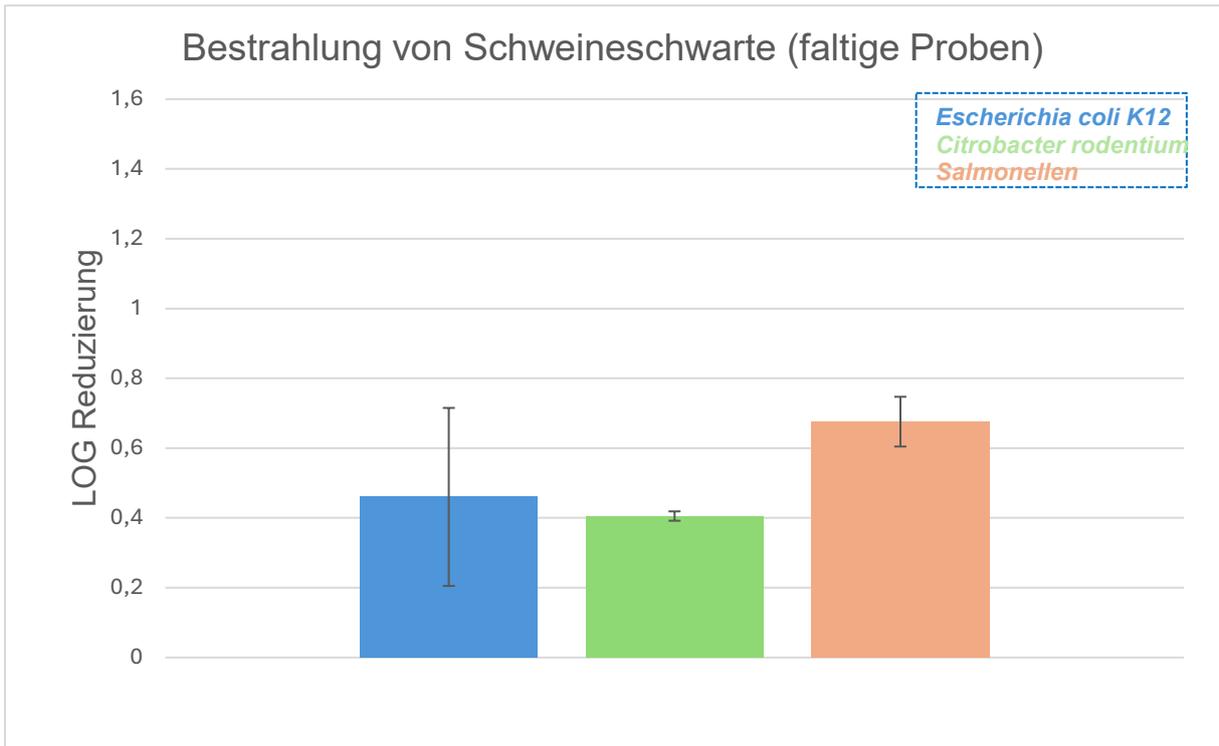


Abbildung 10: Versuchsreihen mit *Escherichia coli* K12, *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* auf Schweineschwarte mit künstlich erzeugten Falten auf der Oberfläche.

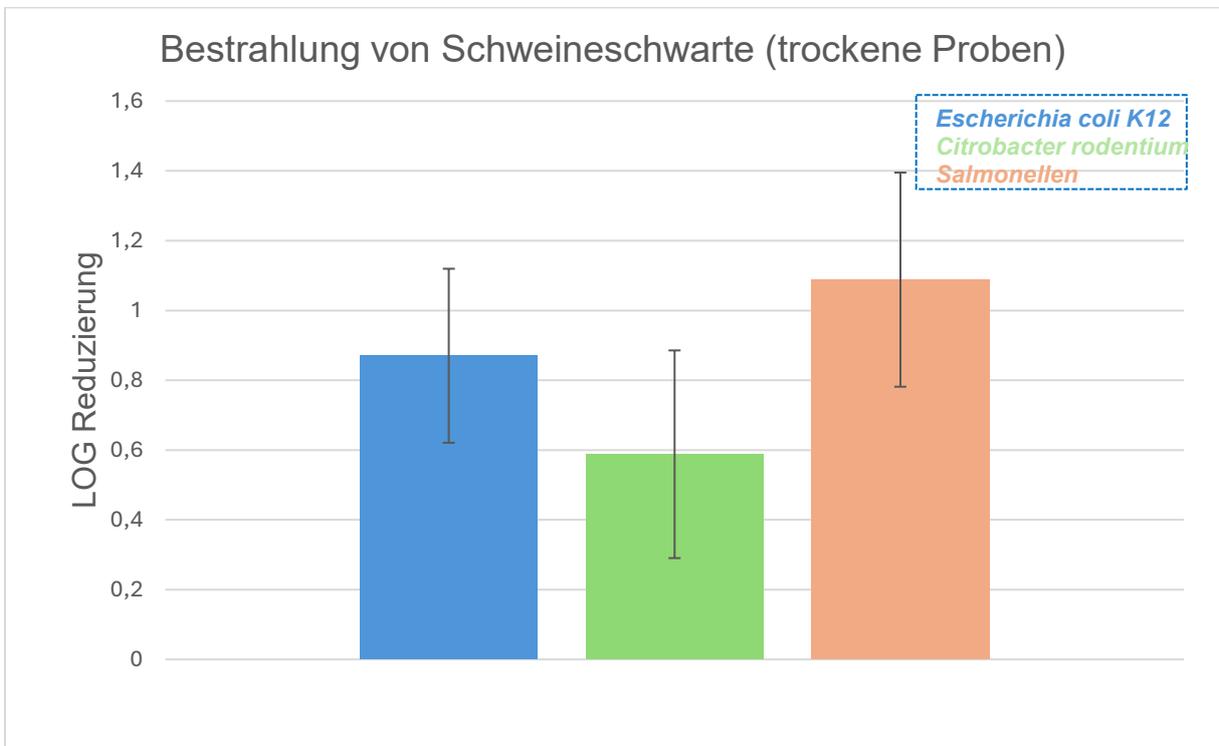


Abbildung 11: Versuchsreihen mit *Escherichia coli* K12, *Citrobacter rodentium* und *Salmonellen* auf Schweineschwarte mit trockener Oberfläche.

Die trockenen Proben, die eine Trockenzeit von 30 Minuten hatten, wiesen im Gesamten die größte Reduzierung der Bakterien auf. Bei den Bakterienstämmen *E. coli* K12 sowie *Salmonella* konnten Reduzierungen von 1 Log-Stufe (feuchte und trockene Proben) erreicht werden, während bei *Citrobacter rodentium* in allen drei Probenzuständen die geringste Reduzierung erzielt worden ist.

Für die Bestrahlungsversuche wurde die höchste Dosis, die bei den Versuchen in Flüssigkeit in den Glaspetrischalen angewandt wurde, genutzt. Im Vergleich zu den Versuchen in Flüssigkeit wurden geringere Log-Reduzierungen mit der gleichen Dosis erreicht. Auch ist auffällig, dass diese zunimmt, sobald die Proben trockener sind. Die Temperatur der Probenoberfläche wurde vor und nach der Bestrahlung gemessen (Bestrahlungsdauer: 23 s) und wies keine Erhöhung auf.

Die Grenze für einen akzeptablen Nachweis und für das Inverkehrbringen der Fleischprodukte ist vom jeweiligen Stamm und des geschlachteten Tieres abhängig. [3] Bei *E. coli* liegt dieser bei 500 Kolonien bildenden Einheiten (colony forming units) pro Quadratzentimeter (cfu/cm²) bis zu 5.000 cfu/cm². Die in den Versuchsreihen nachgewiesenen koloniebildenden Einheiten liegen bei <5.000 cfu/cm².

Bei Enterobacteriaceae liegt der Grenzwert bei maximal 5,0 log cfu/cm² bzw. cfu/g. Darunter fällt der Bakterienstamm *Citrobacter rodentium* bei dem jeweils Log-Reduktionen von 0,6; 0,4 und 0,35 Log-Stufen erzielt worden sind. Im Wesentlichen sind die gezählten koloniebildenden Einheiten von Bedeutung, die hier ebenfalls unterhalb der Grenze von 5,0 log cfu/cm² liegen. Für *E. coli* und *Citrobacter rodentium* wäre daher als nächster Schritt eine Bewertung der Reduktion der Keimzahl unter Realbedingungen notwendig. Dazu könnten Proben von Schweinekarkassen aus dem Schlachthof untersucht werden und zum einen die durchschnittliche Ausgangsbelastung mit den Keimen bestimmt und im zweiten Schritt die Reduktion unter solchen realistischen Bedingungen hinsichtlich Keimbelastung und weiterer Oberflächenparameter untersucht werden. Im Vergleich dazu muss bei *Salmonella* eine komplette Abwesenheit nachgewiesen werden, was mit der UVA-Bestrahlung in den Versuchsreihen nicht erreicht worden ist.

4 Bewertung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens

Zur Bewertung des Verfahrens (AP3) können die Kosten der Beschaffung für die größten Hardwarekomponenten sowie die Instandhaltung (z. B. Wartung der Anlagen) und Betriebskosten für die Kostenrechnung betrachtet werden. In Tabelle 1 sind die Gesamtkosten für die Strahlquelle und verbauten Optikbauteile zur Strahlführung aufgeführt.

Tabelle 1. Überblick der Kosten für die Hardwarekomponenten in Form von Betriebs- sowie Instandhaltung

Hardwarekomponente	Kosten
UVA-Hochleistungslaser (TruMicro8320)	113.200,00 €
Optikbauteile	2.117,03 €
Kühlung (Scanner)	2.336,00 €
Mobile Absaugung	2.424,40 €
	120.077,43 €
Jährliche Betriebskosten	
Jährliche Wartung (mobile Absaugung)	1.377,81 €
Jährliche Wartung (TruMicro 8320)	2.400,00 €
	3.777,81 €
	<u>123.855,24 €</u>

Hierbei handelt es sich um einen prototypischen Laboraufbau ohne besondere Maßnahmen zur Integration in einen Schlachtbetrieb, sodass die aufgeführten Kosten nur als erster Richtwert zu betrachten sind. Erfahrungswerte aus anderen Anwendungen lassen eine Reduktion der Komponentenkosten im Rahmen einer Industrialisierung von teilweise 50 % erwarten. Allerdings wurde der Hochleistungslaser zu einem besonderen Vorzugspreis angeschafft, sodass hier kaum eine Kostenreduzierung zu erwarten ist. Zwar sind in o.g. Auflistung Wartungskosten berücksichtigt, im Verhältnis zu nahezu allen anderen „Werkzeugen“ arbeitet der Laser aber nahezu verschleißfrei.

Zu AP 3 zulassungsrechtliche Fragestellung sollte die Zulassungsfähigkeit von UVA-Bestrahlung im Lebensmittelbereich recherchiert werden. Nach Lebensmittelbestrahlungsverordnung LMBestV, §1(4) ist die Behandlung durch direkte Einwirkung mit ultravioletten Strahlen (Behandlung mit UV-C-Strahlen) zur Entkeimung von Trinkwasser, der Oberfläche von Obst- und Gemüseerzeugnissen, Hartkäse bei der Lagerung, sowie von Eiern, sofern sie ohne sichtbare Verschmutzung der Oberfläche behandelt werden, zugelassen. §1(5) stellt fest, dass die Entkeimung der Luft, die eine indirekte Einwirkung auf Lebensmittel hat, ebenfalls zugelassen ist. Zu beachten ist hier, dass es ausdrücklich um UV-C-Strahlung geht. Zu UV-B- und UV-A-Strahlung enthält die LMBestV keine Angaben. Da es sich hierbei zudem um nicht-ionisierende Strahlung handelt, ist davon auszugehen, dass eine Behandlung mit der genutzten UV-A-Strahlung ebenfalls zulässig wäre.

Für einen Weg zur expliziten Zulassung einer UVA-Dekontamination in der entsprechenden Verordnung kann zum Beispiel der Beschluss für die Zulassung von UV-behandelter Milch herangezogen werden. Dabei handelt es sich um ein mit UV-B-Strahlung behandeltes Lebensmittel, bei dem sogar eine Veränderung (Umwandlung von Prävitamin D in Vitamin D) gezielt herbeigeführt wird. Hierfür wurde das Inverkehrbringen im September 2012 beantragt und im Dezember 2015 erfolgte das Gutachten der EFSA, dass UV-behandelte Milch unter das Kriterium „neuartiges Lebensmittel“ fällt und unter den beantragten Verwendungsbedingungen sicher ist.[2] Auf nationaler Ebene erfolgt in Deutschland eine Zulassung in der Regel erst nach befürwortender Stellungnahme des Bundesamtes für Strahlenschutz.

5 Ausblick

Während die Dekontaminationsmethode durch UVA-Bestrahlung nachweislich zu einer signifikanten Reduktion führte, steht dem Einsatz in Schlachtbetrieben noch insbesondere ein zu geringer erwartbarer Durchsatz entgegen. In diesem Forschungsvorhaben konnte gezeigt werden, dass $0,8 \text{ cm}^2/\text{s}$ per UVA-Laser dekontaminiert werden können. Eine Möglichkeit zur Verminderung der Behandlungszeit wäre gegeben, wenn die bakterielle Belastung auf dem Schlachtkörper individuell darstellbar und nachweisbar ist, um die UVA-Behandlung nur an diesen Stellen durchzuführen. Allerdings ist ein in-line Verfahren zur Detektion von bakterieller Kontamination auf individuellen Schlachtkörpern derzeit nicht in Aussicht.

Der UVA-Hochleistungslaser (TruMicro 8320, TRUMPF Laser GmbH + Co. KG), der für dieses Projekt genutzt wurde, ist derzeit der einzige weltweit mit der ausgewählten Wellenlänge, der einen so hohen Leistungsbereich aufweist. Für die Verwendung in einer Schlachtstraße mit einem hohen Durchsatz müsste die Nutzung von mehreren Laser-Scanner-Systemen in Erwägung gezogen werden. Mit dem derzeitigen Stand der Technik wird es dementsprechend schwierig sein, den durchschnittlichen Durchsatz einer Schlachtstraße zu behandeln.

Weitere Versuche im Rahmen des Projekts, um auszuloten, welches Potenzial die Behandlung mit voller abrufbarer Laserleistung (200 W) und maximaler Scangeschwindigkeit hat, ergaben

keine konsistenten Ergebnisse. Im vorherigen Forschungsvorhaben *Minimierung mikrobieller Verunreinigung von Geflügelfleisch vor und nach der Zerlegung mittels strukturierter Oberflächendekontamination durch Laserapplikation und Bakteriophagen* wurden bei hohen Scangeschwindigkeiten geringere Reduzierungen bei der Bestrahlung beobachtet. Ein Grund hierfür könnte der gepulste Laser sein, der bei einer zu schnell eingestellten Scangeschwindigkeit nicht mehr die komplette Fläche abdeckt und dementsprechend Lücken im Scanmuster entstehen. Das führt zu einer punktuell geringeren Bestrahlung der Pathogene, was eine geringere Reduzierung zur Folge hatte. Um belastbare Ergebnisse zu erhalten, wurden daher aus Erfahrungswerten die Bestrahlungsparameter auf Werte unterhalb der Schwelle begrenzt, die bei z. B. Geflügel filet zu deutlichen sensorischen Veränderungen geführt hatten. Weitere Untersuchungen von Oberflächenveränderungen der Schweineschwarte bei höheren Laserleistungen sind für die spätere Anwendung von Interesse. Im Hochleistungs- bzw. maximalen Durchsatzbereich sollten daher im Anschluss an das vorliegende Projekt weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Leistungsgrenzen der UVA-Laserentkeimung für die Dekontamination von Schweinekarkassen zu untersuchen.

Das vorliegende Forschungsvorhaben *Reduzierung von pathogenen Keimen auf Schweineschlachtkörpern durch strukturierte Laserapplikation* und die daraus gewonnenen Ergebnisse sollen zudem in der Fachzeitschrift *Lebensmittelbrief* in Form eines Artikels veröffentlicht werden. Dieser soll planmäßig in der Ausgabe Anfang April 2025 erscheinen, in der es um die Themenschwerpunkte "Fleisch", "Backwaren" und "Ingredients" gehen wird.

6 Literaturverzeichnis

[1] Hedges, AJ (Jun 25, 2002). "Estimating the precision of serial dilutions and viable bacterial counts". *International Journal of Food Microbiology*. 76 (3): 207–14. doi:10.1016/s0168-1605(02)00022-3. PMID 12051477.

[2] Amtsblatt der Europäischen Union, 2016, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016D1189&from=DE>

[3] Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32005R2073>