

ÜBERPRÜFUNG DER EIGNUNG EINES ATP-TESTSYSTEMS ZUR MIKROBIOLOGISCHEN KONTROLLE VON BETRIEBSWÄSSERN IN TRAUBEN UND FRÜCHTE VERARBEITENDEN BETRIEBEN

KARIN MANDL ¹, JOSCHY HUMMER ², RAINER KLINGER ³ und CHRISTOPH MUTZ ¹

¹ HBLA und BA für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wienerstraße 74

² Kellereiberatung Hummer GmbH
A- 3701 Großweikersdorf, Baumgarten am Wagram 7

³ Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG
A- 1210 Wien, Divischgasse 4

In vorliegender Arbeit wurde die Eignung der ATP-Teststreifen Typ LuciPacPen (Wattestäbchen zur Oberflächenüberprüfung; LPP) und Typ LuciPacPen-Aqua (Spezialstäbchen zur Wasseruntersuchung; LPPA) für die Bestimmung der Verkeimung von Betriebswässern getestet. Das Testsystem nutzt eine Methode basierend auf einer Kombination von Luciferase und Pyruvat-Orthophosphatdikinase (PPDK). Um einen Bezug zwischen den Messwerten (relative light units = RLU-Werte) und dem Keimgehalt zu erhalten, wurden Messungen mit Suspensionen bestimmter Zellzahl von *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni* durchgeführt. Die Bestimmung mit den ATP-Stäbchen ist rasch und ergibt gut reproduzierbare Ergebnisse über die zelluläre Aktivität des Probemediums. Es wurde aber festgestellt, dass sich die ATP-Gehalte mit zunehmender Standzeit der Proben erhöhen, sodass es wichtig ist, die Analysen unmittelbar nach Probenahme durchzuführen. Die Praxiseignung der ATP-Teststreifen wurde anhand der Messung von Betriebswässern in fünf Weinkellereien und bei einem Fruchtsaftabfüller ermittelt. Neben der Messung der RLU-Werte der Betriebswässer wurde der Effekt der Reinigung von Abfüllanlagen untersucht. Die RLU-Werte in den Betriebswässern der meisten Betriebe lagen bei ca. 20. In den Betrieben mit eigener Waschwasserversorgung vom Hausbrunnen konnten bedenkliche Keime isoliert werden. Einige dieser Keime wurden mit dem VITEK® 2 Compact System als Bodenkeime der Familie der *Pseudomonaceae* identifiziert.

Schlagwörter: Wein, Abfüllung, Hygiene, Reinigung, Füllanlage, Spülwasser, Luciferase

Testing of an ATP measuring system for microbiological monitoring of process water in grapes and fruit processing companies. In this work the ATP test swabs type LuciPacPen (cotton swabs for surface inspection) and LuciPacPen-Aqua (special swabs for water analysis) were tested for their suitability to determine the contamination of process waters. The test system uses a method based on a combination of firefly luciferase and pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK). In order to obtain a correlation between the measured values (RLU = relative light units) and the germ count measurements were carried out with suspensions with definite cell numbers of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. Employing the ATP swabs is quick and provides reproducible results on the cellular activity of the sample medium. However, it was found that the measured values increase with lifetime of sample, so it is important to carry out the analysis directly after sampling. The practical suitability of the ATP test swabs was determined by measuring process waters in five wineries and a fruit juice producer plant. In addition to the measurement of the RLU values of the process water, the effect of cleaning of filling plants was studied. The RLU values of tap water of most of the producers were about 20. In the companies with their own supply of wash and process water from private wells, critical germs were isolated. Some of these organisms were identified with the VITEK® 2 Compact system as soil bacteria of the family *Pseudomonaceae*.

Keywords: wine, filling station, hygiene, cleaning, rinsing water, luciferase

Bereits seit vielen Jahren wird Trinkwasser mit Nährbodenplatten auf das Vorhandensein von Keimen (TRINKWASSERVERORDNUNG, 2001; SATORY et al., 2004; WHO, 2006) untersucht. In letzter Zeit setzten sich allerdings immer mehr Schnellmethoden, wie fluoreszenzmikroskopische Methoden, Flowcytometer und ATP (Adenosintriphosphat)-Messungen durch (RINTA-KANOT et al., 2004; HAMMES et al., 2008). ATP ist als Indikatorsubstanz zum Nachweis von lebendigen Organismen im Wasser und auf Oberflächen gut geeignet (SIEBEL et al., 2008; VENKATESWARAN et al., 2003). Diese chemische Substanz kann aus den Organismuszellen austreten und somit in kontaminierten Wässern nachgewiesen werden. Der Ausgangspunkt für die Entwicklung des in diesem Projekt verwendeten ATP-Messgerätes (Lumitester PD-20, Kikkomann, Düsseldorf, Deutschland) war die Hygienekontrolle in Großküchen. Inzwischen wurden die Geräte für die mikrobiologische Kontrolle von Wasserproben weiterentwickelt.

Sauberkeit ist in Lebensmittelbetrieben sehr wichtig, um Verunreinigungen und Mikroorganismen nicht von einem Lebensmittel auf ein anderes zu übertragen. Die Folgen wären Verderb, Qualitätsverluste und Instabilität der Produkte. Auch könnte es zu einem Schweben von Verunreinigungspartikeln in Flüssigkeiten kommen, die sich als ungewollte Trübungen oder Biofilme manifestieren könnten. Insbesondere die Bildung von Biofilmen in Rohrleitungen stellt ein häufiges und schwerwiegendes Hygieneproblem dar (NIQUETTE et al. 2000; HALLAM et al., 2001; STORGÅRDS et al., 2005), sodass die Reinigung und anschließende Reinigungskontrolle von Rohrleitungen mittels durchgeleiteter Flüssigkeit sehr wichtig ist. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass auf unterschiedlichen Materialien von Trinkwasserleitungen das Wachstum der Bakterien und die Biofilmbildung verschieden stark ausgeprägt sind (NIQUETTE et al., 2000; HALLAM et al., 2001; STORGÅRDS et al., 2005). Stehzeiten von Wasser führen in der Folge zu einer Erhöhung der Keimzahl und zu einer erhöhten ATP-Freisetzung (LAUTENSCHLAGER et al.; 2010; CARRICK et al., 2001). Auch können dadurch Schwermetalle wie Blei, Nickel, Cadmium und Kupfer aus den Leitungen freigesetzt werden (ZIETZ et al., 2007; ZIETZ et al., 2003). In Summe wirken sich daher Stehzeiten von Trinkwasser in Leitungen negativ auf den Geschmack, den Geruch und die Farbe des Wassers aus (Servais et al., 1995). Im

Verteilungsnetz des Leitungswassers versucht man, das bakterielle Wachstum durch niedrige Nährstoffkonzentrationen, Anwendung von Desinfektionsmitteln, kurze Stehzeiten und kühle Temperaturen einzuschränken (SERVAIS et al., 1992; KERNEYS et al., 1995).

Im Wein spielen Bakterien aus dem Wasser und pathogene Keime nur eine untergeordnete Rolle, da beispielsweise pathogene Keime wie *Escherichia coli*, *Salmonellen* und *Staphylococcus aureus* bei Kontakt mit Wein bereits nach 30 Minuten abgetötet werden (ZIEGELWAGNER et al., 2012). Trotzdem ist bei der Produktion von Wein oder Fruchtsaft zu bedenken, dass viele Keime mehrere Monate auf trockenen Oberflächen, z. B. von Gerätschaften (KRAMER et al., 2006), überleben können. Diese Tatsache sollte bei der Wartung und Reinigung von Füllanlagen berücksichtigt werden (TIMKE et al., 2008; STORGÅRDS et al., 2006). Füllanlagen neigen bei schlechter Pflege zu starken Biofilmbildungen, die sich negativ auf die Produkte Wein und Fruchtsaft in Form von Qualitätsminderung und Trübungen auswirken. Da sich Biofilme bereits innerhalb weniger Stunden nach der Reinigung des Stahls wieder bilden, sollte die Reinigung der Anlage täglich oder unmittelbar vor dem Einsatz erfolgen (STORGÅRDS et al., 2006). Um den hygienischen Zustand von Füllanlagen und anderen Geräten überprüfen zu können, benötigt die Praxis aber einfache und rasche Bestimmungsmethoden.

Eine rasche und praxistaugliche Alternativmöglichkeit zur aufwändigen Gesamtkeimzahlbestimmung sollte die quantitative Bestimmung von Adenosintriphosphat (ATP) sein. Um dies zu überprüfen, wurde für vorliegende Arbeit die Eignung von ATP-Messungen für die Überprüfung verschiedener Wasserqualitäten und Reinigungsverfahren von Abfüllanlagen untersucht. Anhand von Betriebs- und Spülwasserproben wurden die Ergebnisse von Desinfektions- und Waschmaßnahmen in mehreren Praxisbetrieben analysiert. Es war vor allem von Interesse, ob die eingesetzte ATP-Schnellmethode für den praktischen Einsatz im Weinbaubetrieb oder in der Fruchtsaftabfüllung geeignet ist und ob die Ergebnisse mit denen der traditionellen Gesamtkeimzahlbestimmung vergleichbar sind. Als weitere Kontrollproben wurden Lösungen mit definierten Gehalten weinrelevanter Mikroorganismen untersucht.

MATERIAL UND METHODE

ATP-MESSTECHNIK

Sämtliche ATP-Analysen erfolgten mit einem Lumitester (Typ PD-20; Kikkoman, Düsseldorf, Deutschland). Das Gerät arbeitet mit der patentierten ATP/AMP (Adenosinmonophosphat)-Luciferasetechnik. Als Messverbindungen werden Luciferase aus Glühwürmchen und Pyruvat-Orthophosphatdikinase (PPDK) verwendet. Bei dieser Methode wird durch das in den Proben vorhandene Adenosintriphosphat (ATP) eine definierte Menge an Lumineszenzstrahlung produziert, die als relative Lichtmenge (Relative Light Unit; RLU) gemessen werden kann. Die ATP-Gehalte der Proben werden in RLU-Einheiten angegeben und sind direkt proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen ATP. Vom Hersteller werden zwei verschiedene ATP-Stäbchen für flüssige oder feste Proben angeboten. (LuciPacPen-Aqua und LuciPacPen).

HERSTELLUNG DER KONTROLL-SUSPENSIONEN MIT WEINRELEVANTEN MIKROORGANISMEN

Es wurden jeweils drei Lösungen von *Saccharomyces cerevisiae* (Stamm ATCC 32701) und *Oenococcus oeni* (O.oeni 20047, hauseigene Stammsammlung) als Übernachtkulturen mit Standard I-Nährbouillon (Art.-Nr. 1.07882.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland) angelegt. Von jeder Kultur wurde eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten hergestellt. Jeweils 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf fünf verschiedenen Medien (TSA = Trypton Soja Agar, Art.-Nr. CP70.1 (Roth, Karlsruhe, Deutschland); WL = Wallerstein Nutrient Agar (Oxoid CM0309; Oxoid Deutschland GmbH, Wessel, Deutschland); MEA = Malzextrakt Agar, (Art.-Nr. X923.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland); MRS = MRS Agar (Art.-Nr. X23.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland); PC = Plate Count (Art.-Nr. X930.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)) ausplattiert. Die Platten wurden bei 22 °C fünf Tage lang bebrütet.

Die Keimzahlen der Ausgangslösungen wurden durch

visuelle Auszählung der geeigneten Verdünnungsstufen bestimmt. Im Vergleich dazu wurden von jeder Verdünnungsstufe RLU-Messungen mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua, wie vom Hersteller angegeben, durchgeführt.

LABORWASSERVERSUCH

Nach Abflämmen der metallischen Wasserhähne im mikrobiologischen Labor der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg wurden 2 ml Leitungswasser entnommen und in sterile Plastikröhrchen gefüllt und 3 min bei 95 °C erhitzt, damit die Membran porös wird und das intrazelluläre ATP die Zelle austreten kann. Die RLU-Werte wurden direkt nach der Probenahme und Erhitzung in der abgekühlten Probe mit dem Lumitester (Typ PD-20; Kikkoman, Düsseldorf, Deutschland) viermal gemessen.

UNTERSUCHUNG VON BETRIEBSWÄSSERN

Es wurden sechs repräsentative Betriebe mit unterschiedlichen Reinigungsgewohnheiten im Weinviertel ausgewählt. Davon waren fünf Betriebe Weingüter und ein Betrieb (Betrieb C) ein Fruchtsaftabfüller. In jedem Betrieb wurden das Betriebswasser und das Spülwasser der Abfüllanlage analysiert. Die Spülwasserproben wurden vor und nach dem Reinigen und anschließend nach der Füllung genommen. Die Entnahme der Proben erfolgte nach Abflämmen der Ablässe und kurzem Laufenlassen des Spülwassers. Vor Entnahme der Betriebswasserproben wurden ebenfalls die Hähne abgeflammt und das Wasser für 5 min laufen gelassen. Die Abfüllung der Proben erfolgte in sterile Gefäße. Jede Probe wurde zweimal gezogen und danach gekühlt ins Labor transportiert.

BESCHREIBUNG DER BETRIEBE

BETRIEB A

Betrieb A bezieht das Wasser aus dem öffentlichen Wasserleitungsnetz. Das Wasser wird im Betrieb enthärtet

und mit einer UV-Lampe partiell entkeimt. Die Reinigung der Anlage erfolgt durch regelmäßige chemische Reinigung mit chlorfreier Lauge, 2%ig, kalt, und anschließender Dampfsterilisation (20 min bei 120 °C). Die Flaschen werden vor der Füllung mit ozonisiertem Wasser und Frischwasser ausgespült.

BETRIEB B

Betrieb B bezieht das Betriebswasser aus einem hauseigenen Brunnen. Das Wasser wird ohne weitere Behandlung als Waschwasser verwendet. Die Füllanlage wird sporadisch chemisch mit einer 2%igen Hypochloritlauge, 1%iger Wasserstoffperoxidlösung, beides kalt, und/oder Dampf gereinigt. Die Flaschen werden prinzipiell mit SO₂-Lösung ausgespült.

BETRIEB C

Der Fruchtsaftabfüller betreibt eine genau beschriebene Reinigungspraxis. Zuerst wird mit chlorfreier Lauge, 1%ig, 95 °C im CIP-Verfahren 30 min lang gereinigt, anschließend wird Wasserstoffperoxid, 2%ig, kalt, 20 min lang eingesetzt und danach mit Betriebswasser 20 min gespült. Dabei werden ca. 500 l Wasser durch die Anlage gepumpt. Das Betriebswasser stammt aus dem öffentlichen Netz, wird enthärtet und über eine UV-Lampe geführt.

BETRIEB D

Große Mengen Betriebswasser werden aus dem öffentlichen Netz entnommen und über eine UV-Lampe partiell entkeimt. Die Abfüllanlage wird sporadisch zwei- bis dreimal pro Jahr chemisch mit chlorfreier Lauge gereinigt. Dabei wird die Anlage mit 2%iger Lauge befüllt und 30 min eingeweicht, anschließend wird rundgepumpt und eine Standdesinfektion über Nacht mit 1%iger Wasserstoffperoxidlösung, kalt, durchgeführt. Am nächsten Morgen wird die Anlage mit ca. 1.000 l Wasser wie oben beschrieben über UV-Lampe entkeimt und gespült. Wenn kein chemischer Reinigungszyklus durchgeführt wird, wird die Anlage nur mit einer großen Wassermenge von ca. 3.000 l geschwält.

BETRIEB E

Hierbei handelt es sich um einen technisch älteren Betrieb, der das Betriebswasser aus einem hauseigenen Brunnen bezieht. Die Reinigung der Abfüllanlage erfolgt teilweise mit Hypochloritlauge in einer 2- bis 3%igen Konzentration für 30 min, und anschließend wird mit Wasserstoffperoxid, 1%ig, kalt, 30 min desinfiziert. Die Flaschen werden in einem Tauchsterilisator mit 1,5%iger Peressigsäure entkeimt, das Nachspülwasser nach dem Sterilisator wird über einen kleinen Kerzenfilter geführt.

BETRIEB F

Das Betriebswasser aus dem eigenen Hausbrunnen wird unbehandelt verwendet. Die Reinigung der Füllanlage erfolgt regelmäßig mit 2%iger aktivchlorfreier kalter Lauge und Wasserstoffperoxid in 1%iger Konzentration, kalt, beides für 30 min, danach wird die Füllanlage zusätzlich mit Dampf 120 °C und 20 min beaufschlagt und sterilisiert.

BESTIMMUNG DER KEIME IN DEN PROBEN AUS DEN TESTBETRIEBEN

Von allen Proben wurden Verdünnungsreihen in Zehner-Schritten hergestellt. Die Probenflüssigkeit wurde auf verschiedene Nährmedien (WL, PC, TSA) ausplattiert und fünf Tage bei 22 °C und auf PC zusätzlich noch bei 37 °C bebrütet und anschließend ausgezählt. Die Proben wurden nicht entsprechend der österreichischen Trinkwasserverordnung (TRINKWASSERVERORDNUNG, 2001) bearbeitet, da ein Vergleich mit offiziellen Untersuchungswerten nicht beabsichtigt wurde und nicht Ziel der Arbeit war. Es wurde die Hausmethode mit Ausplattieren von 100 µl Probe der Verdünnungen vorgezogen. Die in den Proben vorhandenen Keime wurden in der Folge weiter untersucht. Dazu wurden diese reinkulti- viert. Die Analyse erfolgte in einem ersten Schritt durch Gramfärbung, im Anschluss wurden die Keime mittels des Systems VITEK® 2 Compact (kompaktes, automatisiertes ID/AST-System, Firma bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) nach Angaben des

Herstellers identifiziert. Anschließend wurden die Ergebnisse des VITEK® 2 Compact auf Übereinstimmung mit dem Aussehen der Kolonien nochmals überprüft.

DATENAUFARBEITUNG

Die grafischen Darstellungen und Berechnungen erfolgten mit der Software SPSS22 (IBM Österreich, Wien, Österreich) und MS Excel 2010 (Microsoft, Redmond, USA).

ERGEBNISSE

VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER ATP-MESSUNG (RLU-WERTE) VON SUSPENSIONEN WEINRELEVANTER MIKROORGANISMEN MIT LUCIPACPEN (LPP) UND LUCIPACPEN-AQUA (LPPA)

In Abbildung 1 ist ein Vergleich der RLU-Werte eines Gemisches aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni*, gemessen mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua, dargestellt. Der Mittelwert der mit LuciPacPen gemessenen Werte lag bei der unverdünnten Lösung bei $1,3 \times 10^5$ RLU mit einem Minimumwert von $1,2 \times 10^5$ RLU und einem Maximumwert von $1,4 \times 10^5$ RLU. Der Mittelwert bei LuciPacPen-Aqua lag bei $1,4 \times 10^5$ RLU, der Minimumwert bei $1,2 \times 10^5$ RLU und der Maximumwert bei $1,6 \times 10^5$ RLU. Der Median der RLU-Messungen mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua lag bei beiden Methoden bei $1,3 \times 10^5$ RLU.

In Abbildung 2 ist ein Vergleich der RLU-Werte einer Suspension von *Saccharomyces cerevisiae*, gemessen mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua, ab der Verdünnungsstufe 10^3 dargestellt. Bei einer Keimzahl von 5280 KBE/ml mit LPPA wurden 251 RLU festgestellt, bei einer Keimzahl von 97 KBE/ml 11 RLU.

Abbildung 3 zeigt die Messergebnisse mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua bei der Suspension von *Oenococ-*

cus oeni ab der Verdünnungsstufe 10^3 . Der Mittelwert der RLU-Werte von LuciPacPen lag bei der unverdünnten Lösung bei $1,3 \times 10^6$ RLU mit einem Minimumwert von $1,2 \times 10^6$ RLU und einem Maximumwert von $1,4 \times 10^6$ RLU. Der Mittelwert von LuciPacPen-Aqua lag bei $1,3 \times 10^6$ RLU, der Minimumwert bei $1,2 \times 10^6$ RLU und der Maximumwert bei $1,6 \times 10^6$ RLU. Der Median der RLU-Messungen des LuciPacPen und des LuciPacPen-Aqua lag bei beiden bei $1,3 \times 10^6$ RLU.

LABORWASSERUNTERSUCHUNG

In Abbildung 4 wird anhand einer Laborwasserprobe der Einfluss eines dreiminütigen Erhitzens auf 95°C auf die Messwerte veranschaulicht. Die Proben wurden erhitzt, damit die Membran durchlässig wird und intrazelluläres ATP aus der Zelle austritt. Hiermit sollte die Alterung der Zelle simuliert werden. Vor dem Erhitzen lagen der Mittelwert bei 13,75 und der Median bei 11,5 RLU-Werten. Nach dem Erhitzen lagen der Mittelwert bei 109 und der Median bei 100,5.

BETRIEBSWASSERUNTERSUCHUNGEN

Die in Abbildung 5 dargestellten Messwerte der untersuchten Betriebe weisen eine große Spannweite von 10 RLU bis 220 RLU auf, die Werte von Betrieb E (>500 RLU) sind nicht dargestellt. Die ATP-Werte des Betriebswassers der meisten Betriebe lagen bei ca. 20 RLU, dies entspricht den durchschnittlichen RLU-Werten von Leitungswasser. Diese Werte stimmen auch mit den Wasserwerten des Labors der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg überein (rund 15 RLU).

In Abbildung 6 bis 12 sind die Messwerte (ermittelt mit LuciPacPen (LPP) und LuciPacPen-Aqua (LPPA)) des Spülwassers vor und nach der Reinigung bzw. nach erfolgter Füllung für die Betriebe einzeln dargestellt (in RLU).

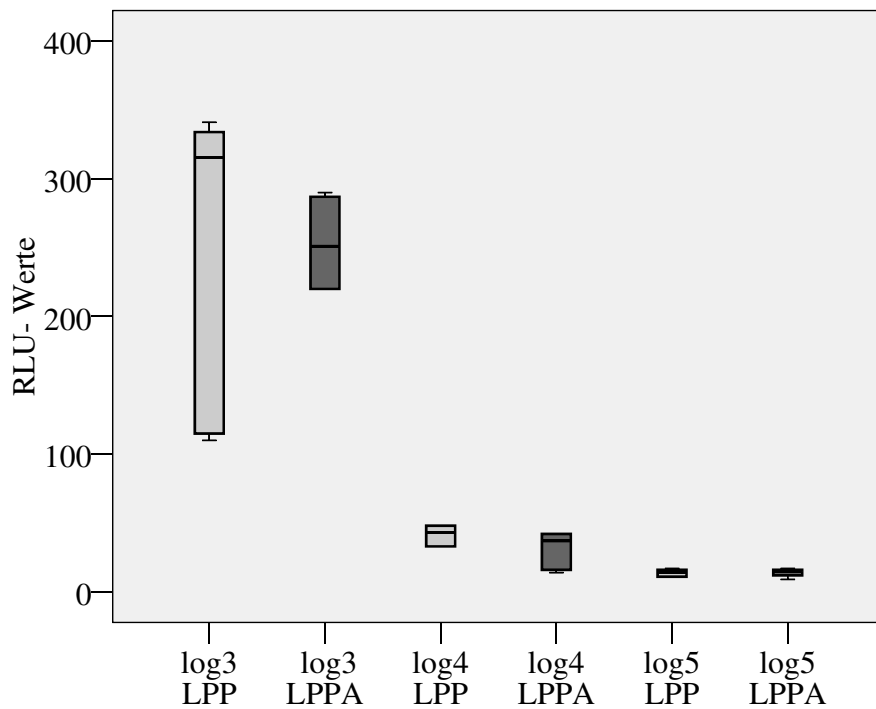


Abb. 1: Vergleich der RLU-Werte eines Gemischs bestehend aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Oenococcus oeni* mit LuciPacPen (LPP) und LuciPacPen-Aqua (LPPA) bei verschiedenen Verdünnungsstufen ($10^3 = \log 3$ bis $10^6 = \log 6$).

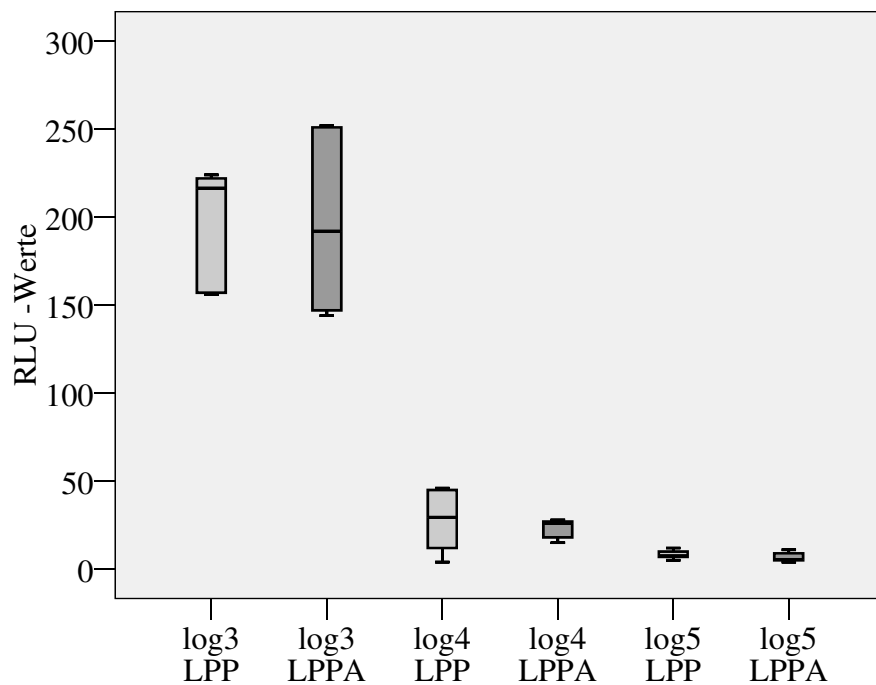


Abb. 2: Vergleich der RLU-Werte einer Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* mit LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua bei verschiedenen Verdünnungsstufen (z. B. $10^3 = \log 3$ bis $10^5 = \log 5$).

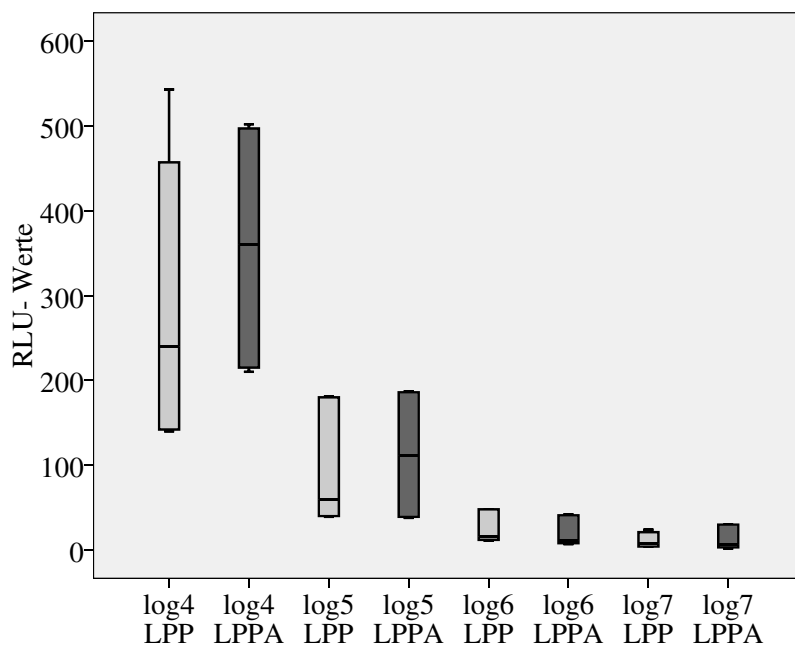


Abb. 3: Vergleich der RLU-Werte einer Suspension von *Oenococcus oeni* mit LuciPacPen (LPP) und LuciPacPen-Aqua (LPPA) bei verschiedenen Verdünnungsstufen (z. B. 10^4 = log 4 bis 10^7 = log 7).

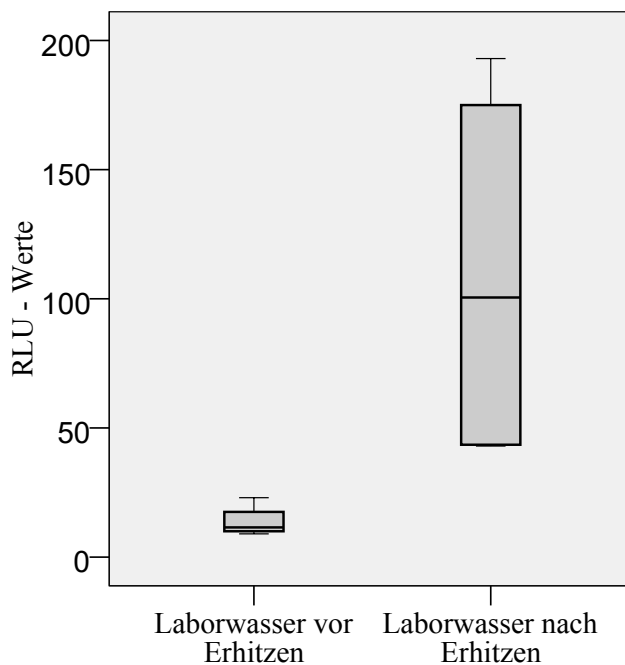


Abb. 4: Messwerte des Laborwassers vor und nach dem Erhitzen.

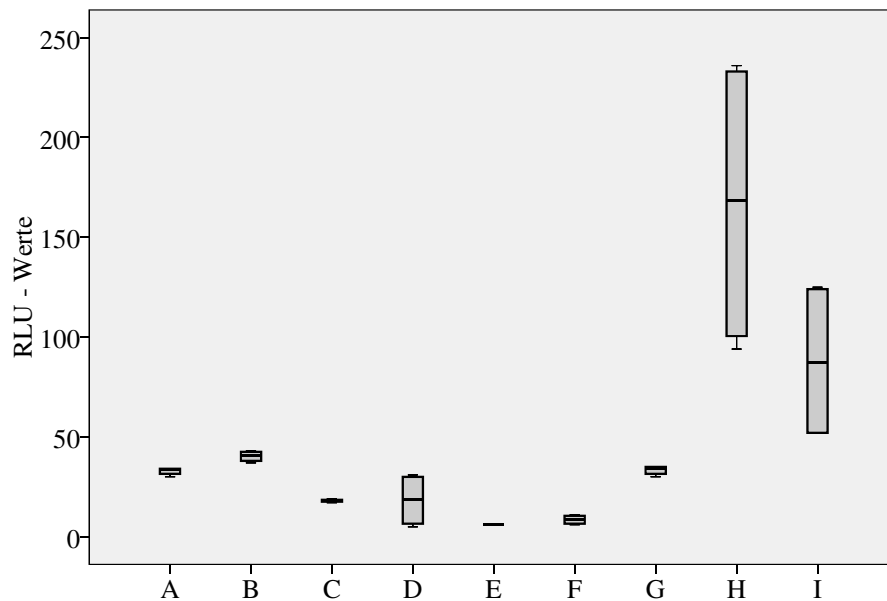


Abb. 5: Messwerte (LuciPacPen; in RLU) verschiedener Betriebswässer

A = Betriebswasser A gemessen am Weingut, B = Betriebswasser Weingut A gemessen im Labor, C = Betriebswasser Fruchtsaftabfüller C gemessen im Labor, D = Betriebswasser am Weingut D gemessen im Labor, E = Betriebswasser Weingut D gemessen am Weingut (Werte nicht dargestellt, da >500 RLU), F = Betriebswasser Weingut D gemessen am Weingut, G = Betriebswasser Weingut F gemessen am Weingut, H = Betriebswasser Weingut F gemessen im Labor, I = Betriebswasser Weingut B gemessen im Labor

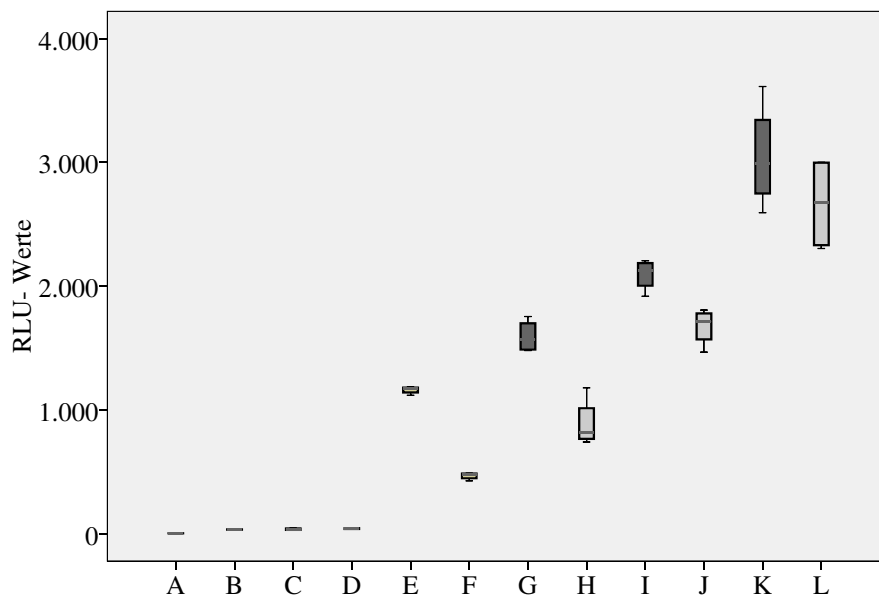


Abb. 6: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb A (in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPPA am Weingut, B = Betriebswasser gemessen mit LPP am Weingut, C = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, D = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser gemessen mit LPPA am Weingut, F = Nachspülwasser gemessen mit LPP am Weingut, G = Nachspülwasser gemessen mit LPPA im Labor, H = Nachspülwasser gemessen im Labor mit LPP im Labor, I = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPPA am Weingut, J = Nachspülwasser aus Füller gemessen mit LPP am Weingut, K = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPPA im Labor, L = Nachspülwasser aus Füller nach Füllung gemessen mit LPP im Labor

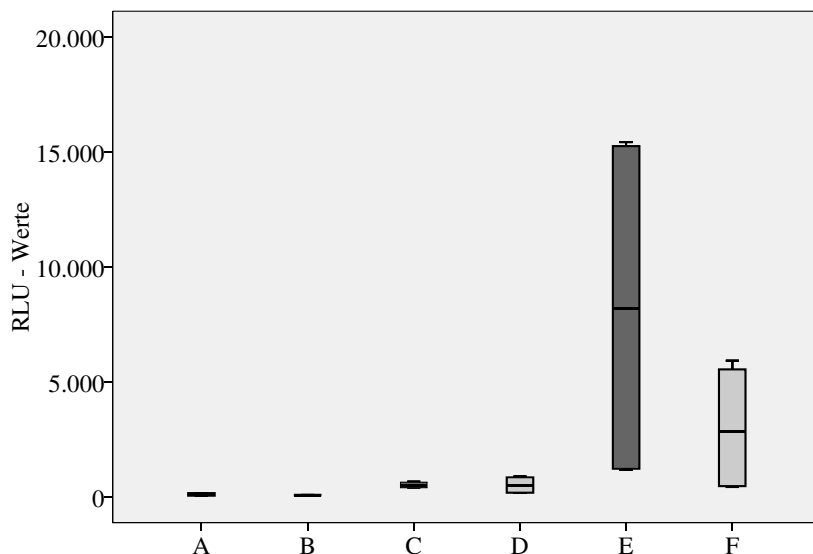


Abb. 7: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb B (in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, B = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, C = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPPA im Labor, D = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPPA im Labor, F = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPP im Labor

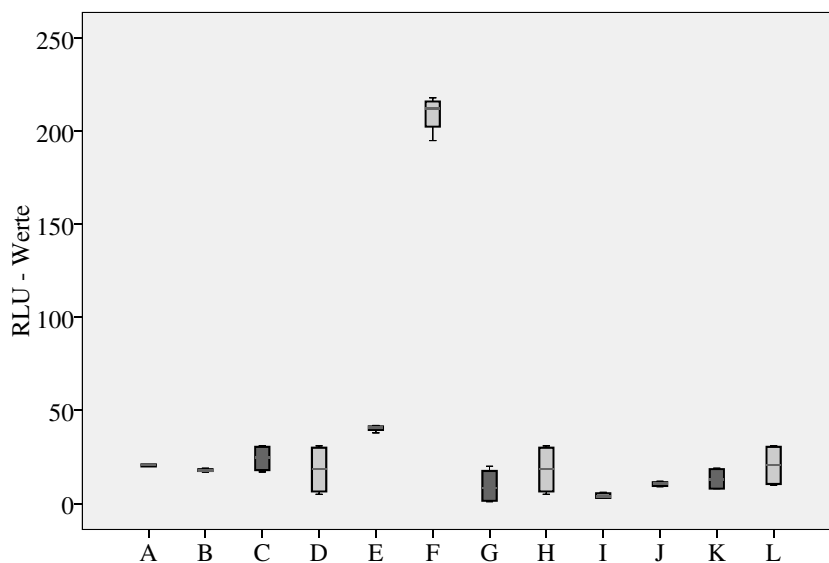


Abb. 8: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb C (Fruchtsaftabfüller; in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Betrieb, B = Betriebswasser gemessen mit LPP im Betrieb, C = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, D = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser gemessen mit LPPA im Betrieb, F = Nachspülwasser gemessen mit LPP im Betrieb, G = Nachspülwasser gemessen mit LPPA gemessen im Labor, H = Nachspülwasser gemessen mit LPP im Labor, I = Nachspülwasser gemessen mit LPPA nach Füllung im Betrieb, J = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPP im Betrieb, K = Nachspülwasser gemessen mit LPPA nach Füllung im Labor, L = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPP im Labor

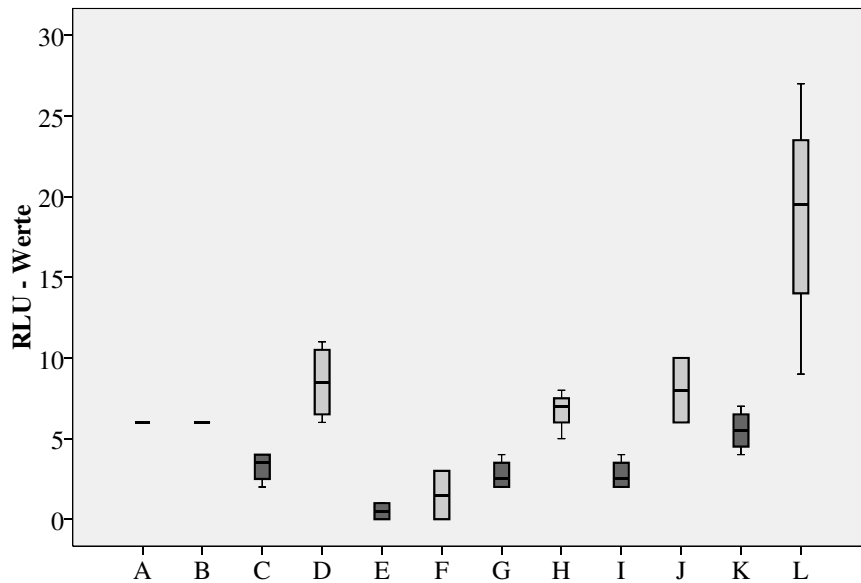


Abb. 9: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb D (in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPPA am Weingut, B = Betriebswasser gemessen mit LPP am Weingut, C = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, D = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser gemessen mit LPPA am Weingut, F = Nachspülwasser gemessen mit LPP am Weingut, G = Nachspülwasser gemessen mit LPPA im Labor, H = Nachspülwasser gemessen mit LPP im Labor, I = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPPA am Weingut, J = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPP am Weingut, K = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPPA im Labor, L = Nachspülwasser nach Füllung gemessen mit LPP im Labor

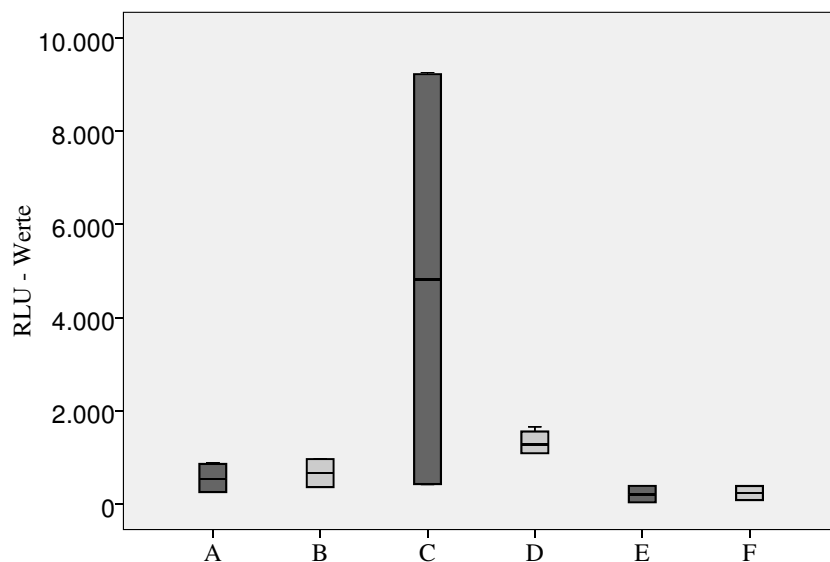


Abb. 10: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb E (in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, B = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, C = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPPA im Labor, D = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser nach Reinigung gemessen mit LPPA im Labor, F = Nachspülwasser nach Reinigung gemessen mit LPP im Labor

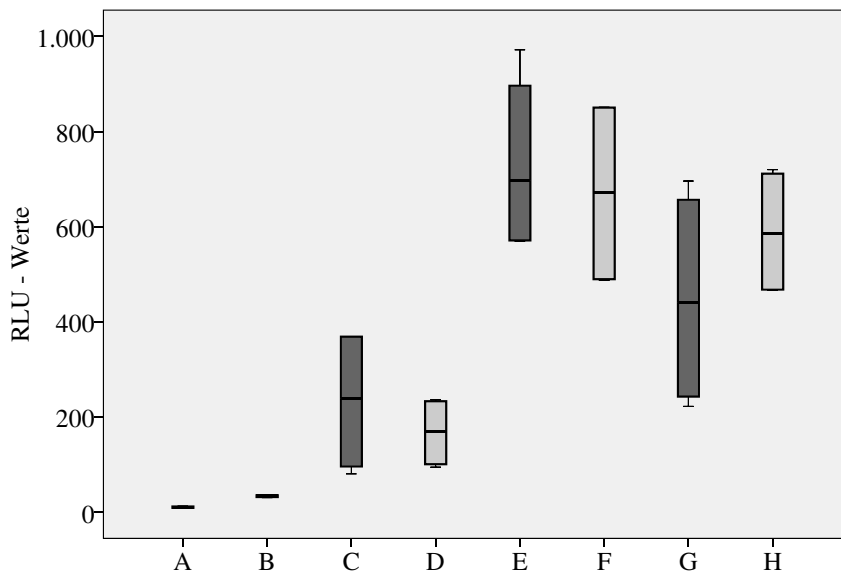


Abb. 11: Messwerte (LPP; LPPA) des Betriebswassers im Betrieb F (in RLU)

A = Betriebswasser gemessen mit LPPA am Weingut, B = Betriebswasser gemessen mit LPP am Weingut, C = Betriebswasser gemessen mit LPPA im Labor, D = Betriebswasser gemessen mit LPP im Labor, E = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPPA im Labor, F = Nachspülwasser vor Reinigung gemessen mit LPP im Labor, G = Nachspülwasser nach Reinigung gemessen mit LPPA im Labor, H = Nachspülwasser nach Reinigung gemessen mit LPPA im Labor

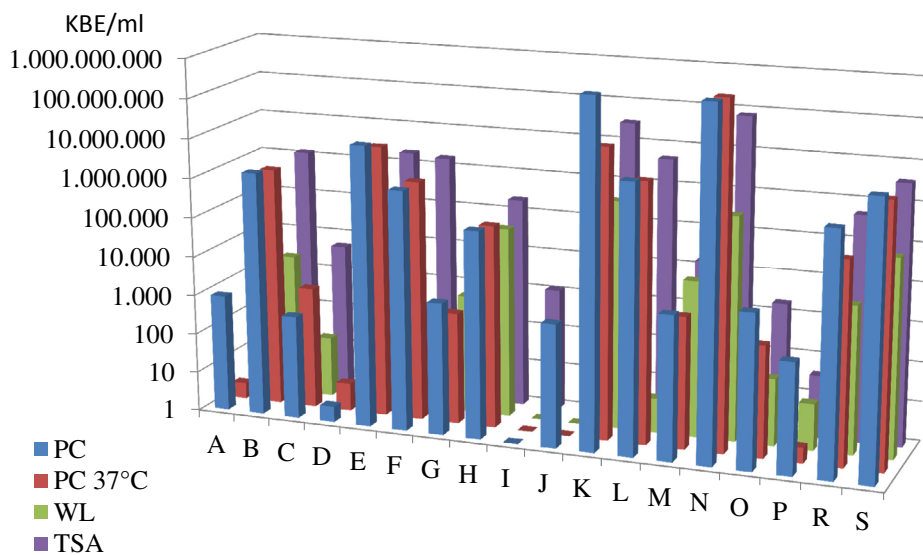


Abb. 12: Logarithmische Darstellung von Keimzahlen aus verschiedenen Betriebswässern auf verschiedenen Nährmedien (in KBE/ml)

A = Weingut A Betriebswasser, B = Weingut B Betriebswasser, C = Weingut C Betriebswasser, D = Weingut D Betriebswasser, E = Weingut E Betriebswasser, F = Weingut F Betriebswasser, G = Weingut A Nachspülwasser aus Füller, H = Weingut B Nachspülwasser vor Reinigung, I = Weingut C Nachspülwasser aus Füllung, J = Weingut D Nachspülwasser nach Dampfsterilisation, K = Weingut E Nachspülwasser vor Reinigung, L = Weingut F Nachspülwasser vor Reinigung, M = Weingut A Nachspülwasser nach Füllung, N = Weingut B Nachspülwasser nach Füllung, O = Weingut C Nachspülwasser nach Füllung, P = Weingut D Nachspülwasser nach Füllung, R = Weingut E Nachspülwasser nach Reinigung, S = Weingut F Nachspülwasser nach Reinigung

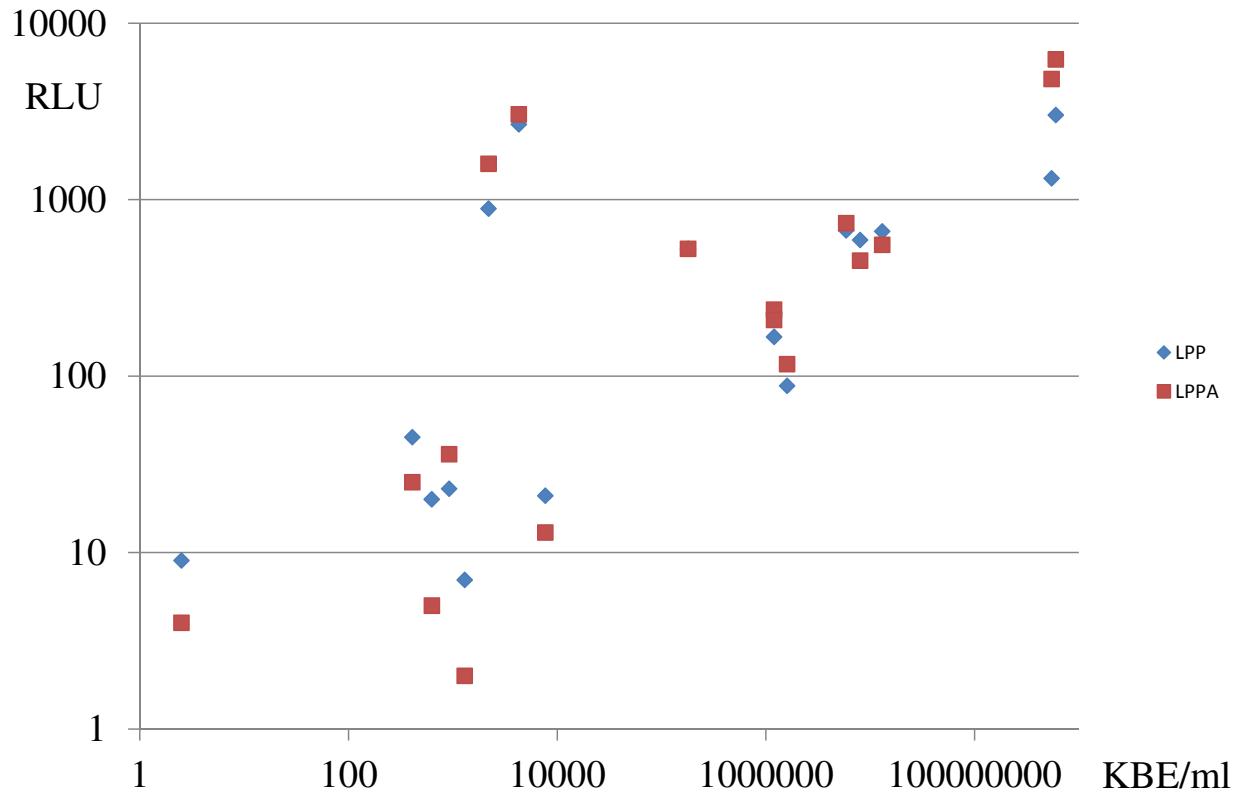


Abb. 13: RLU-Werte und Keimzahlen des Laborwasser auf Plate Count Agar (LPP und LPPA); die Darstellung erfolgte auf beiden Achsen logarithmisch.

BESTIMMUNG DER KEIMZAHLEN AUS BETRIEBSWÄSSERN AUF VERSCHIEDENEN NÄHRMEDIEN

In Abbildung 12 werden die Keimzahlen der verschiedenen Betriebswässer der Betriebe auf verschiedenen Nährmedien (PC bei 22 °C, PC bei 37 °C, WL bei 22 °C und TSA bei 22 °C) in KBE/ml (koloniebildenden Einheiten pro ml) dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass das Keimwachstum sehr stark vom Medium wie auch von der Temperatur abhängig ist. Die logarithmische Darstellung wurde gewählt, um alle Proben in einer Grafik darstellen zu können.

RLU-WERTE UND KEIMZAHLEN DES LABORWASSER AUF PLATE COUNT AGAR

In Abbildung 13 werden die des PC-Mediums gegenübergestellt und logarithmisch dargestellt. Die Werte der Betriebswässer (LPP und LPPA) werden überblicksmäßig grafisch dargestellt, um miteinander visuell verglichen werden zu können.

IDENTIFIZIERUNG DER KEIME IN BETRIEBSWÄSSERN

In zwei Betrieben mit eigener Waschwasserversorgung aus Hausbrunnen konnten mit Hilfe des VITEK® 2 Compact bedenkliche Keime isoliert werden. Im Betrieb B wurden *Pseudomonas fluorescens* (97 %), *Aeromonas sobria* (93 %), *Aeromonas salomonicida* (98 %) und *Pseudomonas aeruginosa* (96 %) nachgewiesen. Im Weingut E wurden *Aeromonas salomonicida* (98 %), *Pseudomonas fluorescens* (99 %), *Pseudomonas putida* (99 %) und *Klebsiella ornithiolytica* (99 %) bestimmt.

Im Weingut A, D, F und im Betrieb C konnten keine potentiell pathogenen Keime nachgewiesen werden.

DISKUSSION

In vorliegender Arbeit wurde die Verkeimung und somit der Verschmutzungsgrad von Betriebswässern von fünf Weinkellereien und einem Fruchtsaftabfüller mittels ATP-Stäbchen (LuciPacPen-Aqua (LPPA) und LuciPacPen (LPP)) untersucht. Die Ergebnisse mit Bakterien- bzw. Hefesuspensionen haben gezeigt, dass die beiden Testsysteme, LuciPacPen und LuciPacPen-Aqua, gut vergleichbare Ergebnisse liefern, trotzdem ist es empfehlenswert, sich während einer Mess-Serie bzw. in einem Betrieb auf eines der beiden Systeme zu beschränken.

Die Untersuchungen der verschiedenen Betriebswässer ergaben, dass die ATP-Stäbchen sehr gut für die Überprüfung des Reinigungserfolges geeignet sind, es kann mit ihnen der Status vor und nach der Reinigung einfach überprüft werden. ATP-Stäbchen geben in wenigen Minuten Auskunft über die Verkeimung (ATP-Werte) von Oberflächen und Flüssigkeiten und damit indirekt über die zelluläre Aktivität des Probemediums. Bei Untersuchungen von Wasser und Flüssigkeiten sollte bedacht werden, dass das normale Leitungswasser ATP enthält und dieser Wert immer als Referenz herangezogen werden muss. Bezugnehmend auf den Ausgangswert ist leicht festzustellen, ob das Wasser einen bestimmten Verschmutzungsgrad überschritten hat oder nicht.

Mittels eines Laborversuches konnte gezeigt werden,

dass es durch die Denaturierung der Zellmembran infolge einer Hitzeeinwirkung zu einem erhöhten Austritt von ATP aus den Zellen kommt. Auch die Autolyse von Zellen infolge längerer Standzeiten führt zu höheren ATP-Werten. Bei einigen Proben erfolgten die ATP-Messungen unmittelbar nach der Probenziehung im Betrieb, bei anderen wurde erst später im Laboratorium gemessen. Dies beeinträchtigt aber die Vergleichbarkeit der Werte, da während der Standzeiten die ATP-Werte stark ansteigen (LAUTENSCHLAGER et al., 2010; CARRICK et al., 2001). Es sollten daher bei künftigen Mess-Serien die Messung direkt im Betrieb erfolgen und Standzeiten der Proben vermieden werden.

Die ATP-Aktivität der Wässer aus dem Gemeindewassernetz lag meist um die 20 RLU. Dieser Wert entspricht fast genau dem des Wassers aus dem Laboratorium der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg (15 RLU). Die Betriebe, die das Wasser aus dem Gemeindewassernetz bezogen, lagen alle um diesen Bereich und wie die hier vorliegenden Untersuchungen gezeigt haben, ist dieses Wasser für die Reinigung von Füllanlagen gut geeignet. Es hat sich gezeigt, dass die Bestrahlung des Wassers mit UV-Lampen zu einer Verringerung der Keimzahl führt und somit einen positiven Einfluss auf die Qualität des Wassers hat. Im Betrieb D wies das Betriebswasser mit einem RLU-Wert von 6 eine sehr geringe ATP-Aktivität auf. Die Werte dieses Betriebs beweisen, dass es möglich ist, mit gutem Reinigungsmanagement die Verunreinigung von Betriebswasser zu minimieren und eine Abfüllung mit sehr niedrigen Keimzahlen durchzuführen.

Die Betriebe, die Brunnenwasser zur Reinigung verwendeten, zeigten sehr hohe RLU-Werte und auch visuell erkennbare Biofilmbildungen bei den Anlagen. Das Wasser entsprach auf keinem Fall den Anforderungen der Trinkwasserverordnung und beinhaltete sogar Keime der Sicherheitsstufe zwei, die bei immungeschwächten Personen zu schweren Krankheiten wie Lungenentzündungen führen können.

Die verschiedenen Reinigungstechniken haben einen großen Einfluss auf die Sauberkeit der Anlage, viel wichtiger ist jedoch die Qualität des Wassers. Sauberes Wasser vermag sehr viele Biofilme zu entfernen, und ein regelmäßiges Reinigen kann prophylaktisch gegen die

Bildung von Biofilmen wirken. Wasser, das der Trinkwasserverordnung nicht entspricht und bedenklich ist, sollte nicht zur Reinigung von Füllanlagen in der Lebensmittelproduktion verwendet werden. Es ist bekannt, dass manche Bakterien im Wein (ZIEGELWAGNER, 2012) überleben können und ein Risiko für den

Menschen darstellen. Für das Produkt sind vor allem Milchsäurebakterien, Essigsäurebakterien und Hefen (BACK, 1994), die häufig in Biofilmen von Anlagen festgestellt werden, als produktschädlich zu betrachten.

LITERATUR

BACK, W. 1994: Farbatlas und Handbuch der Getränkebiologie - Nürnberg: Verlag Hans Carl, 1994

BODENSCHATZ, S. 2005: Kompaktwissen Desinfektion: Neuauflage des Standardwerks, Handbuch für den Desinfektor – Hamburg: Behr's Verlag, 2005

CARRICK, K., BARNEY, M., NAVARRO, A. AND RYDER D. 2000: The comparison of four bioluminometer and their swab kits for instant hygiene monitoring and detection of microorganisms in the brewery. *Journal of Institute of Brewing* 107 (1)

HALLAM, N.B., WEST, J.R., FORSTER, C.F. AND SIMMS, J. 2001: The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res.* 35 (17): 4063-4071

HAMMES, F., BERNEY, M., WANG, Y., VITAL, M., KÖSTER, O. AND EGLI, T. 2008: Flow- Cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.* 42 (1-2): 269 – 277

KRAMER, A., SCHWEBKE, I. AND KAMPE, G. 2006: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review *BMC Infectious Diseases* (6): 130

KERNEYS, A., NAKACHE, F., DEGUIN, A., FEINBERG, M. 1995: The effects of water residence time on the biological quality in a distribution network. *Water Res.* (29): 1719 – 1727

LAUTENSCHLAGER, K., BOON, Y., WANG, N., EGLI, T. AND HAMMES, F. 2010: Overnight stagnation of drink-

ing water in household taps induces microbial growth and changes in community composition. *Water Research* (44): 4868 -4877

NIQUETTE, P., SERVAIS, P. AND SAVOIR, R. 2000: Impact of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Res.* (34): 1952 – 1956

RINTA – KANTO, J.M., LEHTOLA, M.J., VARTIANINEN, T. AND MARTIKAINEN, P.J. 2004: Rapid enumeration of virus – like particles in drinking water samples using SYBR green I-Staining. *Water Res.* (38): 2614 – 2618

SATORY, D.P. 2004: Heterotrophic plate count monitoring of treated drinking water in the UK, a useful operation tool. *Int. J. Food Microbiol.* (92): 297-306

SERVAIS, P., BILLEN, G., LAURENT, P., LEVI, Y., RANDON, G. 1992: Studies of BDOC and bacterial dynamics in the drinking water distribution system of the Northern Parisian suburbs. *Revue des Sci. de léau* (5): 69 -89

SERVAIS, P., LAURENT, P. AND RANDON, G. 1995: Comparison of bacterial dynamics in various French distribution systems. *J. Water Sci. Res. Technol. –Aqua* (44): 10-17

SIEBEL, E., WANG, Y., EGLI, T. AND HAMMES, F. 2008: Correlation between total cell concentration, total adenosine triphosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drinking Engineering and Science Discussions* (1): 71 – 86

STORGÅRDS, E., TAPANI, K., SINEBRYCHOFF, O., HARTWALL, P., HARTWALL, O., SALEVA, R., OYJ, O. AND SUIHKO, M-L. J. 2006: Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants. *Am. Soc. Brew. Chem.* 64(1):8-15

TIMKE, M., WANG-LIEU, ALTENDORFER, K., LAUTENSCHLAGER, K., BOON, Y., WANG, N., EGLI, T. AND HAMMES F. 2008: Overnight stagnation of drinking water in household taps induces microbial growth Lipski, Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek* (93):151-161

Trinkwasserverordnung Verordnung des Bundesministers für soziale Sicherheit und Generationen über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch (Trinkwasserverordnung - TWV) StF: BGBl. II Nr. 304/2001 [CELEX-Nr.: 398L0083] 2001

ZIEGELWAGNER, C., SILHAVY-RICHTER K. UND MANDL K. 2012: Antimikrobielle Wirkung von Wein Ithakajournal (1): 47-56

ZIETZ, B.P., DE VERGARA, J.D., DUNKELBERG, H. 2003: Copper concentrations in tap water and possible effects on infant`s health results of a study in Lower Saxony, Germany, *Environ. Res.* (92): 129-138

ZIETZ, B.P., LASS, J., SUCHENWIRTH, R. 2007: Assessment and management of tap water lead concentration in Lower Saxony, Germany. *Int. J. Environ. Health Res.* (17): 407 -418

VENKATESWARAN, K., HATTORI, N., MYRON, L.D., KERN, R. 2003: ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities *Journal of Microbiological Methods* (52): 367 -377

Eingelangt am 26. Mai 2015