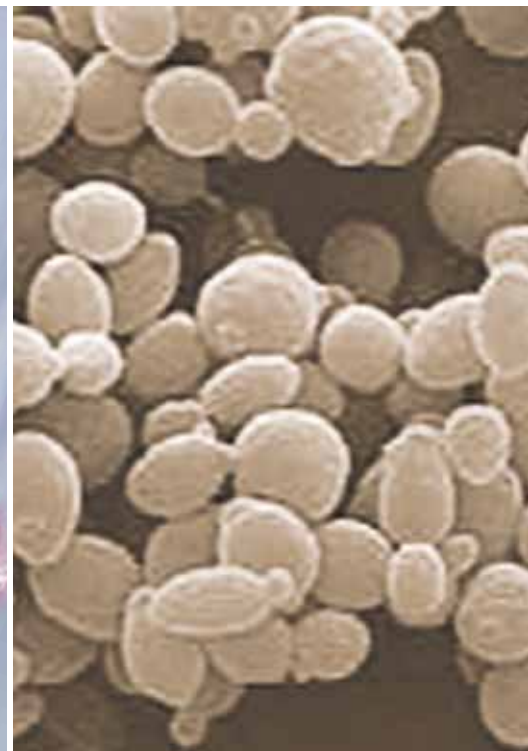




sartorius stedim
biotech

Mikrobiologie und Wein
Vorsorge und Kontrolle für
Produkt und Betrieb



turning science into solutions

Inhalt

1. Ziel des Projekts	4
2. Welche Keime kommen im Wein produzierenden Betrieb vor?	5
3. Untersuchungsmethoden	7
4. Materialien zur mikrobiologischen Untersuchung in der Routine	16
5. Fließschema Weinherstellung und Checklisten für die Kontrolle	20
6. Reinigung und Checklisten für die Reinigung	26
7. Hygieneschulung	31
8. Risikoabschätzung und HACCP	36

1. Ziel des Projekts

Diese Abhandlung soll den Wein produzierenden und Wein verarbeitenden Betrieb dabei unterstützen, sein Produkt und seine Betriebshygiene zu prüfen und mikrobiologisch zu bewerten.

Es wird zuerst beschrieben, welche Keime in den Weinbetrieben am häufigsten vorkommen können, und welche Eigenschaften des Traubenmostes, des Weins oder unterschiedlicher Additive das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen. Auf die unterschiedlichen mikrobiologisch verursachten Weinkrankheiten wird nicht eingegangen, dazu gibt es einschlägige Fachliteratur.

Im dritten Kapitel werden Untersuchungsmethoden erklärt und besprochen, die in den unterschiedlichen Bereichen und für unterschiedliche Proben eingesetzt werden sollten. In der weiteren Folge werden Geräte und Nährmedien aufgeführt, die zu diesem Zweck verwendet werden können. Auch auf weiterführende Methoden zur Keimdifferenzierung und Kolonie-Identifizierung wird eingegangen.

Anhand eines Fließschemas werden die unterschiedlichen Prozessschritte der Weinherstellung von der angelieferten Traube bis zur abgefüllten Flasche aufgezeichnet, und für jede Stufe die Risikobewertung vorgenommen.

Schließlich wird anhand dieses Fließschemas ein Untersuchungsplan erstellt, der für die Routineüberprüfung im Betrieb eingesetzt werden kann. Der Untersuchungsplan schließt eine Stufenkontrolle mit ein, die für solche Fälle anzuwenden ist, wenn im Fertigprodukt eine mikrobiologische Kontamination aufgetreten ist. Hier wie in der Routinekontrolle werden Methoden, Nährmedien und Beurteilungskriterien empfohlen.

Kapitel 6 enthält wichtige Hinweise zur Reinigung von Anlagen im Routinebetrieb, und das 7. Kapitel ergänzt die Reinigung durch eine Hygieneschulung.

Dr. Elke Just und Hildegard Regnery

2. Welche Keime kommen im Wein produzierenden Betrieb vor?

Die Antwort auf die Frage, welche Mikroorganismen in einem Produkt oder in einem Produktionsbereich vorkommen, hängt zum einen von den jeweiligen Umgebungsbedingungen in dem Produkt oder Produktionsbereich ab, zum anderen auch von den speziellen Ansprüchen, die verschiedene Mikroorganismen an ihr Wachstum haben.

Zur Gärung selbst sind bestimmte Stämme der Gärhefen zwingend erforderlich, ebenso werden in vielen Fällen gezielt Milchsäurebakterien eingesetzt. Beide Gruppen sind in diesen Stadien natürlich nicht als Schädlinge anzusehen. Später allerdings, wenn der fertige Wein in Flaschen abgefüllt ist, müssen diese Mikroorganismen abgetrennt oder inaktiviert werden, um nicht durch erneut einsetzendes Wachstum den Wein zu verändern. Im abgefüllten Wein sind daher alle Mikroorganismen unerwünscht und als Schädlinge anzusehen.

Für Traubenmost sind ein niedriger pH-Wert charakteristisch, ein gutes Angebot an Nährstoffen wie Zucker, Eiweiß und Spurenelemente und aerobe Belüftung. Das läßt zum Beispiel Essigsäurebakterien wachsen, ebenso Hefen, Schimmelpilze und speziell diejenigen Milchsäurebakterien, die sich auch bei Anwesenheit von Sauerstoff entwickeln können. Im abgefüllten Wein dagegen liegen anaerobe Bedingungen vor, und es ist Alkohol vorhanden. Beides hemmt das Wachstum von Schimmelpilzen, so daß diese Gruppe nicht als Weinschädling auftritt sondern nur als Trauben- und Mostschädling. Für die streng aerob wachsenden Essigsäurebakterien gilt vergleichbares. Dafür begünstigen die anaeroben Bedingungen im Wein das Wachstum von Milchsäurebakterien, weshalb diese die wichtigsten bakteriellen Schädlinge des abgefüllten Weins darstellen. Hefen können sowohl Alkohol als auch anaerobe Bedingungen ertragen, deshalb stellen sie generell die Hauptschädlinge des abgefüllten Weins dar.

Triviale Keime, wie sie aus Wasser und Luft oder durch Verschmutzung eingetragen werden können, schädigen nicht das Produkt, denn sie können sich bei den dort herrschenden Bedingungen nicht vermehren. Allerdings können sie, falls in größerer Menge vorhanden, zur Zehrung der konservierenden SO_2 beitragen. Auch ein Befall mit Hefen ist unterschiedlich kritisch zu werten je nach Art und Gattung der Hefe. Während die gärstarken Hefen den Wein in Kürze zur Gärung bringen, wobei die Explosion der Flaschen häufig ist, können die gärschwachen Hefen allenfalls eine Trübung hervorrufen.

In jedem Fall ist aber bei positivem mikrobiologischem Befund mit unerwünschten geschmacklichen Veränderungen des Weins zu rechnen.

Hier ein kurzer Überblick über die häufigsten möglichen Schadkeime:

Bakterien

Triviale Bakterien, die keine Produktschädlinge sind (Gesamtkeimzahl)

Diese Keime wirken sich nicht auf Geschmack oder Geruch des Weins aus. Dennoch sollte ihre Zahl nicht zu hoch sein, denn sie tragen zur Zehrung des freien SO_2 bei, wodurch möglicherweise die Stabilität des Weins beeinflusst werden könnte. Zu diesen Keimen gehören:

- Wasserbakterien, die über das Wasch- und Spülwasser eingetragen werden.
- Hygienerelevante Bakterien, die einen Einblick in das hygienische Umfeld liefern.
- Luftgetragene Bakterien, die aufgrund ihrer Überlebensfähigkeit verbreitet werden.

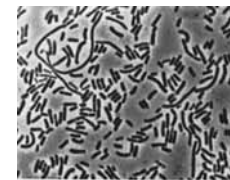
Produktschädigende Bakterien

Die produktschädigenden Bakterien kommen ursprünglich von den Blättern des Weinstocks und von den Traubenbeeren selbst. Durch mangelnde Hygiene können sie bis in das fertige Produkt verschleppt werden. Die Auswirkungen, die sie auf den Wein haben, werden als unterschiedliche Weinkrankheiten beschrieben, auf die hier nicht näher eingegangen wird. Prinzipiell kann gesagt werden, dass Milchsäurebakterien, wenn sie in der abgefüllten Flasche erneut zu wachsen beginnen, zu Trübungen führen, die den Geschmack des Weins negativ beeinflussen. Hauptsächlich

entstehen Milchsäure- und Essigsäureschmack, aber auch andere störende Geschmacksnoten. Sie können sowohl einen Säureabbau bewirken, als auch eine schleimige, ölige Konsistenz des Weins hervorrufen. Essigsäurebakterien sind in jedem Fall Verursacher eines Fehlgeschmacks. Gelegentlich sind im Wein auch sporenbildende Bakterien nachzuweisen. Diese Mikroorganismen wachsen allerdings nicht bei dem für Wein normalerweise charakteristischen pH-Wert und treten oft erst als Folgeschädlinge auf, wenn der Wein bereits einen weitgehenden Säureabbau durchgemacht hat.

Milchsäurebakterien: Homofermentative und heterofermentative Milchsäurestäbchen:

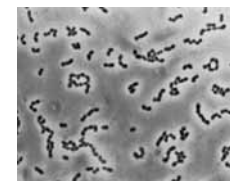
Lactobacillus brevis
Lactobacillus buchneri
Lactobacillus casei
Lactobacillus fermentum
Lactobacillus fructivorans
Lactobacillus lindneri
Lactobacillus plantarum



Lactobacillus brevis

Milchsäurekokken:

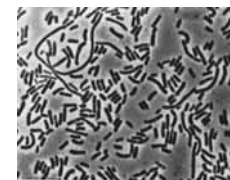
Oenococcus oeni
Pediococcus inopinatus
Pediococcus damnosus
Pediococcus pentosaceus



Leuconostoc mesenteroides

Essigsäurebakterien:

Acetobacter aceti
Acetobacter pasteurianus
Gluconobacter oxydans



Acetobacter aceti

Hefen

Hefen sind im Fertigprodukt prinzipiell unerwünscht, selbst wenn sie nicht zu den gärstarken Typen gehören, von denen unmittelbare Gefahr einer Nachgärung ausgeht.

Hefen können in Sporenform im Boden überdauern, aber meistens stammen sie von der Oberfläche der Traubenbeeren, auf denen Zahlen bis zu 100 000 Hefen pro Beere zu finden sind. Durch die Spaltöffnungen finden sie einen natürlichen Zugang zum Inneren, und wenn die Beeren durch Bissverletzungen von Insekten verletzt worden sind, finden Hefen hier eine zusätzliche Zugangsmöglichkeit. Meistens sind die schwach gärenden Hefen in der Überzahl vorhanden und werden erst später zahlenmäßig von den stark gärenden überholt. Sie können Fehlgerüche und -geschmäcke im Wein erzeugen oder den Alkohol abbauen. Die sauerstoff-bedürftigen Hefen (Atmungshefen) sind im Most problematisch, im Wein haben sie keine guten Wachstumsmöglichkeiten mehr.

Gärhefen:

Saccharomyces cerevisiae, verschiedene Unterarten bzw. Stämme

Wilde Hefen:

gärstarke Hefen:

Saccharomyces ludwigii
Schizosaccharomyces pombe
Zygosaccharomyces bailii
Zygosaccharomyces florentinus

gärfähige Hefen:

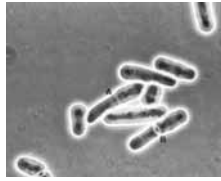
Kloeckera apiculata
Pichia anomala
Saccharomyces kluyveri
Torulasporea delbrueckii
Zygosaccharomyces rouxii
Zygosaccharomyces microellipsoides

gärschwache Hefen:

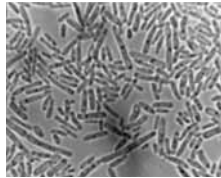
Brettanomyces anomalus
Brettanomyces bruxellensis
Candida
Dekkera
Hansenula
Pichia anomala

Atmungshefen:

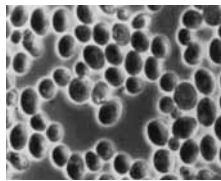
Candida
Cryptococcus albidus
Debaromyces hansenii
Pichia membranefaciens
Rhodotorula glutinis



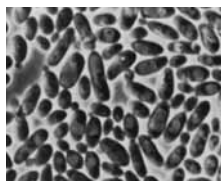
Schizosaccharomyces pombe



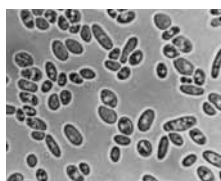
Brettanomyces naardenensis



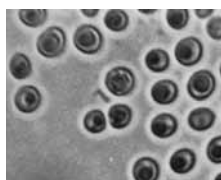
Zygosaccharomyces rouxii



Pichia membranefaciens



Saccharomyces cerevisiae



Rhodotorula glutinis

Schimmelpilze

Schimmelpilze sind im Wein normalerweise kein Problem, können aber durch Vorschädigung der Trauben Geschmacksfehler verursachen.

Aspergillus
Aureobasidium pullans
Bothrytis cinerea
Mucor
Penicillium



Aspergillus



Penicillium

Im Traubenmost herrscht also ein anderer Bewuchs an Keimen vor als im gegorenen Wein, man findet daher eine Verschiebung der mikrobiellen Flora von der Traube zur Flasche.

Zuerst hat man eine Vorherrschaft der wilden Hefen, die keine starke Gärung verursachen können, die aber während ihres Wachstums den Gehalt an Sauerstoff im Traubenmost reduzieren und so Wegbereiter für die Gärhefen sind.

Auch die Essigsäurebakterien können nur bei Anwesenheit von Sauerstoff wachsen und gehen in dem Maße zurück, in dem der Sauerstoff weniger wird. Falls sie nicht sogar absterben, haben sie doch wenigstens keine Wachstums- und Vermehrungschancen mehr. Gleiches gilt letztlich auch für die Schimmelpilze. Beide Gruppen können jedoch im Traubenmost bereits starke Fehlgeschmäcke verursachen, die sich später im Wein nicht mehr entfernen lassen.

Es wird immer wieder von Anwenderseite gefragt, welche Keimzahlen man in der abgefüllten Flasche tolerieren kann, ohne Probleme befürchten zu müssen. Leider bekommt man dazu nie eine verbindliche Aussage. Auch wir können darauf keine Antwort geben. Zu entscheidend sind dabei nämlich die individuellen Gegebenheiten von Produkt und Betrieb als daß Verallgemeinerungen hilfreich wären. Trockenem, durchgegorenen Weinsorten werden einige wenige Hefen pro Flasche nicht schädlich. Anders ist es bei Weinen mit hoher Restsüße, bei denen auch schon vereinzelte Hefezellen zur Nachgärung führen können. Neben dem Gehalt an Restsüße spielt auch der Gehalt an freier SO_2 eine Rolle. Und natürlich ist es wichtig, um welche Art von Hefe es sich handelt. Ist es eine Gärhefe oder nur eine Atmungshefe? Letztere stellt keine akute Gefährdung des Produktes dar, erstere schon. Ähnliches trifft auch zu für den Gehalt an Bakterien zu.. Viele Weinkellereien führen lediglich einen Hefenachweis und vernachlässigen die Anwesenheit von Bakterien. Das kann aber gefährlich sein, denn viele der Weinkrankheiten sind bakteriellen Ursprungs. Neben der bloßen Anwesenheit von Bakterien ist auch wenigstens eine Grobidentifizierung erforderlich, um den Grad der Produktgefährdung abzuschätzen, den ihre Anwesenheit darstellen könnte.

3. Untersuchungsmethoden

Die mikrobiologische Überwachung eines Betriebes zielt schlussendlich auf die Unbedenklichkeit des Endproduktes, also des abgefüllten Weins und seiner unterschiedlichen Vorstufen in der Verarbeitung vom Traubenmost über den Lagerkeller bis zur Endfiltration. Hier hat man es mit flüssigen Proben zu tun, für die in erster Linie das Membranfilterverfahren einzusetzen ist. Darüber hinaus müssen aber auch die Anlagen überwacht werden, denn die Mehrzahl aller mikrobiologischen Verunreinigungen stammen aus dem Füller oder dem Verschließer. Hier hat man es statt mit flüssigen Proben mit Oberflächen zu tun, für die andere Untersuchungsmethoden eingesetzt werden müssen. Die Bestimmung der Oberflächenkeimzahl ist ein ganz wichtiger Faktor der Betriebshygiene und an zahlreichen Stationen unerlässlich.

Abhängig von den räumlichen Gegebenheiten des Betriebes ist das Risiko einer mikrobiologischen Verunreinigung durch Luft größer oder kleiner. Auszuschließen ist es aber in keinem Fall, weshalb die mikrobiologische Überprüfung der Luft immer gebräuchlicher wird.

Ein relativ geringes Risiko stellt die Druckluft dar. Falls Untersuchungen erforderlich werden, steht auch dafür eine Methode zur Verfügung.

3.1. Untersuchung flüssiger Proben 3.1.1. Das Membranfilterverfahren

Ziel des Membranfilterverfahrens ist es, aus einer möglichst großen Probemenge einige wenige Mikroorganismen zu isolieren und in der folgenden Bebrütung auf geeignetem Nährmedium als Kolonie nachzuweisen. Nur so ist eine frühzeitige Erkennung einer Spureninfection möglich. Dazu wird neben einer Vakuumquelle ein Filtrationsgerät aus Filterhalter, Filtertrichter und Saugflasche benötigt (1).



| 1

In das Filtrationsgerät wird auf den Filterhalter ein Membranfilter aufgelegt (2), die Probe wird in den Filtertrichter eingegossen (3)



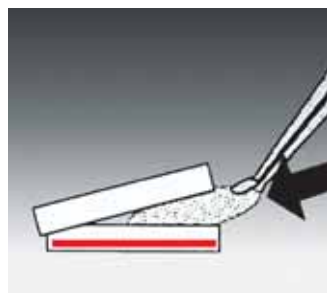
| 2

und durch Anlegen des Vakuums in die Saugflasche gezogen. Dabei werden die



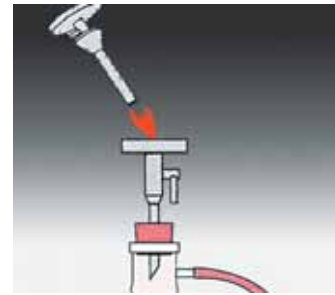
| 3

Mikroorganismen auf der Filteroberfläche zurückgehalten und aus dem filtrierten Volumen aufkonzentriert. Durch Nachspülen des Filters mit einigen ml sterilen Wassers entfernt man die Reste und Rückstände aus der Probe und legt nun den Membranfilter auf einen geeigneten Nährboden (4), wo es für die vorgeschriebene Zeit bebrütet wird. Im Anschluss daran liest man die Anzahl der Kolonien ab,



| 4

die mit der aufkonzentrierten Anzahl an Mikroorganismen aus der Probe gleichzusetzen ist. Das Filtrationsgerät muss zwischen 2 Proben stets desinfiziert werden, was in der Routine durch Abflammen der Filterunterstützung (5), der Trichterunterseite (6) und des Trichterinneren (7) erfolgt,



| 5

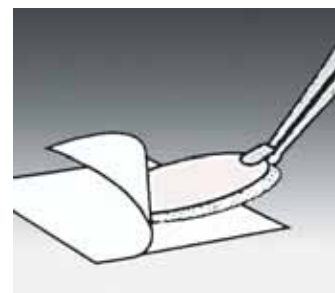


| 6



| 7

oder durch das Abbrennen von Alkohol im Filtertrichter. Die Membranfilter werden mit einer Spezialpinzette aufgelegt und entnommen (8), auch diese muss jedes Mal durch Abflammen sterilisiert werden (9).



| 8



| 9

Der Einfachheit halber wählt man einzeln steril verpackte Membranfilter, da diese nicht sterilisiert werden müssen sondern sofort einsatzbereit sind.



Durchführung einer Filtration

1 | Vorbereitung des Filtrationsgerätes
Korrekte Durchführung einer Filtration

2 | Vor Arbeitsbeginn alle nicht zur Versuchsdurchführung nötigen Gegenstände wegräumen.
Arbeitsfläche gut reinigen und desinfizieren.
Geräte wie Pinzetten sind in einem Gefäß mit Alkohol bereitzustellen.

3 | Für einfache mikrobiologische Untersuchungen ist keine Laminar Flow Box erforderlich. Sie verursacht bei unsachgemäßem Gebrauch eher Kontaminationen als davor zu schützen! Einen guten Schutz vor Kontamination aus der Luft bietet jedoch das Arbeiten dicht neben der Flamme eines Bunsenbrenners.



4 | Die erforderliche Anzahl an Petrischalen bereitstellen und beschriften.



5 | Vakuumbahn öffnen und Filtriertisch ca. 10 sec. lang abflammen.
Vakuumbahn wieder schließen.



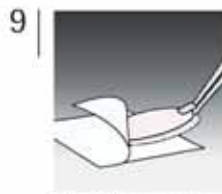
6 | Filtertrichter an beiden Seiten der Klammer fassen und für ca. 10 sec die Unterseite gut abflammen.
Wieder auf den Filtriertisch aufsetzen.



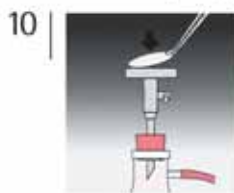
7 | Vakuumbahn öffnen und Innenraum des Filtertrichters abflammen.
Vakuumbahn wieder schließen.
Zum schnelleren Abkühlen kann der Filtertrichter mit einigen ml sterilem Wasser gespült werden.



8 | Pinzette stets in einem Glas mit Alkohol aufbewahren.
Diesem entnehmen und abflammen.
Kurz abkühlen lassen.



9 | Sterilfilterverpackung aufreißen ohne Berührung des Filters.
Das Filter zusammen mit dem gelben Schutzblättchen mit der Pinzette aus der Einzelverpackung entnehmen.



10 | Beides gemeinsam auf den Filtriertisch legen.
Beim Kontakt mit der feuchten Fritte rollt sich das gelbe Schutzblättchen zusammen.



11 | Schutzblättchen entfernen und werfen.



12 | Filtertrichter aufsetzen und mit der Klammer verschließen.



13 | Probe eingießen, filtrieren und mit einigen ml sterilem Wasser nachspülen, um alle Produktreste und evtl. vorhandene Hemmstoffe zu entfernen.
Vakuumbahn wieder schließen.



14 | Filtertrichter entfernen und Filter entnehmen.



15 | Filter unter Vermeidung von Luft-einschlüssen auf die Nährbodenplatte legen.
Deckel der Petrischale nur vorsichtig anheben, um Kontaminationen durch Luftkeime zu vermeiden.



16 | Petrischalen in den Brutschrank stellen.
Bebrütungsbedingung genau einhalten.
Nach Ende der Bebrütung sofort auswerten.

Einwegfiltrationsgeräte aus Kunststoff sind bereits steril und brauchen, im Gegensatz zu den Edelstahlgeräten, nicht desinfiziert zu werden.

Der Membranfilter sollte aus Cellulosenitrat bestehen, da dieses Material die besten Wachstumseigenschaften für Mikroorganismen hat. Die Porenweite des Membranfilters richtet sich nach dem Nachweisziel: Zum Nachweis von Bakterien wählt man üblicherweise eine Porenweite von 0,45 µm. Zum Nachweis der viel größeren Hefen und Schimmelpilze ist ein Membranfilter mit 0,65 µm, 0,8 µm, in besonderen Fällen sogar 1,2 µm ausreichend. Diese größeren Membranen haben einen rascheren Durchfluss, dadurch spart man Zeit bei der Filtration. Die Gefahr, dass durch die größere Porenweite Mikroorganismen durch die Membran durchrutschen und so dem Nachweis verloren gehen, ist bei Hefen und Schimmelpilzen absolut nicht gegeben.

In Fällen, in denen das zu untersuchende Volumen zu klein ist für eine Filtration, so wie es bei Rinserflüssigkeit mitunter der Fall ist, können auch diese wenigen Tropfen direkt auf Agarnährboden aufgetropft werden. Das Entfernen von hemmenden Substanzen ist dabei allerdings nicht möglich. Soll das erfolgen (was nach einer Desinfektion durchaus wichtig ist) dann kann man in ein Filtrationsgerät eine Vorlage von einigen wenigen ml sterilen Wassers geben und dann die Tropfen Probe dazugeben. So lassen sich auch sehr kleine Volumina über das Membranfilterverfahren untersuchen, wobei das Auswaschen hemmender Stoffe wie beispielsweise von Desinfektionsmitteln erfolgt.

3.1.2. Flaschenspülverfahren

Bei diesem Verfahren ist es das Ziel, die gereinigten Flaschen mikrobiologisch zu überprüfen. Zu diesem Zweck werden in die gereinigte Flasche ca. 50 ml steriles Wasser eingefüllt und durch kräftiges Schütteln die Keime von den Flaschenwänden abgewaschen, sodass sie bei der folgenden Membranfiltration des Spülwassers wiedergefunden werden.

3.1.3. Methode Mayer-Vetsch

Hier handelt es sich um eine sehr einfach durchzuführende Methode, zu der keinerlei Gerätschaften benötigt werden, die allerdings nur recht hohe Keimzahlen von

einigen 100 pro Flasche erkennen lässt. Man nimmt Röhrchen mit 20 ml eines speziellen Agars, der nicht ganz fest ist und sich noch rühren lässt. Notfalls kann man diesen selber aus einem festen Agarmedium herstellen, indem man dieses verflüssigt und mit sterilem Wasser verdünnt. Mittels einer Pipette werden 2 ml Probe in das Medium eingerührt, vorsichtig und unter Vermeidung von Luftblasen. Während der anschließenden Bebrütung entwickeln sich die damit eingebrachten Mikroorganismen zu Kolonien, die im Agarmedium sichtbar und ausgezählt werden können. Da das Probenvolumen auf ca. 2 ml beschränkt ist, ist jedoch ein Nachweis von Spureninfektionen mit einigen wenigen Keime pro Flasche nicht möglich, sondern es wird erst ein höherer Verkeimungsgrad angezeigt.

3.1.4. Flüssiganreicherung

Diese Methode ist von der Handhabung her ebenfalls einfach, aber aufgrund des kleinen Probenvolumens auch nicht zur Erkennung von Spureninfektionen geeignet. In sterile Reagenzröhrchen mit je 10 ml sterilem Traubensaft werden je 10 ml der zu untersuchenden Weinprobe pipettiert, wobei man die Probe am besten vom Flaschenboden entnimmt, um sedimentierte Keime ebenfalls zu erfassen. In dem Traubensaft wachsen sowohl Hefen als auch Bakterien und sind als Trübung zu erkennen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden ist somit keine quantitative sondern nur eine qualitative Bestimmung möglich (z.B.: 10 ml ohne Befund).

Werden Wein-Mixgetränke untersucht, die Fruchtfleisch oder andere Trübstoffe enthalten, ist das Membranfilterverfahren oft nicht durchzuführen, da die Partikel schon nach wenigen Millilitern Probe das Membranfilter blockieren. Dann müssen 100–200 ml des Produktes mit Nährlösung versetzt werden (je nach Konzentration der Lösung 20–200 ml) und nach Abschluss der Bebrütung wird mit einer Impföse ein Tropfen dieser Anreicherung auf festem Nährboden (oder auf der befeuchteten Nährkartonscheibe mit aufgelegtem trockenem Sterilfilter) ausgestrichen. Nach 2 Tagen lässt sich meistens schon erkennen, ob die Anreicherung Keimwachstum erbracht hat, was sich als Kolonien auf dem Nährboden zeigt, oder ob die Probe steril war.

3.2. Oberflächenuntersuchungen

3.2.1. Abklatschmethode



Mit dieser Methode lässt sich die Keimbelastung von relativ glatten Oberflächen untersuchen.

Es besteht die Möglichkeit, den Abklatsch direkt mit einer Agarplatte (Rodacplatte) durchzuführen. Dabei handelt es sich um eine Spezialagarplatte, die bis zum oberen Rand gefüllt ist und deshalb beim Auflegen auf eine Fläche Kontakt hat. Die Keime bleiben auf dem Agar hängen und können nach der Bebrütung als Kolonien ausgezählt werden.

Die Lebensdauer solcher Rodacplatten ist aber meistens recht kurz, da die Feuchtigkeit aus dem Agar verdunstet, die Oberfläche absinkt und kein Kontakt zwischen Fläche und Agar mehr möglich ist. Deshalb kann man auch hier Membranfilter zum Sammeln der Keime verwenden, allerdings nicht über eine Filtration sondern über den Kontakt zwischen Membran und der zu untersuchenden Fläche: Die Verpackung der Membran wird an einer Ecke geöffnet. Mit Hilfe einer abgeflamten, sterilen Pinzette wird das gelbe Schutzpapier abgezogen ohne die Membran zu entnehmen. Anschließend wird die Membran samt Trägerpapier mit der Oberseite (Gitternetzseite) auf die zu beprobende Fläche aufgelegt. Durch Reiben auf der Rückseite des Trägerpapiers wird die Membran elektrostatisch aufgeladen und die Mikroorganismen der so beprobten Fläche bleiben durch die Ladungskräfte an der Membran haften. Anschließend wird die Membran samt Trägerpapier von der Fläche wieder abgehoben. Dabei muss immer vorsichtig vorge-

gangen werden, damit die Rückseite des Membranfilters steril bleibt. Dann wird die Membran entnommen und je nach Zielsetzung auf dem entsprechenden Nährmedium bebrütet. Sollen feuchte Oberflächen beprobt werden, dann entfällt das Reiben auf der Rückseite, denn die Mikroorganismen werden zusammen mit der Feuchtigkeit von der Unterlage aufgesaugt und landen so auf der Oberseite des Membranfilters. Eine Anziehung durch elektrostatische Aufladung ist bei feuchten Flächen nicht möglich und auch nicht erforderlich.

3.2.2. Abstrichverfahren

Abstrichtests eignen sich zur semi-quantitativen Bestimmung der Keimzahl schwer zugänglicher Stellen, die mit Abklatschtestests nicht beprobt werden können.



Für die Beprobung trockener Oberflächen werden feuchte Wattestäbchen verwendet, nasse Oberflächen werden mit trockenen Wattetupfer beprobt.

Die Wattestäbchen müssen steril sein und können ggf. mit ebenfalls steriler physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet werden.

Um eine angenähert quantitative Aussage treffen zu können, sollte die ausgestrichene Fläche zumindest annähernd bestimmt werden. Zur Aufnahme der Mikroorganismen wird die zu untersuchende Oberfläche mit dem Wattestäbchen abgewischt. Der Wattetupfer kann anschließend direkt auf einem Nährboden ausgestrichen werden, wobei man allerdings das Risiko eingeht, einen Gutteil der Mikroorganismen einzubüßen, da sie an den Watteflusen hängen bleiben. Ein quantitativ besseres Ergebnis

kann erzielt werden, wenn der Wattetupfer in sterilem Wasser ausgespült und dieses dann über Membranfilterverfahren untersucht wird. Für eine rein qualitative Analyse, die häufig ausreichend ist, kann der Wattetupfer einfach in Bouillon bebrütet werden, was die sicherste Wiederfindung bietet, allerdings keine quantitative Aussage ermöglicht.

3.3. Untersuchungsmethoden für Luftkeime

3.3.1. Sedimentationsplattenverfahren

Bei dieser Methode werden Petrischalen mit Nährmedium für eine bestimmte Zeit in den Produktionsstätten (Füllbereich) in geöffnetem Zustand exponiert und danach bebrütet. Der Nachteil besteht in der geringen Luftmenge, die je nach Luftbewegung erfasst wird. Die Richtzeit, die für die Öffnung der Petrischalen genannt wird, beträgt ca. 20-30 min und richtet sich nach der zu erwartenden Keimzahl. Mit diesem Verfahren kann keine quantitative Aussage über eine Anzahl an Mikroorganismen pro definierter Luftmenge getroffen werden, sondern man erreicht nur eine qualitative, vergleichende Aussage über unterschiedliche Standorte oder Tageszeiten.

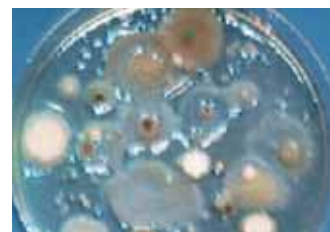


Es können auch Petrischalen mit Nährmedium in den Produktionsstätten (hauptsächlich im Füllblock, am Filter, im Etikettierer etc.) vertikal festgeklebt und so über einen längeren Zeitraum von ca. 2h verbleiben, danach wieder entfernt und anschließend 2-3 Tage bebrütet zu werden.

3.3.2. Gelatine-Membranfilter-Verfahren

Die Keimzahlen können mit dieser Methode quantitativ pro Volumeneinheit (m^3) Luft erfasst werden. Dabei saugt ein Rotameter die Luft an (Staubsaugerprinzip). Diese strömt durch einen sterilen Gelatine-Membranfilter, der auf einer Filterunterstützung sitzt und auf das Gerät aufgesteckt wird. Die Zeit und die Luftmenge lassen sich regeln. Mit der Gelatine-Membranfilter-Direkt-Methode wird der Gelatine-Membranfilter direkt auf einem Standardagar aufgebracht (durch Umstülpen) und 3 Tage (ideale Zeit) bebrütet.

Will man die gesammelten Mikroorganismen auf mehrere Nährmedien aufteilen, dann löst man den Gelatinefilter in warmem sterilem Wasser auf, filtriert diese Lösung portionsweise über mehrere Membranfilter und bebrütet diese Membranen auf unterschiedlichen Medien.



3.4. Welche Untersuchungsmethode kann man wo anwenden

Flüssiganreicherung, Ausstrich, Ausspülen, Abklatsch | Abdruck, Membranfilterverfahren usw.

1. **Membranfiltration** der Probe und Bebrütung des Filters auf Nährkartonscheibe (NKS) oder Agarplatte: Sämtliche Stellen an allen Typen von Filteranlagen, Einlauf und Auslauf, abgefüllte Flaschen, Spülwasser, Abspritzwasser usw.
2. **Abstrich bzw. Abklatschtest:** Hygienekontrolle über den gesamten Betrieb, Gefäße, Wannen, Transportbänder, Geräte und Maschinen zur Traubenverarbeitung, Rohrleitungen, Schläuche, Fässer, Füllstellen, Verschlüsse.
3. **Ausspülen, Lösung filtrieren:** Leergut und Verschlüsse.
4. **Flüssiganreicherung in Traubensaft:** Verschlüsse
5. **Rest aus der Flasche auslaufen lassen** direkt auf den Agarnährboden oder die mit Filter bedeckte, befeuchtete NKS: Flaschenrinsler
6. **Über Filterhalter für In-line Filtration 16254:** Druckluft
7. **Mit Luftkeimsammelgerät** MD8 Airport und Gelatinefiltern, die auf Agar gelegt werden. Im gesamten Betrieb zur Luftüberwachung, speziell aber in den kritischen Zonen im Füllbereich.
8. **Schnelltestgeräte:** sind nur geeignet, wenn hohe Keimzahlen vorliegen, also z.B. zur Hygienekontrolle kann ein Biolumineszenzverfahren verwendet werden. Zur Suche von Spureninfektionen sind solche Schnelltests weniger geeignet. Hygienemonitoring zur Überprüfung der Reinigung an Transportbändern, Kleidung und Hände der Mitarbeiter.

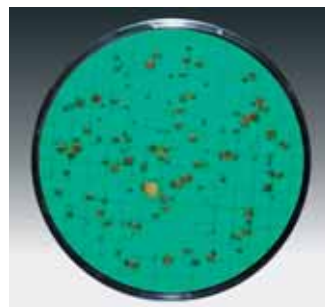
3.5. Geeignete Nährmedien für den Wein herstellenden Betrieb

3.5.1. Gesamtkeimzahl

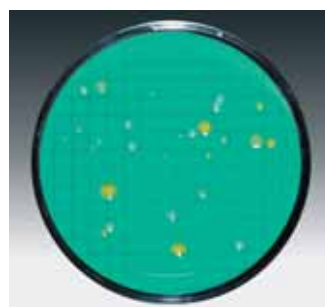
Das Artenspektrum im Produkt Wein oder in dessen Vorstufe, dem Traubenmost, weicht beträchtlich von dem Artenspektrum ab, das man beispielsweise bei der Untersuchung von Wasser finden würde. Dies ist begründet durch das unterschiedliche Milieu (pH-Wert, Nährstoffangebot, hemmende Eigenschaften usw.). Wird von der Gesamtkeimzahl in Wein oder Traubenmost gesprochen, dann sind eigentlich die spezifischen Problemkeime dieser Produkte gemeint.

Im Wein erzeugenden Betrieb wird aber bei der Hygienekontrolle auch allgemein auf Gesamtkeimzahl untersucht, wobei die Gesamtkeimzahl der aeroben mesophilen Bakterien im Blickfeld steht. Anwendungsziele sind beispielsweise das Wasser, das zur Reinigung benutzt wird, oder auch die Hygieneüberwachung von Geräten, Behältern, Leergut oder der Kleidung des Bedienerpersonals.

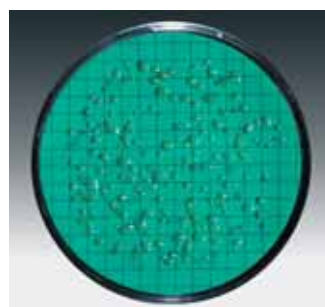
Dazu wird ein Universalnährmedium eingesetzt mit neutralem pH-Wert und ausreichendem Nährstoffangebot an Peptonen und ohne hemmende Zusätze. Dazu gehört das Medium Standard (mit oder ohne TTC), **TGE, Hefeextrakt** (besonders geeignet für Wasser) oder **R2A** (für ultrareines Wasser).



Standard TTC



Hefeextrakt

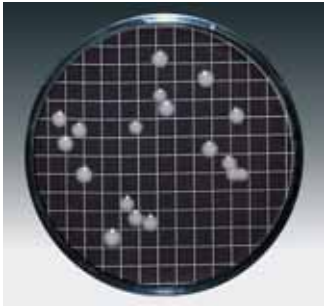


R2A

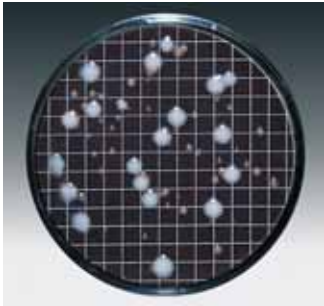
3.5.2. Hefen und Schimmelpilze

Die oben erwähnten Nährmedien zur Gesamtkeimzahlbestimmung sind für den Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen nicht geeignet, auch wenn gelegentlich vereinzelt Hefe- oder Pilzkolonien darauf zu finden sind. Nährmedien für Hefen und Pilze benötigen viel mehr Nährstoffe, vor allem Kohlehydrate, und ein niedrigerer pH-Wert ist ebenfalls von Vorteil. Die Typen **Würze** und **Malzextrakt** sind geeignet, mancherorts ist auch der Typ **Wallerstein** gebräuchlich.

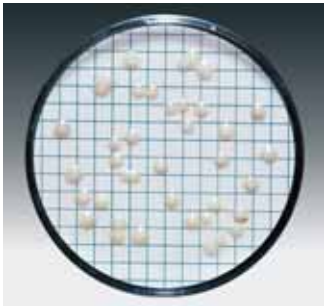
Soll speziell die Hefe *Brettanomyces* nachgewiesen werden, dann kann dazu eines dieser Medien eingesetzt werden mit einem Zusatz von Cycloheximid (Actidion) von 20-50 mg/l. Dieser Zusatz unterdrückt wirkungsvoll nahezu alle Hefen mit Ausnahme von *Brettanomyces* und einigen Stämmen von *Kloeckera*. Soll speziell auf „wilde“ Hefen, das heißt auf nicht-*Saccharomyces*-Hefen untersucht werden, dann kommt der Typ Lysin zum Einsatz. Bei Nährmedien auf Agar-Basis gibt es ein natürliches Limit hinsichtlich des pH-Wertes, da bei pH-Werten unterhalb von 5 der Agar zum Hydrolysieren neigt und nicht mehr fest wird. Deshalb ist es von Vorteil, andere Trägermaterialien als Agar als Nährbodenbasis einzusetzen, nämlich Zellulosekartonscheiben, die entweder bereits mit den Nährstoffen imprägniert sind oder die mit flüssigem Nährmedium getränkt werden. Hier können die pH-Werte an den pH-Wert des Produktes angepasst werden, was zum einen die Selektivität erhöht (das heißt, dass nur diese Mikroorganismen auf den Medien wachsen, die die pH-Werte des Produktes ertragen können). Zum anderen grenzt der niedrige pH-Wert das störende Begleitwachstum von Bakterien der Gattung *Bacillus* aus, die den Hefekolonien sehr ähnlich sehen, was im Einzelfall eine mikroskopische Nachkontrolle erfordert. Beim Einsatz saurer Medien entfällt diese Zusatzarbeit, da die *Bacillus*-Arten gar nicht mehr zur Koloniebildung kommen. Einzige Ausnahme von dieser Regel ist der säuretolerante Vertreter *Alicyclobacillus*, der aber im Wein normalerweise nicht vorkommt.



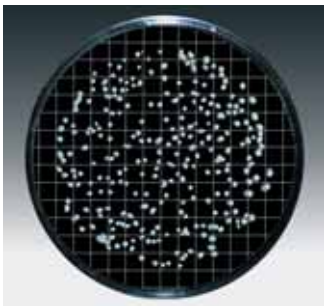
Würze



Malzextrakt



Wallerstein



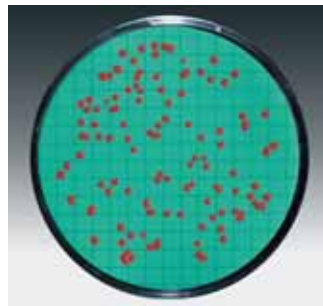
Lysin

3.5.3. Weinschädliche Bakterien

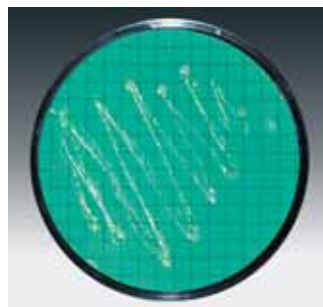
Aufgrund des niedrigen pH-Wertes von Wein sind weinschädliche Bakterien säuretolerant. Daher müssen die eingesetzten Nährmedien dem Rechnung tragen und ebenfalls niedrig im pH-Wert sein.

Das gebräuchlichste Medium zum Nachweis säuretoleranter Keime ist **Orangenserum**-Medium. Auf ihm wachsen vor allem die säuretoleranten Bakterien aus der Gruppe der Milchsäurebakterien. Zum Nachweis dieser Gruppe sollte der Nährboden unter anaeroben bis mikroaerophilen Bedingungen bebrütet werden, da viele Milchsäurebakterien durch Sauerstoff gehemmt werden. Auch die Essigsäurebakterien kann man auf Orangenserum gut zum Anwachsen bringen, allerdings aerob bebrütet. Außerdem empfiehlt sich ein Zusatz von 5-8% Ethanol zur Förderung ihres Wachstums und gleichzeitig zur Hemmung von Schimmelpilzen. Auf Orangenserum können auch Hefen und Schimmelpilze wachsen, bei anaeroben Bebrütungsbedingungen werden sie aber gehemmt.

Speziell zum Nachweis von *Oenococcus oeni* ist der Nährboden **Jus de Tomate** entwickelt worden. Er muss unter anaeroben Bedingungen bebrütet werden, soll dieses Bakterium gut anwachsen.



Orangenserum



Jus de Tomate

Für die Flüssiganreicherung kann einfach steriler **Traubensaft** verwendet werden, in dem die produktschädigenden Mikroorganismen wie Hefen, Bakterien und Pilze ebenso gutes Wachstum zeigen wie im Fertigprodukt.

Das halbflüssige Agarmedium, das für den Test nach Mayer-Vetsch eingesetzt werden kann, ist ein **Tomatensaftagar**.

3.6. Schnelltestverfahren

Häufig werden auch Schnelltests auf dem Markt angeboten, mit denen man die mikrobiologische Untersuchung binnen Minuten oder weniger Stunden durchführen kann. Natürlich ist diese Möglichkeit äußerst attraktiv, denn es entfällt die Quarantänezeit, die bei der konventionellen Mikrobiologie durch das Abwarten der Bebrütungszeit erforderlich wird.

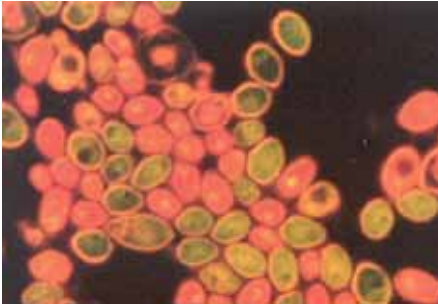
Bevor man sich für eine solche Möglichkeit entscheidet, muss man aber sehr genau hinsehen, wie der Schnelltest durchgeführt wird und ab welcher Keimbelastung er eine zuverlässige Aussage machen kann.

3.6.1. Biosensoren

Die Schnelltestverfahren, so es sich nicht um eine reine mikroskopische Untersuchung handelt, werden vielfach mit Biosensoren durchgeführt. Ein Biosensor ist ein Gerät, das eine Stoffwechselreaktion der Mikroorganismen in ein – in der Regel physikalisch – messbares Signal übersetzt. Aufgrund ihrer Kleinheit produziert der einzelne Keim aber nur winzigste Mengen an Stoffwechselprodukt. Daher bedarf es einer größeren Menge dieser Keime, um ein überhaupt messbares Ergebnis zu erzielen. Dazu wird eine Vorbebrütung empfohlen, die einen oder auch mehrere Tage in Anspruch nimmt, je nach Keimart. Entschließt man sich für ein solches Schnelltestverfahren, dann ist zwar die Messzeit wie versprochen sehr kurz, aber die Vorbebrütung zehrt die Zeitersparnis wieder weitgehend auf, sodass eine Quarantänezeit dennoch einzuhalten ist. Damit ist der Schnelltest kein echter Schnelltest mehr. Möchte man sich diese Vorbebrütungszeit ersparen, dann steigt die Erfassungsgrenze so weit an, dass ein positives Signal erst bei einigen hundert oder Tausend Keimen pro ml erhalten wird, was zur Erkennung von Spureninfektionen in der abgefüllten Flasche absolut unbrauchbar ist.

Solche Verfahren, beispielsweise das Biolumineszenzverfahren, das die ATP-Menge misst, bleiben daher speziellen Anwendungen überlassen wie der Überprüfung des Gärvorganges oder der Hygieneüberwachung von Geräten oder Personal vor Arbeitsbeginn.

3.6.2. Mikroskopie | Epifluoreszenz



Hefezellen unter dem Epifluoreszenzmikroskop

Mittels mikroskopischer Kontrolle kann ohne Bebrütungszeit und ohne eine Voranreicherung die Keimzahl ermittelt werden. Direktes Auszählen in einer Zählkammer ist nur bei sehr hohen Keimzahlen möglich und entfällt daher für die Überwachung zumindest des abgefüllten Endproduktes. Allerdings kann die Nachweisgrenze fast beliebig weit gesenkt werden, wenn die Mikroorganismen auf einem Membranfilter aufkonzentriert, mit einer Farblösung (häufig mit Methyleneblau) angefärbt und direkt auf dem Filter ausgezählt werden. Oder mit einem Vitalfarbstoff wie Acridinorange, mit dem sich gleichzeitig auch die Vitalität der Zellen darstellt. Eine solche mikroskopische Kontrolle ist unbedingt empfehlenswert, soll es einmal ganz schnell gehen. Für die Routinekontrolle braucht das Mikroskopieren eines ganzen Membranfilters viel zu viel Zeit. Hefezellen sind im Mikroskop sehr gut zu erkennen. Will man auch die Bakterien mit auszählen, dann muss man schon sehr sorgfältig auswerten, denn die sind 5-10 mal kleiner als Hefezellen und dementsprechend schwieriger zu erkennen.

3.6.3. Immunochemische Techniken

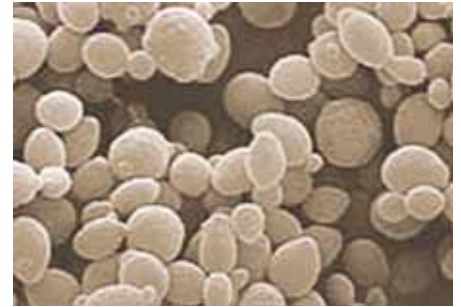
ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ist im medizinischen Bereich eine längst etablierte Technik zur Erkennung krankheitserregender Mikroorganismen. Genauso ist es auch möglich, im Produkt spezifische produktschädigende Keime nachzuweisen über monoklonale Antikörper. ELISA Versuche arbeiten mit sehr spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen, die an sekundäre Antikörper-Enzym-Farbkomplexe gebunden werden. So entsteht bei positivem Befund eine Färbung, die visuell oder colorimetrisch den Zielkeim leicht erkennbar macht.

3.6.4. PCR und ähnliche Techniken

PCR (Polymerase chain reaction) ist eine Methode, bei der nicht die Mikroorganismen selbst vermehrt werden sondern nur die Erbsubstanz der Keime, die DNS. Das geht wesentlich schneller als das Wachsen der Mikroorganismen selbst. Es wird ein kurzes Stück einer definierten DNS verwendet, was bedeutet, dass es eine gezielte Suche nach einem bestimmten Keim ist. Mittels PCR können also definierte Ziel-Mikroorganismen, also Produktschädlinge, in einer Probe gesucht werden. Gensonden sind identisch mit typischen Abschnitten des Erbmaterials einer bestimmten Mikroorganismenart, sozusagen ihr genetischer Fingerabdruck. An die Sonde kann noch ein Farbstoffträger angehängt werden, wodurch das Erkennen des gesuchten Mikroorganismus im Fluoreszenzmikroskop möglich wird.

3.7. Weiterführende Identifizierungstestmethoden

In vielen Fällen endet die Labor-Routineuntersuchung mit dem Befund, der auf dem Nährboden ermittelt wurde. Gegebenenfalls wird eine mikroskopische Kontrolle angeschlossen, um zu verifizieren, dass es sich bei der gefundenen Kolonie tatsächlich um eine Hefe handelt, oder ob eine Bakterienkolonie das typische Zellbild von beispielsweise Milchsäurestäbchen oder Milchsäurekokken aufweist.



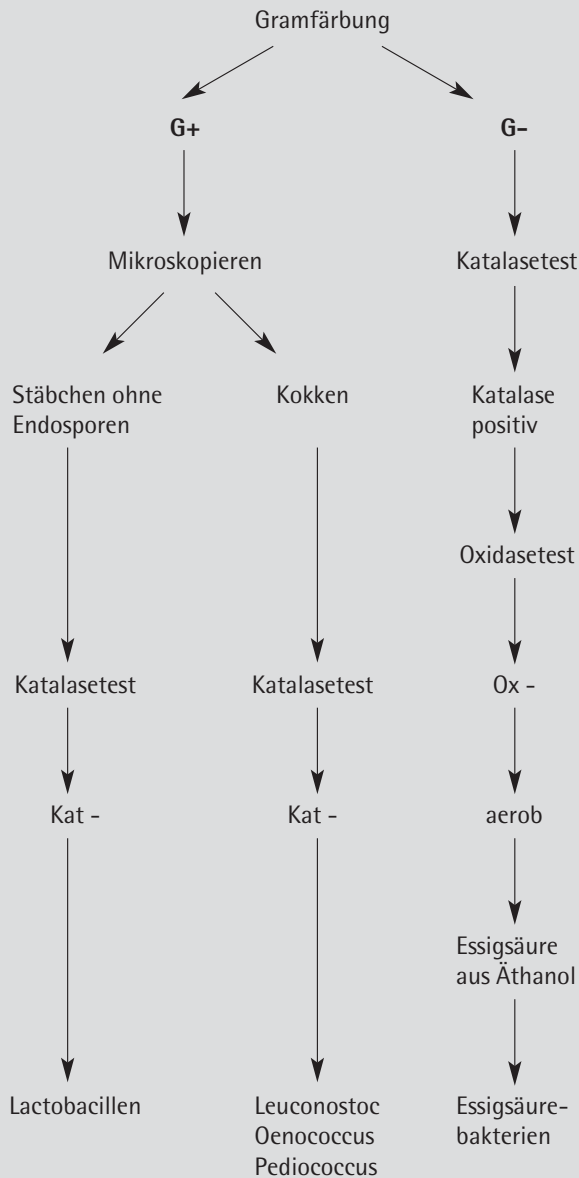
3.7.1. Hefen

Hefen sind unter dem Mikroskop zum einen an ihrer Größe zu erkennen, zum anderen ist bei frischen Kulturen, die sich im Wachstumsstadium befinden, die Knospung ein unschlagbarer Beweis (es sei denn, man hat es mit einem Vertreter der Gattung Schizosaccharomyces zu tun).

Eine genauere Untersuchung, um welche Hefe es sich handelt, kann über biochemische Untersuchung ermittelt werden, bei der primär auf die Fähigkeit zur Vergärung bestimmter Zucker untersucht wird. Es gibt verschiedene sehr einfach zu bedienende Testkits dazu im Laborhandel, deren bekannteste API 20 AUX, BBL Mycotube, RapiD Yeast Plus sind. Leider sind all diese Systeme primär auf den medizinischen Bereich ausgerichtet, weshalb die typischen getränkeschädlichen Hefen in den Dateien zur Auswertung nur sehr spärlich vertreten sind. Das einzige System, das einen guten Überblick über getränkespezifische Hefen enthält, ist das Biolog. Dessen Auswertung erfordert allerdings ein teures Gerät zur Trübungsmessung, was den Kostenrahmen der durchschnittlichen Weinbetriebe zu diesem Zweck übersteigt.

Vielfach beschränkt man sich deshalb darauf, die Gärfähigkeit einer Hefeart zu ermitteln, um damit ihre Produktgefährdung einschätzen zu können. Dazu verimpft man eine Hefekolonie in sterilen Traubenmost und beobachtet die Probe auf Wachstum und Gasbildung.

Vereinfachtes Schema zur Grobdifferenzierung weinschädlicher Bakterien



Nach Back, modifiziert

3.7.2. Bakterien

Die wichtigsten Untersuchungen zur Grobdifferenzierung weinschädlicher Bakterien:

1. Mikroskopische Untersuchung der gewachsenen Kolonien auf ihre Zellmorphologie – Stäbchen oder Kokken, Endosporen vorhanden oder fehlend.
2. Gramverhalten über den KOH-Test
3. Oxidasetest
4. Katalasetest
5. Aerobes oder anaerobes Wachstum
6. Bildung von Essigsäure aus Äthanol

Bei Koloniewachstum auf einem Bakteriennährboden muss genauer ermittelt werden, ob hier ein Produktschädling vorliegt oder ob ein banaler Keim gewachsen ist. Das hängt natürlich von dem Medium ab, auf dem die Bakterienkolonie gefunden wurde. Wird ein Universalmedium wie Standard, Plate Count oder ähnliches eingesetzt, dann wachsen auf diesem wahrscheinlich gar keine weinschädlichen Bakterien, weil deren Nährstoffansprüche durch Medien wie Standard, Plate Count etc. nicht abgedeckt werden. Hat man die Kolonien dagegen von einem Nährmedium wie Orangenserum abgeimpft, insbesondere nach mikroaerophiler Bebrütung, dann ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass es sich um weinschädigende Keime handelt. Eine weiterführende Untersuchung ist dann angezeigt. Dazu gibt es einige grundlegende und methodisch sehr einfache Tests, deren wichtigste neben der mikroskopischen Überprüfung der Gramtest und der Katalasetest sind.

Als erstes wird mikroskopiert, wodurch man eine Entscheidung über Hefen, Bakterien oder Schimmelpilze treffen kann. Bakterien sind 5-10mal kleiner als Hefen, bilden keine Knospen und sind in der Regel nicht fadenförmig wie Schimmelpilze. Bei der Diagnose „Bakterium“ wird im Mikroskop gleichzeitig festgestellt, ob es sich um ein Stäbchen oder eine Kokke handelt. Anschließend erfolgt ein Gramtest. Die Gramfärbung zielt auf die Struktur der Bakterienzellwand ab. Grampositive Bakterien haben eine Zellwand mit dicker Mureinschicht, die bei der Gramfärbung blau ist, gramnegative Bakterien dagegen eine Zellwand mit dünner Peptidoglycanschicht, die nach der Gramfärbung rot ist. Dieser klassische Gramtest mit Farbstoffen ist recht zeitaufwendig, man kann stattdessen den sehr viel einfacheren KOH-Test durchführen.

Dieser erfolgt mit 2-3 Tropfen 3%iger KOH, die auf einen Objektträger aufgetropft wird und in die mittels Impföse die fragliche Kolonie verrührt wird. Bildet sich ein Faden beim Anheben der Impföse aus dem Gemisch, dann ist die Kolonie Gram-negativ, unterbleibt die Fadenbildung, handelt es sich um eine Gram-positive Kolonie.

Als weiterer Test bietet sich nun der Katalasetest an, bei dem Sauerstoffentwicklung das Anzeichen für Katalase-positiven Befund ist und ein Hinweis auf aerobes und fakultativ aerobes Wachstum. Katalase-negativer Befund ist bei anaerobem Wachstum gegeben. Die Durchführung ist

wiederum sehr einfach. Es wird eine Kolonie mit 2-3 Tropfen Katalase-Reagenz betropft, worauf die Mischung im positiven Fall eine lebhafte Schaumbildung entwickelt. Im negativen Fall unterbleibt diese Schaumbildung. Getränkschädliche Bakterien sind häufig anaerob, da sie ja in der verschlossenen Flasche wachsen, entweder Stäbchen oder Kokken. Milchsäurebakterien sind Katalase-negativ und Gram-positiv. Die Essigsäurebakterien dagegen sind Katalase-positiv, strikt aerobe, Gram-negative Stäbchen oder Kokken. So erhält man bereits aus diesen wenigen Tests eine grobe Aussage darüber, ob eine Bakterienkolonie zu den gefährlichen Typen gehören könnte.

Auch zur Identifizierung von Bakterien sind fertige Testkits erhältlich, aber auch hier sind die meisten davon auf medizinisch wichtige Keime ausgerichtet und oft nicht ausreichend für die Untersuchung von weinschädlichen Keimen geeignet.



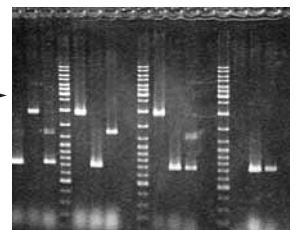
Auswerten der Platte



Abimpfen zur Reinkultur



PCR im Agarosegel



Genom PCR

Anschließend genaue Identifizierung über das Biolog System



Mycotube Testkit



API 20 Aux Testkit



Remel Testkit

4. Materialien zur mikrobiologischen Untersuchung in der Routine



Absaugleiste



Biosart 100 Monitor



Wasserstop



Biosart 100 Monitore auf der Absaugleiste



Einzelgerät



Microsart e.jet Vakuumpumpe, wird ohne Vakuumflasche eingesetzt



Biosart 250



Einwegtrichter auf der Absaugleiste

4.1. Edelstahl-Vakuumfiltrationsgeräte und Disposables

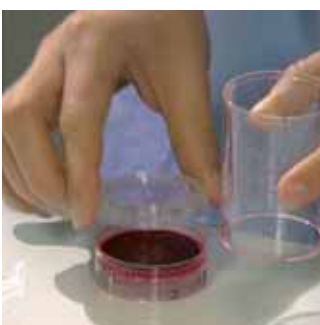
Bei größeren Probemengen wird eine Dreifach- oder Sechsfachabsaugleiste mit 500 ml Trichtern eingesetzt. Dies Leiste wird mit einer Laborvakuumpumpe betrieben, und zwischen beide muss eine Saugflasche geschaltet werden, in der man das Filtrat auffängt. Ein Wasserstop (Vacusart) schützt die Pumpe vor Kondenswasser.

Es sind auch solche Vakuumpumpen auf dem Markt zu erhalten, durch die Flüssigkeit direkt abgesaugt werden kann. Eine Vakuumflasche entfällt dann.

Ist der Probenumfang kleiner, kann man auch mit einem einzelnen Filtrationsgerät auskommen. Die Filtrationsgeräte werden zwischen den einzelnen Proben durch Abflammen oder durch Abbrennen von Alkohol desinfiziert. Auch andere Desinfektionsmethoden können angewendet werden.

Falls das Desinfizieren der Edelstahltrichter vermieden werden soll, kann auch mit Einweg-Kunststofftrichtern gearbeitet werden. Diese werden steril angeliefert und sind zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Das Material kann vom Anwender jedoch autoklaviert und somit notfalls auch mehrfach eingesetzt werden.

Wer überhaupt nicht desinfizieren möchte, kann stattdessen Einweg-Monitore des Typs Biosart 100 einsetzen, die nach einmaligem Einsatz verworfen werden müssen.



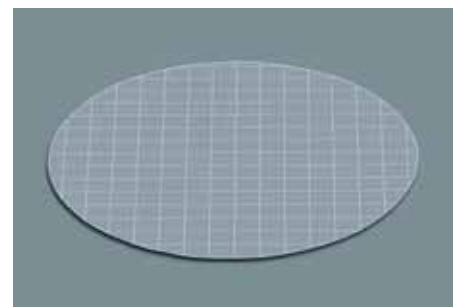
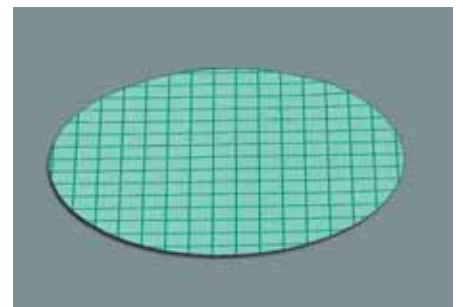
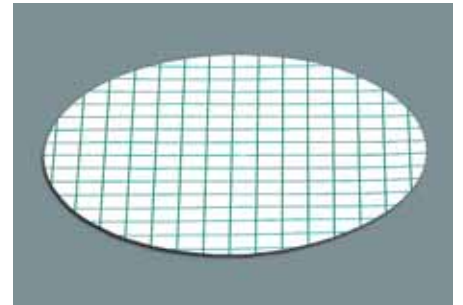
Ein besonderer Vorteil des Biosart 100 Monitors besteht darin, dass man ihn auch als Probenahmegefäß einsetzen kann. Man verfährt dann so, dass man den Biosart Monitor mit dem mitgelieferten Stopfen von unten verschließt und dann vor Ort die Probe zieht. So kann die Probe dann sicher vor Sekundärverunreinigungen ins Labor transportiert und dort filtriert werden. Anschließend wird mit sterilem Wasser nachgespült, die Ampulle mit dem Nährmedium aufgegossen, der Monitor wieder von unten verschlossen und durch Entfernung des Filtertrichters zur Petrischale modifiziert.

4.2. Membranfiltertypen entsprechend Einsatzziel

Membranfilter sind optimal geeignet, um aus einem großen Probevolumen kleinste Mengen an Mikroorganismen aufzufangen, anzureichern und auf geeigneten Nährböden zu sichtbaren und somit auszählbaren Kolonien heranwachsen zu lassen.

Bakterien sind sehr viel kleiner als Hefen, sie haben eine durchschnittliche Größe von ungefähr $0,2-1 \mu\text{m} \times 1-5 \mu\text{m}$. Um die kleinsten weinschädlichen Bakterien mit Sicherheit abzufangen, wählt man üblicherweise eine Porenweite des Membranfilters von $0,45 \mu\text{m}$. Für die wesentlich größeren Zellen von Hefen und Schimmelpilzen ist dagegen ein Filter mit der Porenweite $0,65 - 0,8 \mu\text{m}$ absolut ausreichend.

Der Membranfilter für die Keimzahlbestimmung sollte stets aus Cellulosenitrat bestehen, da dieses Material die besten Wachstumseigenschaften für die Mikroorganismen bietet.



Es werden Membranen unterschiedlicher Farbe angeboten: grüne, weiße und graue. Sinn dessen ist es, einen möglichst optimalen Kontrast zwischen Kolonien und Membranfilter zu haben, denn dadurch wird das Auszählen leichter. Man nimmt daher die grauen Filter für Untersuchung auf Hefen und Schimmelpilze, die in ihrem vegetativen Zustand weiße Kolonien bilden, die grünen Filter werden für den Nachweis von Bakterien auf Nährmedien ohne Farbstoffe eingesetzt, und die weißen Filter für den Bakteriennachweis auf solchen Nährmedien, die eine Differenzierung der gewachsenen Kolonien über eine Farbreaktion ermöglichen.



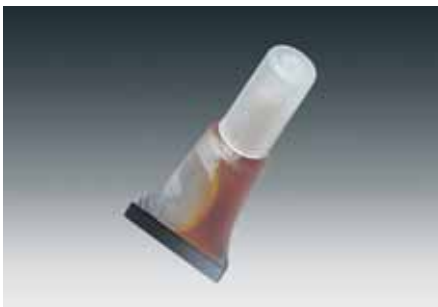
Nährkartonscheibe und Membranfilter



Nährkartonscheiben in Originalpackung



Agarmedien zum Ausgießen in Flaschen und Röhrchen



Ampulle mit flüssigem Nährmedium

4.3 Nährmedien entsprechend Einsatzziel

4.3.1. Nährkartonscheiben

Mit dem Einsatz von Nährkartonscheiben hat man eine einfache und sichere Variante an Nährmedien zur Verfügung. Es sind sterile gebrauchsfähige Medien, bereits in Petrischalen eingebracht und darüber hinaus mit den optimal geeigneten Membranfiltern ausgerüstet. Die müssen daher nicht separat gekauft werden. Die Haltbarkeit dieser Medien beträgt bis zu 2 Jahre nach Produktionsdatum, und ist durch eine für Licht und Gas undurchlässige Verpackung, die auch noch ein Trocknungsmittel enthält, absolut zuverlässig geschützt.

Zum Gebrauch müssen die Nährkartonscheiben lediglich mit sterilem Wasser befeuchtet werden. Dazu kann das sterile Wasser über eine sterile Pipette zugefügt werden. Einfacher und sicherer ist aber die Zugabe des Wassers über eine Dosierspritze, die mit einem sterilisierenden Spritzenvorsatz ausgerüstet ist. Oder das Wasser kann über Ampullen einzeln zugegeben werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass dem sterilen Wasser Zusätze beigelegt werden können, die das Medium selektiver machen (wie beispielsweise Actidion zum Nachweis von *Brettanomyces*) oder bestimmte Keime besser anwachsen lassen (wie Alkoholzusatz beim Nachweis von Essigsäurebakterien).

Für sämtliche in der Weinindustrie erforderlichen Untersuchungsziele sind die geeigneten Typen verfügbar: Würze, Malzextrakt, Wallerstein und Lysin zum Nachweis von Hefen und Pilzen, Orangenserum, Jus de Tomate zum Nachweis von weinschädlichen Bakterien, zur Hygienekontrolle Standard TTC.

4.3.2. Agarmedien

Agarmedien gibt es teilweise als fertig gegossene Platten, die allerdings sehr zur Unsterilität neigen und darüber hinaus oft Haltbarkeitsprobleme haben. Deshalb wird Agar gerne in Flaschen oder Röhrchen gekauft, die vor Gebrauch in Petrischalen ausgegossen werden.

Die Typen sind vergleichbar den Nährkartonscheiben: Würze, Malzextrakt, Lysin, Orangenserum, Jus de Tomate, Standard.

4.3.3. Ampullen mit Nährlösung

Falls zur Filtration mit Monitoren gearbeitet wird, muss die darin enthaltene Kartonscheibe mit flüssigem Nährmedium getränkt werden. Die einzusetzenden Medien sind vergleichbar den bei Nährkartonscheiben und bei Agar Nährböden erwähnten Typen. Am einfachsten zu bedienen sind solche Flüssigmedien, wenn sie gebrauchsfertig steril im Ampullen bezogen werden, von denen dann eine für jede Kartonscheibe benutzt wird.

4.4 Spezifischer Keimnachweis mit Nährmedien

4.4.1. Hefen und Schimmelpilze

Nährmedien:

Würze, Malzextrakt, Wallerstein Nutrient als wichtigste Nährmedien. Auch noch andere sind im Gebrauch, z.B. Schaufus-Pottinger (=mGreen Yeast and Mold), Lysin, Orangenserum u.a.

Bebrütungsbedingungen:

Unter aeroben Bedingungen für 2 – 5 Tage bei 25 – 30°C gilt als allgemeine Empfehlung.

Die Zeit kann modifiziert werden, falls besonders schnellwüchsige oder extrem langsam wachsende Arten gesucht werden. Die Temperatur kann ebenfalls in Richtung auf besondere Ansprüche der Zielkeime hin variiert werden. Werden beispielsweise hitzeresistente Schimmelpilze gesucht, dann erhöht man die Bebrütungstemperatur, bei kälteliebenden Formen kann die Bebrütungstemperatur dementsprechend abgesenkt werden. Man muss dann gegebenenfalls auch die Bebrütungszeit verlängern, weil Extremformen in der Regel langsamer wachsen.

Auswertung:

Hefen bilden in der Regel weiße, glatte, glänzende Kolonien. In Ausnahmefällen sind sie jedoch auch zur Bildung von Farbstoffen befähigt wie beispielsweise *Rhodotorula*, die eine rote Färbung aufweist. Schimmelpilze wachsen anfangs als weiße, wattebauschartige Kolonien. Sobald das Pilzmycel jedoch anfängt Sporen zu bilden ändert sich die Farbe in schwarz, braun, rötlich oder andere, je nach Färbung der Sporen.

Da Schimmelpilze mitunter sehr schnell die ganze Platte überziehen und eine quantitative Auswertung dann nicht mehr möglich ist, empfiehlt es sich, bereits nach 2–3 Tagen schon eine Vorkontrolle zu machen und dann weiterzubebürten, bis die gewünschte Koloniebildung erreicht ist. Das Wachstum von Schimmelpilzen kann gehemmt werden, wenn dem Medium ein Zusatz von 5–8% Äthanol zugegeben wird. Besonders einfach geht das bei Nährkartonscheiben, wo der Alkohol einfach dem Wasser beigegeben wird, mit dem die Kartonscheiben zum Einsatz befeuchtet werden.

Besondere Hinweise:

Um spezielle Hefen oder Pilze nachweisen zu können, sind unter Umständen Zusätze zum Nährmedium erforderlich. Beispielsweise kann durch Zusatz von Actidion (Cycloheximid) mit maximal 50 mg/l das Wachstum fast aller Hefen unterdrückt werden, so dass nur noch die resistenten Hefen wachsen. Das sind *Brettanomyces* (Dekkera) und *Kloeckera*. Letztere ertragen sogar Actidiongaben von über 50 mg/l. Oder der pH-Wert kann abgesenkt werden, um das unerwünschte Wachstum von Bakterien zu unterdrücken. Das ist auch durch Zugabe von Antibiotika möglich. Bei Agar-Nährböden werden diese Substanzen (sterilfiltriert) nach dem Autoklavieren in das noch flüssige Medium eingegeben und verrührt. Bei dem Einsatz von Nährkartonscheiben können sie einfach in die Tränklösung zugegeben werden.

4.4.2. Bakterien

Nährmedien:

Die Medien für weinschädigende Bakterien sind generell zum Nachweis säuretoleranter Keime geeignet. Das wichtigste davon ist Orangenserum. Wallerstein wird ebenfalls eingesetzt, allerdings in seiner Variante WL Differential. Speziell für Weinschädlinge ist auch das Medium Jus de Tomate (Tomatensaft) geeignet.

Bebrütungsbedingungen:

Zum Nachweis von Milchsäurebakterien mikroaerophil bis anaerob bei 3–6 Tage, in besonderen Fällen kann die Bebrütung sogar noch länger ausgedehnt werden. Die Temperatur liegt in der Regel bei 28–30 °C. Will man Essigsäurebakterien nachweisen, dann müssen aerobe Bebrütungsbedingungen eingehalten werden.

Auswertung:

Enthält das Medium einen Hemmstoff gegen Hefen (Actidion), dann sind alle gewachsenen Kolonien Bakterien, und vorzugsweise Milchsäurebakterien, wenn unter anaeroben bzw. mikroaerophilen Bedingungen bebrütet wurde. Eine Bestätigung dieser Diagnose durch Mikroskopieren sollte allerdings dennoch erfolgen. Für genauere Diagnosen ist eine biochemische Weiteruntersuchung erforderlich (siehe Schema zur Grobdifferenzierung und Kapitel 3.7.2.)

Besondere Hinweise:

Die Medien für die Bakterienuntersuchung können, genau wie die Medien zum Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen, durch Zusätze selektiver gemacht werden oder es kann eine bestimmte Keimart gefördert werden durch Zugabe von Nähr- oder Wuchsstoffen (siehe Kapitel 3.5.3.).

5. Fließschema

Fließschema Weinherstellung

Traubenverarbeitung:

Traubenanlieferung | Kelterhalle

1. Anlieferungsgefäße
2. Auffangwannen
3. Transportbänder | -schnecken
4. Entrapper
5. Traubenmühlen
6. Traubenpressen
7. KZE-Anlagen
8. Maischeklärungen (Flotationen, Separatoren, Kieselgurfilter)
9. Rohrleitungen, Schläuche und Anschlüsse
10. Pumpen
11. Tanks (Maischetanks, Puffer- und Lagertanks)

Gär- und Jungweinbereich:

1. Gärtanks
2. Barrique - Fässer

Weinverarbeitung:

Anlieferung

1. Tankwagen bei der Anlieferung
2. Tankwagen nach der Reinigung
3. Anschlüsse und Rohrleitungen bzw. Schläuche
4. Pumpen

Keller

1. Lagertanks
2. Rohrleitungen bzw. Schläuche und Anschlüsse
3. Pumpen
4. Dosierstationen
5. Vorlagegefäße
6. Filter: (Einlauf und Auslauf)
Schichtenfilter
Kieselgurfilter
Kerzenfilter
5. Entschwefelungsanlagen

Füllbereich:

Produktionsräume

1. Füllbereich (Nassbereich)
2. Trockenbereich
3. Leergutbehandlung:
Flaschenrinsler Flaschensterilisatoren (Ozon, SO₂, Dampf, Chlordioxid)
4. Flaschen:
Leerflaschen bei Anlieferung
Leerflaschen nach Rinsler bzw.
5. Vorlegetanks
6. Produktpumpe
7. Carbonisierer
8. Wärmetauscher
9. Produkt-Filter:
vor dem Vorfilter
vor dem Endfilter
nach dem Endfilter
10. automatische Probennehmer (nach Endfilter bzw.VF/EF)
11. Füller:
Füllstellen
Einlauf- und Auslaufsterne
Scherbenabspritzungen
12. Rücklauf bzw. Vorlaufbehälter
13. Ablauftische
14. Verschließer:
Korker
Anroll-Verschließer
Kronkorker
15. Abgefüllte Flasche
erste Füllerrunde
Pro Füllcharge
Während der gesamten Produktion
16. Transportbänder
Flaschentransportbänder
Hilfsstofftransportbänder (Kork, MCA, Kronkork usw.)
17. Hilfsstoffaufbewahrungsbehälter
18. Medienfilter
Spülwasserfilter
Sterilluftfilter (O₂, N₂, CO₂)
Rinslerwasserfilter
19. Filter-Scherbenabspritzung

Lager:

1. Transportbänder für Vollkartons | Trays | BIB | Tetra
2. Ware auf Stellplätzen
3. Vollgutlager bei beschädigten Behältnissen

Checkliste: Traubenverarbeitung Kontrolle

Traubenverarbeitung	Methode	Routinekontrolle	Bewertungskriterien
Traubenanlieferung Kelterhalle			
1. Anlieferungsgefäße			
leere Anlieferungsgefäße	Abklatsch Abstrich	1× wöchentlich	
volle Anlieferungsgefäße	Watteabstrich	1× wöchentlich	
gereinigte Anlieferungsgefäße	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
2. Auffangwannen			
gereinigte Auffangwannen	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
befüllte Auffangwannen	Watteabstrich	1× wöchentlich	
3. Transportbänder- schnecken			
gereinigt	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
in Betrieb	Abklatschtest	1× wöchentlich	
4. Entrapper			
gereinigt	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	
5. Traubenmühlen			
gereinigt	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	
6. Traubenpressen			
gereinigt	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	
7. Maischeklärung: Flotation, Seperator, Kieselgurfilter			
gereinigt	Abklatschtest	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	
8. Rohrleitungen, Schläuche, Anschlüsse			
gereinigt	Watteabstrich	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
9. Tanks (Maischetanks, Puffer- und Lagertanks)			
gereinigt	Abklatsch Abstrich	1× wöchentlich	< 10 KBE, keine Hefen
befüllt	Membranfiltration	1× wöchentlich	
10. KZE-Anlagen	Abklatsch Abstrich	1× wöchentlich	
Gär- und Jungweibereich			
1. Gärtanks			
gereinigt	Abklatsch Abstrich	vor Befüllung	gefüllten Tank auf Bakt., falls keine Milchsäuregärung erwünscht
befüllt	Probevolumen 0,5–1 ml		
2. Barrique-Fässer			
gereinigt	Abklatsch Abstrich	vor Befüllung	gefülltes Fass auf Milchsäure- u. Essigsäurebakterien, ggf. auf Brettanomyces
befüllt	Probevolumen 0,5–1 ml		

Die hier angegebenen Werte sind abhängig vom Restzuckergehalt des Weins, von der Weinart (weiß, rot oder rosé) und vom Schwefelgehalt. Sie können demnach unterschiedlich angesetzt werden. In allen 3 Checklisten finden sich nur ungefähre Richtlinien.

Checkliste: Weinverarbeitung; Mikrobiologische Kontrolle

Weinanlieferung	Methode	Routinekontrolle	Stufenkontrolle	Bewertungskriterien
Abladestation				
Probenahmestelle				
1. Tankwagen bei Anlieferung				
Tankwagen bei Anlieferung	0,5 – 1 ml Probevolumen	1× wöchentlich	jeder Tankwagen 1× täglich	
Tankwagen nach Reinigung	1,0 ml Probevolumen	1× wöchentlich	jeder Tankwagen 1× täglich	< 10 KBE
2. Anschlüsse Rohrleitungen, Schläuche				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
3. Ablade-Pumpen				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
Keller				
Probenahmestelle				
1. Lagertanks				
nach der Reinigung	Abklatschtest Watteabstrich	nach der Reinigung	1× täglich	< 10 KBE
voller Lagertank	Membranfiltermethode	nach Bedarf	1× täglich	
2. Anschlüsse, Rohrleitungen, Schläuche				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
3. Förder-Pumpen				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
4. Dosierstationen				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
5. Vorlagegefäße				
vor der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Watteabstrich	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE
6. Entschwefelungsanlagen				
vor der Reinigung	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich	
nach der Reinigung	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich	< 10 KBE, keine Hefen/100 ml
7. Wasseranschlüsse				
Warmwasser	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich	keine Hefen/100 ml
Kaltwasser	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich	keine Hefen/100 ml
8. Wasserfilter				
Luftfilter	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich	keine Hefen/100 ml
	Sedimentationstest	1× wöchentlich	1× täglich	o.B.

Weinanlieferung	Methode	Routinekontrolle	Stufenkontrolle	Bewertungskriterien
Keller				
Probenahmestelle				
9. Filter				
9.1. Schichtenfilter				
in Betrieb				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
nach Reinigung bzw. Sterilisation				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
9.2. Kieselgurfilter				
in Betrieb				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
nach Reinigung				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
9.2.1. Kerzenfilter				
in Betrieb				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
nach Reinigung bzw. Sterilisation				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
9.3. Crossflow-Filter				
in Betrieb				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	
nach Reinigung bzw. Sterilisation				
Filtereinlauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	Abhängig v. d. Trennschärfe
Filterauslauf	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	1× täglich, jede Charge	

Checkliste Füllbereich Mikrobiologische Qualitätskontrolle

Produktionsräume	Methode	Routinekontrolle	Ergebnis
Probenahme			
1. Füllbereich Naß und Trockenbereich	Luftkeimsammlung	1× monatlich	< 500 KBE 100 Liter
2. Füllbehältnisse Leerflaschen bei Anlieferung	Abtropftest MF-Methode	1× wöchentlich	
Leerflaschen nach Rinser bzw. Sterilisation	Abtropftest MF-Methode	1× wöchentlich	ohne Befund
3. Leergutbehandlung Flaschenrinser	Abtropftest MF-Methode	1× wöchentlich	ohne Befund
Flaschensterilisatoren (Ozon, Dampf, SO ₂ , Chlordioxid)	Abtropftest MF-Methode	1× wöchentlich	ohne Befund
4. Vorlegetanks nach Reinigung bzw. Sterilisation in Betrieb	Watteabstrich Abklatschtest Watteabstrich Abklatschtest	1× wöchentlich 1× wöchentlich	ohne Befund ohne Befund
5. Produktpumpen nach Sterilisation und in Betrieb	Watteabstrich Abklatschtest	1× wöchentlich	ohne Befund
6. Carbonisierer nach Reinigung Sterilisation in Betrieb	Watteabstrich Membranfiltermethode	1× wöchentlich 1× wöchentlich	ohne Befund ohne Befund
7. Wärmetauscher nach der Sterilisation in Betrieb	Membranfiltermethode Membranfiltermethode	1× wöchentlich 1× wöchentlich	ohne Befund ohne Befund
8. Produktfilter nach der Sterilisation Filtereingang Vorfilter	Membranfiltermethode	täglich	
Ausgang Vorfilter Eingang Endfilter	Membranfiltermethode	täglich	je nach Trennschärfe
Filterausgang Endfilter	Membranfiltermethode	täglich	steril oder keine Hefen
9. Füller Füllraum nach Sterilisation	Luftkeimsammlung Sedimentationstest		0 Hefen/100 Liter
Füllraum bei Betrieb	Luftkeimsammlung Sedimentationstest		0 Hefen/100 Liter
Füllraum nach Füllpausen	Luftkeimsammlung Sedimentationstest		0 Hefen/100 Liter
10. Füllstellen nach der Sterilisation	Watteabstrich	min. 1–2 × monatlich	ohne Befund
in Betrieb	Watteabstrich	min. 1–2 × monatlich	ohne Befund
nach Füllpausen	Watteabstrich	min. 1–2 × monatlich	ohne Befund
11. Füllerrücklauf-Vorlaufbehälter nach der Sterilisation	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	ohne Befund
12. Ablauftische nach der Sterilisation	Watteabstrich	1× wöchentlich	ohne Befund
in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	ohne Befund

Produktionsräume	Methode	Routinekontrolle	Ergebnis
Probenahme			
13. Verschleißer (Korker)			
Korker nach Sterilisation	Watteabstrich	1× wöchentlich	ohne Befund
Korker in Betrieb	Watteabstrich	1× wöchentlich	ohne Befund
14. Abgefüllte Flaschen			
nach der Sterilisation die erste Füllrunde	Membranfiltermethode		keine Hefen/100 ml
in Betrieb:	Membranfiltermethode	1. Flasche, wh. Produktion eine Flasche/Std.	keine Hefen/100 ml
Membranfiltermethode im Chargenbetrieb:	Membranfiltermethode	min. 1 Flasche / Füllcharge	keine Hefen /100 ml
15. Transportbänder			
Flaschentransportbänder	Watteabstrich Abklatschtest	1× monatlich	keine Hefen
Hilfsstoffaufbewahrungsbehälter	Sedimentation Watteabstrich	1× monatlich	keine Hefen
16. Medienfilter			
Spülwasserfilter nach Sterilisation in Betrieb	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	keine Hefen/100 ml
Sterilluftfilter (O ₂ , N ₂ , CO ₂)	Sedimentationstest	1× wöchentlich	keine Hefen/100 ml
Rinsewasser nach Sterilisation in Betrieb	Abtropftest	1× wöchentlich	keine Hefen/100 ml
17. Wasserfilter für die Scherbenabspritzung			
	Membranfiltermethode	1× wöchentlich	keine Hefen/100 ml
18. Fertigwarenlager			
Transportbänder für Vollkartons, BIB, Tetrapack	Abklatschmethode	1× pro Halbjahr mindestens	
Ware auf Stellplatz	Abklatschmethode	1× pro Halbjahr mindestens	
Vollgutlager bei beschädigten Behältnissen	Abklatschmethode	1× pro Halbjahr mindestens	

Stufenkontrollen

Bei Stufenkontrollen müssen sämtliche Stationen mit einbezogen werden von 1 bis 18

6. Reinigung

Reinigung im Food und Beverage Bereich. Um eine gleichbleibende Produktqualität unter Lebensmittelbedingungen sicherstellen zu können, müssen periodische Reinigungen im Gesamtbetrieb erfolgen.

Die Ziele der Reinigung sind:

- Erhalt des hygienisch einwandfreien Zustandes der Gebäude, Anlagen und Gerätschaften
- Erhöhung der Lebensdauer der Anlagen und Gerätschaften
- Sicherung der Qualität des zu verarbeitenden Produktes
- Senkung von Kosten

Da sich die meisten Verschmutzungen im Laufe der Zeit verfestigen (altern) und somit schwerer zu entfernen sind, sollte die Reinigung unmittelbar nach Beendigung der Nutzung erfolgen. Auch das Risiko einer mikrobiellen Kontamination wird durch eine möglichst frühzeitige Reinigung minimiert. Bei längerem Stillstand, ist vor einer Neuinbetriebnahme zu reinigen.

Der Reinigungsablauf teilt sich in folgende Stufen ein:

- Spülung der Anlage oder Geräte
- Eine oder zwei chemische Reinigungen
- Neutralisation
- Endspülung

Bei der Spülung wird bereits ein Großteil der Verschmutzung entfernt. Als Spülmedium sollte möglichst enthärtetes, partikelfreies Wasser verwendet werden.

Die chemische Reinigung bedarf einer sorgfältigen Planung.

Zum einen müssen die verwendeten Chemikalien geeignet sein, die Verschmutzung zu lösen und zu beseitigen, zum anderen dürfen Teile nicht chemisch angegriffen werden. Auch ist darauf zu achten, dass keine Bestandteile des Reinigungsmittels verbleiben und hierdurch folgendes Produkt schädigen können. In vielen Fällen bieten sich konfektionierte Reinigungschemikalien an, die speziell für bestimmte Reinigungseinsätze zusammengestellt sind und im Handel zu erwerben sind. Die Komponenten dieser Reinigungskonzentrate sind im wesentlichen spezielle Tenside, Säuren oder Laugen, Komplexbildner, Enzyme und Oxidationsmittel.

Bei jeder chemischen Reinigung sollten die vier Grundelemente der Reinigung, nämlich

- Die Zeit
 - Die Chemikalienkonzentration
 - Die Temperatur und
 - Die Mechanik
- optimal eingestellt werden.

Transportmechanismen sowie chemische Reaktionen benötigen eine gewisse Zeit. Daher sollte eine chemische Reinigung mindestens 30 Minuten betragen. In gewissen Fällen bietet sich sogar eine Reinigungsdauer über Nacht an.

Die Chemikalienkonzentration richtet sich nach Art und Intensität der Verschmutzung. Hier sollte man sich nach den Angaben des Reinigungsmittelherstellers richten. Meist wird eine Konzentration von 1% bis 3% empfohlen. Der häufig verwendete Glaube „viel hilft viel“ ist falsch. Durch zu hohe Chemikalienkonzentrationen kann es im Gegenteil zu unerwünschten Ablagerungen kommen.

Für den Reinigungserfolg ist die Temperatur der Reinigungslösung ein häufig entscheidender Faktor. Durch höhere Temperatur laufen chemische Reaktionen schneller ab., die Viskosität fällt, die Bindungskräfte werden geringer und die Transportgeschwindigkeiten steigen. Daher gilt in den meisten Fällen, dass eine Temperaturerhöhung die Geschwindigkeit der Reinigung steigert. Leider gibt es jedoch auch bei der Temperatúrauswahl Ausnahmen. Für enzymatische Reinigungen gibt es ein zu beachtendes Temperaturoptimum. Auch sollte eine Proteinverschmutzung nicht mit zu hoher Temperatur gereinigt werden, da hierdurch Proteine denaturieren können.

Bei der Mechanik ist folgendes zu beachten: Die Reinigungskemikalien müssen an den Ort der Verschmutzung transportiert werden. Eine hohe Überströmungsgeschwindigkeit bewirkt durch Scherkräfte eine Ablösung der Verschmutzung. Zum Beispiel: Membrananlagen, die im Crossflow Modus betrieben werden, sollten daher mit geschlossenem Permeat im Kreislauf überströmt werden, da hierbei der Druck auf die Membran am geringsten ist. Statische Filtrationsanlagen (Kerzenfiltration) sind möglichst von der Anströmseite mit der Reinigungslösung (in Filtrationsrichtung) zu beaufschlagen.

Nach erfolgter alkalischer Reinigung ist mit 0,5%iger Phosphor- oder Zitronensäure zu neutralisieren. Hierdurch verkürzt sich die Endspülung mit Wasser.

Das letzte Spülwasser muss frei von Geschmack und auch nach einer Schüttelprobe frei von Schaumbildung sein. Die pH-Wert Prüfung muss einen neutralen Wert anzeigen.

Da Reinigungskemikalien häufig ätzend sind, ist bei der chemischen Reinigung auf entsprechende Schutzausrüstung (Brille, Handschuhe) zu achten.

Generell kann über Reinigung und Reinigungsmittel folgendes gesagt werden:

Eine gründliche Reinigung entfernt alle Produktreste und Schmutzpartikel, die ansonsten als Nährstoffe für Mikroorganismen dienen. Solche Schmutzreste bestehen zum einen aus organischen Substanzen, die aus dem Wein selbst stammen oder Reste von abgetöteten Mikroorganismen sind. Zum anderen sind auch anorganische Bestandteile in diesen Schmutz-Partikeln enthalten. Die Wahl des Reinigungsmittels richtet sich also auch nach den Rückständen selbst, und natürlich nach den zu reinigenden Ausrüstungsteilen und ihrer Beständigkeit gegenüber Chemikalien.

Saure Reinigungsmittel sind vor allem geeignet, um Kalk, Weinstein und andere mineralische Beläge zu lösen. Beläge sind immer auch Lebensraum für mikrobiologische Wachstumsgemeinschaften, die auch als Biofilme bezeichnet werden. Biofilme sind sehr schwierig rückstandsfrei zu beseitigen, also setzt man von Anfang an besser auf ihre Vermeidung.

Essigsäure und Zitronensäure sowie deren Salze sind die Basis der gebräuchlichsten sauren Reinigungsmittel. Ihre pH-Werte liegen zwischen 1 und 5. Die alkalischen Reinigungsmittel werden überwiegend eingesetzt, um organische Rückstände zu entfernen wie Eiweiß, Stärke oder Zucker.

Solche Rückstände dienen ebenfalls als Basis für die Entstehung von Biofilmen und müssen daher sorgfältig entfernt werden. Der pH-Wert alkalischer Reinigungsmittel liegt zwischen 10 und 14, und die Basis dieser Mittel sind Natriumhydroxid, Kalilauge, Kalium- und Natriumphosphat usw.

Eine wirkungsvolle Desinfektion erfolgt prinzipiell erst nach der Reinigung und niemals davor. Auch der Einsatz von kombinierten Reinigungs-Desinfektionsmitteln ist nicht sinnvoll, da die Wirkungen von Reinigern und die von Desinfektionsmitteln sich gegenseitig aufheben können, oder da bei der Vermischung von beiden die Entstehung von umweltgefährdenden Chemikalien nicht ausgeschlossen ist. Die Desinfektion soll routinemäßig nur den kritischen Bereichen vorbehalten bleiben und nicht generell im gesamten Kellereibereich erfolgen. Im Falle von Infektionen, falls sie nicht durch gründliche Reinigung beseitigt werden können, mag das anders aussehen. Bekanntestes und sehr wirkungsvolles Desinfektionsmittel ist die Peressigsäure, häufig eingesetzt als Kombinationspräparat aus Peressigsäure, Essigsäure und Wasserstoffperoxid.

Generell sollte jeder Kellereibetrieb einen Reinigungsplan ausarbeiten, nach dem in der Routine vorzugehen ist. Dieses Konzept muss alle Schritte erfassen von den ankommenden Trauben über den gesamten Produktionsverlauf hin bis zur abgefüllten und gelagerten Flasche, und es muss detaillierte Anweisungen darüber enthalten, in welchen Zeitabständen an welchem Punkt mit welchem Produkt auf welche Art und Weise vorgegangen werden muss. Das lässt sich am besten in einem Fließschema unterbringen so wie wir es in Kapitel 5 für den Produktionsprozess selbst aufgestellt haben. Der Erfolg der Reinigungs- und ggf. Desinfektionsmaßnahmen ist durch mikrobiologische Kontrollen zu überprüfen. Nicht zwingend nach jeder Reinigung, aber doch – festgeschrieben im Hygieneplan – in regelmäßigen Zeitabständen, die abhängig sind von der hygienischen Stabilität des gesamten Kellereibetriebes.

Checkliste: Traubenverarbeitung Reinigung

Traubenverarbeitung	Unterhaltsreinigung	Grundreinigung
Traubenanlieferung Kelterhalle		
1. Anlieferungsgefäße	min 1× täglich aus-, abspritzen	min 1× wöchentlich mit Reinigungsmittel abspritzen ggf. auch mit Desinfektionsmittel. Nachspülen!
2. Auffangwannen	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
3. Transportbänder- schnecken	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
4. Entrapper	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
5. Traubenmühlen	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
6. Traubenpressen	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
7. Maischeklä rung: Flotation, Seperator, Kieselgurfilter	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
8. Rohrleitungen, Schläuche, Anschlüsse	min 1× täglich aus-, abspritzen	dto.
9. Tanks (Maischetanks, Puffer- und Lagertanks)	vor der Belegung	
10. KZE-Anlagen	min 1× täglich ausspülen	1× wöchentlich Spülung im Umpumpverfahren
Gär- und Jungweibereich		
1. Gärtanks		vor Belegung spülen Reinigungsmittel & nachspülen
2. Barrique-Fässer		vor Belegung spülen Reinigungsmittel & nachspülen ggf. mit Desinfektion

Checkliste: Weinverarbeitung Reinigung

Weinanlieferung	Unterhaltsreinigung	Grundreinigung
Abladestation		
Probenahmestelle		
1. Tankwagen bei Anlieferung	täglich ausspritzen	1× wöchentlich
2. Anschlüsse Rohrleitungen, Schläuche	täglich ausspritzen	1× wöchentlich
3. Ablade-Pumpen	täglich ausspritzen	1× wöchentlich
Keller		
Probenahmestelle		
1. Lagertanks	vor der Belegung 1× täglich mit Wasser aus- abspritzen	1× wöchentlich
2. Anschlüsse, Rohrleitungen, Schläuche	dto.	1× wöchentlich
3. Förder-Pumpen	dto.	1× wöchentlich
4. Dosierstationen	dto.	1× wöchentlich
5. Vorlagegefäße	dto.	1× wöchentlich
6. Filter		
6.1. Schichtenfilter	1× täglich spülen oder bei Sortenwechsel	1–2 × wöchentlich Sterilisation mit Dampf oder Heißwasser
6.2. Kieselgurfilter	dto.	spülen, ggf. mit Reiniger
6.2.1. Kerzenfilter	dto.	1–2 × wöchentlich Sterilisation mit Dampf oder Heißwasser
6.3. Crossflow-Filter	laut BA des Herstellers	laut BA* des Herstellers
7. Entschwefelungsanlagen	laut BA des Herstellers	laut BA des Herstellers
8. Wasseranschlüsse		
9. Wasserfilter Luftfilter		1× wöchentlich Sterilisieren 1× wöchentlich Sterilisieren
10. Wasseraufbereitungsanlagen	laut BA des Herstellers	laut BA des Herstellers

* 1–2 × wöchentlich chemische Reinigung

Checkliste: Füllbereich Reinigung

Produktionsräume	Unterhaltsreinigung	Grundreinigung
1. Füllbereich (Nassbereich)	tägl. abspritzen	1× wöchentl. mit Bodenreiniger
2. Trockenbereich	täglich abspritzen	1× wöchentl. mit Bodenreiniger
3. Füllbehältnisse	täglich abspritzen	1× wöchentlich CIP
4. Leergutbehandlung Flaschenrinsler Flaschensterilisatoren	morgens sterilisieren morgens sterilisieren	1/Woche desinfizieren je nach Typ 1/Woche desinfizieren je nach Typ
5. Vorlegetanks	tägl. thermisch sterilisieren	1× wöchentl. CIP
6. Produktpumpen	tägl. thermisch sterilisieren	1× wöchentl. CIP
7. Carbonisierer	tägl. thermisch sterilisieren	1× wöchentl. CIP
8. Wärmetauscher	tägl. thermisch sterilisieren	1× wöchentl. CIP
9. Produktfilter		
9.1. Vorfilter	tägl. spülen und sterilisieren	1× wöchentl. CIP
9.2. Endfilter	tägl. spülen und sterilisieren	1× wöchentl. CIP
10. Füller	tägl. spülen und sterilisieren	1× wöchentl. CIP
11. Füllerrücklauf- bzw. Vorlaufbehälter	tägl. thermisch sterilisieren	1× wöchentl. CIP
12. Ablauftische	tägl. abspritzen	1× wöchentlich desinfizieren
13. Verschleißer	tägl. Reinigen desinfizieren	mechanische Reinigung
14. Abgefüllte Flaschen		
15. Transportbänder	tägl. abspritzen; reinigen	
16. Hilfstoffaufbewahrungsbehälter; Kork, MCA usw.	jeden Tag reinigen	1× wöchentlich desinfizieren
17. Medienfilter	täglich mit Dampf und Heißwasser sterilisieren	
18. Wasserfilter für die Scherbenabspritzung	tägl. sterilisieren	
19. Fertigwarenlager Transportbänder für Vollkartons Trys BIB Tetra		1× monatl. reinigen

7. Hygieneschulung



7.1 Betriebshygiene in der Traubenverarbeitung

Ziel der Betriebshygiene in der Traubenverarbeitung ist es optimale Voraussetzungen für Weinbereitung und Weinqualität zu schaffen.

Gesundheitszustand, Reife der Trauben, Witterung und Lesetemperatur haben einen großen Einfluss auf die Art und Häufigkeit der durchzuführenden Hygienemaßnahme.

Siehe Checkliste Kontrolle Traubenverarbeitung und Reinigung

Eine Verschleppung von Mikroorganismen im Herbst aus der Traubenverarbeitung in andere Produktionsbereiche, sowie eine Beeinträchtigung des Abfüllbereiches erfolgt bei ausreichender Abtrennung der einzelnen Bereiche eher selten.



7.2 Betriebshygiene in den Produktions- und Kellerräumen

Ziel der Betriebshygiene in den Produktions- und Kellerräumen ist die hygienische und saubere Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Getränken unter Lebensmittelbedingungen.

Man unterscheidet verschiedene Bereiche:

- Weinanlieferung
- Tanklager
- Arbeitsplatz
- Zentrifugen, Filter, Entschweflungsanlagen, Wärmetauscher, Pumpen etc.
- Füllkeller



Diese Bereiche sind unterschiedlich mikrobiologisch zu bewerten und die Grenzwerte der Keimbelastung betriebsbezogen festzusetzen. Die Checklisten: Weinverarbeitung Kontrolle und Reinigung dient als Grundlage für die individuelle Festlegung der Kontrollpunkte. Bei Kontrollzeitraum und Bewertung der einzelnen Bereiche sind die verschiedenen Jahreszeiten zu berücksichtigen. Die Reinigungsmaßnahmen und Reinigungsabstände bzw. Wiederholungen richten sich nach den jeweiligen Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen.

Dabei unterscheidet man in:

- Unterhaltsreinigung
- Grundreinigung

Die Unterhaltsreinigung erfolgt während des laufenden Produktionsbetriebes und die intensive Grundreinigung in zeitlich festgelegten Abständen.

Grundsätzlich ist folgendes zu beachten: Die Tankwagenanlieferung muss mit Reinigungszertifikat erfolgen. Pumpen, Rohrleitung, Vorlagegefäße, Anschlüsse und Schläuche müssen regelmäßig mit Kalt- und Warmwasser gereinigt, sterilisiert und in regelmäßigen Abständen ggf. eine CIP-Reinigung mit Lauge erfolgen. Lagertanks sind vor der Belegung zu reinigen ggf. zu desinfizieren. Die Regeneration bzw. Sterilisation der Filter erfolgt laut Betriebsanleitung des Herstellers.

Der Arbeitsplatz sollte sauber und möglichst trocken sein, Spüleleitungen sind in Gully-Leitungen zu sammeln. Kein Schimmel darf in den Produktionsräumen toleriert werden. Befallene Stellen sind entsprechend zu behandeln bzw. mit Schimmelfarbe zu streichen.

Hilfsstoffe und Behandlungsmittel sollten in gesonderten Räumen oder Stellflächen verpackt, sauber und trocken lagern. Reinigungsmittel müssen in einem gesonderten Raum auf speziellen Auffangwannen gelagert werden.

Hilfsmedien: Wasser, Luft, CO₂, Stickstoff, sind mit entsprechenden Filtern zu versehen, regelmäßig zu regenerieren und zu sterilisieren.



7.2 Betriebshygiene im Abfüllbereich

Ziel der Betriebshygiene im Abfüllbereich ist die sichere Abfüllung von Getränken unter Lebensmittelbedingungen.

Dabei werden das abgefüllte Produkt und die Betriebsabläufe in der Produktionskette einer regelmäßigen mikrobiologischen Kontrolle unterzogen. Die Produktionssicherheit wird erhöht, wenn neben dem Fertigprodukt auch der Produktweg untersucht wird, und die Effektivität der Reinigung und oder Sterilisation der einzelnen Produktionsaggregate mikrobiologisch gecheckt werden.



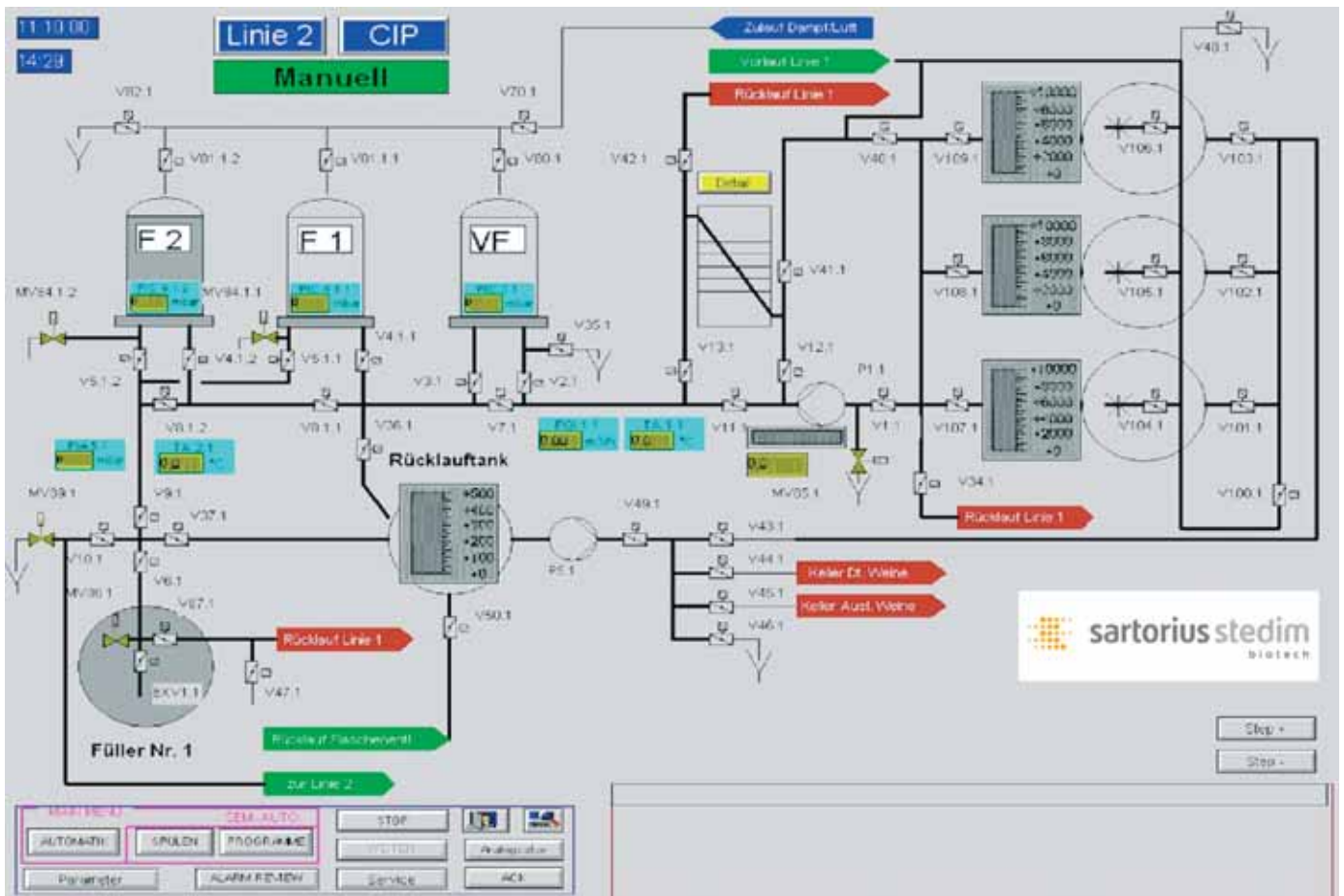
Bei den Produktionsräumen liegt der Untersuchungsschwerpunkt auf dem Nassbereich. Beim eher weniger sensiblen Trockenbereich können die Untersuchungszeiträume weiter gesteckt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Personalhygiene im Abfüllbereich und das Verhalten der Mitarbeiter während der Produktion. Generell sind in der Füllhalle alle Maschinen, Hilfsstoffe und Personen, die mit dem Produkt in Berührung kommen, als sensibel zu bewerten.



Beim abgefüllten Produkt sind von jeder einzelnen Füllcharge mindestens die erste und letzte Flasche und eine Flasche aus der Chargenmitte zu kontrollieren, bei größeren Füllchargen während der gesamten Produktion Proben im Abstand von 1 Stunde.



Nachfolgend sind die einzelnen Hygienebereiche in der Abfüllung aufgeführt und beschrieben. In den Checklisten (Kapitel 6) wird tabellarisch die Art der Probenahme bzw. die Untersuchungsmethode aufgezeigt und in Routinekontrolle und Stufenkontrolle bei mikrobiologischem Befund unterteilt. Im Anschluss an die mikrobiologischen Bestandsaufnahme des Ist-Zustandes sollte immer die Überprüfung auf die Wirksamkeit der durchgeführten Maßnahme erfolgen.



Fließbild: Produktweg einer automatisierten Kerzenfilteranlage

Maschinen und Aggregate des

Produktweges:

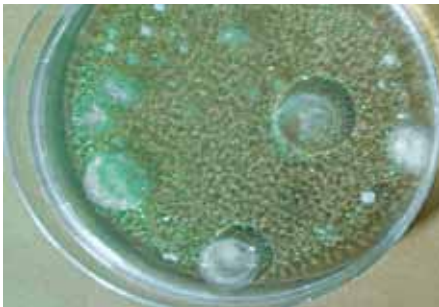
- Vorlegetanks
- Pumpen
- Weinerwärmung
- Filteranlage
- Füller
- Verschliesser

Der gesamte Produktionsweg die Vorlegetanks, Pumpen, Weinerwärmungen, Filteranlagen und Füller unterliegen einer Morgenroutine zur Füllvorbereitung und im Anschluss an die Füllung einer Abendroutine. Die Morgenroutine beinhaltet das Spülen des Produktionsweges mit Kaltwasser und Warmwasser, das Sterilisieren mit Dampf oder Heißwasser, das Abkühlen mit Kaltwasser, sowie den Integritätstest der Filtermembranen. Im Anschluss erfolgt das Vorlegen des Produktes in den Füller und die Produktion. Die Abendroutine nach Ende der Produktion, beinhaltet das Leerdücken des Produktionsweges mit Luft mit anschließender Regeneration mit Kalt- und Warmwasser.

Bei Vorlegetanks und Rohrleitungen und Füller ist in regelmäßigen Zeitabständen, neben der Reinigung mit Kalt- und Heißwasser, der Sterilisation mit Dampf oder Heißwasser, eine CIP-Reinigung mit Lauge und anschließender Neutralisation nötig. Die Förderpumpen sind zusätzlich auf Restentleerungen (Sink) zu prüfen.

Der Füller zählt zu den mikrobiologisch sensibelsten Aggregaten in der Produktionskette. Während der Sterilisation des Füllers sind Temperatur und Sterilisationszeit am Füllerausgang und der Füllorgane regelmäßig zu überwachen bzw. zu dokumentieren. Die Schutzverkleidung des Füllers ist während der Produktion immer geschlossen, eine entsprechende Überprüfung der Umgebungsluft im Füllraum sollte periodisch erfolgen. Nach jedem Stillstand, Füllpausen, Reparaturarbeiten oder anderen Produktionsverzögerungen ist eine Alkoholesinfektion mit 70%igem Ethanol durchzuführen.

Für das Füllerbedienungspersonal und Füllerwartungspersonal ist eine spezielle Hygieneschulung erforderlich. Grundsätzlich dürfen keinerlei Reinigungsarbeiten mit Druckluft, Wasserschlauch, oder gar Hochdruckreiniger bei laufender Produktion durchgeführt werden. Keine offenen Abfallbehälter im Füllbereich. Bei den Verschließern ist auf die Temperatur der Korkschesheizung (falls vorhanden bzw. die Verarbeitung des Verschlussmaterial es erlauben) zu achten. Verschlusszuführungen sind trocken, frei von Produkt zu halten, ebenfalls mit Ethanol zu sterilisieren.



7.3.1 Hilfsstoffe

- Behältnisse (Flaschen, Weichpackungen usw.)
- Verschlüsse (Kork, Plastikkork, Schraubverschlüsse Kronkork usw.)

Alle Hilfsstoffe sollten in eine unbeschädigten Verpackung trocken gelagert werden. Die Füllbehältnisse müssen sauber, frei von Partikeln und produktschädigenden Mikroorganismen sein, um dies sicherzustellen müssen alle Flaschen durch den Rinser.

7.3.2 Aggregate zur Füllvorbereitung, Förderung und Bevorratung der Hilfsstoffe

- Rinser
- Förderbänder für Behältnisse, Verschlüsse, Fertigpackungen, Kartonagen usw.
- Förderbandabdeckungen
- Vorratsbehälter für Verschlüsse

Beim Flaschenrinser bzw. Sterilisator erfolgt, je nach Bauart und Art der Flaschensterilisation, in der Regel vor der Füllung eine Morgenroutine mit Kaltwasser- Warmwasser und anschließender Sterilisation. Die Abendroutine nach dem Produktionsende beinhaltet eine Kalt- und Warmwasser Spülung. Bei Sterilisationsmitteln (Ozon, Peressigsäure, Chlordioxid usw.) ist die Konzentration regelmäßig zu prüfen. Bei Sterilwasserausspritzungen muss der Wasserfilter mit Membranfilterkerzen bestückt sein, die in der Morgenroutine sterilisiert und auf Integrität getestet werden.

Die Förderbandabdeckungen sollten frei von Produktresten, sauber und trocken sein. Nach Produktionsende erfolgt eine mechanische Reinigung mit Lauge ggf. eine Sterilisation mit Alkohol. Bei den Vorratsbehältern für Verschlüsse ist ebenfalls eine geschlossene, saubere und trockene Lagerung erforderlich.

Der Fußboden soll sauber sein, und – soweit das möglich ist – trocken. Im Füllerbereich, der eine ganz besonders sensible Zone ist, soll der Fußboden nicht mit Wasserschlauch abgespritzt werden oder mit einem Dampfstrahler gereinigt werden. Die Gefahr ist, dass durch das Spritzwasser über Aerosole Infektionskeime verbreitet werden und an den Füller gelangen können. Spülleitungen sind möglichst in den Gully zu führen. Während der Produktion sollen in Füllernähe keine Reinigungsmittel angewendet werden.

7.3.3 Abfüllhalle

Alle Türen müssen geschlossen gehalten werden. In erster Linie die Türen zum Außenbereich, aber auch der Werkstattbereich muss abgetrennt sein und ebenso die Sozialräume. Die Abfüllhalle ist, wenn möglich, von der restlichen Produktion abzutrennen. Bei der Sterilisation mit Dampf sollte ein Abzug aus der Produktionshalle führen.

Die Abfüllhalle muss frei von Insekten und anderen Schädlingen sein. Dabei haben sich Insektenleuchten als wirksam erwiesen. Hilfsstoffe dürfen nur an den dafür vorgesehenen Stellflächen lagern. Die Gegenstände, die zur Reinigung benötigt werden, sind in den dafür vorgesehenen Stauflächen abzustellen. Die Staplertransporte dürfen nur auf den vorgesehenen Staplerwegen erfolgen.

7.3.4 Verhalten während der Produktion

Im Produktionsbereich darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden. Vor Betreten des sensiblen Produktionsbereiches sind die Hände zu waschen und zu desinfizieren!

Beim Arbeiten mit offenen Produktbehältern darf kein Schmuck getragen werden. Vor dem Arbeiten an Maschinen oder Hilfsmitteln, die unmittelbar mit dem Produkt in Berührung kommen, sind die Hände zu desinfizieren.

Es muss Betriebskleidung getragen werden, einschließlich Sicherheitsschuhen und im Füllbereich auch eine Kopfbedeckung.

7.3.5 Weniger sensible Bereiche

- Lager
- Hilfsstoffannahme
- Hilfsstofflagerung
- Fertiglager

Diese Bereiche sollen sauber, trocken und frei von Schädlingen sein. Reinigungsmittel sind je nach Gefahrenklasse in geeigneten Schutzwannen zu lagern.

In allen Bereichen sollte der hygienische Status, abhängig von der Sensibilität des jeweiligen Bereiches, in angemessenen Zeitabständen und mit den entsprechenden Untersuchungsverfahren überwacht werden.

Dazu wird auf Kapitel 3 verwiesen.

7.2 Vorgehensweise bei mikrobiologischem Befund im abgefüllten Produkt

Bei permanenter Produktion sollte unmittelbar nach Feststellung eines Befundes eine CIP-Reinigung der CIP-fähigen Aggregate und anschließende Sterilisation des gesamten Produktionsweges erfolgen.

Maßnahmen

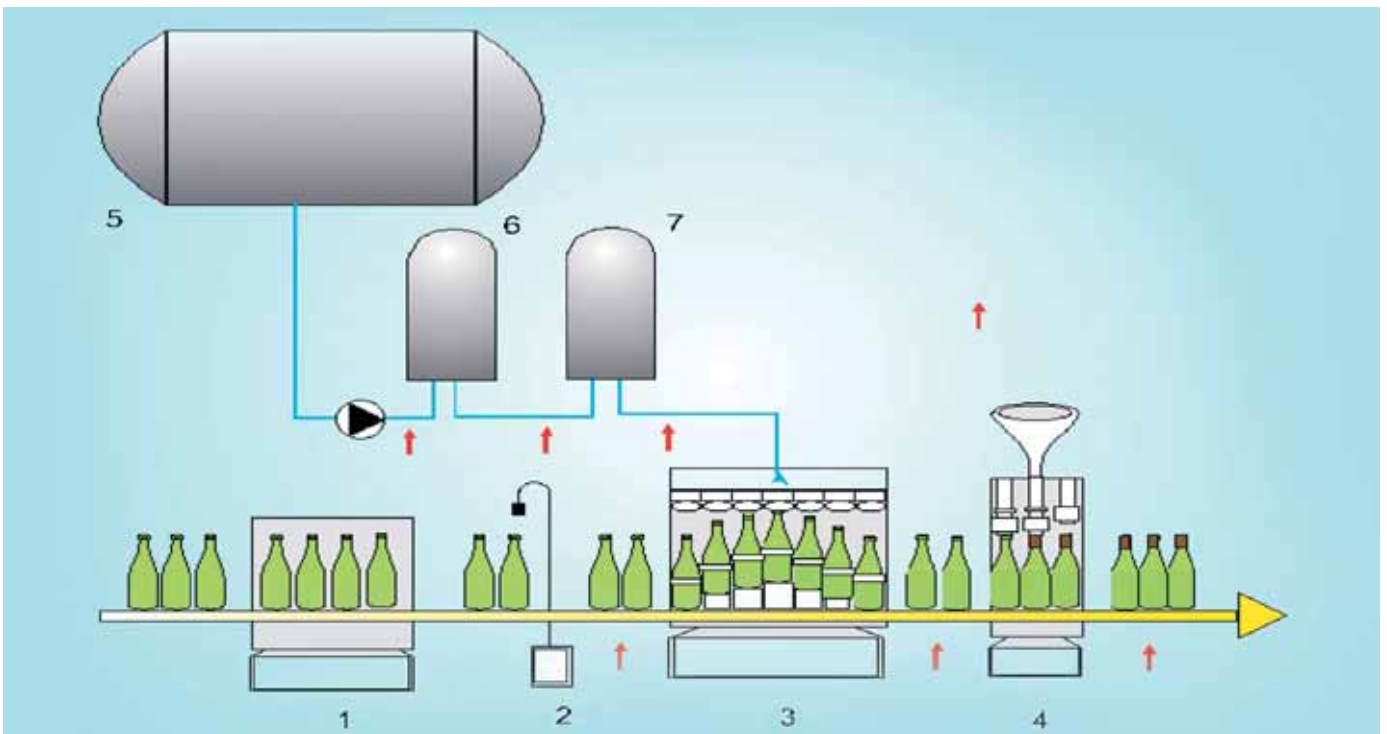
- Nachkontrolle der abgefüllten Ware
- Identifizierung der Mikroorganismen
- Lokalisierung der Schadursache
- Behebung der Schadursache
- Nachkontrolle

Nachkontrolle der abgefüllten Ware dient zur Feststellung des Schadensausmaßes. Handelt es sich um eine Streuinfektion, sind Teile der Füllung oder ist die gesamte Füllcharge oder Fülltag betroffen?

Probenvolumen der Nachkontrolle

1. Rückstellproben
2. Fertigware:
 - min. 1 Karton pro abgefüllte Palette
 - Beginn und Ende der Füllcharge
 - Oder 1 Flasche jede halbe Stunde

Identifizierung des Mikroorganismus siehe vorhergehende Kapitel



Kontrollpunkte

(mit roten Pfeilen gekennzeichnet):

- 1 Flaschenkontrolle
- 2 Evtl. Flaschenhalssterilisation
- 3 Füller
- 4 Korker
- 5 Vorlegetank
- 6 Vorfilter
- 7 Endfilter

Lokalisierung der Schadursache durch Stufenkontrolle: – siehe Checkliste –

Bei starker Verkeimung ist die Ursachenforschung in Form einer Probefüllung ratsam. Besondere Aufmerksamkeit gilt dem Füller und Rinser, die in 60 % der Fälle die Verkei-

mung verursachen. Die 1. Füllerrunde nach Füllbeginn gibt Auskunft über Erfolg der Füllersterilisation und Reinigungszustand aller Füllventile. Hilfreich ist auch die Prüfung der Sterilisationstemperatur am Füllventil und Füllerauslauf.

Die Probe vom Produktweg – gezogen am Filterauslauf bzw. Füllereinlauf – schließt die Verkeimung vom Produktweg aus. Wichtig sind auch Proben beim Leerdrücken der Produktleitung und Filter in den Füller. Dabei sind automatische Probennehmer, die in bestimmten Zeitabständen einige ml Produkt in eine sterile Untersuchungsflasche einleiten vorteilhaft, in der Routinekontrolle gelten sie als Sterilkon-

trolle für die gesamte Produktionszeit. Rinserwasser, gerinnte Flaschen, Kontrolle der Verschlussorgane und -Behälter können weitere Infektionsursache sein. Infektionsherde können auch durch defekte Ventile, Bypässe und Rücklaufleitungen im Sterilbereich des Füllerknosens verursacht werden.

Ist die Schadensursache lokalisiert und behoben muss in jedem Fall eine weitere Stufenkontrolle als Nachkontrolle zur Absicherung erfolgen.

8. Risikoabschätzung und HACCP

HACCP ist ein vorbeugendes System, das die Sicherheit von Lebensmitteln und Verbrauchern gewährleisten soll.

HACCP – Hazard Analysis Critical Control Points – könnte am besten übersetzt werden mit Gefahrenanalyse und entscheidende Lenkungspunkte. Es ist ein System, das den gesamten Herstellprozess begleiten und dabei auftretende Unregelmäßigkeiten erkennen soll zu einem Zeitpunkt, zu dem sie in-line korrigiert werden können, ohne den gesamten Prozess unterbrechen zu müssen. Das Ziel ist es, den Konsumenten vor gesundheitlichen Risiken zu schützen.

Das HACCP Konzept beruht auf 7 Grundsätzen:

1. Risikoanalyse
2. Identifizierung der Lenkungspunkte
3. Bestimmung der Grenzwerte
4. Überwachungs- und Kontrollverfahren
5. Kontrollmaßnahmen
6. Überprüfungsverfahren
7. Dokumentation

Diese Grundsätze sollen jetzt noch etwas genauer erläutert werden. Man sollte allerdings im Auge behalten, dass dieses Konzept eigentlich für Lebensmittel entwickelt wurde, die für den Konsumenten ein gesundheitliches Risiko werden können, wenn sie nicht sachgemäß hergestellt sind. Das Risiko kann zum einen ein mikrobiologisches sein, also das Auftreten von Krankheitserregern im Produkt, zum anderen können auch chemische und physikalische Gefahren auftreten. Das mikrobiologische Risiko ist in der Weinindustrie praktisch nicht vorhanden, denn die Mikroorganismen, die im Wein lebens- und vermehrungsfähig sind, gehören nicht in die Kategorie der pathogenen Keime. Listerien im Käse, Salmonellen in Trockenmilch oder Clostridium botulinum im Knochenschinken – solche Gefahren gehen vom Wein glücklicherweise nicht aus.

1. Risikoanalyse

Der erste Schritt ist die Gefahren- bzw. Risikoanalyse. Dabei werden alle Gefahren der einzelnen Schritte eines Herstellungsverfahrens identifiziert, die die Lebensmittelhygiene des gefertigten Produktes negativ beeinflussen können.

Jede Gefahr wird analysiert und bewertet auf ihre Bedeutung für die Lebensmittelsicherheit und auf die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens. Damit wird eine Risikotransparenz geschaffen. Das Resultat ist eine Liste klar definierter Einzelrisiken. Die Risikoanalyse soll durch ein fachübergreifendes Team durchgeführt werden, das eigens zu diesem Zweck, benannt wird. Dieses Team erstellt eine ausführliche Beschreibung des Produktes und ein Fließdiagramm seiner betriebstypischen Herstellung einschließlich einer detaillierten Auflistung möglicher Risiken. Dieses Fließdiagramm muss vom Team durch eine Vor Ort Prüfung auf seine Stichhaltigkeit überprüft werden. Als Risiken kommen mikrobiologische Risiken infrage (im Wein, wie bereits erwähnt, bedeutungslos), chemische Risiken (Desinfektionsmittel, Reinigungsmittel, Pflanzenschutzmittel etc.) und physikalische Risiken (Glassplitter, Metallteile usw.). Der Herstellprozess muss auch auf möglicherweise problematische Umfeldbedingungen abgeklöpft werden wie beispielsweise Ungeziefer, Abfallsorgung, schlecht zu reinigende Oberflächen, hygienisch undisziplinierte Mitarbeiter usw.

Die Risikogruppe, in die das Produkt fällt, ist ebenfalls zu definieren; beispielsweise „anfällig“, „leichtverderblich“ oder „wird vor dem Verzehr noch erhitzt“ usw. und es ist der Konsumentenkreis zu präzisieren, für den dieses Produkt geplant ist „gesunde Erwachsene“, „Diätkost“ oder andere Zielgruppen. An diesen beiden Beispielen wird klar, dass neben dem praktisch nicht vorhandenen mikrobiologischen Risiko auch die Risiken hinsichtlich Haltbarkeit und Konsumentengruppe gering sind.

2. Identifizierung der Lenkungspunkte

Auf dieser Stufe werden die kritischen Lenkungspunkte, die CCP's, bestimmt, an denen die identifizierte Gefahr unter Kontrolle gebracht werden und gelenkt werden kann. Dies kann ein Ort oder Arbeitsbereich sein, z.B. ein Kühlraum oder der Pasteurisator. Es kann ein Rohstoff sein, der möglicherweise mit Pflanzenschutzmitteln oder anderem verunreinigt ist. Es kann ein kritisches Verfahren sein wie Wasserenthärtung etc. Oder es kann ein kritisches Endprodukt sein, das aufgrund seines pH-Wertes oder anderer Eigenschaften nur begrenzte Haltbarkeit besitzt. Die Festlegung der Lenkungspunkte geschieht mit einem sogenannten Entscheidungsbaum. Das Ergebnis muss eine vollständige Liste der CCP's sein. Ist diese Liste erstellt, sollte jeder CCP nochmals daraufhin überprüft werden, ob er nicht so umgestaltet werden kann das er aus dem Risikobereich herausfällt und damit zukünftig kein CCP mehr ist. Wo das nicht möglich ist, soll das Risiko wenigstens minimiert werden.

3. Bestimmung der Grenzwerte

Nachdem die Lenkungspunkte bestimmt worden sind, geht es nun um die Sollwerte und Toleranzgrenzen. Dazu bieten sich physikalische Parameter wie die Temperatur an (z.B. Temperatur während der Gärung) oder chemische Parameter wie der pH-Wert und der Gehalt an schwefeliger Säure im Wein. Für derartige Parameter können Grenzwerte festgelegt werden, die einzuhalten sind, wenn das Produkt die erforderliche Stabilität haben soll.

4. Überwachungs- und Kontrollverfahren

Für die unter Punkt 3 festgelegten Sollwerte müssen nun Mess- und Prüfverfahren festgelegt werden, die eine laufende Überwachung jedes der CCP's ermöglichen und anzeigen, wenn er außerhalb der festgelegten Grenzwerte gerät. Dabei sind In-Prozess-Kontrollen den Stichprobenkontrollen in jedem Fall vorzuziehen.

5. Kontrollmaßnahmen

Werden bei der Überwachung Abweichungen von den Sollwerten festgestellt, dann müssen diese möglichst sofort gestoppt und behoben werden, noch bevor die Abweichung zu einer Gefahr für die Produktsicherheit wird. Dazu müssen unter Punkt 5 die geeigneten Maßnahmen festgelegt werden. Der Kontrollpunkt wird dadurch vor Ort als Lenkungspunkt steuerbar und damit beherrschbar gemacht. Als Maßnahme bieten sich an z.B. Erhöhung des Drucks, Kühlung oder Erwärmung, pH-Modifizierung usw.

6. Überprüfungsverfahren

Zur Kontrolle der Effizienz des Systems müssen zusätzliche, System unabhängige Kontrollen festgelegt werden, z.B. Audits, die Analyse von Zufallsstichproben durch Dritte, Prüfmittelkontrollen, Verfügung von Arbeitsabläufen etc.

7. Dokumentation

Buchführung über sämtliche Verfahren und Anweisungen, schriftliche Dokumentation aller Erkenntnisse und Ergebnisse während der Planung, Einrichtung, Anwendung und ggf. Änderung des Systems. Dazu gehören Prüfvorschriften, Verfahrens-, Ablauf- und Erfassungspläne, Speicherung der erfassten Messwerte samt statistischer Auswertung. Sichere Regelung des Änderungsdienstes für Vorschriften.

Als Zusammenfassung kann folgendes gesagt werden:

Ein CCP kann nur dort eingerichtet werden, wo Prozessabweichungen gemessen werden können, z.B. Prozessabweichungen von einem kritischen Grenzwert. Und er kann nur dort eingerichtet werden, wo Maßnahmen ergriffen werden können, um diesen Prozess noch während der laufenden Herstellung zu korrigieren.

Dabei ist zu bedenken, das es bei alledem um die gesundheitliche Unbedenklichkeit des hergestellten Produktes geht und nicht um die geschmackliche Qualität, die Füllmenge, eine unerwünschte Geruchsnote oder dergleichen.

In der Praxis im Weinbereich wird dies allerdings weniger strikt gehandhabt, und es werden in das HACCP System öfters auch qualitätsrelevante Punkte mit einbezogen, bei deren Nichteinhaltung dem Konsumenten keine gesundheitliche Gefährdung droht, so wie beispielsweise die Füllhöhe der Flasche. Im einzelnen muss jeder Betrieb selbst über seine CCP's entscheiden.

Wir geben einige Beispiele zur Einrichtung der CCP's

1. Nach der Flaschenreinigung. Es muss sichergestellt sein, dass keine Rückstände von Laugen oder Reinigungsmitteln in der Flasche verblieben sind.
– Kontrolle mittels pH-Meter oder Lackmuspapier.
2. Nach der Reinigung von Cross-Flow Anlagen. Auch hier ist eine Gefährdung nicht auszuschließen, falls Reinigungsmittel nicht korrekt ausgespült wurden.
– Kontrolle mittels pH-Meter oder Lackmuspapier.
3. Flascheninspektor. Leergut, das Glasbruchstücke oder beschädigte Flaschenhälse aufweist, müssen zuverlässig erkannt und ausgeschleust werden.
– Kontrolle visuell oder über optischen Sensor.
4. Etikettierung. Es darf nicht vorkommen, dass z.B. eine als Diabetikerwein gekennzeichnete Flasche oder Füllserie ein Produkt enthält, das nicht dieser Anforderung entspricht.
– Kontrolle optisch oder über ein Lesegerät.

Zum Abschluss folgen noch einige Erfahrungen und Ergebnisse aus unseren umfassenden eigenen mikrobiologischen Untersuchungen in verschiedenen Kellereibetrieben.

Treten überhöhte Keimzahlen auf, dann findet sich die Ursache meistens in ungenügender Reinigung der Produktionsanlagen.

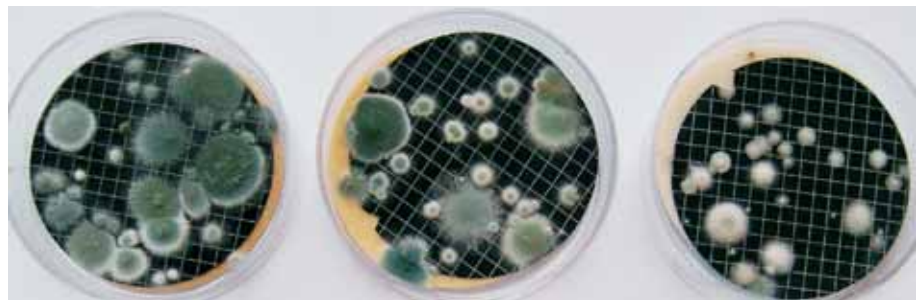
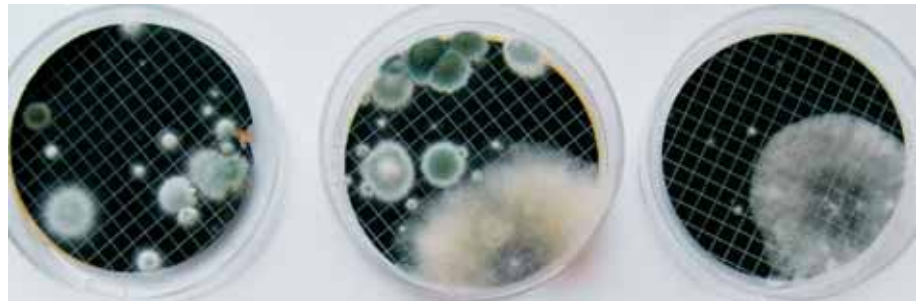
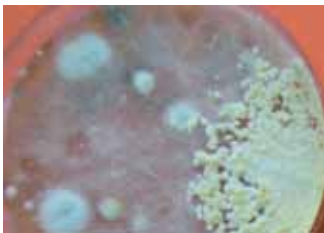
Tanks sind oft nicht ausreichend gereinigt. In der Folge ergeben sich hohe Keimzahlen im Produkt. Entweder vor der Abfüllung, so dass die Filteranlagen vorzeitig verblocken, oder, falls keine hochwertige Sterilfiltration erfolgt, sogar im abgefüllten Endprodukt.



Beispiel: Vorlagetank

Die Hygiene von Schläuchen, Leitungen lässt oft zu wünschen übrig, was sich dann in entsprechend hohen Keimzahlen niederschlägt.





Es erweist sich als praktisch, Petrischalen mit Agar oder mit befeuchteten Nährkartonscheiben, auf denen ein Membranfilter liegt, direkt im Füllraum zu befestigen, dort für einige Stunden – beispielsweise während einer Füllschicht – exponiert zu lassen. Das gibt eine direkte Korrelation zu der Keimbelastung, der die Füllorgane ausgesetzt sind. Wie aus den beigefügten Bildern deutlich zu sehen ist, kann die Keimbelastung sehr unterschiedlich sein.

Reinigungsarbeiten sind unerlässlich und sollten nach einem Reinigungsplan abgewickelt werden, der den jeweiligen Gegebenheiten eines Betriebes Rechnung trägt. Während der laufenden Arbeit im Füllraum muss aber sehr darauf geachtet werden, dass sie nicht zu zusätzlichen Keimbelastungen führen. So hat das Abspritzen der Böden und Geräte nach unseren Messungen zu einer Vervielfachung der Luftkeimbelastung geführt.

Die meisten Infektionen jedoch gehen vom Füller bzw. Verschleißer aus. Regelmäßige Überprüfung ist genauso wichtig wie Reinigung und Desinfektion. Kontaminierte Füllstellen führen unweigerlich zu Produktveränderungen, da – außer bei Heißabfüllung – keine Möglichkeit mehr besteht, die Infektion abzuwenden. Gerne vernachlässigt bei Reinigung sowie Überprüfung sind auch Stellen wie die Förderschienen für die Korken, obwohl dort mitunter reichlich Keime nachgewiesen werden können.

Nur wenn über den ganzen Betrieb hin konsequent auf die Hygiene geachtet wird und nur, wenn über den gesamten Verlauf regelmäßig und ausreichend Proben gezogen und auf ihren mikrobiologischen Befund untersucht werden, nur dann kann über die Zeit konstante Qualität produziert und Fehler vermieden werden, die zur Beeinträchtigung des Geschmacks und zu Reklamationen seitens der Kunden führen.

Die Kontrollen und Verfahren, die in dieser Broschüre beschrieben werden, sind lediglich Anleitungen und Empfehlungen für die Weinindustrie. Sie sind jedoch keine bindenden Vorschriften.

Sales and Service Contacts

For further contacts, visit www.sartorius-stedim.com

Europa

Deutschland

Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
D-37079 Göttingen

Telefon +49.551.308.0
Fax +49.551.308.3289

www.sartorius-stedim.com

Sartorius Stedim Systems GmbH
Schwarzenberger Weg 73-79
D-34212 Melsungen

Telefon +49.5661.71.3400
Fax +49.5661.71.3702

www.sartorius-stedim.com

France

Sartorius Stedim Biotech S.A.
Z.I. des Paluds
Avenue de Jouques – BP 1051
13781 Aubagne Cedex

Telefon +33.442.845600
Fax +33.442.845619

Sartorius Stedim France
4, rue Emile Baudot
91127 Palaiseau Cedex

Telefon +33.1.6919.2100
Fax +33.1.6920.0922

Belgien

Sartorius Stedim Belgium N.V.
Leuvensesteenweg, 248/B
1800 Vilvoorde

Telefon +32.2.756.06.80
Fax +32.2.756.06.81

Dänemark

Sartorius Stedim Nordic A/S
Hoerskaetten 6D, 1.
DK-2630 Taastrup

Telefon +45.7023.4400
Fax +45.4630.4030

Großbritannien

Sartorius Stedim UK Limited
Longmead Business Park
Blenheim Road, Epsom
Surrey KT19 9 QQ

Telefon +44.1372.737159
Fax +44.1372.726171

Italien

Sartorius Stedim Italy S.p.A.
Via dell'Antella, 76/A
I-50012 Antella-Bagno a Ripoli (FI)

Telefon +39.055.63.40.41
Fax +39.055.63.40.526

Niederlande

Sartorius Stedim Netherlands B.V.
Edisonbaan 24
3439 MN Nieuwegein

Telefon +31.30.6025080
Fax +31.30.6025099

Österreich

Sartorius Stedim Austria GmbH
Franzosengraben 12
A-1030 Wien

Telefon +43.1.7965763.18
Fax +43.1.796576344

Schweiz

Sartorius Stedim Switzerland GmbH
Lerzenstrasse 21
CH-8953 Dietikon

Telefon +41.1.746.50.00
Fax +41.1.746.50.50

Spanien

Sartorius Stedim Spain SA
C/Isabel Colbrand 10-12,
Planta 4, Oficina 121
Polígono Industrial de Fuencarral
E-28050 Madrid

Telefon +34.91.3586102
Fax +34.91.3588804

Amerika

USA

Sartorius Stedim North America Inc.
131 Heartland Blvd.
Edgewood, New York 11717

Telefon +1.631.254.4249
Gebührenfrei (nur USA)
+1.800.368.7178
Fax +1.631.254.4253

Sartorius Stedim SUS Inc.
1910 Mark Court
Concord, CA 94520

Telefon +1.925.689.6650
Gebührenfrei (nur USA)
+1.800.914.6644
Fax +1.925.689.6988

Asien | Pazifik

Australien

Sartorius Stedim Australia Pty. Ltd.
Unit 17/104 Ferntree Gully Road
Waverley Business Park
East Oakleigh, Victoria 3166

Telefon +61.3.9590.8800
Fax +61.3.9590.8828

Indien

Sartorius Stedim India Pvt. Ltd.
10, 6th Main, 3rd Phase Peenya
KIADB Industrial Area
Bangalore – 560 058

Telefon +91.80.2839.1963 | 0461
Fax +91.80.2839.8262

Japan

Sartorius Stedim Japan K.K.
KY Building, 8-11
Kita Shinagawa 1-chome
Shinagawa-ku
Tokyo 140-0001

Telefon +81.3.3740.5407
Fax +81.3.3740.5406

Malaysia

Sartorius Stedim Malaysia Sdn. Bhd.
Lot L3-E-3B, Enterprise 4
Technology Park Malaysia
Bukit Jalil
57000 Kuala Lumpur

Telefon +60.3.8996.0622
Fax +60.3.8996.0755

Singapore

Sartorius Stedim Singapore Pte. Ltd.
10, Science Park Road, The Alpha
#02-25, Singapore Science Park 2
Singapore 117684

Telefon +65.6872.3966
Fax +65.6778.2494