

Gütegemeinschaft Paletten e. V.
Frau Suzane Giurlando
Benrather Schlossallee 2A
40597 Düsseldorf

Institut für Holztechnologie
Dresden gemeinnützige GmbH
Zellescher Weg 24
01217 Dresden - Germany

Tel.: +49 351 4662 334
Fax: +49 351 4662 211
katharina.plaschkies@ihd-
dresden.de
www.ihd-dresden.de

Dresden, 18.12.2019

Abschlussbericht

Auftrags-Nr. 9218001-A1

Dieser Bericht ersetzt den Untersuchungsbericht Nr. 9218001 vom 28.08.2019, der in den Abschnitten 4.3 bis 4.5 und Abschnitt 6 vervollständigt wurde.

Auftraggeber (AG):	Gütegemeinschaft Paletten e. V. Benrather Schlossallee 2A 40597 Düsseldorf
Auftrag vom:	27.02.2018
Auftrag:	Studie zum Thema der hygienischen Eigenschaften von Europaletten (Ladungsträgern) aus Holz im Vergleich zu Kunststoff
Auftragnehmer (AN):	Institut für Holztechnologie Dresden gemeinnützige GmbH
Verantw. Bearbeiter:	Dipl.-Biol. Katharina Plaschkies



Dr. Wolfram Scheiding

Ressortleiter Biologie/Holzschutz

Der Bericht enthält 38 Seiten und eine Anlage mit 5 Seiten. Jede auszugsweise Vervielfältigung bedarf der schriftlichen Genehmigung des IHD. Die Untersuchungsergebnisse beziehen sich ausschließlich auf das untersuchte Material.

1 Auftrag

Das Institut für Holztechnologie Dresden gemeinnützige GmbH (IHD) wurde beauftragt, eine Studie zum Thema der hygienischen Eigenschaften von Europaletten (Ladungsträgern) aus Holz im Vergleich zu Kunststoff durchzuführen.

Dazu wurden der Stand des Wissens und der Technik zum Thema zusammengestellt und ausgewertet sowie die hygienischen Eigenschaften an relevanten Materialien für Europaletten (Nadelholz und Kunststoff) untersucht und vergleichend bewertet. Im Ergebnis liegt eine Dokumentation vor, die sowohl allgemeine Aussagen zu hygienischen Eigenschaften von Materialien als auch konkrete Angaben zu experimentell ermittelten Werten der unterschiedlichen Palettenmaterialien enthält.

2 Arbeitspakete

Die Studie beinhaltet einen theoretischen sowie einen versuchstechnischen Teil und gliedert sich in folgende 4 Arbeitspakete:

- Arbeitspaket 1: Literaturstudie
- Arbeitspaket 2: Bestimmung der mikrobiellen Beladung von Paletten aus der Praxis
- Arbeitspaket 3: Laboruntersuchungen zum Nachweis der antibakteriellen Eigenschaften von Palettenmaterial

3 AP 1: Literaturstudie

3.1 Zielstellung

Ziel ist die Darstellung des aktuellen Erkenntnisstandes zu hygienischen Eigenschaften von Holz und Kunststoff in Bezug auf die mikrobielle Besiedelbarkeit, die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen und angewendete Prüfverfahren zur objektiven Beurteilung.

3.1.1 Hygienische Eigenschaften von Holz und Kunststoff

Anforderungen an Paletten im Lebensmittelbereich

Hygieneanforderungen an Transport und Lagerung von Lebensmitteln sind in der Lebensmittelhygieneverordnung (LMHV) sowie der Lebensmitteltransportbehälterverordnung (LMTV) geregelt.

Von der Organisation GS 1 Germany wurden die Qualitätsklassen A, B und C für gebrauchte EPAL-Paletten definiert. Neben den mechanischen Eigenschaften sind hier auch hygienerelevante Merkmale definiert. Während Paletten der Klasse A keine Verfärbungen aufweisen dürfen, sind in Klasse B dunkle Verfärbungen zugelassen. In Klasse C darf das Holz oberflächlich feucht sein und Verunreinigungen aufweisen, die nicht an das Ladegut abgegeben werden. Nicht gebrauchsfähig sind dagegen Paletten mit Schimmelbewuchs oder Stockflecken. Die Unterscheidung zwischen einer natürlichen Holzverfärbung durch Licht und Sauerstoff, durch Verschmutzung sowie einem mikrobiellen Bewuchs ist durch den Nichtfachmann nicht immer einfach.

Im internationalen Handel sind die Anforderungen an Pack- und Transportmittel aus Holz u. a. im ISPM 15 geregelt - mit dem Ziel, die Verbreitung von Schadorganismen zu verhindern. Es handelt sich hier um phytosanitäre und nicht um hygienische Maßnahmen im eigentlichen Sinne, da es nicht um die Kontrolle von human- oder tierpathogenen Keimen geht.

Voraussetzungen für die mikrobielle Besiedlung von Materialien

Zunächst spielen die klimatischen Bedingungen eine wesentliche Rolle und dabei insbesondere die verfügbare Feuchte, die als wichtigster limitierender Faktor angesehen werden kann (Hankammer und Lorenz 2003). Die meisten Bakterien benötigen für einen Bewuchs an der Oberfläche eine relative Luftfeuchte von 98-100 %, was einem a_w -Wert von 0,98-1,00 entspricht. Als a_w -Wert wird die Wasseraktivität bezeichnet, die ein Maß für das verfügbare Wasser im Substrat ist. Insbesondere halophile oder halotolerante¹ Arten können jedoch auch bei Feuchten ab ca. 60 % wachsen. Eine Pilzbesiedlung kann artenabhängig ab ca. 70 % relativer Luftfeuchte erfolgen, wobei die meisten Arten erst bei Luftfeuchten oberhalb von 85 % wachsen (Mack 2000). Ein weiterer begrenzender Faktor ist die Temperatur. Bakterien und Pilze wachsen in einem sehr weiten Bereich von wenigen Grad über Null bis ca. 40 °C; manche Arten können auch Temperaturen außerhalb dieser Spanne tolerieren. In der natürlichen Umgebung ist stets eine große Vielfalt von Mikroorganismen vorhanden, die unter geeigneten klimatischen Bedingungen Materialien besiedeln können. Die Besiedlung kann jedoch durch die Materialeigenschaften begrenzt werden, zum Beispiel durch natürlich vorkommende biozide Inhaltsstoffe, durch Schutzimprägnierung bzw. -

¹ bevorzugen oder tolerieren hohe Salzgehalte

behandlung mit bioziden Wirkstoffen oder einen ungünstigen pH-Wert, der außerhalb von 2 bis 11 liegt.

Bei dem Bewuchs von Materialien werden in der Regel sogenannte Biofilme aus einer oder mehreren, unterschiedlichen Arten von Mikroorganismen gebildet, in denen die Spezies innerhalb einer Polymermatrix vor negativen Einflüssen, wie Austrocknung, UV-Licht, pH-Wert oder toxischen Substanzen, geschützt sind (Hall-Stoodley et al. 2004).

Unabhängig von der Art des Materials stellt Schmutz auf der Oberfläche oder in der Luft, wie z. B. Staub, Fett und Schweiß, eine Nahrungsquelle dar, so dass auch inerte Materialien wie Glas oder Metall bewachsen werden können. In Bezug auf Paletten können in allen Bereichen Verschmutzungen auftreten, und insbesondere in der Lebensmittelindustrie ist mit organischen Ablagerungen zu rechnen, wenn die Paletten mit unverpackten Gütern in Kontakt kommen.

Mikrobielle Besiedlung von Kunststoffen

Für die mikrobielle Besiedlung von Kunststoff gelten die oben beschriebenen Umgebungsvoraussetzungen. Für Hygienepaletten werden meist Polyethylen (PE) oder Polypropylen (PP) verwendet. Dabei handelt es sich um organische Polymere, die künstlich aus Ethen bzw. Propen synthetisiert werden und als nicht oder begrenzt biologisch abbaubare Kunststoffe gelten. Niedermolekulares Polyethylen kann von Bakterien besiedelt (Jen-Hou und Schwartz 1961) und nur durch Pilze mit speziellen Enzymen (Peroxidasen) teilweise abgebaut werden (Iiyoshi et al. 1998). Ein Abbau der Kunststoffe in der Natur ist nicht zu erwarten, wie neueste Studien mit Mikroplastikmüll der Meere zeigen (Overbeckmann und Labrenz 2019).

Kunststoffe werden unter anderem auch in solchen Bereichen eingesetzt, bei denen eine Besiedlung mit Mikroorganismen weitreichende negative Folgen für die Gesundheit hätte, wie bei Trinkwasserleitungen oder der Medizin. Für Trinkwasserleitungen muss in Deutschland die Eignung der Kunststoffe gemäß dem Arbeitsblatt W270 des Deutschen Vereins des Gas- und Wasserfaches (DVGW) nachgewiesen werden, d. h., im Durchfluss mit Trinkwasser darf sich in einem definierten Zeitraum kein Biofilm bilden (Kötzsch et al. 2016). Das bedeutet jedoch nicht, dass das Material unter anderen Bedingungen nicht besiedelt wird (Kötzsch et al. 2017). Diese scharfe Anforderung erfüllen viele Kunststoffe durchaus, und so wird auch Polyethylen häufig für Trinkwasserleitungen verwendet (<https://www.baunetzwissen.de>).

In dem besonders sensiblen medizinischen Bereich gehören Kunststoffe zu den am meisten verwendeten und in Bezug auf die Patientensicherheit besten Materialien für Geräte, Verbrauchsmaterial und Implantate, wobei Eigenschaften wie Biokompatibilität (Verträglichkeit mit dem Körper) und leichte Reinigung besonders wichtig sind. Die sogenannten medizinischen Kunststoffe können zusätzlich antimikrobiell ausgestattet sein, beispielsweise mit Metallsalzen oder Silberionen (<https://medlexi.de>).

Mikrobielle Besiedlung von Holz

Holz ist ein organisches, natürliches Material und kann von Mikroorganismen (Pilzen und Bakterien) besiedelt und abgebaut werden. Ob eine Besiedlung bzw. ein Abbau erfolgt, hängt von den o.g. Faktoren und insbesondere von der Feuchte ab. Für den Abbau des Holzes durch holzerstörende Pilze (Braun- und Weißfäulepilze sowie Moderfäulepilze) ist nicht die Oberflächen- oder

Umgebungsfeuchte, sondern die Materialfeuchte entscheidend – ein Abbau findet erst ab Holzfeuchten von ca. 30 % statt (Huckfeldt und Schmidt 2006).

In der Praxis ist der Befall von Holz mit Schimmelpilzen unter Bedingungen mit erhöhter Feuchte häufig ein Problem. Dieser bedeutet im Außenbereich vor allem eine optische Beeinträchtigung und stellt im Innenraum zusätzlich ein hygienisches Problem dar, da Schimmelpilze zu gesundheitlichen Problemen – insbesondere zu allergischen Reaktionen – führen können. Das konkrete gesundheitliche Risiko hängt dabei immer von der Art der Pilze, der Art und Häufigkeit des Kontaktes und nicht zuletzt von der Prädisposition (Anfälligkeit) der Personen ab.

Unter optimalen Bedingungen werden nahezu alle Vollhölzer und Holzwerkstoffe von Schimmelpilzen bewachsen; Ausnahmen bilden Materialien mit sehr hohen pH-Werten > 11, wie z. B. zementgebundene Spanplatten. Auch die für Paletten üblicherweise verwendeten Hölzer Fichte und Kiefer stellen ein geeignetes Substrat dar, wobei Kiefernkernholz weniger anfällig gegenüber Schimmelpilzen ist (Scheidung et al. 2003).

Eine besondere Form des Pilzbefalls stellt bei Holz die Verblauung dar. Diese wird von den sogenannten Bläuepilzen, die wie auch Schimmelpilze zur Abteilung der Ascomycota gehören, hervorgerufen. Die dunkelbraunen Pilzhyphen (Pilzfäden) wachsen tief ins Holz ein und erscheinen durch die Lichtbrechung blau. Es werden vorwiegend Nadelhölzer, selten auch Laubhölzer wie Ahorn oder Buche, befallen. Die Bläuepilze ernähren sich von den Inhaltsstoffen der Parenchymzellen des Splintholzes und greifen die Struktursubstanzen Lignin und Cellulose nicht an, so dass die Festigkeit nicht beeinträchtigt wird. Von verblautem Holz geht keine gesundheitliche Gefahr aus (UBA 2019). So ist auch die Verwendung von Paletten aus verblautem Holz unproblematisch.

Im Baubereich ist die Besiedlung von Holz mit Pilzen eine wichtige Fragestellung, während der Bakterienbefall eine untergeordnete Rolle spielt. Bakterien sind zwar auch am Holzabbau beteiligt, benötigen jedoch stets höhere Materialfeuchten als Pilze. Auch im Innenraum treten in der Regel unter feuchten Bedingungen überwiegend bzw. zuerst Schimmelpilze auf.

In Bereichen, in denen die Übertragung von Krankheitserregern bzw. Lebensmittelverderbern verhindert werden muss, kommt der Frage nach der Besiedlung mit Bakterien dagegen eine große Bedeutung zu. Daher beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit den antibakteriellen Eigenschaften von Holz im Lebensmittelbereich und in Krankenhäusern. Die Auswertung dazu findet sich im folgenden Abschnitt, in dem die hygienischen Eigenschaften von Holz und Kunststoff verglichen werden.

Vergleich der hygienischen Eigenschaften von Holz und Kunststoff

Der Fragestellung, ob Holz hygienischer ist als Kunststoff, widmeten sich in der Vergangenheit eine Reihe von Arbeiten. Dabei geht es in den meisten Fällen um die Verwendung im direkten Kontakt (z. B. Schneidunterlagen) oder indirekten Kontakt mit Lebensmitteln (Ak et al. 1994, Welker et al. 1997, Gehrig et al. 2002, Prechter et al. 2002, Schönwälder et al. 2002, Mühlbauer und Milenovic 2012, Kleiner und Lampe 2014, Lücke und Skowyrska 2015). Darüber hinaus wird die Eignung von Holz als Innenausbaumaterial in Bereichen mit hohen Hygieneanforderungen, wie in Krankenhäusern, beurteilt (Strehlein et al. 2004, Schuster et al. 2006). Auch gibt es Studien

über die hygienischen Eigenschaften von Packmitteln (Steinkamp und Wilms 2000, HPE 2014, Milling 2005-1).

In fast allen Arbeiten wurden durch unterschiedliche Verfahren antibakterielle Effekte von Holz nachgewiesen, die einerseits auf die Materialbeschaffenheit und andererseits auf die chemische Zusammensetzung zurückzuführen sind. So besitzt Holz eine poröse Struktur mit einer sehr großen inneren Oberfläche sowie hygroskopische Eigenschaften, wodurch die Wasserverfügbarkeit für Bakterien herabgesetzt ist. Dazu kommen je nach Holzart noch antimikrobielle Inhaltsstoffe (Stingl und Hansmann 2006).

Einen umfassenden Überblick über die hygienischen Eigenschaften von Holz geben Aviat et al. (2016) nach Auswertung von 86 Literaturquellen unter Berücksichtigung der Fragestellung, ob Holz für den Direktkontakt mit Lebensmitteln geeignet ist. Dabei werden antimikrobielle Eigenschaften von Holz sowie Prüfverfahren zum Nachweis diskutiert. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass Holz für den direkten Kontakt mit Lebensmitteln geeignet ist, weil das raue oder poröse Material oft ungünstige Bedingungen für die Mikroorganismen bietet und/oder diese bindet oder im Material einschließt. Diese Eigenschaft ist eher für das antibakterielle Verhalten verantwortlich als mögliche antimikrobielle Inhaltsstoffe (Lukowsky 1994), die in Hölzern enthalten sind. Dabei handelt es sich um Substanzen aus den Stoffgruppen Phenole, Lignane, Tannine, Stilbene, Flavonoide und Terpenoide, die gegen pathogene Mikroorganismen wirken können (Pearce 1996, Mourey und Canillac 2002).

Eine besondere Rolle kommt den sogenannten Holz-Hygienepaletten zu, die aus Kiefernkernholz gefertigt sind. Steinkamp (2004) zeigt im Labor- und Praxistest mit relevanten Keimen aus der Fleisch- und Tierproduktion sowie aus dem Krankenhausbereich eindeutig antibakterielle Eigenschaften und damit Vorteile gegenüber Kunststoffpaletten. Belege für die antibakterielle Wirkung von Kiefernkernholz finden sich außerdem zum Beispiel bei Milling et al. (2005-2) und Ripolles-Avila et al. (2019) für den Transport von Frischfisch.

Nachweismethoden

Für den Nachweis des Überlebens von Bakterien gibt es derzeit noch kein einheitliches Prüfverfahren. Ein Agardiffusionstest gemäß DIN EN ISO 846² oder DIN EN 1104³ ist wenig praxisrelevant und nur dafür geeignet, zu zeigen, dass aus dem Holz antimikrobielle Substanzen austreten können. Dieser Übergang von Stoffen kann jedoch problematisch sein, denn Artikel 3 der EU-Verordnung VO 1935/2004 regelt, dass ein Stoffübergang von antimikrobiellen Substanzen auf Lebensmittel unzulässig sind, da sie diese unter Umständen verändern können.

Deutlich praxisnäher sind Methoden, bei denen die Bakterien auf das Material geimpft werden und nach einer Inkubationszeit auf Nährboden übertragen werden, um die Lebensfähigkeit zu beurteilen. Dazu können die Proben mit Druck auf festen Nährboden gestempelt werden (Gehrig et al. 2002, Fürst 2007, Kaviani-Jahromi 2015), was allerdings den Nachteil hat, dass die sich im

² DIN EN ISO 846:2019: Kunststoffe - Bestimmung der Einwirkung von Mikroorganismen auf Kunststoffe

³ DIN EN 1104:2019: Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln - Bestimmung des Übergangs antimikrobieller Bestandteile

Materialinneren befindenden Bakterien nicht erfasst werden. Vorteilhafter sind sogenannte Abschwemmverfahren, bei denen die Überlebensrate durch Abspülen der Bakterien und anschließendes Übertragen auf Nährmedium bestimmt wird. Bei dieser Methode besteht jedoch eine Unsicherheit bezüglich der vollständigen Ablösung der Bakterien vom Material. Während bei glatten Kunststoffoberflächen eine vollständige Ablösung durch einfaches Abspülen erreicht werden kann, ist die Wiederfindungsrate bei porösen bzw. rauen Holzoberflächen relativ gering (Carpentier 1997) und eine Behandlung durch Ultraschall, Stomacher (Le Bayon et al. 2010) oder Bürsten (Mariani et al. 2007) vorteilhaft. Die höchste Freisetzung kann durch Abschleifen erreicht werden, was zeigt, dass die Bakterien in das Holz eindringen und relativ fest anhaften (Ismail et al. 2014).

Die Methode zum Nachweis antibakterieller Aktivität auf Kunststoffen und anderen porenfreien Oberflächen (ISO CD 22196) kann für Kunststoffpaletten ohne Änderungen angewendet werden. Für unbehandeltes Holz als poröses Material ist sie jedoch ungeeignet bzw. wird das Ergebnis immer eine Reduktion der Bakterienzahl sein, da diese nicht vollständig abgespült werden können.

Eine speziell für Holzprodukte entwickelte Methode zum Nachweis antibakterieller Eigenschaften gibt es derzeit nicht. Die folgenden Prüfverfahren könnten als Basis genutzt und für die Matrix Holz entsprechend angepasst werden:

- DIN EN ISO 846: Bestimmung der Einwirkung von Mikroorganismen auf Kunststoffe.
- ASTM G-22-76: Standard practice for determining resistance of plastics to bacteria.
- DIN EN ISO 20645: Textile Flächengebilde – Prüfung der antibakteriellen Wirkung – Agarplattendiffusionstest.
- EN 1104: Papier und Pappe vorgesehen für den Kontakt mit Lebensmitteln – Bestimmung des Übergangs antimikrobieller Bestandteile.
- ISO 22196: Messung von antibakterieller Aktivität auf Kunststoff- und anderen porenfreien Oberflächen.
- DIN EN ISO 20743: Textilien – Bestimmung der antibakteriellen Wirkung antibakteriell behandelter Erzeugnisse.
- DIN 54379: Prüfung von Papier, Karton und Pappe: Bestimmung der Gesamtkoloniezahl.

Bei der Methodenentwicklung sollten Einflussfaktoren wie das Alter bzw. die Vorgeschichte des Holzes (Neuzustand vs. gebrauchter Zustand), die Umgebungsbedingungen (Temperatur, Luft- und Materialfeuchte) sowie der mögliche Eintrag von Nährstoffen berücksichtigt werden.

3.2 Quellenverzeichnis

Wissenschaftliche Publikationen

- Ak No, Cliver Do, Kaspar Cw (1994) Cutting Boards of Plastic and Wood Contaminated Experimentally with Bacteria. *Journal of Food Protection*: January 1994, Vol. 57, No. 1, S. 16-22.
- Aviat F, Gerhards C, Rodriguez-Jerez JJ, Michel V, Le Bayon, I, Ismail R, Federighi M (2016) Microbial Safety of Wood in Contact with Food: A Review. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety* 15 (3), S. 491–505. DOI: 10.1111/1541-4337.12199.

- Carpentier B (1997) Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiology* (14), S. 31–37.
- Fürst D (2007) Vergleichende Untersuchung der antimikrobiellen Wirksamkeit von sieben verschiedenen Hölzern. Dissertation. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Medizinische Fakultät.
- Gehrig M, Schnell G, Zürcher E, Kucera LJ (2000) Hygienische Eigenschaften von Holz- und Kunststoffbrettern in der Nahrungsmittelverarbeitung und -präsentation: Ein Vergleich. *Holz als Roh- und Werkstoff* 58 (4), S. 265–269. DOI: 10.1007/s001070050423.
- Hall-Stoodley Luanne, Costerton JW, Stoodley P (2004): Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. In: *Nature reviews. Microbiology* 2 (2), S. 95–108. DOI: 10.1038/nrmicro821.
- Hankammer G, Lorenz W (2003) Schimmelpilze und Bakterien in Gebäuden. Müller-Verlag Köln.
- Huckfeldt T, Schmidt O (2015) Hausfäule- und Bauholzpilze: Diagnose und Sanierung. 2. Auflage. Rudolf-Müller-Verlag Köln.
- Iiyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T (1998) Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. *Journal of Wood Science* (44), S. 222-229.
- Ismail R, Le Bayon I, Michel V, Jequel M, Kutnik M, Aviat F, Federighi M (2014) Comparative study of three methods for recovering microorganisms from wooden surfaces in the food industry. *Food Anal Method* 8:1238–47.
- Jen-Hou L, Schwartz A (1961) Verhalten von Bakteriengemischen gegenüber Polyethylen verschiedenen mittleren Molekulargewichts. *Kunststoffe Nr. 51*, S. 317-320.
- Kavian-Jahromi K (2015) Comparison of the antibacterial effects of sapwood and heartwood of the larch tree focusing on the use in hygiene sensitive areas *Eur. J. Wood Wood Products* 73(6), 841-844 (2015)
- Kleiner U, Lampe U (2014) Vergleichsuntersuchungen zum Hygienestatus von Holz- und Kunststoffschneidbrettern im Labormodell. *Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung* 66 (9), S. 319–322.
- Kötzsch S, Rölli F, Sigrist R, Hammes F (2016) Kunststoffe in Kontakt mit Trinkwasser. Hygienetest im Vergleich. *Aqua & Gas* (12), S. 43-52
- Kötzsch S, Rölli F, Sigrist R, Hammes F (2017) Trinkwasserqualität in Gebäuden. Synthesebericht: KTI-Projekt "Materialien in Kontakt mit Trinkwasser". *Aqua & Gas* (10), S. 74-78
- Le Bayon I, Callot H, Kutnik M, Denis C, Revol-Junelles A-M, Millière J-B, Giraud M, Gabillé M, Passédat N (2010) Development of microbiological test methods for the wooden packaging of foodstuffs. IRG/WP 10-20453. Biarritz, France. The International Research Group on Wood Protection.
- Lücke F, Skowyrska A (2015) Hygienic aspects of using wooden and plastic cutting boards, assessed in laboratory and small gastronomy units. *J. Verbr. Lebensm.* 10 (4), S. 317–322. DOI: 10.1007/s00003-015-0949-5.
- Mack H (2000) www.agfdt.de/loads/ds10/mack.pdf. Abgerufen am 07.08.2019
- Mariani C, Briandet R, Chamba J-F, Notz E, Carnet-Pantiez A, Eyoug RN, Oulahal N (2007): Biofilm ecology of wooden shelves used in ripening the French raw milk smear cheese Reblochon de Savoie. *Journal of dairy science* 90 (4), S. 1653–1661. DOI: 10.3168/jds.2006-190.
- Milling A, Kehr R, Wulf A, Smalla K (2005-2): Survival of bacteria on wood and plastic particles: Dependence on wood species and environmental conditions. *Holzforschung* 59 (1), S. 16.
- Milling A, Smalla K, Kehr R, Wulf A (2005-1) The use of wood in practice – a hygienic risk? *Holz Roh Werkst* 63 (6), S. 463–472.

- Mourey A, Canillac N (2002) Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13 (4-5), S. 289–292. DOI: 10.1016/S0956-7135(02)00026-9.
- Mühlbauer M, Milenovic N (2012) Hygienische Eigenschaften von Holz im Vergleich zu Kunststoff. Diplomarbeit. Höhere Technische Bundes, Lehr- und Versuchsanstalt Mödling. Abteilung Holztechnik.
- Neubrand M (2017) Eignung von Holzunterlagen bei der Wildbretzerwirkung. Abschlussarbeit. Höhere Lehranstalt für Forstwirtschaft, Bruck an der Mur.
- Oberbeckmann S, Labrenz M (2019): Marine microbial assemblages on microplastics: diversity, adaptation, and role in degradation. *Annu Rev Mar Sci*; <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010633>.
- Pearce RB (1996) Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol* 132 (2), S. 203–233.
- Prechter S, Betz M, Cerny G, Wegener G, Windeisen E (2002) Hygienische Aspekte von Schneidbrettern aus Holz bzw. Kunststoff. *Holz als Roh- und Werkstoff* 60 (4), S. 239–248. DOI: 10.1007/s00107-002-0301-5.
- Reinhardt P (2018) Kunststoffe in der Medizin: Materialien, Anwendung und Verarbeitung. <https://www.devicemed.de/kunststoffe-in-der-medizin-materialien-anwendung-und-verarbeitung-a-725299/>. abgerufen am 07.08.2019
- Ripolles-Avila C, Hascoët AS, Ríos-Castillo AG, Rodríguez-Jerez JJ (2019) Hygienic properties exhibited by single-use wood and plastic packaging on the microbial stability for fish. *LWT* 113, S. 108309.
- Scheidung W, Kruse K, Plaschkies K, Weiß B (2003) Untersuchungen zum Verhalten ausgewählter Bau- und Holzwerkstoffe gegenüber Schimmelpilzen. Abschlussbericht zum BMWi-Forschungsprojekt Reg.-Nr. 39/01
- Schönwälder A, Kehr R, Wulf A, Smalla K (2002) Wooden boards affecting the survival of bacteria? *Holz als Roh- und Werkstoff* 60 (4), S. 249–257.
- Schuster A, Schmidt-Eisenlohr E, Daschner F (2006) Wie hygienisch und sinnvoll ist Holz in Patientenzimmern? In: *Krankenhaushygiene + Inf.verh.* (28 Heft 4), S. 131–137.
- Steinkamp H, Wilms H (2000) Untersuchungen zur Einführung von hygiene-Paletten aus Holz zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie. Abschlussbericht zum FuE-Vorhaben, Quakenbrück. Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.
- Steinkamp H (2004) Antibakterielle Wirkung von Holz - Einsatz als Filter- und Absorptionsmaterial. *NaRo.Net - Holzforum*. Osnabrück, 19.04.2004.
- Stingl R, Hansmann C (2006) Holz und Hygiene. Antibakterielle Eigenschaften von Materialien. *proHolz Zuschnitt* 22.
- Strehlein M (2004) Nutzung von Holz im Krankenhaus unbedenklich. Studie weist antimikrobielle Wirkung von Kiefernkerneholz gegen Erreger von Krankenhausinfektionen nach. *Holzzentralblatt* (71), S. 951–952.
- UBA (2019) <https://www.umweltbundesamt.de/blaeuepilze#textpart-3>. Abgerufen am 08.08.2019.
- Welker C, Faiola N, Davis S, Maffatore I, Batt Ca (1997) Bacterial Retention and Cleanability of Plastic and Wood Cutting Boards with Commercial Food Service Maintenance Practices. *Journal of Food Protection* 60 (4), S. 407–413.

Internetquellen

Bundesverband HPE e.V. (2014) Keimabtötende Eigenschaften von Holzpackmitteln. Online verfügbar unter <https://www.neue-verpackung.de/26569/keimabtoetende-eigenschaften-von-holzpackmitteln/>, abgerufen am 29.07.2019.

https://medlexi.de/Medizinischer_Kunststoff. Abgerufen am: 07.08.2019

<https://www.baunetzwissen.de/gebaeudetechnik/fachwissen/trinkwarmwasser/rohrleitungen-werkstoffe-2456313>). Abgerufen am: 07.08.21019

Regelwerke

- Verordnung (EG) Nr. 1935/2004: Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen.
- Verordnung (EG) Nr. 852/2004: Lebensmittelhygiene
- Verordnung (EG) Nr. 853/2004: Spezifische Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs.
- Nationale Lebensmittelhygiene-Verordnung (LMHV)
- Nationale Lebensmitteltransport-Verordnung (LMHV)
- ISPM 15-2017: International standard for phytosanitary measures (International Plant Protection Convention)

4 AP 2: Bestimmung der mikrobiellen Beladung von Paletten aus der Praxis

4.1 Zielstellung

Durch die Untersuchung der mikrobiellen Beladung von Paletten soll die Bedeutung dieses Problems im Zuge der Verwendung bewertet werden.

4.2 Untersuchungsmaterial Holzpaletten

Planmäßig sollten Palettenmaterialien von Herstellern und Anwendern/Verarbeitern aus unterschiedlichen Branchen (z. B. Lebensmittelverarbeitung, Futtermittelindustrie, Agrarwirtschaft) mikrobiologisch untersucht werden. Auswahl, Beschaffung und Bereitstellung der Materialien oblagen dem AG.

Am 29.11.2018 erfolgte die Lieferung folgender Holzpaletten durch die Firma Collico Verpackungslogistik und Service GmbH:

- 3 Pakete Nr. 1.1 bis 1.3 mit je 10 Europaletten Nr. E1 bis E30

Dabei handelte es sich um benutzte Holzpaletten. Die Stempel, falls vorhanden, geben Auskunft über die Herkunft; weitere Angaben liegen dem Auftragnehmer nicht vor. Die Angaben der Kennzeichnung sind in Tab. 1 aufgelistet.

Alle Paletten bestehen EPA-konform aus 13 Brettern und 9 Klötzen. Eine Bestimmung der Holzarten war nicht Bestandteil des Auftrags. Stichprobenartige Untersuchungen zeigten, dass es sich um vorwiegend um Nadelhölzer und teilweise um Laubhölzer handelte. Bei den Klötzen wurde entweder Massivholz oder formgepresste Holzspanklötze (Pressspan) verwendet; einige Paletten wiesen beide Klotzarten auf. Einzelheiten dazu finden sich in Abschnitt 4.4 in Tab. 2.

Tabelle 1: Paletten und Auflistung der Stempelangaben

Nr.	IPPC-Stempel	Länderkennung	Registriernummer der PS-Behörde	Lizenz-Nr./Monat/Jahr	Siegel
<i>Paket 1.1</i>					
E 1	x	DE-SN1	497027	021-3-03	EPAL
E 2	-	nicht lesbar			EPAL
E 3	x	nicht lesbar	nicht lesbar	...-6-03	UIC
E 4	x	nicht lesbar	nicht lesbar		EPAL
E 5	x	DK	8015	GC-148-5-0	EPAL
E 6	x	nicht lesbar	nicht lesbar	024-4-07	EPAL
E 7	x	DE-RP	nicht lesbar	nicht lesbar	EPAL
E 8	-	nicht lesbar			EPAL
E 9	x	BY	009	010-2-02	EPAL
E 10	x	H	nicht lesbar	604-2-05	MAV
<i>Paket 1.2</i>					
E 11	x	SK	2291	2156 A27-7-11	UIC
E 12	x	SK	2291	2156 A27-7-08	UIC
E 13	x	PI	18153	152-7-01	EPAL
E 14	x	LV	012	008-4-03	EPAL
E 15	x	SK-3231	2291	2156 A27-8-01	UIC
E 16	x	DE-HE	nicht lesbar	nicht lesbar	EPAL
E 17	x	RO-CV	nicht lesbar	nicht lesbar	EPAL
E 18	x	BE	99012	012-3-09	EPAL
E 19	x	GB	FC-035	05-3	EPAL
E 20	x	BA	nicht lesbar	003-6-05	EPAL

Nr.	IPPC-Stempel	Länderkennung	Registriernummer der PS-Behörde	Lizenz-Nr./Monat/Jahr	Siegel
<i>Paket 1.3</i>					
E 21	x	DE-HE	493027	003-0-12	EPAL
E 22	x	DE-SN1	497027	021-3-07	EPAL
E 23	x	SK	2291	2156 A27-5-09	UIC
E 24	x	nicht lesbar	nicht lesbar	004-5-11	EPAL
E 25	x	SK	2291	2156 A27-7-08	UIC
E 26	x	SK	2291	2156 A27-7-95	UIC
E 27	x	PL	02-387	181-8-01	EPAL
E 28	x	DE-SN1	497027	021-5-05	EPAL
E 29	x	RO CV	nicht lesbar	004-7-07	EPAL
E 30	x	DE-SN1	497027	021-6-12	EPAL

4.3 Untersuchungsmaterial Kunststoffpaletten

Am 28.11.2019 wurden fünf Kunststoffpaletten geliefert, welche nach Angaben des AG in fleischverarbeitenden Betrieben benutzt worden waren. Darüber hinaus liegen dem AN keine Informationen zur Historie der Paletten vor. Die Paletten wiesen keine Kennzeichnungen auf und wurden vom AN durchgehend von Nr. K1 bis K5 nummeriert.

4.4 Untersuchungsmethoden

Quantitative und qualitative Bestimmung der mikrobiellen Kontamination an der Oberfläche durch Abklatschverfahren

Die Holzpaletten wurden stichprobenartig an drei unterschiedlichen Stellen in den folgenden Bereichen beprobt:

- auf der Oberseite eines Deckbrettes,
- auf der Unterseite eines Deckbrettes,
- an einem Palettenklotz.

Dabei wurden spezielle Kontakt-Petrischalen mit festem Nährmedien auf das Material aufgedrückt und so die oberflächlich vorhandenen Mikroorganismen direkt übertragen. Als Nährmedium wurden DG18-Agar für xerophile Pilze und Malzextrakt-Agar (MEA) als Universalmedium für Pilze und Bakterien verwendet. Die beprobten Schalen wurden über einen Zeitraum von einer Woche im Brutschrank bei 25 °C bebrütet. Zur Auswertung wurden die ausgekeimten Mikroorganismen-Kolonien ausgezählt und die auftretenden Arten anhand der mikro- und makromorphologischen Merkmale näher bestimmt.

Die Kunststoffpaletten wurde an jeweils fünf Stellen mit Abstrichtupfern auf einer Fläche von jeweils 20 cm² beprobt. Dabei wurden offensichtlich kontaminierte sowie unauffällige Bereiche berücksichtigt. Die Tupferproben wurden in 0,9 %iger Kochsalzlösung mit Zusatz von Tween 80 eluiert und mittels Spiralplater auf unterschiedliche Nährmedien zur Bebrütung übertragen. Verwendet wurden MEA, DG18-Agar sowie Plate-Count-Agar (PCA). Die ausgekeimten Kolonien wurden gezählt und anhand morphologischer und biochemischer Merkmale näher bestimmt.

Quantitative und qualitative Bestimmung der mikrobiellen Kontamination der Holzpaletten über den Materialquerschnitt durch Suspensionsverfahren

Hier wurden stichprobenartig von jeder Palette zwei Bohrkerne mit einem Durchmesser von 10 mm aus solchen Bereichen von horizontalen Deckbrettern entnommen, die keinen offensichtlichen Pilzbefall und keine Verschmutzung aufwiesen. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß DIN ISO 16000-21:21014-05⁴. Die Bohrkerne wurden sofort in jeweils 10 ml Phosphatpuffer überführt. Die Ansätze wurden zum Abspülen der anhaftenden Keime für 15 min auf einem Kreisschüttler geschüttelt. Verdünnungsstufen des Eluates wurden dann mittels Spiralplater auf Nährböden übertragen, um nach einer Bebrütung die Keimzahl zu bestimmen.

4.5 Ergebnisse

4.5.1 Holzpaletten

Die Paletten wiesen unterschiedliche Erscheinungsformen auf, welche in den Tabellen 2 bis 4 dargestellt sind.

Die Mehrzahl zeigte Vergrauungen und teilweise auch pilzliche Verblauungen des Holzes, was jedoch keine Qualitätsminderung bedeutet. 18 Paletten waren in gewisser Weise verschmutzt, wobei es sich oft um Fußspuren und schwarze Staplerspuren handelte. Die stärksten Verschmutzungen hatten die Paletten des Paketes 1.1. Diese zeigten auch in fast allen Fällen einen mit bloßem Auge deutlich erkennbaren Pilzbefall in Form farbiger Beläge an verschiedenen Stellen der Paletten. Insgesamt war auf 14 Paletten ein Pilzbefall zu erkennen, wodurch diese nach den EPAL-Qualitätskriterien nicht mehr gebrauchsfähig waren.

Bei den Abdruckproben auf Nährmedien wurde eine Vielzahl von Pilzen nachgewiesen. Am häufigsten wurden Schimmelpilze der Gattungen *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* und *Trichoderma* sowie der Bläuepilz *Aureobasidium pullulans* nachgewiesen. Alle Pilzarten treten typischerweise auch auf Holz in anderen Bereichen, insbesondere im Baubereich, auf. Daneben wurden teilweise auch Bakterien und Hefen gefunden.

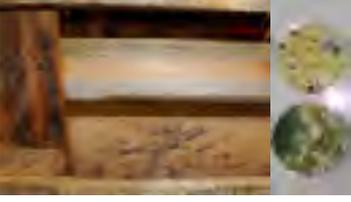
Die mikrobiologische Untersuchung der stichprobenartig entnommenen Bohrkerne zeigte deutliche Unterschiede in der Beladung (Tab. 5). Bei der Mehrzahl der Proben (20 Paletten) lag die volumenbezogene Mikroorganismen-Konzentration unter der Nachweisgrenze und war somit mikrobiologisch unauffällig. Das Paket 1.1. zeigte, wie auch die Abdruckproben, deutlich höhere Werte als die anderen. Fünf Paletten wurden mit $> 100.000 \text{ KbE/cm}^3$ der höchsten Kategorie zugeordnet.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass jeweils mehrere Paletten in engem Kontakt zueinander verpackt waren und es somit zu einer Übertragung der Pilzsporen kommen konnte. Die bei den Abdruckproben ausgekeimten Pilze sind nicht in jedem Fall die Arten, die auch auf dem Material am stärksten gewachsen waren. Das zeigt jedoch, dass auf allen Materialien keimfähige Pilzstrukturen vorhanden sind, die unter ungünstigen Bedingungen rasch auskeimen und zu einem Befall führen können.

⁴ DIN ISO 16000-21:2014-05: Innenraumluftverunreinigungen – Teil 21: Nachweis und Zählung von Schimmelpilzen – Probenahme von Materialien

Tabelle 2: Beschreibung der Paletten E1 bis E10 (Paket 1.1)

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E1</p> <ul style="list-style-type: none"> wenig vergraut stark verschmutzt grüne Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> stark vergraut grüne und weiße Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan teilweise beschädigt graue Beläge 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus glaucus</i>-Gruppe, <i>A. niger</i>-Komplex, <i>A. westerdijkiae</i>, <i>Alternaria</i> sp., Zygomycet 		
<p>E2</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise stark vergraut/ verblaut stark verschmutzt teilweise beschädigt grüne Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> stark vergraut grau-grüne Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz und Pressspan graue und weiße Beläge 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus glaucus</i>-Gruppe, <i>Trichoderma</i> sp., Bakterien 		
<p>E3</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut gering verschmutzt 	<ul style="list-style-type: none"> unauffällig 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch nicht erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 		
<p>E4</p> <ul style="list-style-type: none"> gering verblaut gering verschmutzt fleckige, schwarze Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> grüne Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Trichoderma</i> sp., Hefe (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>) 		

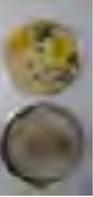
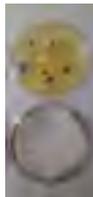
Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E5</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ teilweise vergraut ▪ mäßig verschmutzt ▪ schwarze Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus ochraceus</i>, <i>Trichoderma</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ stark vergraut/verblaut ▪ dunkle Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ graue Beläge 
<p>E6</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ teilweise vergraut ▪ mäßig verschmutzt ▪ dunkle, fleckige Verfärbungen  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Trichoderma</i> sp., Hefe (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>), Bakterien 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ großflächige dunkle Verfärbungen ▪ weiße und dunkle Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ graue Beläge 
<p>E7</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ gering verschmutzt ▪ graue Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Trichoderma</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ teilweise vergraut/teilweise verblaut 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ mäßig verschmutzt 
<p>E8</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ großflächig vergraut ▪ gering verschmutzt ▪ wenige schwarze Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Trichoderma</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., Bakterien 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ gering verblaut 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massivholz + 1x Pressspan ▪ dunkel 

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E9</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise vergraut mäßig verschmutzt 	<ul style="list-style-type: none"> großflächige dunkle Verfärbungen stark verschmutzt 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz + Pressspan unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Trichoderma</i> sp., zahlreiche Bakterien 		
<p>E10</p> <ul style="list-style-type: none"> gering vergraut mäßig verschmutzt grau-schwarze Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> teilweise flächig verblaut schwarze Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz grau-grüne Beläge 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Zygomycet</i>, <i>Trichoderma</i> sp., <i>Alternaria</i> sp. 		

Tabelle 3: Beschreibung der Paletten E11 bis E20 (Paket 1.2)

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E11</p> <ul style="list-style-type: none"> mäßig verschmutzt graue Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> wenige grau-grüne Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz Splintholz verblaut 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Trichoderma</i> sp., <i>Zygomycet</i>, Bakterien 		
<p>E12</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut sauber 	<ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut schwarze Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz Splintholz verblaut 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Alternaria</i> sp., <i>Zygomycet</i> 		

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E13</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ wenig vergraut ▪ sauber ▪ grau-schwarze Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, Bakterien 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ wenig vergraut 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massivholz ▪ unauffällig 
<p>E14</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ gering vergraut, teilweise verblaut ▪ mäßig verschmutzt ▪ graue Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Mucor</i> sp., Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sauber 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ unauffällig 
<p>E15</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ gering verschmutzt  <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Zygomycet</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ teilweise vergraut/verblaut ▪ partiell graue Beläge 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massivholz ▪ Splintholz verblaut 
<p>E16</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ großflächig vergraut/verblaut ▪ mäßig verschmutzt ▪ grau-grüne Beläge  <ul style="list-style-type: none"> ▪ kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Zygomycet</i>, Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sauber 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ grau-grüner Belag 

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E17</p> <ul style="list-style-type: none"> nicht vergraut/verblaut gering verschmutzt  	<ul style="list-style-type: none"> sauber (wenige Staplerspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan unauffällig  
<p>E18</p> <ul style="list-style-type: none"> durchgehend vergraut/verblaut gering verschmutzt (Staplerspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> partiell graue Beläge  	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan unauffällig  
<p>E19</p> <ul style="list-style-type: none"> gering vergraut/verblaut gering verschmutzt Holz rötlich (Lärche/Douglasie)  	<ul style="list-style-type: none"> sauber (wenige Staplerspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz punktuell grauer Belag  
<p>E20</p> <ul style="list-style-type: none"> gering verschmutzt (Fußspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> sauber (wenige Staplerspuren) punktuell graue Beläge  	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz pilzliche Beläge  

kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar
 Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Aspergillus-niger*-Komplex, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus stolonifer*

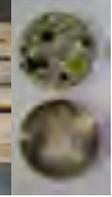
Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar
 Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Aspergillus-niger*-Komplex, *Aspergillus flavus*, *Zygomycet*, *Trichoderma* sp., Bakterien (*Bacillus* sp.)

Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar
 Auskeimung: *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus stolonifer*

Pilzbefall makroskopisch erkennbar (Klötze)
 Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Aspergillus-niger*-Komplex, *Aspergillus ochraceus*, *Rhizopus stolonifer*, Hefe

Tabelle 4: Beschreibung der Paletten E21 bis E30 (Paket 1.3)

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E21</p> <ul style="list-style-type: none"> gering verschmutzt (wenige Fußspuren) weiße Flecken im Randbereich 	<ul style="list-style-type: none"> wenige Staplerspuren 	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Rhizopus</i> sp., <i>Achaetomium</i> sp., Hefen, Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 		
<p>E22</p> <ul style="list-style-type: none"> gering vergraut/verblaut gering verschmutzt (wenige Staplerspuren) 	<ul style="list-style-type: none"> teilweise vergraut/verblaut 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz teilweise verblaut Farbkern 
<ul style="list-style-type: none"> kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Rhizopus stolonifer</i>, <i>Trichoderma</i> sp., Hefe 		
<p>E23</p> <ul style="list-style-type: none"> sehr gering vergraut/verblaut gering verschmutzt 	<ul style="list-style-type: none"> teilweise vergraut/verblaut sauber 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar Auskeimung: <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Rhizopus</i> sp., Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 		
<p>E24</p> <ul style="list-style-type: none"> gering verschmutzt (wenige Fußspuren) 	<ul style="list-style-type: none"> punktuell schwarzer und grüner Belag 	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz unauffällig 
<ul style="list-style-type: none"> Pilzbefall makroskopisch erkennbar (Unterseite) Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Rhizopus</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., Bakterien (<i>Bacillus</i> sp.) 		

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E25</p> <ul style="list-style-type: none"> gering vergraut/teilweise verblaut gering verschmutzt (Fußspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> teilweise vergraut/verblaut gering verschmutzt (Stapler-spuren) punktuell grauer Belag  	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz wenig grauer Belag  
<p>E26</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut gering verschmutzt (Fußspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut sauber punktuell grauer Belag  	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz unauffällig  
<p>E27</p> <ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut gering verschmutzt (Fußspuren)  	<ul style="list-style-type: none"> teilweise verblaut  	<ul style="list-style-type: none"> Massivholz und Pressspan unauffällig  
<p>E28</p> <ul style="list-style-type: none"> sauber  	<ul style="list-style-type: none"> sauber  	<ul style="list-style-type: none"> Pressspan unauffällig  

▪ Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar
 ▪ Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus stolonifer*, Bakterien (*Bacillus*)

▪ Pilzbefall makroskopisch nicht eindeutig erkennbar
 ▪ Auskeimung: *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-niger*-Komplex, *Rhizopus* sp., Hefe (*Rhodotorula* sp.), Bakterien (*Bacillus*)

▪ Pilzbefall makroskopisch erkennbar (Unterseite)
 ▪ Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus-glaucus*-Gruppe, *Rhizopus* sp.

▪ kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar
 ▪ Auskeimung: *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhizopus stolonifer*, Bakterien (*Bacillus*)

Bretter Oberseite	Bretter Unterseite	Klötze
<p>E29</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ sauber  <ul style="list-style-type: none"> ▪ kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus-glaucus</i>-Gruppe, <i>Aspergillus versicolor</i>, <i>Aspergillus-niger</i>-Komplex, <i>Rhizopus</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ sauber 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Massivholz ▪ Hirnholz mit dunkler Verfärbung 
<p>E30</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ gering verblaut ▪ sauber  <ul style="list-style-type: none"> ▪ kein Pilzbefall makroskopisch erkennbar ▪ Auskeimung: <i>Penicillium</i> spp., <i>Cladosporium</i> spp., <i>Aspergillus flavus</i>, <i>Aspergillus versicolor</i>, <i>Aspergillus ochraceus</i>, <i>Aureobasidium pullulans</i>, <i>Rhizopus stolonifer</i>, Bakterien (<i>Bacillus</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ nicht verblaut 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pressspan ▪ graue Beläge 

Tabelle 5: Vergleich der durch Kontaktproben und im Suspensionsverfahren ermittelten mikrobiellen Beladung der Holzpaletten (Repräsentative Fotos dazu befinden sich in der Anlage)

Palet- teNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontaktproben [KbE/cm ²]			Lebendkeimzahl im Querschnitt, ermittelt an Bohrkernen mit Suspensionsverfahren [KbE/cm ³] (untere Nachweisgrenze = 400)
	Oberseite	Unterseite	Klotz	
<i>Paket 1.1</i>				
E 1	> 20	> 20	> 20	1×10^4
E 2	> 20	> 20	> 20	9×10^3
E 3	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 4	> 20	> 20	< 10	1×10^3
E 5	> 20	> 20	> 30	4×10^4
E 6	> 30	> 30	> 30	4×10^5
E 7	> 30	< 10	< 10	2×10^4
E 8	> 30	> 30	> 30	1×10^5
E 9	> 30	> 30	> 30	4×10^5
E 10	> 30	> 30	> 30	5×10^5
<i>Paket 1.2</i>				
E 11	> 30	< 10	< 10	6×10^2
E 12	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 13	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 14	< 10	< 10	< 10	4×10^2
E 15	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 16	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 17	> 10	> 10	> 10	2×10^2
E 18	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 19	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 20	> 10	> 10	> 10	2×10^2
<i>Paket 1.3</i>				
E 21	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 22	> 30	< 10	> 10	2×10^2
E 23	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 24	2	< 10	< 10	2×10^2
E 25	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 26	> 30	< 10	< 10	2×10^2
E 27	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 28	> 10	< 10	< 10	2×10^2
E 29	> 30	> 10	> 10	2×10^2
E 30	> 10	< 10	< 10	2×10^2

4.5.2 Kunststoffpaletten

Alle Kunststoffpaletten wiesen deutliche Gebrauchsspuren in Form von zerkratzten Oberflächen auf. Darüber hinaus waren teilweise deutliche Verschmutzungen vorhanden, wie dunkle Beläge, aber auch Blut- und Fleischreste. Die durch Abstrichproben ermittelten Keimzahlen der Kunststoffoberflächen finden sich in Tab. 6. Im Anschluss daran werden die jeweils fünf beprobten Bereiche sowie die Auskeimungen auf den Nährböden dargestellt.

Tabelle 6: Mikrobielle Beladung der Kunststoffoberflächen

Palette Nr.	Beprobter Bereich Nr.	Lebendkeimzahl [KbE/cm ²]		
		PCA	MEA	DG 18
K1	1.1	2×10^4	1×10^4	2×10^3
	1.2	4×10^4	2×10^3	n.a. ⁵
	1.3	4×10^3	3×10^3	2×10^2
	1.4	3×10^3	2×10^3	3×10^3
	1.5	5×10^1	2×10^2	4×10^1
K2	2.1	2×10^1	2×10^1	3×10^1
	2.2	8×10^3	8×10^3	1×10^1
	2.3	6×10^4	7×10^2	1×10^2
	2.4	< 10	< 10	< 10
	2.5	< 10	< 10	< 10
K3	3.1	1×10^5	2×10^4	2×10^3
	3.2	2×10^4	4×10^3	2×10^3
	3.3	1×10^3	3×10^2	2×10^3
	3.4	4×10^2	3×10^3	2×10^3
	3.5	< 10	1×10^2	3×10^1
K4	4.1	5×10^4	n.a.	1×10^4
	4.2	2×10^4	n.a.	1×10^4
	4.3	8×10^4	2×10^4	2×10^4
	4.4	8×10^1	3×10^2	2×10^2
	4.5	5×10^1	1×10^2	1×10^2
K5	5.1	4×10^4	n.a.	2×10^4
	5.2	< 10	2×10^1	2×10^1
	5.3	2×10^1	2×10^1	2×10^1
	5.4	< 10	2×10^1	2×10^1
	5.5	4×10^1	1×10^1	< 10

Palette K1

Die Palette war relativ stark verschmutzt mit angetrockneten Fleischresten und Blutspuren. Ein mikrobieller Befall war mit bloßem Auge nicht erkennbar. Bei den Auskeimungen zeigten sich jedoch deutliche mikrobielle Kontaminationen. Es traten vor allem Hefepilze (u. a. *Rhodotorula mucilaginosa*) und Bakterien auf. Bei den Bakterien wurden in Zusammenhang mit eingetrockneten Fleischresten vor allem coliforme Bakterien und andere Enterobakterien, einschließlich *Escherichia coli*, aber auch grampositive Kokken, nachgewiesen. Bei den unauffälligen Bereichen war die Keimzahl entsprechend gering (K1.5).

⁵ n.a.: nicht auswertbar

Bereich K1.1: angetrockneter Fleischrest



MEA

DG18

PCA

Bereich K1.2: bräunliche Verschmutzung auf der Oberseite (mit Schablone von 20 cm²)



MEA

DG18

PCA

Bereich K1.3: angetrockneter Fleischrest



MEA

DG18

PCA

Bereich K1.4: angetrockneter Fleischrest



MEA

DG18

PCA

Bereich K1.5: unauffälliger Bereich, gering verschmutzt



MEA

DG18

PCA

Palette K2

Die Palette bot ein ähnliches Erscheinungsbild wie die Palette K1 mit relativ starker Verschmutzung in Form von eingetrockneten Fleischresten und Blutspuren. Die mikrobiellen Kontaminationen waren jedoch deutlich geringer als bei der Palette K1. Es traten ebenfalls überwiegend Hefen und gramnegative Bakterien, einschließlich Enterobakterien, und nur vereinzelt Schimmelpilze auf. In der folgenden Übersicht sind die beprobten fünf Bereiche sowie die Auskeimungen auf den Nährböden dargestellt.

Bereich K2.1: angetrockneter Fleischsaft auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K2.2: unauffälliger Bereich auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K2.3: angetrockneter Fleischsaft auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

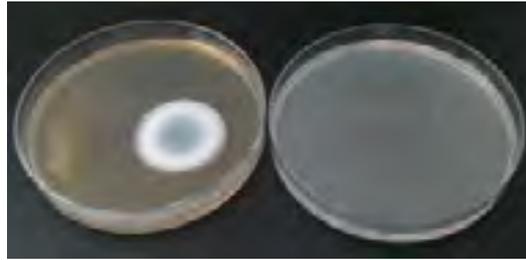
Bereich K2.4: angetrockneter Fleischsaft im Zwischenraum



MEA

DG18

Bereich K2.5: angetrockneter Fleischsaft im unteren Bereich



MEA

DG18

Palette K3

Diese Palette zeigte normale Gebrauchsspuren sowie durchgehend geringe Verschmutzungen und einige nasse, farblose Flecken. Trotz dieser unauffälligen bzw. geringen Verschmutzungen wurden deutliche mikrobielle Kontaminationen nachgewiesen, wobei auch hier überwiegend Hefen sowie gramnegative und grampositive Bakterien vorhanden waren. Besonders hoch war die Hefe-/Bakterienkonzentration in dem beprobten nassen Bereich (K3.1). In den unauffälligen Bereichen fanden sich auch Schimmelpilze (*Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp.).

Bereich K3.1: nasser Bereich auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K3.2: dunkle Verschmutzung auf der Oberseite

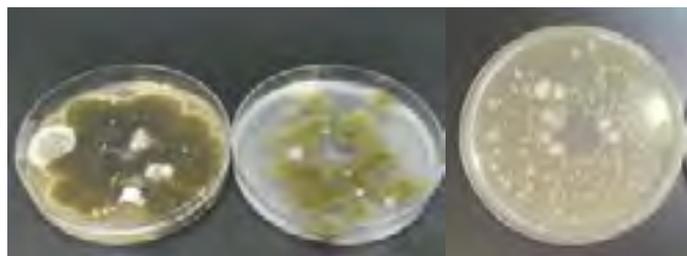


MEA

DG18

PCA

Bereich K3.3: unauffälliger Bereich im Zwischenraum



MEA

DG18

PCA

Bereich K3.4: gering verschmutzter Bereich auf der Unterseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K3.5: gering verschmutzter Bereich im Zwischenraum



MEA

DG18

PCA

Palette K4

Diese Palette zeigte normale Gebrauchsspuren, war durchgehend deutlich verschmutzt und teilweise nass. Auch hier wurden deutliche mikrobielle Kontaminationen mit Hefen, Bakterien und vereinzelt Schimmelpilzen (*Paecilomyces variotii*) nachgewiesen und dabei besonders hohe Hefe-/Bakterienkonzentration in den beprobten nassen Bereichen (K4.1 und K4.3) gefunden.

Bereich K4.1: nasser, schmutziger Bereich auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K 4.2: dunkle Verschmutzung auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K 4.3: nasser, schmutziger Bereich auf der Oberseite



MEA

DG18

PCA

Bereich K 4.4: verschmutzter Bereich im Zwischenraum



MEA

DG18

Bereich K 4.5: verschmutzter Bereich im Zwischenraum



MEA

DG18

PCA

Palette K5

Diese Palette war besonders stark verschmutzt – jedoch ohne Fleisch- oder Blutspuren. Auf der Unterlage waren großflächige schwarze Beläge vorhanden. Es fand sich jedoch ausschließlich auf der Oberseite deutliche Kontaminationen mit Bakterien, Hefen und vereinzelt Schimmelpilzen.

Bereich K 5.1: grau-verschmutzter Bereich auf der Oberseite

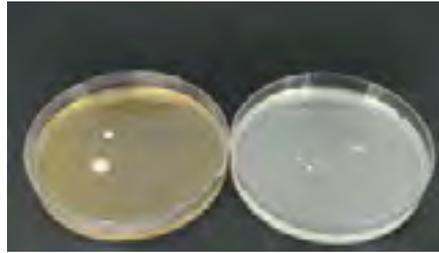


MEA

DG18

PCA

Bereich K 5.2: grau-verschmutzter Bereich auf der Oberseite



MEA

DG18

Bereich K 5.3: grau-verschmutzter Bereich im Zwischenraum



MEA

DG18

PCA

Bereich K 5.4: schwarze Beläge auf der Unterseite



MEA

DG18

Bereich K 5.5: schwarze Beläge auf der Unterseite



MEA

DG18

5 AP 3: Laboruntersuchungen zum Nachweis der antibakteriellen Eigenschaften von Palettenmaterial

5.1 Zielstellung

Ziel war der Vergleich von Palettenmaterial aus Holz und Kunststoff hinsichtlich der mikrobiellen Besiedelbarkeit und Überlebensfähigkeit von Bakterien.

5.2 Untersuchungsmaterial

Durch den Auftraggeber wurden verschiedene Materialien bereitgestellt.

Am 29.11.2018 wurden folgende Paletten geliefert:

- Hygienepaletten H1 aus HDPE,
- Europaletten aus Fichtenholz: Da sich bei stichprobenartigen Untersuchungen herausstellte, dass es sich nicht ausschließlich um Fichtenholz, sondern auch um Kiefernholz handelte, wurde dieses Material verworfen und nicht in die Untersuchungen einbezogen.

Dafür lieferte der Auftraggeber am 31.05.2019 Bretter aus Fichten- und Kiefernholz über die Firma Treyer aus Peterstal. Das Kiefernholz wurde durch den AN in Splint- und Kernbereiche getrennt.

Vom AG wurde das Vergleichsmaterial Polyethylenfolie zur Verfügung gestellt. Alle untersuchten Materialvarianten sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Untersuchte Materialien (Abb. 1)

Nr.	Material
1	H1 Kunststoffhygienepalette
1.1	glatte Originaloberfläche
1.2	aufgeraute Oberfläche (mit Schleifpapier behandelt zur Simulation von Gebrauchsspuren)
2	Fichtenholz
3	Kiefern Splintholz
4	Kiefern Kernholz
5	Vergleichsmaterial Polyethylenfolie

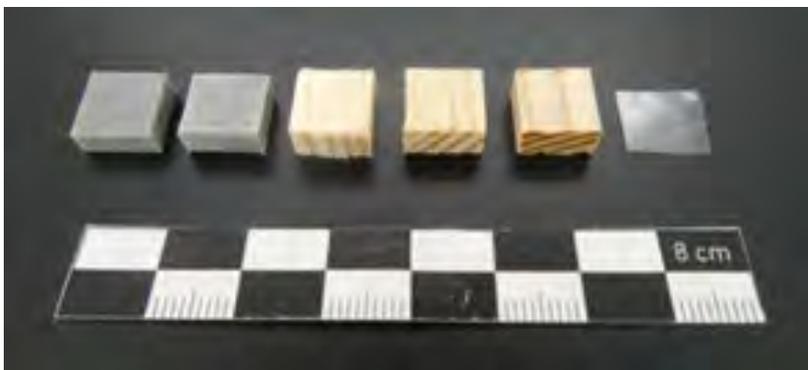


Abb. 1: Untersuchte Materialien (v.l.n.r. Nr. 1.1 bis 5)

5.3 Untersuchungsmethode

Da es kein Normverfahren für die Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften von Holz gibt, wurden zwei Verfahren herangezogen und modifiziert:

- ISO 22196⁶: Die Prüforganismen aus dieser Norm wurden verwendet, und die Herstellung der Bakteriensuspension erfolgte normgemäß.
- DIN EN ISO 20743⁷: Die Bestimmung der Lebensfähigkeit erfolgte nach dem in dieser Norm beschriebenen Lumineszenzverfahren.

Prüfprinzip

Die Materialien wurden mit einer definierten Bakteriensuspension beimpft, die Ansätze über einen Zeitraum von 18 bis 24 Stunden bei 36 °C in einer feuchten Kammer bebrütet und anschließend die Überlebensrate mit Hilfe des Lumineszenzverfahrens bestimmt. Um den Einfluss einer Reinigung zu ermitteln, wurden ausgewählte Ansätze nach der Bebrütung vor der Bestimmung der Überlebensrate durch unterschiedliche Verfahren gereinigt.

Prüfvarianten

- Prüfvariante 1: Bestimmung der Besiedelbarkeit mit Bakterien unter optimalen Bedingungen für Bakterien: Beimpfung von feuchten Materialproben
- Prüfvariante 2: Bestimmung der Besiedelbarkeit mit Bakterien unter suboptimalen Bedingungen für Bakterien: Beimpfung von trockenen Materialproben
- Prüfvariante 3: Bestimmung der Besiedelbarkeit mit Bakterien unter verschärften Bedingungen: Beimpfung von feuchten Materialproben unter Zugabe einer Nährlösung
- Prüfvariante 4: Bestimmung des Einflusses einer Reinigung auf die Überlebensfähigkeit von Bakterien

Prüfbakterien

- *Escherichia coli* DSM 1576
- *Staphylococcus aureus* DSM 799

Prüfkörper

Es wurden quaderförmige Prüfkörper (Volumen 0,5 cm³) mit einer Prüffläche von 10 mm × 10 mm und einer Dicke von 5 mm verwendet (s. Abb. 1).

Vorbehandlung der Prüfkörper

Die Holzprüfkörper wurden im heißen Dampf, die Kunststoff-Prüfkörper durch Gammastrahlung sterilisiert.

Anschließend erfolgte die unterschiedliche Vorbehandlung der Prüfvarianten:

- Prüfvariante 1: Auffeuchtung durch Auftragen von 1 ml deionisiertem Wasser, Einwirkung über mehrere Stunden, bis das Wasser komplett aufgenommen war

⁶ ISO 22196:2011: Messung der antibakteriellen Aktivität auf Kunststoff- und anderen porenfreien Oberflächen

⁷ DIN EN ISO 20743:2013: Textilien – Bestimmung der antibakteriellen Wirkung antibakteriell behandelter Erzeugnisse.

Prüfvariante 2: keine weitere Vorbehandlung

Prüfvarianten 3 u. 4: Auffeuchtung und Nährstoffzugabe durch Auftragen von 1 ml 5%iger Malzlösung, Einwirkung über mehrere Stunden, bis die Nährlösung komplett aufgenommen war

Beimpfung

Es wurden jeweils 500 µl einer Bakteriensuspension mit einer Konzentration von 5×10^5 Bakterien/ml mittig aufpipettiert.

Bebrütung

Die beimpften Ansätze wurden über 24 Stunden bei 36 °C und einer relativen Luftfeuchte von $> 95 \pm 4 \%$ gelagert.

Reinigung der Prüfkörper nach der Lagerung (nur Prüfvariante 4)

Die Prüfkörper wurden durch zwei unterschiedliche Verfahren gewaschen:

- A) mit Wasser: für 1 min in 10 ml mit Vortexer geschüttelt
- B) mit Wasser mit Spülmittelzusatz: für 1 min in 10 ml Wasser mit Spülmittelzusatz und anschließend für 1 min in 10 ml Wasser mit Vortexer geschüttelt

Abspülen der Bakterien nach der Lagerung

Die Prüfkörper wurden mit der beimpften Oberseite nach unten in Zellkulturplatten auf Glasperlen gelegt, 6 ml phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung dazugegeben und auf dem Kreisschüttler bei 250 rpm über 15 min geschüttelt (Abb. 2 und 3). Danach wurde umgehend die Lebensfähigkeit der Bakterien im Eluat mittels Lumineszenzverfahren gemessen.



Abb. 2: Kreisschüttler mit Prüfansätzen



Abb. 3: Zellkulturplatten mit Prüfkörpern auf Glasperlen zum Ausschütteln

Verfahren zur Bestimmung der Lebensfähigkeit der Bakterien (Lumineszenzverfahren)

Grundlage für dieses Verfahren ist die Fähigkeit aller lebenden Zellen, Adenosintriphosphat (ATP) als Energiespeicher zu bilden. Dieses kann über die Luciferin-Luciferase-Reaktion nachgewiesen werden, bei der das ATP die Energie bereitstellt, um das Substrat Luciferin mit Hilfe des Enzyms Luciferase umzuwandeln und dabei Licht zu erzeugen. Da die emittierte Lichtmenge proportional zur ATP-Menge ist, kann das System zum Nachweis der Lebensfähigkeit bzw. zur Bestimmung der Lebendkeimzahl genutzt werden. Der Test wird auch als ATP-Test bezeichnet.

Bei den Untersuchungen kam das Testsystem „bactiter glo“ der Firma Promega zur Anwendung. Dabei wurden je 50 µl Eluat in 96well-Mikrotiterplatten mit 50 µl Nachweisreagens vermischt und nach einer Inkubationszeit von 5 min die Lumineszenz gemessen.

5.4 Ergebnisse

Das Lumineszenzsignal ist ein Maß für die Bakterienaktivität. Mit den zur Beimpfung verwendeten Bakteriensuspensionen zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem Lumineszenzsignal (RLU) und der Zellzahl (Abb. 4), so dass daraus die Bakterienzahl berechnet werden konnte.

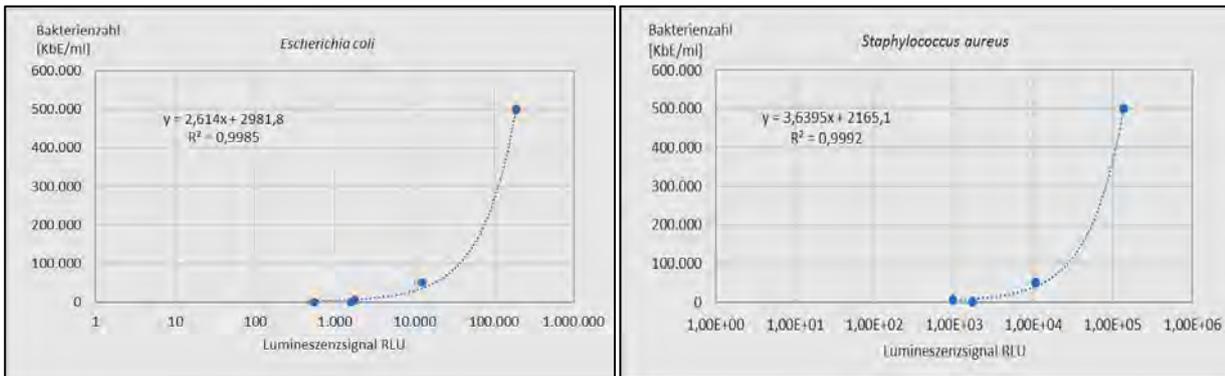


Abb. 4: Eichkurve: Zusammenhang zwischen Bakterienzahl und Lumineszenzsignal

Die Ergebnisse der Lumineszenzmessung sind in der Tabelle 8 und den Diagrammen in Abb. 5 dargestellt.

Bei der Lagerung über 24 Stunden zeigten alle Hölzer ein ähnliches Verhalten. Die Aktivität von *Escherichia coli* wurde bei allen Hölzern, unabhängig von der Prüfvariante, deutlich reduziert, während sie auf den Kunststoffpaletten fast in jedem Fall zunahm. Eine Ausnahme bildete hier die Prüfvariante 3 mit Nährlösung, bei der es zu einer Reduktion der Aktivität kam.

Bei *Staphylococcus aureus* war das Ergebnis ähnlich, außer, dass bei den Proben aus Kiefernkernholz keine wesentliche Änderung der Aktivität nach der Inkubation verzeichnet wurde. Demgegenüber wurden auf den Kunststoffpaletten nach der Inkubation deutlich höhere Lumineszenzsignale als vorher gemessen. Die Aufrauung der Kunststoffoberfläche führte zu einer deutlich stärkeren Vermehrung von *Staphylococcus aureus* als auf der glatten Oberfläche.

Die Auffeuchtung der Prüfkörper bei der Prüfvariante 1 beeinflusste das Ergebnis nur unwesentlich. Durch Zugabe einer Nährlösung in der Prüfvariante 3 nahm die Aktivität in den meisten Fällen ab, was durch eine gewisse Klebrigkeit der zuckerhaltigen Lösung und damit eine stärkere Anhaftung der Bakterien begründet werden kann.

Die Reinigung mit Wasser bzw. mit Spülmittel und Wasser führte in jedem Fall zu einer weiteren Reduktion der Aktivität.

Tabelle 8: Lumineszenzsignale (RLU) der Eluate vor und nach der Inkubation (Mittelwerte aus n=4, abzüglich Blindwerte und bei Kiefernkernelholz abzüglich Korrekturwert)

Material	vor der Inkubation	RLU nach einer Inkubationszeit von 24 h				
		Prüfvariante 1	Prüfvariante 2	Prüfvariante 3		
		ohne Reinigung	ohne Reinigung	ohne Reinigung	Reinigung mit Wasser	Reinigung mit Spülmittel
<i>Escherichia coli</i>						
1.1 H1-Palette glatt	1.220	3.044	2.357	963	< 250 ⁸	< 1
1.2 H1-Palette rau	1.312	3.211	2.104	942	< 250	< 1
2 Fichtenholz	1.000	< 250	< 250	< 250	< 250	< 250
3 Kiefernspalinholz	1.179	< 250	< 1	< 1	n.b. ⁹	n.b.
4 Kiefernkernelholz	1.138	< 250	< 250	< 1	< 250	< 250
5 Polyethylen	1.021	< 250	1.951	1.520	< 250	< 1
<i>Staphylococcus aureus</i>						
1.1 H1-Palette glatt	305	2.551	2.593	538	n.b.	n.b.
1.2 H1-Palette rau	423	3.291	4.107	2.795	n.b.	n.b.
2 Fichtenholz	471	< 250	< 250	< 250	n.b.	n.b.
3 Kiefernspalinholz	606	< 250	< 250	< 250	n.b.	n.b.
4 Kiefernkernelholz	252	311	408	311	n.b.	n.b.
5 Polyethylen	246	1.400	932	690	n.b.	n.b.

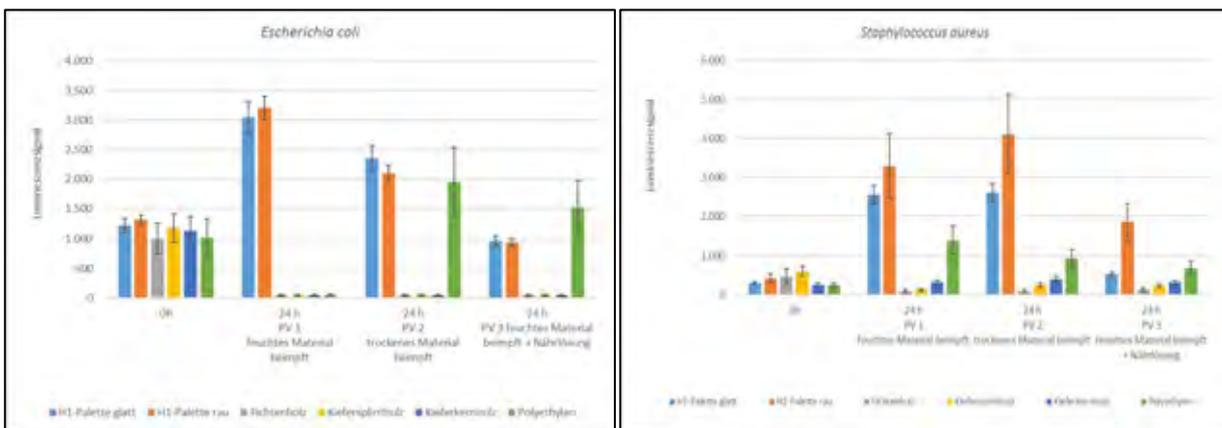


Abb. 5: Lumineszenz als Maß für die Aktivität vor und nach der Inkubation über 24 Stunden

Aus den Zellzahlen nach der Inkubation im Vergleich zur Referenzmaterial kann der Wert der antibakteriellen Wirkung wie folgt nach Gleichung [1] bestimmt werden:

[1] $A = F - G$

A: Wert der antibakteriellen Wirkung

F: Zunahmewert auf dem Referenzmaterial ($F = \lg N_t - \lg N_0$)

G: Zunahmewert auf dem Prüfmaterial ($G = \lg N_t - \lg N_0$)

N_t : Lebendkeimzahl nach der Inkubation

N_0 : Lebendkeimzahl vor der Inkubation

Die Werte der antibakteriellen Aktivitäten sind den Tab. 9 und 10 zu entnehmen. Positive Werte deuten auf eine antibakterielle Aktivität hin, je höher der Wert, desto stärker ist die Aktivität.

⁸ untere Bestimmungsgrenze = 250 RLU

⁹ n.b. nicht bestimmt

Negative Werte bedeuten, dass sich die Bakterien stärker als auf dem Referenzmaterial vermehrt haben.

Tabelle 9: Antibakterielle Aktivität der Palettenmaterialien, Prüfkeim: *Escherichia coli*

Material	N ₀ vor der In- kubation	N _t nach einer Inkubationszeit von 24 h				
		Prüfvariante 1	Prüfvariante 2	Prüfvariante 3		
		ohne Reini- gung ¹⁰	ohne Reini- gung	ohne Rei- nigung	Reinigung mit Wasser	Reinigung mit Spülmittel
Referenz PE	4,8	< 3,7	5,0	4,9	< 1,0	< 1,0
Zunahmewert F			0,2	0,1		
1.1 H1-Palette glatt	4,9	5,1	5,0	4,8	< 1,0	< 1,0
Zunahmewert G			0,1	-0,1		
Antibakt. Aktivität A			0,1	0,2		
1.2 H1-Palette rau	4,9	5,1	5,0	4,8	< 1,0	< 1,0
Zunahmewert G			0,1	-0,1		
Antibakt. Aktivität A			0,1	0,2		
2 Fichtenholz	4,8	< 3,7	< 3,7	< 3,7	< 1,0	< 1,0
Zunahmewert G			-1,1	-1,1		
Antibakt. Aktivität A			1,3	1,2		
3 Kiefernspalintholz	4,9	< 3,7	< 1,0	< 1,0	n.b.	n.b.
Zunahmewert G			-3,9	-3,9		
Antibakt. Aktivität A			4,1	4,0		
4 Kiefernkernelholz	4,9	< 3,7	< 3,7	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Zunahmewert G			-1,2	-3,9		
Antibakt. Aktivität A			1,4	4,0		

Tabelle 10: Antibakterielle Aktivität der Palettenmaterialien, Prüfkeim: *Staphylococcus aureus*

Material	N ₀ vor der In- kubation	N _t nach einer Inkubationszeit von 24 h		
		Prüfvariante 1	Prüfvariante 2	Prüfvariante 3
		ohne Reinigung	ohne Reinigung	ohne Reinigung
Referenz PE	4,6	4,9	4,8	4,7
Zunahmewert F		0,3	0,2	0,1
1.1 H1-Palette glatt	4,6	5,1	5,1	4,7
Zunahmewert G		0,5	0,5	0,1
Antibakt. Aktivität A		-0,2	-0,3	0,0
1.2 H1-Palette rau	4,6	5,2	5,3	5,2
Zunahmewert G		0,6	0,7	0,6
Antibakt. Aktivität A		-0,3	-0,5	-0,5
2 Fichtenholz	4,7	< 3,7	< 3,7	< 3,7
Zunahmewert G		-1,0	-1,0	-1,0
Antibakt. Aktivität A		1,3	1,3	1,3
3 Kiefernspalintholz	4,7	< 3,7	< 3,7	4,5
Zunahmewert G		-1,0	-1,0	-0,2
Antibakt. Aktivität A		1,3	1,3	0,3
4 Kiefernkernelholz	4,6	4,6	4,6	4,6
Zunahmewert G		0,0	0,0	0,0
Antibakt. Aktivität A		0,3	0,2	0,1

¹⁰ Da die Bakterienzahl auf dem Referenzmaterial bei der Prüfvariante 1 innerhalb von 24 Stunden abgenommen hat, erfolgt bei dieser Variante für die Prüfmaterialien keine Berechnung der antibakteriellen Aktivität.

Orientierende Untersuchungen zur Anhaftung von Bakterien am Prüfmaterial

An zusätzlichen Prüfkörpern wurde mit dem Prüfkeim *Escherichia coli* untersucht, ob die Bakterien durch das gewählte Schüttelverfahren vollständig vom Material abgelöst werden. Dazu wurden Proben aus Kiefernspiltholz und Kunststoffpaletten nach der Beimpfung bzw. nach dem Ausschütteln getrocknet und anschließend mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) begutachtet. Dabei waren nur auf den beimpften Proben Bakterien eindeutig erkennbar. Das zeigt, dass das Abspülen effektiv war und Bakterien zumindest nicht in hoher Anzahl am Material und insbesondere am Holz anhafteten. Die Abb. 6 bis 9 zeigen repräsentative Erscheinungsformen.

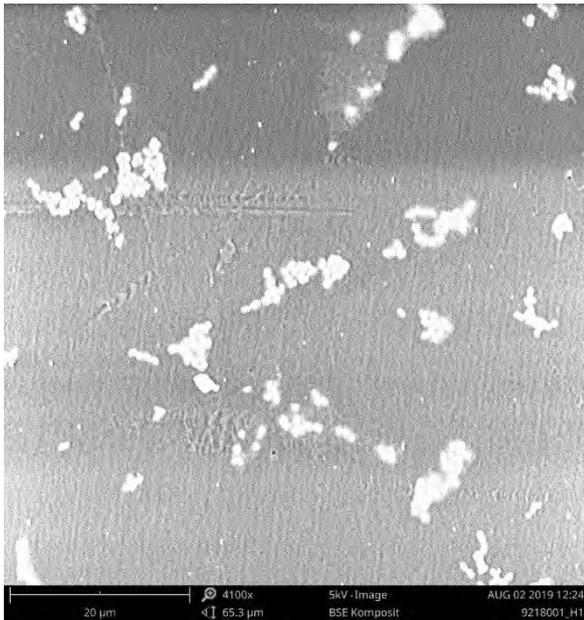


Abb. 6: H1-Kunststoffpalette nach Beimpfung und Inkubation über 2 Stunden: Bakterien deutlich erkennbar (REM)

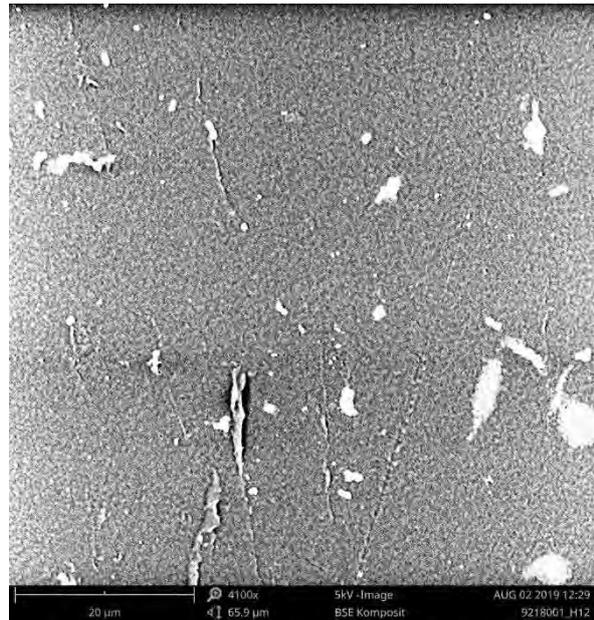


Abb. 7: H1-Kunststoffpalette nach Beimpfung, Inkubation über 2 Stunden und Ausschütteln: keine Bakterien erkennbar (REM)

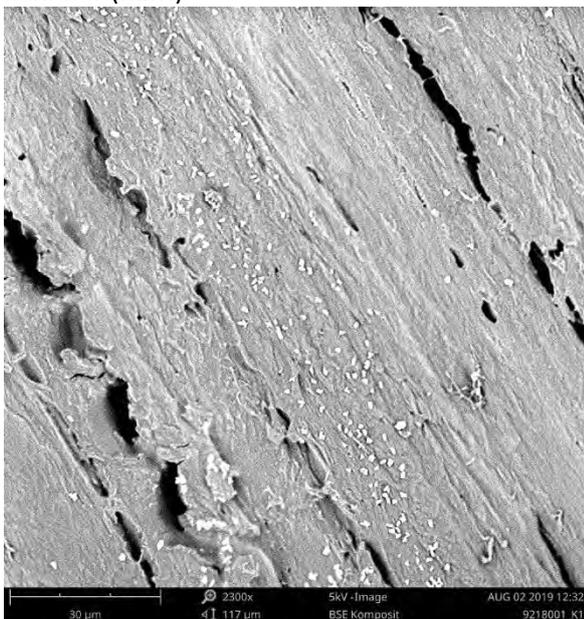


Abb. 8: Kiefernspiltholz nach Beimpfung und Inkubation über 2 Stunden: Bakterien deutlich erkennbar (REM)

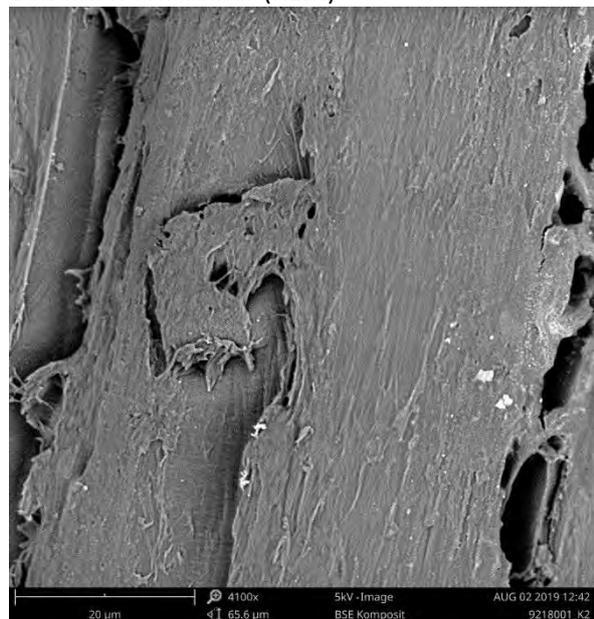


Abb. 9: Kiefernspiltholz nach Beimpfung, Inkubation über 2 Stunden und Ausschütteln: keine Bakterien erkennbar (REM)

6 Zusammenfassung und Diskussion

Nach Auswertung der einschlägigen Literatur sowie anhand der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen ist davon auszugehen, dass Paletten aus Holz gegenüber Paletten aus Kunststoff aus hygienischer Sicht insgesamt nicht nachteilig sind, sondern sogar vorteilhafte Eigenschaften besitzen.

Überlebensfähigkeit von Bakterien auf dem Material

Bakterien überlebten in Tests nach verschiedenen Verfahren auf Holz stets schlechter als auf Kunststoff. Die lt. Literatur besonders stark ausgeprägte antibakterielle Wirkung von Kiefernkerneholz konnte in den eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Hier zeigte es teilweise eine geringere Wirkung als Fichtenholz und Kiefernspiltholz. Möglicherweise handelte es sich jedoch nicht um reines Kernholz.

Als Nachteil von Holz ist allerdings zu beachten, dass es sich dabei um ein poröses Material handelt, das schlechter gereinigt werden kann als eine glatte Kunststoffoberfläche. Es ist davon auszugehen, dass Verunreinigungen (insbesondere organische Substanzen) besser anhaften und möglicherweise einen Nährboden für Bakterien und auch Pilze bieten. In den Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass bereits eine einfache Reinigung mit Wasser sowohl auf Kunststoff als auch auf Holz sehr effektiv ist und dadurch die Bakterienzahl deutlich reduziert werden kann.

Demgegenüber steht allerdings das Verhalten von Kunststoffpaletten bei mehrfacher Nutzung, wenn die Oberfläche Kratzer und Rauigkeiten aufweist. Hier zeigten die Untersuchungen mit aufgerautem Material eine stärkere Bakterienvermehrung als auf glattem Material.

Mikrobielle Besiedlung von Praxisproben

Die im Rahmen des Arbeitspaketes 2 untersuchten Holz- und Kunststoffpaletten wiesen deutliche Gebrauchsspuren und teilweise starke Besiedlungen mit Mikroorganismen auf. Während es sich bei den Holzpaletten überwiegend um Schimmelpilze und weniger um Bakterien und Hefen handelte, dominierten bei den Kunststoffpaletten deutlich Hefen und Bakterien, die zum Verderb von Lebensmitteln führen können. Die Lebendkeimzahl auf der Oberfläche der Holzpaletten lag zwischen $< 10 \text{ KbE/cm}^2$ und $> 30 \text{ KbE/cm}^2$ und im Querschnitt zwischen $2 \times 10^2 \text{ KbE/cm}^3$ und $5 \times 10^5 \text{ KbE/cm}^3$. Bei den Kunststoffpaletten wurden an der Oberfläche Werte von $< 10 \text{ KbE/cm}^2$ bis 10^5 KbE/cm^2 ermittelt.

Ein Vergleich der ermittelten Absolutwerte zwischen den beiden Materialgruppen ist auf Grund von Unterschieden bei den angewendeten Methoden sowie wegen der unterschiedlichen Historie der Paletten, die nicht im Einzelnen bekannt ist, nicht möglich. Die Befunde machen jedoch deutlich, dass ein mikrobieller Befall in der Praxis eine große Rolle spielt. Auf den Holzpaletten war ein mikrobieller Befall, insbesondere durch Schimmelpilze, teilweise deutlich zu erkennen, was zur Aussonderung der Paletten führt. Im Gegensatz dazu, wurde auf keiner der Kunststoffpaletten ein Befall mit bloßem Auge diagnostiziert. Trotzdem wurden hier durch nähere Untersuchung erhebliche Keimkonzentrationen festgestellt. Besonders kritisch ist hier der Umstand zu

betrachten, dass einige Paletten feucht bzw. nass waren und damit optimale Voraussetzungen für die Vermehrung der Mikroorganismen bestehen.

Überlebensfähigkeit von Bakterien auf Holz und Kunststoff

In den Laboruntersuchungen wurde nachgewiesen, dass Bakterien auf Holz prinzipiell schlechter überleben als auf Kunststoff. Deshalb ist davon auszugehen, dass Holzpaletten in dem sensiblen Lebensmittelbereich eingesetzt werden können. Dies setzt allerdings genauso wie bei Kunststoffpaletten die strenge Einhaltung der Hygienevorschriften bei der Herstellung sowie bei Transport und Lagerung von Lebensmitteln und bei einer ständigen Kontrolle der Palettenqualität sowie regelmäßige Reinigung voraus. Um einen mikrobiellen Befall zu verhindern, sind Feuchtigkeit und Schmutz vom Material fernzuhalten bzw. regelmäßig zu entfernen.



Dipl.-Biol. Katharina Plaschkies

Verantwortliche Bearbeiterin

Anlage

Gegenüberstellung der durch Kontaktproben und im Suspensionsverfahren ermittelten mikrobiellen Beladung der Holzpaletten aus der Praxis

PaletteNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontaktproben			Lebendkeimzahl im Querschnitt, ermittelt an Bohrkernen mit Suspensionsverfahren [KbE/g]		
	KbE/cm ²		Kategorie	KbE/cm ³	Kategorie	
	≤ 1		1	≤ 400 (Nachweisgrenze)		1
	> 1 ... ≤ 10		2	> 400 ... ≤ 1.000		2
> 10 ... ≤ 20		3	> 1.000 ... ≤ 5.000		3	
> 20		4	> 5.000		4	
	Oberseite	Unterseite	Klotz			
E 1	4	4	4	4		
						
E 2	4	4	4	4		
						
E 3	2	1	2	1		
						
E 4	3	3	2	3		
						
E 5	4	3	4	4		
						
E 6	4	4	4	5		
						
E 7	4	2	2			
						

Palet- teNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontakt- proben			Lebendkeimzahl im Querschnitt, er- mittelt an Bohrkernen mit Suspensi- onsverfahren [KbE/g]
	KbE/cm ²		Kategorie	
	≤ 1		1	
	> 1 ... ≤ 10		2	
	> 10 ... ≤ 20		3	
> 20		4		
Oberseite	Unterseite	Klotz	KbE/cm ³	Kategorie
			≤ 400 (Nachweis- grenze)	1
			> 400 ... ≤ 1.000	2
			> 1.000 ... ≤ 5.000	3
			> 5.000	4
				
E 8	4	4	4	5
				
E 9	4	4	4	5
				
E 10	4	4	4	5
				
E 11	4	2	2	3
				
E 12	4	1	1	1
				
E 13	4	1	1	1

PaletteNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontaktproben			Lebendkeimzahl im Querschnitt, ermittelt an Bohrkernen mit Suspensionsverfahren [KbE/g]		
	KbE/cm ²		Kategorie	KbE/cm ³		
	≤ 1		1	≤ 400 (Nachweisgrenze)		1
	> 1 ... ≤ 10		2	> 400 ... ≤ 1.000		2
	> 10 ... ≤ 20		3	> 1.000 ... ≤ 5.000		3
> 20		4	> 5.000		4	
	Oberseite	Unterseite	Klotz			
E 14	2	2	2	1		
E 15	2	1	1	1		
E 16	2	1	2	1		
E 17	2	2	2	1		
E 18	4	2	2	1		
E 19	4	2	1	1		

PaletteNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontaktproben			Lebendkeimzahl im Querschnitt, ermittelt an Bohrkernen mit Suspensionsverfahren [KbE/g]		
	KbE/cm ²		Kategorie	KbE/cm ³		
	≤ 1		1	≤ 400 (Nachweisgrenze)		1
	> 1 ... ≤ 10		2	> 400 ... ≤ 1.000		2
	> 10 ... ≤ 20		3	> 1.000 ... ≤ 5.000		3
> 20		4	> 5.000		4	
	Oberseite	Unterseite	Klotz			
E 20	2	2	2	1		
E 21	4	1	1	1		
E 22	4	1	2	1		
E 23	2	1	1	1		
E 24	2	2	1	1		
E 25	2	1	2	1		

PaletteNr.	Lebendkeimzahl auf der Oberfläche, ermittelt mit Kontaktpollen			Lebendkeimzahl im Querschnitt, ermittelt an Bohrkernen mit Suspensionsverfahren [KbE/g]		
	KbE/cm ²		Kategorie	KbE/cm ³		
	≤ 1		1	≤ 400 (Nachweisgrenze)		1
	> 1 ... ≤ 10		2	> 400 ... ≤ 1.000		2
	> 10 ... ≤ 20		3	> 1.000 ... ≤ 5.000		3
> 20		4	> 5.000		4	
	Oberseite	Unterseite	Klotz			
E 26	4	1	1	1		
E 27	2	2	1	1		
E 28	2	2	2	1		
E 29	4	2	2	1		
E 30	2	1	2	1		