Schlussbericht

Für die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

<table>
<tr><td colspan="2">Fördermaßnahme: Förderung von Innovationen zur Minimierung der Übertragung von mikrobiellen Kontaminationen im Rahmen der Fleischgewinnung und der Fleischverarbeitung im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL)</td></tr>
<tr><td>Zuwendungsempfänger:
Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit (TiHo-LMQS) sowie
Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung (TiHo-IBEI)</td><td>Förderkennzeichen:
281C104C18</td></tr>
<tr><td colspan="2">Vorhabenbezeichnung:
"Entwicklung und Implementierung technologischer Verfahren zur Reduktion von mikrobiellen Kontaminanten im Geflügel- und Schweineschlachtprozess" (KontRed)
<u>Teilprojekt "Bakteriozine"</u> sowie
<u>Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"</u></td></tr>
<tr><td colspan="2">Laufzeit des Vorhabens:
15.11.2020 bis 30.06.2024</td></tr>
<tr><td colspan="2">Berichtszeitraum:
15.11.2020 bis 30.06.2024</td></tr>
</table>

Teil I: Kurzbericht

1. Aufgabenstellung und wissenschaftlicher und technische Stand an den angeknüpft wurde

Teilprojekt "Bakteriozine"

Im Rahmen des Teilprojektes **AP II.6** – "Bakteriozine" wurde an der Entwicklung neuer biologischer Dekontaminationsstrategien gearbeitet. Diese Strategien zielten darauf ab, mikrobielle Kontaminationen auf Geflügel- und Schweinefleisch zu reduzieren. Dazu wurden Bakteriozine zur Reduktion von *Salmonella enterica* und *Campylobacter* spp. aus Bakterien des Geflügel- bzw. Schweinschlachtprozesses isoliert, aufgereinigt, charakterisiert und auf ihre Effektivität und Stabilität getestet. Bakteriozine sind antimikrobielle Peptide oder Proteine, die von Bakterienstämmen gebildet werden, um das Wachstum anderer Bakterien gleicher oder andersartiger Spezies zu hemmen. Eine Anwendung dieser Bakteriozine in der Lebensmittelproduktion könnte einen Eintrag pathogener Keime in die Lebensmittelkette verhindern und die Haltbarkeit der Produkte verlängern.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Die Arbeiten des TiHo-IBEIs bezogen sich auf **Komplex IV** "Datenstrukturierung, -auswertung und Modellierung". Die Arbeitsgruppe beschäftigte sich primär mit der Harmonisierung der erhobenen (primär) und gesammelten (primär und sekundär) Daten. Hauptziel war es eine übergreifende Datenstruktur zu schaffen, die es ermöglicht, eine gemeinsame Interpretation der Reduktion von Kontamination zu bewerten. Im Rahmen des Teilprojekts wurden drei Arbeitspakete bearbeitet. In **AP IV.1** sollte eine gemeinsame Datenbank zur Sammlung aller projektrelevanten Daten erstellt werden. Diese Datenbank sollte im Verlauf des Projekts betreut und verwaltet werden. Die unter IV.1 eingestellten Daten sollten im Rahmen des **AP IV.2** unter Abstimmung mit den Projektpartnern harmonisiert und deskriptiv ausgewertet werden. Zusätzlich wurden in den Teilprojekten Forschungshypothesen definiert, welche mit induktiven statistischen Verfahren vom TiHo-IBEI ausgewertet werden sollten. Das **AP IV.3** hatte eine grundlegende Expositionsmodellierung zum Hauptziel. Hierzu sollten zunächst die Primär- und Sekundärdaten miteinander abgestimmt und vernetzt werden.

2. Ablauf des Vorhabens

In Tabelle 1 werden die geplanten und umgesetzten Zeiträume der einzelnen Tasks aufgeführt.

Tabelle 1: Zeitplan für die Arbeiten im AP II.6 und AP IV

	Jahr 1				Jahr 2				Jahr 3				Jahr 4			
AP II.6: Identifizierung, Wirksamkeitsprüfung und Charakterisierung von Bakteriozinen																
Task 1. Wirksamkeitsprüfung der Bakteriozine				*	*	*	*	*	*	*	*	*				
Task 2. Charakterisierung der Bakteriozine						*	*	*	*	*	*	*				
Task 3. Weiterführende Charakterisierung							*	*	*	*	*	*	*	*		
AP IV.1. Aufbau einer gemeinsamen Datenbank																
Task 1. Aufbau einer Datenbank												*	*	*		
Task 2. Betreuung und Verwaltung												*	*	*		
AP IV.2. Statistische Planung und Auswertung																
Task 1. Einstellung der Daten												*	*	*		
Task 2. Statistische Auswertung				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
AP IV.3. Modellierung																
Task 1. Datenerfassung												*	*	*		
Task 2.Deskriptive Auswertung				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
Task 3. Modellierung														*		

*: Zeitraum in dem die Ziele umgesetzt wurden; graue Markierung: geplante Zeiträume laut Antrag

Teilprojekt "Bakteriozine"

Die Arbeiten gliederten sich in drei Tasks (Tasks 1-3) des **Arbeitspaketes II.6**, welche im Folgenden detailliert beschrieben werden. Zur Isolierung und Charakterisierung von Bakteriozinen wurden Bakterien gesucht, die Bakteriozine produzieren. Die Durchführung im Labor erfolgte, indem Proben von Hühnerdarminhalt oder -kot entnommen und verdünnt und ausgestrichen wurden, um Milchsäurebakterien und sporenbildende Bakterien zu isolieren (siehe Abbildung 1). Die isolierten Bakterien wurden in 96-Well-Platten angezüchtet, am folgenden Tag zentrifugiert und die Überstände filtriert, um deren Wirkung gegen *Campylobacter jejuni*- und *Salmonella enterica* spp.-Stämme zu testen.

Zur Durchführung der Inhibitionstests wurden die Indikatorkeime (*Campylobacter jejuni*- und *Salmonella enterica* spp.-Stämme) angezüchtet und zu flüssigem Agar hinzugefügt. Diese Mischung wurde in quadratische Platten gegossen, in die nach dem Verfestigen Löcher gestanzt wurden. Die Kulturüberstände der Effektorkeime (sporenbildende Bakterien und Milchsäurebakterien) wurden in die Löcher gegeben, um ihre hemmende Wirkung in Form von Hemmhöfen nachzuweisen (siehe Abbildung 2).

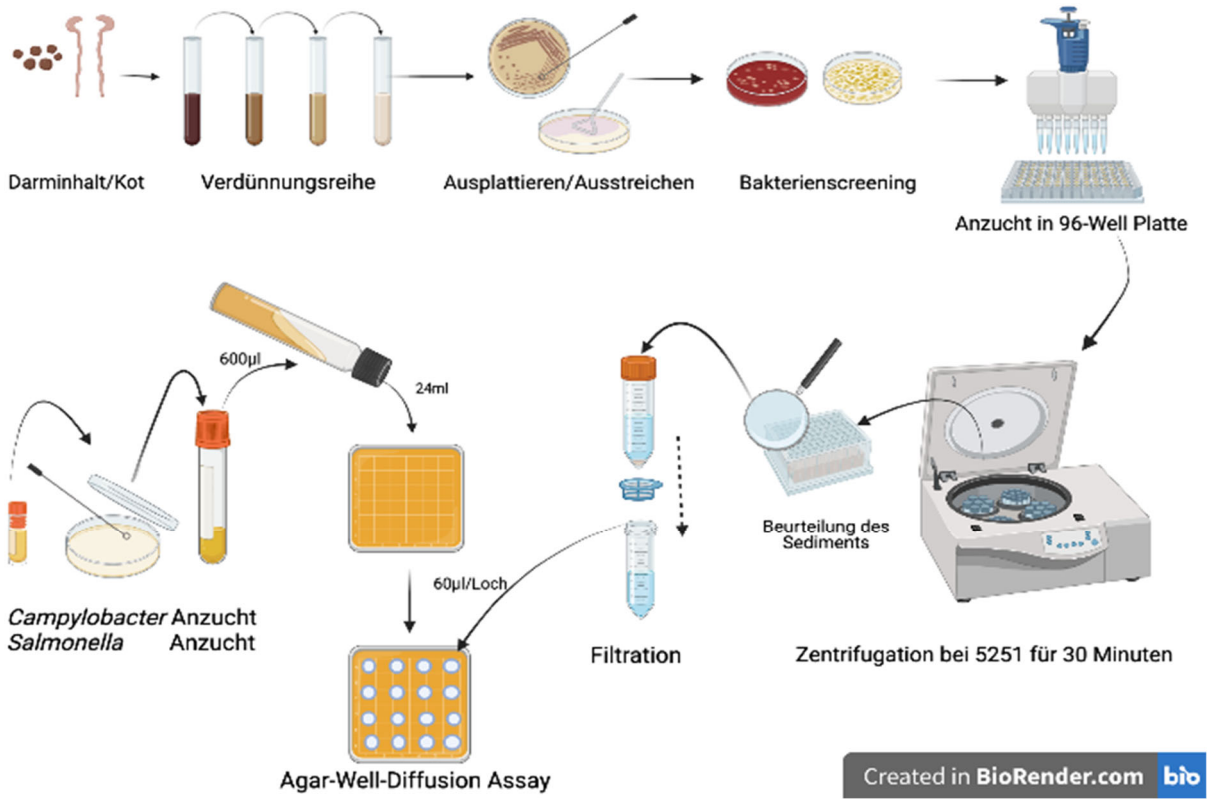

Abbildung 1: Isolierungsmethode zur Untersuchung und Charakterisierung potenzieller Bakteriozin-bildender Isolate.

Task 1: Wirksamkeitsprüfung der Bakteriozine

Im Rahmen dieses Tasks wurden von den in Tabelle 2 aufgeführten, neu isolierten oder in der Institutssammlung vorhandenen Bakterienisolaten Kulturüberstände gewonnen und mittels des oben beschriebenen Agar-Well Diffusionstests auf ihre Wirksamkeit gegenüber den Zielbakterien *Salmonella enterica* spp. und *Campylobacter jejuni* untersucht (Abbildung 2).

Tabelle 2: Art, Herkunft und Anzahl der Proben, die für die Identifizierung potenzieller Bakteriozine untersucht wurden.

Beprobungsrunde	Probenart	Proben Anzahl	Isolate Anzahl	Davon Milchsäurebildner	Davon Sporenbildner	Isolate mit Hemmwirkung insgesamt
1.	Kot von Masthähnchen	11	186	-	40	14
	Hühnerkot	39	638	4	116	2
	Gänsekot	2	10	-	10	0
	Rinderkot (Jungtier)	7	-	-	96	8
	Hühnerdarm	10	160	-	23	1
	Putenkükendarm	5	92	-	-	0
	Gülle	17	254	-	188	0
	Isolate aus einem Vorgängerprojekt (Hähnchendarm)	0	205	84	85	3
	Umgebungsproben Rind	6	14	-	-	0
	Milch	1	6	-	6	0
1.	Gesamt 1. Beprobungsrunde	98	1565	88	564	28
2.	Blinddarminhalt Masthähnchen	30	990	450	540	371
2.	Gesamt 2. Beprobungsrunde	30	990	450	540	371
1. und 2.	Gesamt 1. und 2. Beprobungsrunde	128	2555	538	1104	399

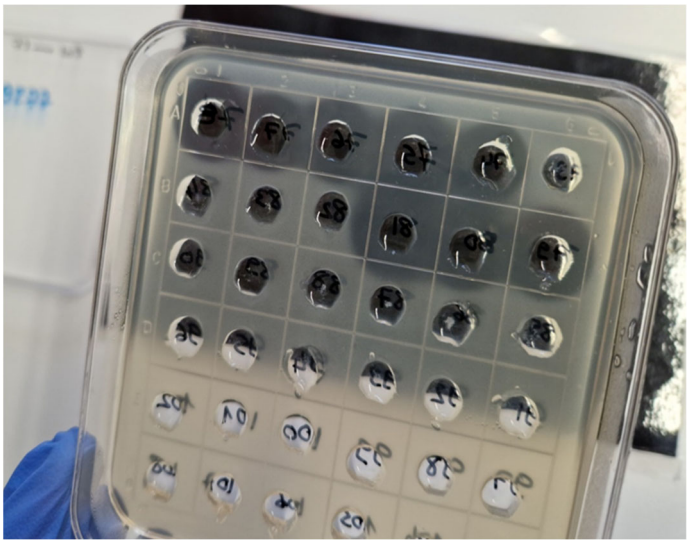

Abbildung 2: Test auf Hemmwirkung mit dem Indikatorkeim Campylobacter jejuni Stamm Bfr- C19277. Getestet wurden hier Überstände der Isolate Nr. 73 bis 108 aus der zweiten Beprobungsrunde. Hemmhöfe sind die klare Zonen in den zwei oberen Reihen.

Task 2: Charakterisierung der Bakteriozine

Ein zweistufiger Arbeitsprozess zur Identifizierung und Charakterisierung von Bakteriozinen wurde etabliert (siehe Abbildung 3), der einen hohen Probendurchsatz ermöglicht. In der ersten Beprobungsrunde wurden präsumtive Bakteriozinproduzenten nach der ersten Charakterisierung ausgewählt und weiter identifiziert (siehe Tabelle 3).

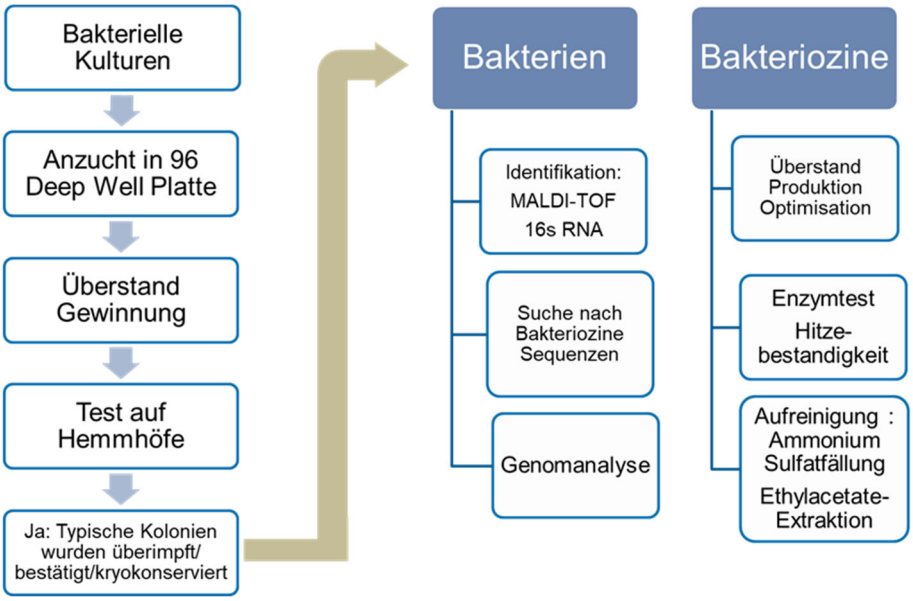

Abbildung 3: Hochdurchsatzmethode zur Isolierung und Charakterisierung von Bakteriozinen

Tabelle 3: Ergebnisse der Charakterisierung der Überstände der beiden ausgewählten Kandidaten aus der 1. Beprobungsrunde: Bacillus amiloliquefaciens 599 und Bacillus subtilis 236.3

Test	Alpha-Amylase	Lipase	Proteinase K	Pronase E	Hitzebe-ständigkeit
Überstand von **Stamm 599** Überstand von **Stamm 236.3**	Hemmungsef-fekt vorhanden	Hemmungsef-fekt vorhanden	Hemmungsef-fekt vorhanden	Geringere Hem-mungseffekt	>30min bei 100°C

Die Ergebnisse der weiterführenden Identifizierung zeigten, dass sehr wahrscheinlich bereits bekannte Bakteriozine die Hemmwirkung ihrer Überstände vermittelten (siehe Tabelle 4). In einem Nebenversuch wurde durch angepasste Kulturbedingungen versucht, die Hemmwirkung von Überständen unterschiedlicher Isolate zu optimieren. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für einen Agar-Well-Diffusion-Assay mit Überständen, die sich in ihrer Inkubationszeit unterscheiden: T1 steht für 12 Stunden Bebrütung, T2 für 20 Stunden und T3 für 24 Stunden. Es ist deutlich zu sehen, dass bei T3 eine größere Hemmwirkung vorliegt als bei T2 oder T1.

Da aus diesen Isolaten mit großer Wahrscheinlichkeit keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden könnten, führten wir eine zweite Beprobungsrunde durch mit dem Ziel, neue interessante Isolate zu isolieren, deren Überstände eine Hemmwirkung gegenüber *Salmonella* und *Campylobacter* zeigten und neue Bakteriozine enthielten.

Tabelle 4: Ergebnisse des PCR-Screenings zur Suche nach bekannten Sequenzen hemmender Substanzen im Genom der ausgewählten Isolate aus der ersten Beprobungsrunde

	Bekannte Hemmstoffe						
DNA von Isolaten	Lactacin F	Skf	Bacitracin	Subtilomycin	Sakacin p	subtilosin	Surfactin
B. amyloliquefaciens 599L	+	+	-	+	+	+	+
B. subtilis 236,3	+	+	-	+	+	+	+
L. vaginalis 492,7	-	-	-	-	-	-	+
L. vaginalis 1197,4	+	+	-	-	+	+	+
B. licheniformis 1185,5	+	-	+	-	+	-	+
B. subtilis 708	-	+	-	+	+	-	+

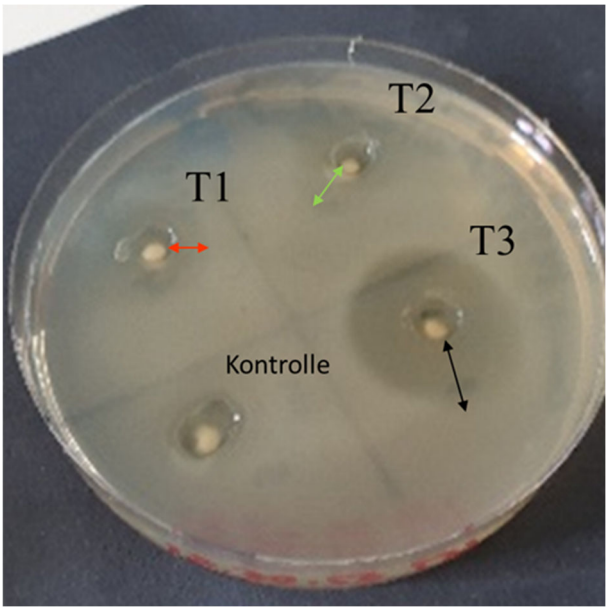

Abbildung 4: Agar Well Diffusion Assay. Getestete Überstände, die sich in ihrer Inkubationszeit voneinander unterscheiden

Aus der zweiten Beprobungsrunde wurden auf Basis der Maldi-TOF-Spezies-Identifizierung fünf Kandidaten ausgewählt (siehe Tabelle 5), die anschließend weiterführend charakterisiert wurden (siehe Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8).

Tabelle 5: fünf ausgewählte Isolate aus der 2. Beprobungsrunde, Spezies identifiziert mit MALDI-TOF.

Isolate	**Spezies**
M 24B1.11	*Lactobacillus johnsonii*
M 25B1.9	*Streptococcus alactolyticus*
M 27B1.2	*Lactobacillus reuteri*
M 30B1.6	*Ligilactobacillus salivarius*
C10B2.10	*Bacillus velezensis*

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Hitzebeständigkeitstests für die Überstände der fünf ausgewählten Isolate gegen sechs spezifische Indikatorkeime. Die Tests zielten darauf ab, die Stabilität der Überstände bei zwei verschiedenen Temperaturen – 75°C und 100°C, jeweils für 10 Minuten – zu bewerten. Als Indikatorkeime wurden drei Serovare von *Salmonella enterica* ausgewählt: *S.* Typhimurium (Stamm S1020), *S.* Infantis (Stamm S2265) und Enteritidis (Stamm S2231), ergänzt durch drei Stämme von *Campylobacter jejuni*: Bfr-CA-18064, Bfr-CA-19277 und Bfr-CA-19285. Die Auswertung eines Hemmungstests (Agar Well Diffusion Assay) basiert auf der Bildung einer Hemmungszone, wobei das Fehlen einer Hemmzone nach Erhitzen des Überstandes auf eine Hitzeempfindlichkeit und das Vorhandensein einer Hemmzone auf eine Hitzestabilität der aktiven Komponente im Überstandes hinweist. Diese Bewertung ermöglicht eine genauere Einschätzung der potenziellen Einsatzmöglichkeiten der Überstände in Bereichen, die eine Hitzebehandlung erfordern, und liefert wertvolle Einblicke auf die spezifische Eigenschaft der getesteten Überstände.

*Tabelle 6: Hitzebeständigkeit von Überständen ausgewählter Isolate aus der 2. Beprobungsrunde bei 75°C und 100°C für 10 Minuten und deren Wirkung auf Indikatorkeime (*S. enterica *und C. jejuni) im Hemmungstest (Agar Well Diffusion Assay).*

ID	**Isolate**	**Indikatorkeime**					
		S1020	S2231	S2265	C18064	C19285	C19277
Lactobacillus johnsonii	M 24B1.11	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+ 75°C	+ 75°C
Streptococcus alactolyticus	M 25B1.9	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+ 75°C	+ 75°C
Limosilactobacillus reuteri	M 27B1.2	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C
Ligilactobacillus salivarius	M 30B1.6	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C	+100°C
Bacillus velezensis	C 10B2.10	*	*	*	+100°C	+100°C	+100°C

*keine Hemmwirkung bei diesen Isolaten

Tabelle 7 zeigt, wie die Behandlung mit Proteinase K die antibakterielle Aktivität der ausgewählten Bakterienüberstände beeinflusst, gemessen an ihrer Wirkung auf ausgewählte Indikatorkeime im Agar Well Diffusion Assay (siehe oben). Das Fehlen einer Hemmzone deutet darauf hin, dass Proteinase K die aktive Komponente im Überstand vollständig verdaut und somit die antibakterielle Aktivität aufgehoben hat. Dies deutet auf eine Protein- oder Peptidwirkstoff (ggf. Bakteriozin) hin. Im Gegensatz dazu weist das Vorhandensein einer Hemmungszone darauf hin, dass der Überstand seine antibakterielle Wirkung gegenüber den genannten Stämmen behält, d.h. die aktive Komponente kann nicht durch Proteinase K gespalten werden und ist mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Bakteriozin. Weitere Enzymtests wurden durchgeführt, um das Vorhandensein zyklischer Bakteriozine auszuschließen, die durch Proteinase K nicht gespalten werden.

Tabelle 7: Proteinase K-Verdaulichkeit der Überstände ausgewählter Isolate und deren Wirkung auf Indikatorkeime im Hemmungstest (Agar Well Diffusion Assay). Dreimal identische Ergebnisse sind in grün dargestellt. Zweimal identische Ergebnisse wurden in Gelb dargestellt. Bei zweimal identischen Ergebnissen, bei denen das dritte Ergebnis aufgrund der fehlenden positiven Kontrolle nicht auswertbar ist, erfolgt die Darstellung in Gelb mit einem Stern. Nicht reproduzierte Ergebnisse sind in Rot dargestellt.

ID	**Isolate**	**Indikatorkeime**					
		S1020	S2231	S2265	C18064	C19285	C19277
Lactobacillus johnsonii	M 24B1.11	+	+	+	+	+*	+*
Streptococcus alactolyticus	M 25B1.9	+	+	+	+	+*	+*
Limosilactobacillus reuteri	M 27B1.2	+	+	+	+	+*	+
Ligilactobacillus salivarius	M 30B1.6	+	+	+	+	+*	+
Bacillus velezensis	C10B2.10	*	*	*	-*	-*	-*

*keine Hemmwirkung bei diesen Isolaten

Tabelle 8 veranschaulicht die pH-Wert-Stabilität der Überstände ausgewählter Isolate und deren Wirkung auf Indikatorkeime (siehe oben) im Agar Well Diffusion Assay. Hierbei wurden die Überstände von sechs bakteriellen Isolaten auf ihre Fähigkeit untersucht, das Wachstum der genannten Keime bei pH-Werten von 4 bis 9 zu hemmen. Ein positives Ergebnis (+) deutet darauf hin, dass die antibakterielle Aktivität des Überstandes bei dem angegebenen pH-Wert erhalten bleibt. Die in Tabelle 8 dargestellten Daten zeigen, dass die meisten untersuchten Überstände nur bei einem sauren pH-Wert von 4 eine stabile Aktivität zeigen. Im Gegensatz dazu zeigt der Überstand von *Bacillus velezensis* C10B2.10 eine breitere pH-Wert-Stabilität, mit nachgewiesener Aktivität bei pH-Werten 4, 6, 7 und 9. Vor allem in Kombination mit anderen Maßnahmen wie der Anwendung organischer Säuren im Rahmen eines Mehrhürdenansatzes (Multi-Hurdle-Approach) ist die pH-Stabilität von großer Bedeutung, da die Wirksamkeit auch in saurem Milieu gewährleistet sein muss. Daher können diese Erkenntnisse für die Entwicklung neuer antimikrobieller Strategien von besonderer Relevanz sein.

Tabelle 8: pH-Wert-Stabilität der Überstände ausgewählter Isolate und deren Wirkung auf Indikatorkeime im Hemmungstest (Agar Well Diffusion Assay). Grün n =3 gelb n=2

ID	**Isolate**	**Indikatorkeime**					
		S1020	S2231	S2265	C18064	C19285	C19277
Lactobacillus johnsonii	M 24B1.11	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4
Streptococcus alactolyticus	M 25B1.9	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4
Limosilactobacillus reuteri	M 27B1.2	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4
Ligilactobacillus salivarius	M 30B1.6	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4	+ 4
Bacillus velezensis	C10B2.10	*	`*	*	+ 4, 6, 7, 9	+ 4, 6, 7, 9	+ 4, 6, 7, 9

*keine Hemmwirkung bei diesen Isolaten

Task 3: Weiterführende Charakterisierung

Anhand der Ergebnisse aus Task 2, Hitze- und pH- Stabilität, sowie aufgrund der proteinösen Natur des potentiellen Bakteriozins wurde der Überstand von *Bacillus velezensis* C10B2.10 für weiterführende Untersuchungen und die eingehende Charakterisierung ausgewählt. Dafür wurde das Isolat *Bacillus velezensis* C10B2.10 sequenziert und der Überstand teilweise mit Ammoniumsulfatfällung aufgereinigt (siehe 3. Zwischenbericht). Die Sequenzierung des Genomes von *Bacillus velezensis* C10B2.10 ermöglichte die Identifizierung von Genen, die für antimikrobielle Stoffe codieren: Mit antiSMASH 7.0 (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) wurden Gene für folgende antimikrobielle Stoffgruppen in der Sequenz von *B.velezensis* erkannt: Polyketide, Lipopeptide und Bakteriozine (siehe Tabelle 9). Mit BAGEL4 wurden im Genom des Isolates C 10 B2.10 die Bakteriozin-Gene LCI, Amylocyclicin, LAPs, LS2 chain b und Enterolysin identifiziert.

Tabelle 9: Identifikation von Genen, die für antimikrobielle Substanzen im sequenzierten Genom des ausgewählten Isolats codieren, mit antiSMASH

Genomregion	**Typ**	**ähnliche bekannte Cluster**		
		Produkt	**Typ**	**Funktion**
1 und 11	NRPS-like	Surfactin	Nicht-ribosomales Peptid, Lipopeptid	antimikrobiell, antiviral, antifungal, antitumoral, Immunmodulation, Bioremediation, Biofilminhibition
2	Terpene	Diverse Molekülgruppe	-	Teilweise antimikrobielle Wirkung
3	transAT-PKS	Macrolactin	Polyketide	antimikrobiell, antiviral, antitumoral, entzündungshemmend, antimykotisch, immunmodulatorisch
4	transAT-PKS, NRPS	Bacillaene	Polyketide, nicht-ribosomales Peptid,	Antibiotische Aktivität, Hemmung der Proteinsynthese, Abwehr und Biofilmdynamik in *Bacillus*
5	NRPS-like, NRPS, TransAT-PKS, betalactone	Fengycin	Nicht-ribosomales Peptid, Lipopeptid	Antibiotische Aktivität, zielt auf die Zellmembran, Abwehr- und Biofilmdynamik
6	T3PKS	Typ III polyketidsynthase		Mikrobielle Enzyme, Produkte teilweise mit antimikrobiellen Eigenschaften
7	transAT-PKS	Difficidin	Polyketide	Antibiotische Aktivität
9	Other	Bacilysin		Antimikrobiell, Zelllyse, pleiotrope Signalgebung
10	Thiopeptide, LAP	Linear azole containing Peptides (LAP)		Teilweise antimikrobielle Aktivität von Molekülen dieser Gruppe
Plasmid	RiPP-like	Salivaricin CRL1328 α peptide/ Salivaricin CRL 1328β peptide	Bakteriozine	Antimikrobielle Aktivität

Mit Hilfe von SDS-PAGE wurden Proteine mit antibakterieller Aktivität dargestellt (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).

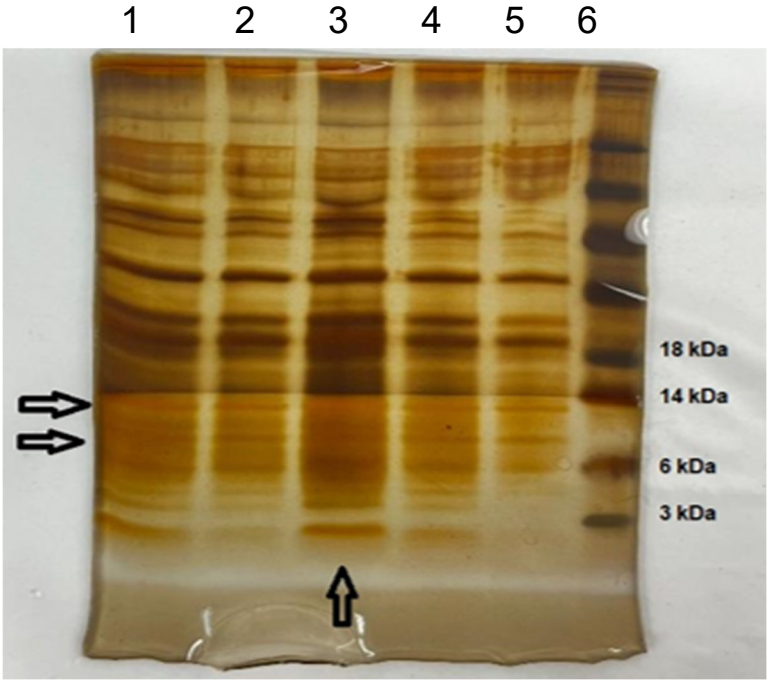

Abbildung 3: SDS-PAGE-Analyse des Überstands vom Isolat C10B2.10: Dargestellt sind die mit 60% Ammoniumsulfat gefällten Überstände nach der Dialyse durch zwei unterschiedliche Membranen, MWCO 14 kDa (1 und 2) und MWCO 2kDa (3, 4 und 5), sowie der 1kb Marker (6). Spur 1 zeigt die dialysierte Fraktion mit der 14 kDa MWCO Membran, Spur 2 ist eine 1:2 Verdünnung davon. Spur 3 zeigt die dialysierte Fraktion mit der 2 kDa MWCO Membran. Die Spuren 4 und 5 sind Verdünnungen dieser Probe (1:2 und 1:4). Doppelte Pfeile links zeigen die Proteine von Interesse im Molekulargewichtsbereich zwischen 3 kDa und 14 kDa. Ein einzelner Pfeil unten in der Spur 3 weist auf das spezifische Protein bei 3 kDa hin, welches von besonderem Interesse ist (siehe Abbildung 2).

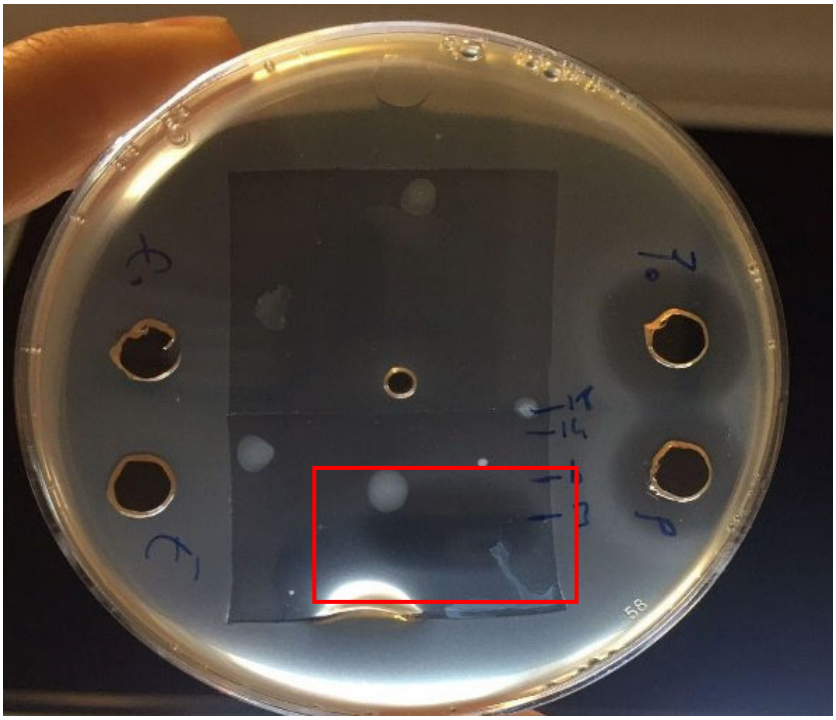

Abbildung 4: Agar-Well-Diffusion-Assay, in dem das zuvor für die Analyse des teilweise aufgereinigten Überstands C10B2.10 verwendete SDS-PAGE Gel eingesetzt wurde (siehe Abbildung 1). Es diente dazu, zu überprüfen, ob eine der Proteinbanden eine Hemmwirkung gegen Listeria monocytogenes zeigt. Entsprechende Analysen mit Campylobacter konnten aufgrund der hohen Sensitivität der Bakterien für Substanzen aus dem Gel nicht durchgeführt werden (kein Wachstum).

In einer anschließenden Massenspektrometrieanalyse unterschiedlicher Fraktionen des partiell aufgereinigten Überstands wurden unterschiedliche Proteine gefunden, die jedoch nach weiterführender Prüfung nicht der gesuchten Proteingröße entsprachen. In einer zweiten Analyse mit einer verbesserten Datenbank wurden Polyketide und Phagenproteine gefunden, die zu den exprimierten und antimikrobiell wirksamen Substanzen aus dem Genom gehören könnten. Allerdings wurde keines, der durch die Sequenzanalyse identifizierten Bakteriozine, nachgewiesen. Die Analyse identifizierte jedoch auch acht uncharakterisierte Proteine, die potenziell Bakteriozine sein könnten. Zudem könnte eine “Überdeckung” der gesuchten Bakteriozine durch andere Proteine in höherer Konzentration vorgelegen haben. Eine antimikrobielle Wirkung durch die in der Massenspektrometrie nachgewiesenen Phagen wurde durch Agar-Well-Diffusionstests mit entsprechenden Modellphagen ausgeschlossen, da die Hemmhöfe eine deutlich geringere Hemmzone zeigten als der Überstand.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Über den gesamten Berichtszeitraum wurden im Wesentlichen drei Arbeitspakete bearbeitet. Im Arbeitspaket IV.2. "Statistische Planung und Auswertung" wurden kontinuierlich über den gesamten Projektzeitraum spezifische Einzelprojekte in den Komplexen I, II und III in enger Zusammenarbeit mit den Projektpartnern durchgeführt. Hierzu ist eine Reihe von spezifischen Publikationen ab dem ersten Projektjahr entstanden.

Da die Datenerfassung der Projektpartner im ersten Projektjahr noch nicht abgeschlossen wurde, konnte die Datenbank aus AP IV.1 nicht wie geplant zu Beginn erstellt werden. Stattdessen wurden alle Daten der Projektpartner im letzten Projektjahr ab dem vierten Quartal 2023 bis ins Jahr 2024 zusammengestellt, harmonisiert und als Metadaten in einem REDCap (=Research Data Capture) DataHub abgelegt. Zusätzlich wurde für die Öffentlichkeit eine Website mit RShiny aufgebaut, die eine vollständige Übersicht über die im Verbund entwickelten Datenstrukturen gibt. Dabei konnten die Datenschutzanforderungen so umgesetzt werden, dass ein Zugang zu den Daten jeweils mit dem Dateneigner abgestimmt werden kann.

Die geplante Modellierung im Arbeitspaket IV.3. konnte nicht wie geplant im Rahmen des Projektes vollständig abschlossen werden, da sich gezeigt hat, dass die im Verbund abgestimmten Modellierungsgrößen "Prozessschritte", "Messeinheiten" und "Matrizes" trotz der Berücksichtigung der gesetzlichen Vorgaben so heterogen in der Literatur abgehandelt werden, dass eine geplante unmittelbare Weiterentwicklung bzw. komplementäre Ergänzung der Modelle nicht möglich ist. Mit Hilfe des entwickelten DataHubs und der darin abgelegten he-

terogenen und komplexen Datenstrukturen sowie der Übersicht über die aktuell in der Literatur und im Projekt untersuchten Prozesspunkte liegen nunmehr aber die zwei wesentlichen Komponenten für ein Pflichtenheft zur Etablierung eines fortgeschrittenen Modells zur Verfügung, das in einem eigenständigen Vorhaben erstellt und validiert werden kann. Zudem ist hierüber eine Priorisierung für die Umsetzung der Kontaminationsreduktion möglich.

3. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Teilprojekt "Bakteriozine"

Wir haben einen vielversprechenden bakteriellen Kandidaten für die Bakteriozinbildung isoliert: *Bacillus velezensis* C10B2.10, der einen Überstand produzierte, der reich an antimikrobiellen Substanzen ist. Mit Hilfe bioinformatischer Tools haben wir Gene bekannter antimikrobieller Substanzen im Genom von C10B2.10 identifiziert. Die Analyse der Peptide und Proteine im Überstand mittels Massenspektrometrie bestätigte das Vorhandensein von Polyketiden. Allerdings konnte keines der bekannten Bakteriozine nachgewiesen werden, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass die Bakteriozine aufgrund ihrer geringen Größe (weniger als 5 kDa) nicht detektiert werden konnten, da die verwendete MS-Technik kleine Peptide nicht erkennt, oder dass unsere Bakteriozine zu den uncharakterisierten Proteinen gehören oder im MS durch andere Proteine überdeckt wurden. Abschließend lässt sich sagen, dass eine gründliche Aufreinigung der Substanzen erforderlich ist. Aufgrund der Komplexität der Substanzzusammensetzung im Überstand von C10B2.10 ist dies jedoch im Rahmen dieses Projektes nicht abschließend möglich.

Teilprojekt “Biometrie und Epidemiologie”

Da in KontRed grundsätzlich das Ziel einer Kontaminationsreduktion in den Prozessen der Schlachtung formuliert ist, wurde im Rahmen von **AP I.1** zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt, um den derzeitigen Status Quo der Kontamination wissenschaftlich zu validieren**.** Das TiHo-IBEI war hierbei an der Strukturierung der Review sowie der Datenerfassung beteiligt. Im weiteren Verlauf des Projekts wurden die Literaturdaten ausgewertet und sollen im Rahmen von zwei Publikationen im Geflügel- und Schweinebereich veröffentlicht werden. Die Literaturrecherche ergab, dass eine gemeinsame Meta-Analyse aufgrund der Heterogenität der Daten nicht möglich war. Stattdessen wurden in enger Zusammenarbeit mit FFG, BfR und FU ILS die Gründe für solche heterogenen Ergebnisse bei Geflügel aufgearbeitet und Empfehlungen ausgesprochen.

So konnten 32 verschiedene Prozesspunkte zu acht neuen übergreifenden Kategorien, die verschiedenen Probenmaterialien und –typen zu 14 Gruppen und verschiedene Maßeinheiten zu drei empfohlenen Skalen zusammengefasst werden. Allein in Hinblick auf die Prozesspunkte und Materialen sind damit 112 verschiedene Kombinationen möglich.

In Zusammenarbeit mit PHW, RU, TLB, BQF konnten Prozessdaten aus den Schlachtbetrieben gewonnen und ausgewertet werden. Die durchgeführten Auswertungen werden den vier Schlachthofpartner intern zur Verfügung gestellt und die Metadaten stehen über das DataHub den Projektpartnern als Bezugspunkt für einschlägige Publikationen zur Verfügung.

Zusätzlich wurden die Projektpartner in Vorbereitung auf **AP IV.1** im Datenmanagement und –erzeugung geschult. Die Erfassung aller Datenstrukturen wurde mit Hilfe von REDCap (=Research Data Capture) auf einem virtuellen Server der Tierärztlichen Hochschule umgesetzt. Dieses DataHub wurde unter intensiver Abstimmung mit sämtlichen Projektpartnern aufgebaut. Zusätzlich ist eine Website unter RShiny generiert wurden, um die Projektergebnisse der Öffentlichkeit zu präsentieren.

Im Rahmen des **AP IV.2** hat das TiHo-IBEI an der Studienplanung, Fallzahlberechnung und/oder statistischen Auswertung für FU ILS-F, FU ILS, FU ITU, BfR 41, BfR 45 und OWL mitgewirkt. Dabei sind zahlreiche Publikationen AP I.2, AP I.3, AP II.1, AP II.2, AP II.4, AP II.6, AP II.8 und AP III.2 entstanden oder in Bearbeitung.

Teil II: Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Teilprojekt "Bakteriozine"

AP II.6: Identifizierung, Wirksamkeitsprüfung und Charakterisierung von Bakteriozinen

Im Rahmen dieses Projekts wurden Bakterien-Screening-Verfahren und eine Hochdurchsatzmethode zur Ermittlung neuer Bakteriozine entwickelt (siehe Abbildung 3). **Task 1** sollte im ersten Jahr abgeschlossen werden, was basierend auf unseren ersten Ergebnissen erfolgreich war. Ende des ersten Jahres und im Verlauf des zweiten Jahres wandten wir uns **Task 2** und **Task 3** zu. Dabei wurde klar, dass wir **Task 1** und **2** aufgrund der präsumtiv bekannten Substanzen ein zweites Mal durchführen mussten. Daher haben wir im zweiten Jahr **Task 1** nochmals durchgeführt und im dritten Jahr erneut **Task 2** und **3** mit den neu isolierten Bakterienisolaten bearbeitet.

Unser Bakterien-Screening-Verfahren ermöglichte die Sammlung und Untersuchung von insgesamt 2555 Isolaten aus 128 Proben, verteilt auf 2 Beprobungsrunden.

Die erste Suche umfasste 1565 Isolate, von denen 28 eine Hemmwirkung gegenüber den getesteten Indikatorkeimen zeigten. Nach den ersten Charakterisierungsschritten wurden 2 Kandidaten ausgewählt, die zuverlässige hemmende Aktivität zeigten: *Bacillus subtilis* 236.3 und *Bacillus amyloliquefaciens* 599. Weiterführende Charakterisierungen dieser Kandidaten deuteten darauf hin, dass keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden konnten und dass die nachgewiesene Hemmwirkung auf bekannte hemmende Substanzen zurückzuführen ist.

Für die zweite Beprobungsrunde wurden 990 Isolate aus 30 Proben untersucht, von denen 250 eine hemmende Wirkung zeigten. Die Menge der positiven Isolate in der zweiten Beprobungsrunde betrug 25% im Vergleich zu 2% in der ersten Runde. Die optimierte Isolierungspipeline ist daher als erfolgreich zu bewerten. Basierend auf den Charakterisierungsergebnissen wurden 5 Kandidaten ausgewählt (siehe oben). Der beste Kandidat ist hitzestabil, verdaulich mit Proteinase K und aktiv in pH-Werten von 4 bis 9. Es handelt sich um *Bacillus velezensis* C10B2.10, der sequenziert wurde und dessen Überstand für die teilweise Aufreinigung verwendet, sowie mittels Massenspektrometrie und SDS-PAGE analysiert wurde. Dabei wurde ein hemmendes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 3 kDa identifiziert. Polyketide, die ungefähr diese Größe haben können, gehören zu den hemmenden Substanzen die im Überstand von *Bacillus velezensis* C10B2.10 vorhanden sind. Dieselben Gene sind im Genom vorhanden (siehe oben). Aufgrund der Komplexität unserer Ergebnisse sind

jedoch weiterführende Arbeiten erforderlich, um unsere Erkenntnisse vollständig zu nutzen und praktisch anzuwenden.

Teilprojekt “Biometrie und Epidemiologie”

AP IV.1 Aufbau einer gemeinsamen Datenbank

Im Rahmen des Arbeitspakets IV.1 wurde der Aufbau und die Betreuung einer Projektdatenbank thematisiert. Ziel war eine Datenbank zur Dokumentation aller im Projekt verwendeten Informationen. Eine Datenbank auf Basis von Einzeldaten konnte aus Gründen der technischen Heterogenität sowie Datenschutz relevanten Gründen nicht im Vorhaben umgesetzt werden.

Daher wurde eine datenschutzgerechte Umsetzung im Rahmen eines Data Hubs umgesetzt, der den derzeitigen Forderungen der "Nationalen Forschungsdateninfrastruktur (NFDI)" genügt (Fluck, 2021). Die Realisierung erfolgt mit Hilfe des REDCap ("Research Date Capture"), einer browserbasierten, metadatengesteuerte EDC-Software und Workflow-Methodik zum Entwerfen translationaler Forschungsdatenbanken. Hierzu wurden alle Projektdaten in Form von Excel-Tabellen entgegengenommen, harmonisiert und zusammengefasst. Die Zusammenfassung erfolgte auf mehreren Ebenen auf Grundlage der Literaturrecherche aus **AP I.1**. Für jede empirische Datenstruktur wurden die Daten auf Ebene der Tiergruppe, dem Datentyp (z.B. Basisbeprobung, Probentyps, -materials, Prozesspunkts, Messziels (z.B. Keimzahlmessung), Untersuchungsziels (z.B. Campylobacter) und, falls relevant, auf Ebene der Intervention und Versuchseinstellung zusammengefasst (siehe Abbildung 5).

Auf diese Weise wurden die Daten soweit komprimiert, wie es inhaltlich sinnvoll erscheint. Im REDCap Data Hub werden diese zusammengefassten Ergebnisse inklusive der gemessenen Mittelwerte, Prävalenzen und erzielten Reduktionen, projektintern zur Verfügung gestellt (Abbildung 6 und Abbildung 7). Die Struktur der Daten wird hierbei in einem Codebuch vollständig dokumentiert, so dass sowohl die Datenbankfelder als auch die zugewiesenen Kataloge zugänglich sind.

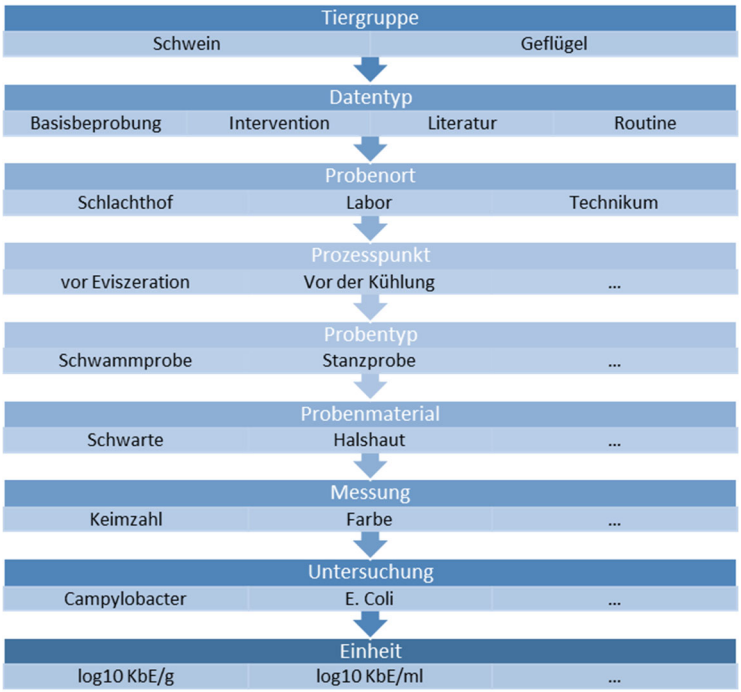

Abbildung 5: Grunddatenstruktur im KontRed-Data Hub

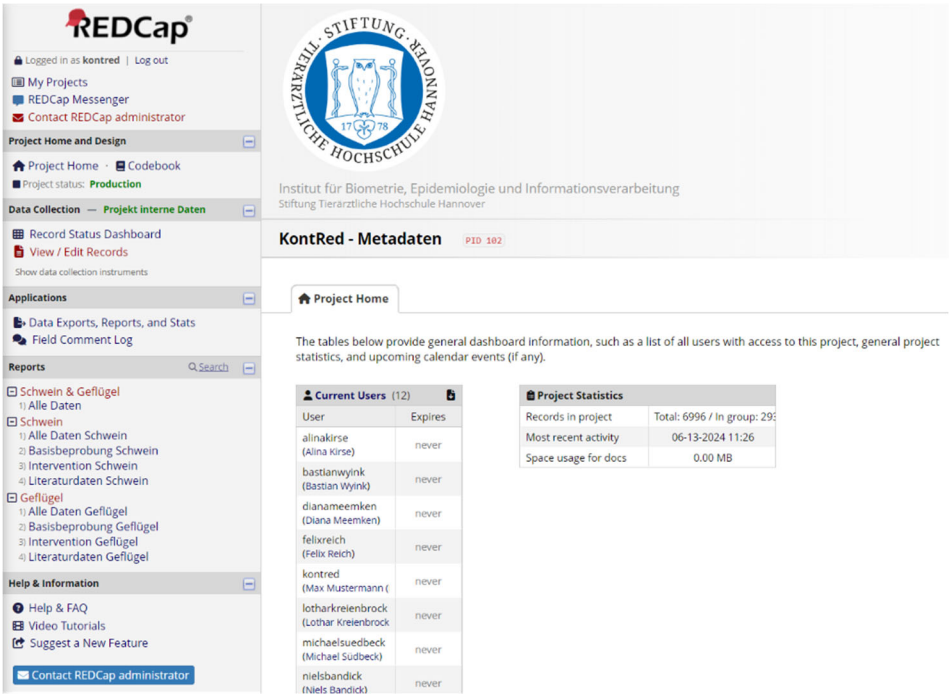

Abbildung 6: Startseite des KontRed-Projekts in REDCap

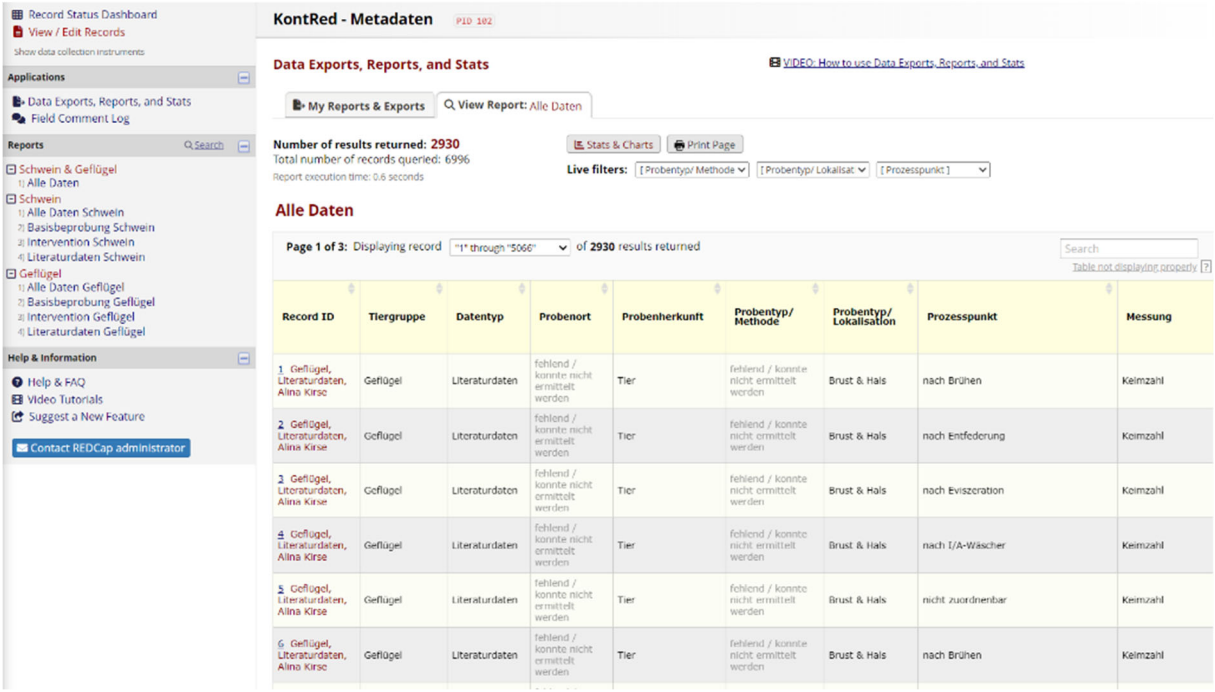

Abbildung 7: Darstellung aller Projektdaten in REDCap

Obwohl in **Task 2** das Ziel formuliert wurde die Datenbank für den gesamten Projektzeitraum zur Verfügung zu stellen, konnte das Data Hub erst im letzten Quartal des Projekts finalisiert und den Projektpartner zur Verfügung gestellt werden, da vorher die finalen Datenstrukturen der Projektpartner nicht zugänglich waren. Statt einer gemeinsamen Datenbank zur zeitnahen Sammlung aller Projektdaten ist hier somit eine vollständige Zusammenfassung aller im Projekt erzielten Forschungsdateninformationen entstanden.

Neben dem KontRed-internen Informationszugang wurde in RShiny eine Website erstellt, über welche der Öffentlichkeit die Verbundergebnisse zugänglich gemacht wurde. Zum Schutz der Projektpartner wurden sensible Informationen wie der Mittelwert, die Prävalenz und die erzielte Reduktion exkludiert. Diese Informationen können bei Interesse den entsprechenden Publikationen entnommen oder bei den Ansprechpartnern erfragt werden. Die Projektpartner haben dann die unmittelbare Möglichkeit eigene Daten zur Verfügung zu stellen oder eine Erlaubnis zu erteilen, dass TiHo-IBEI dies übernimmt.

Auf der Website hat die Öffentlichkeit die Möglichkeit sich über die Ziele des Projekts (Abbildung 8), die durchgeführten Untersuchungen (Abbildung 9), Ansprechpartner und die im Rahmen des Projekts veröffentlichte Literatur zu informieren. Die Website ist unter https://shiny.tiho-hannover.de/kontred/# zu erreichen.

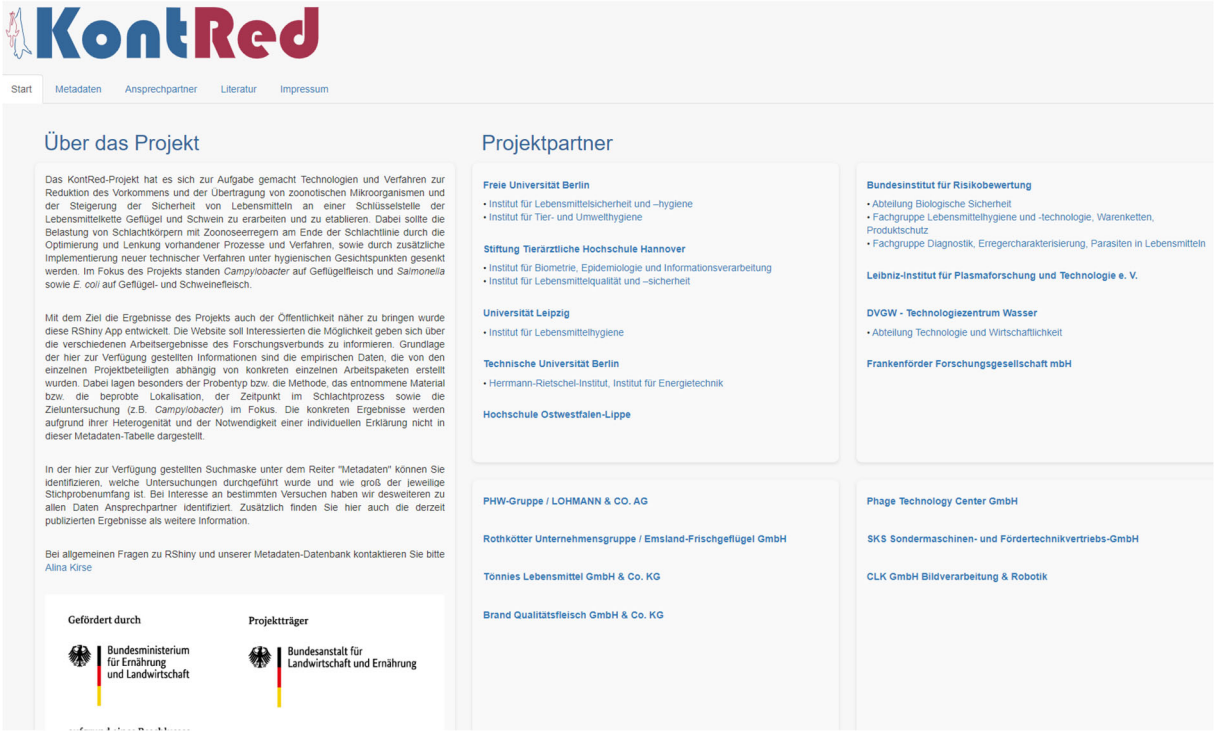

Abbildung 8: Startseite der KontRed Website erstellt mit RShiny

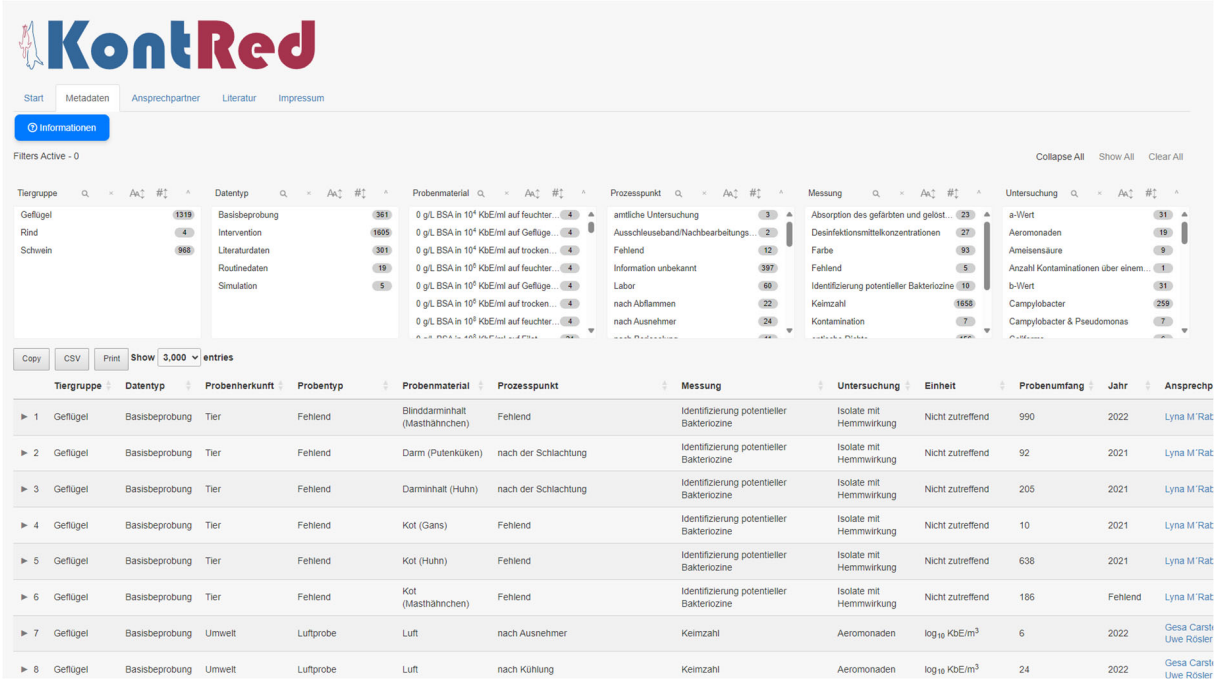

Abbildung 9: Ausschnitt der auf der KontRed Website dargestellten Metadaten

AP IV.2. Statistische Auswertung

Task 1 hatte u.A. das Ziel, die Projektpartner bei der Auswertung der Daten zu unterstützen. Dazu wurden dem TiHo-IBEI alle Daten in Form von Excel-Tabellen übermittelt. Diese Excel-

Dateien wurden genutzt, um sowohl die in **Task 1** formulierten deskriptiven aber auch die in **Task 2** formulierten induktiven statistischen Auswertungen durchzuführen. Die Auswertungen waren hierbei an die Meilensteine der Verbundpartner angepasst. Das TiHo-IBEI hat hierzu an der Entwicklung der Studiendesigns sowie der Fallzahlberechnung für AP I.3 Task 2 und 5, AP II.2 Task 2 mitgewirkt. Zusätzlich wurden sowohl deskriptive als auch induktive Auswertungen für AP I.1, AP I.2, AP II.2, AP II.4 AP II.6 und AP II.8 durchgeführt. In Zusammenarbeit mit den Projektpartnern wurde hierbei an der Erstellung der Publikationen mitgewirkt.

AP IV.3. Modellierung

Grundlegend sollen die Ergebnisse des KontRed-Verbunds einen Beitrag zur Reduktion der Kontamination in der Routineschlachtung liefern. Trotz diverser nationaler wie internationaler gesetzlicher Vorgaben sind die Informationen zum derzeitigen Status Quo der Kontamination aber sehr heterogen, so dass die Informationen aus

- wissenschaftlicher zugänglicher Literatur
- Routineuntersuchungen in der Schlachthofpraxis
- Basisbeprobungen im Verbund selbst
- Ergebnisse aus experimentelle Maßnahmen im Labor bzw. im Schlachthof

nicht zu einem gesamthaften Modell zusammengeführt werden konnten. Daher wurden in Vorbereitung für eine Modellierung das Ziel formuliert die Primär- und Sekundärdaten miteinander abzustimmen, auf Vollständigkeit zu prüfen und zu vernetzen.

Dazu wurden Plausibilitätsprüfungen durchgeführt. Dies erfolgte entweder an Hand von durch die Projektpartner übermittelten Originaldaten oder beim Transfer der Daten in das Data Hub.

In Task 2 wurden wie geplant die Status-Quo, die experimentellen und die Routinedaten der Verbundpartner gemeinsam deskriptiv ausgewertet. Für Geflügel konnten hier Campylobacter und die Gesamtkeimzahl für alle vier Datentyp miteinander verglichen werden. Bei den – Daten zur Schlachtung von Schweinen war ein solcher Vergleich für Enterobakterien und Gesamtkeimzahl möglich. Bei den anderen Erreger fehlen für beide Tiergruppe mindestens ein Datentyp (Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersichtstabelle der untersuchten Erreger pro Datentyp

Tiergruppe	Untersuchung	Datentyp			
		Basisbeprobung	Intervention	Literaturdaten	Routinedaten
Geflügel	Aeromonaden	✓	.	.	.
	Campylobacter	✓	✓	✓	✓
	E. coli	✓	✓	✓	.
	Enterobakterien	✓	.	✓	✓
	Enterokokken	✓	✓	.	.
	Gesamtkeimzahl	✓	✓	✓	✓
	Moraxellaceae	✓	.	.	.
	Salmonellen	.	✓	✓	✓
Schwein	Coliforms	.	.	✓	.
	E. coli	.	.	✓	✓
	Enterobakterien	✓	✓	✓	✓
	Gesamtkeimzahl	✓	✓	✓	✓
	Hefen	✓	✓	.	.
	Listerien	.	✓	.	.
	MRSA	.	✓	.	.
	Pseudomonas	.	✓	.	.
	Salmonellen	✓	✓	.	✓
	Schimmelpilze	✓	✓	.	.
	Yersinien	.	✓	.	.

Die spezifische Belastung durch einzelne Erreger sowie die Keimreduktion konnte so abgeschätzt werden. Hierbei ist sowohl bei Geflügel (Tabelle 11 und Abbildung 10) als auch Schwein (Tabelle 12 und Abbildung 11) die unterliegende Heterogenität in Bezug auf Probenmaterial und Messmethode zu beachten.

Tabelle 11: mittlere Keimbelastung, -reduktion und Prävalenz pro Erreger und Datentyp für Geflügel

Untersuchung	Datentyp	Keimbelastung		Reduktion		Prävalenz	
		N	Mittelwert	N	Mittelwert	N	Mittelwert
Aeromonaden	Basisbeprobung	15	1,40	0	.	0	.
Campylobacter	Basisbeprobung	24	2,76	0	.	8	29,86
	Intervention	120	4,37	125	-0,10	0	.
	Literaturdaten	41	3,05	0	.	48	73,46
	Routinedaten	644	1,56	0	.	0	.
E. coli	Basisbeprobung	41	2,77	0	.	0	.
	Intervention	57	4,26	45	-0,04	0	.
	Literaturdaten	35	3,29	0	.	16	95,89
Enterobakterien	Basisbeprobung	17	1,45	0	.	0	.
	Literaturdaten	20	3,33	0	.	9	94,57
	Routinedaten	489	2,24	0	.	0	.
Enterokokken	Basisbeprobung	19	1,93	0	.	0	.
	Intervention	0	.	9	1,37	0	.
Gesamtkeimzahl	Basisbeprobung	42	3,98	0	.	0	.
	Intervention	66	4,73	43	0,12	0	.
	Literaturdaten	27	3,71	0	.	10	100,00
	Routinedaten	720	3,61	0	.	0	.
Moraxellaceae	Basisbeprobung	15	1,37	0	.	0	.
Salmonellen	Intervention	142	6,35	130	-0,22	0	.
	Literaturdaten	7	2,17	0	.	25	25,28
	Routinedaten	0	.	0	.	749	1,48

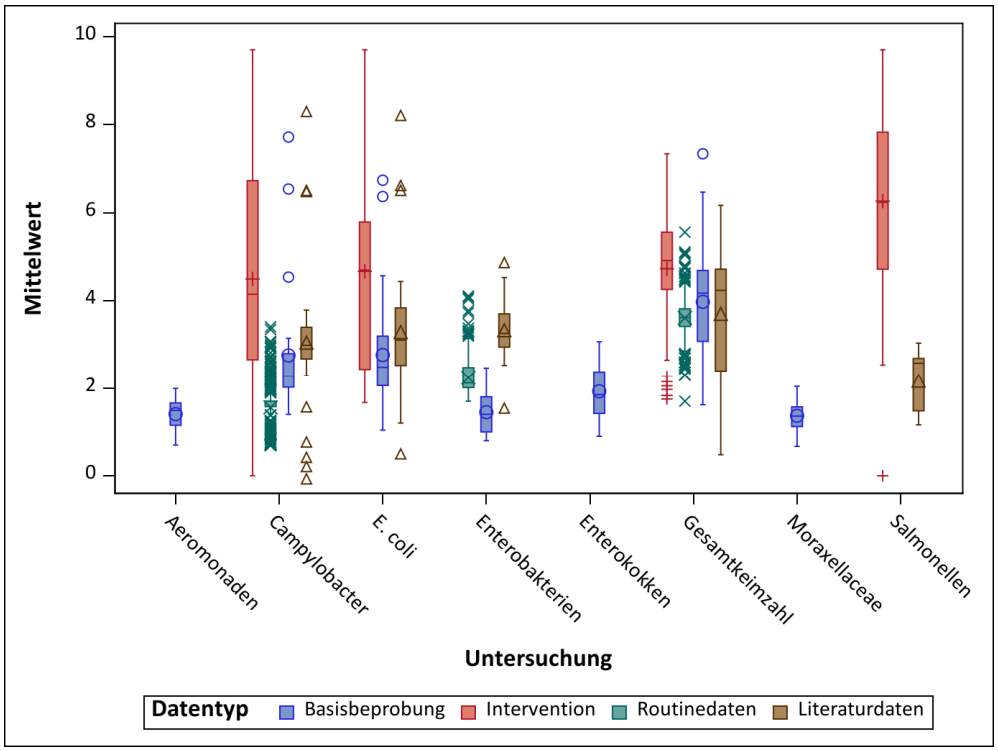

Abbildung 10: Darstellung der mittleren Keimbelastung pro untersuchtem Erreger und Datentyp für Geflügel

Tabelle 12: mittlere Keimbelastung, -reduktion und Prävalenz pro Erreger und Datengrundlage für Schwein

Untersuchung	Datentyp	Mittelwert		Reduktion		Prävalenz	
		N	Mittelwert	N	Mittelwert	N	Mittelwert
Coliforms	Literaturdaten	6	-0,28	0	.	6	86,67
E. coli	Literaturdaten	27	0,05	0	.	22	82,98
	Routinedaten	152	0,72	0	.	0	.
Enterobakterien	Basisbeprobung	47	2,10	0	.	0	.
	Intervention	37	0,88	26	0,08	4	42,50
	Literaturdaten	33	1,09	0	.	25	88,12
	Routinedaten	361	1,31	0	.	0	.
Gesamtkeimzahl	Basisbeprobung	51	4,09	0	.	0	.
	Intervention	48	4,30	30	-0,23	4	0,00
	Literaturdaten	34	2,87	0	.	29	98,83
	Routinedaten	361	3,09	0	.	0	.
Hefen	Basisbeprobung	12	0,81	0	.	0	.
	Intervention	8	0,80	4	0,01	0	.
Listerien	Intervention	0	.	0	.	40	0,83
MRSA	Intervention	0	.	0	.	40	7,08
Pseudomonas	Intervention	20	1,36	4	2,14	40	56,25
Salmonellen	Basisbeprobung	35	0,00	0	.	42	0,33
	Intervention	0	.	0	.	40	4,17
	Routinedaten	0	.	0	.	259	0,00
Schimmelpilze	Basisbeprobung	12	0,91	0	.	0	.
	Intervention	8	0,75	4	0,10	0	.
Yersinien	Intervention	0	.	0	.	40	2,92

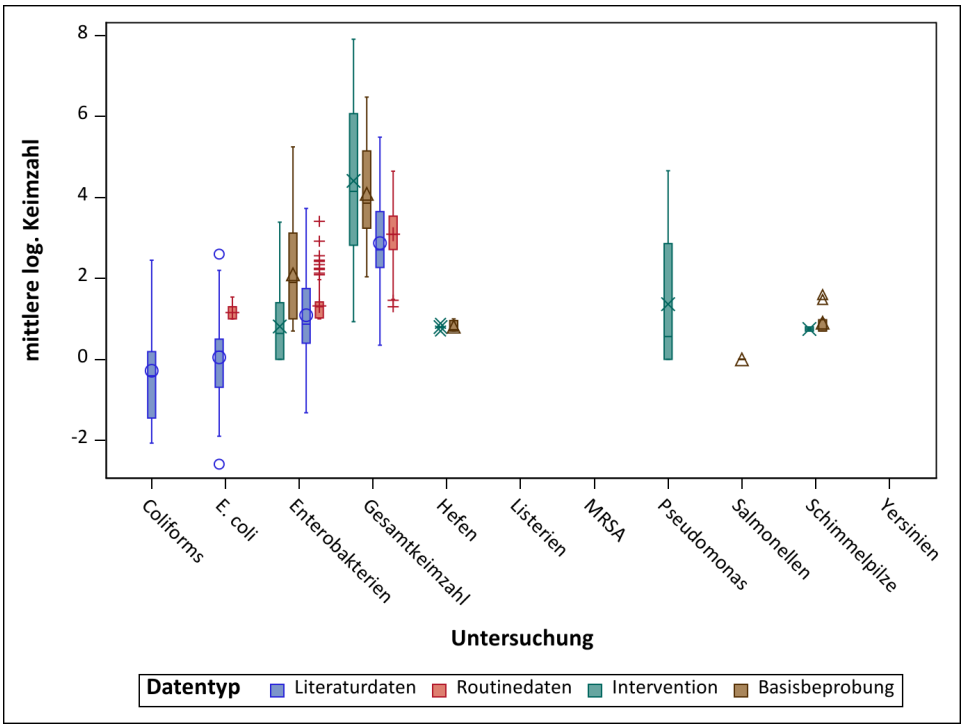

Abbildung 11: Darstellung der mittleren Keimbelastung pro untersuchtem Erreger und Datentyp für Schwein

Aus der Literaturrecherche sowie Publikationen zu bislang bestehenden Modellen (entlang der Prozesskette Schlachthof) wurden die Modellvariablen zusammengestellt, die bislang in eine Modellierung eingegangen sind bzw. die im Rahmen der Verbundarbeit intensiv untersucht wurden. Damit konnten die Modellkomponenten und Ergebnisse, die in KontRed erstellt wurden, verglichen werden.

Dieser Vergleich ist derzeit erschwert, da angemessene Modelle derzeit für Geflügel nur für *Enterobakterien* (Correia Carreira et al., 2023) und für Schwein für *Salmonellen spp.* (Swart et al., 2016) vorliegen. Im Geflügelbereich wurden im Rahmen des Projekts jedoch nur *E. coli* Proben genommen und *Salmonellen spp.* für Schweine qualitativ statt quantitativ betrachtet. Zudem beschäftigten sich Correia Carreira et al. (2023) nur mit der Keimzahlreduktion durch verschiedenste Interventionen an sieben Prozesspunkten, wohingegen die Projektdaten auch Routinedaten und Basisbeprobungen enthalten. Zusätzlich beziehen sich die Modellierungen auf Schlachthofdaten, wohingegen die Projektdaten sowohl am Schlachthof als auch am Technikum und im Labor erhoben wurden.

Tabelle 13: Vergleich der in KontRed und in der aktuellen Modell-literatur behandelten Prozesspunkte in der Geflügelschlachtung

Prozesspunkt	**KontRed**						**Literatur**
	Schlachthof	**Technikum**	**Labor**	**Unbekannt**	**fehlend**	**nicht zutreffend**	**Schlachthof**
Vorbereitung							✓
Infrastruktur							✓
nach Tötung	✓				✓		
vor Brühen		✓					
Brüher							✓
nach Brühen	✓	✓			✓		
Rupfen							✓
nach Entfederung	✓				✓		
1. Besichtigung	✓						
amtliche Untersuchung					✓		
vor Kloakenschneider	✓						
Eviszeration							✓
nach Eviszeration	✓				✓		
nach Lungensauger	✓	✓					
Waschen							✓
nach I/A Wäscher	✓				✓		
vor Kühlung	✓						
Kühlung							✓
nach Kühlung	✓	✓		✓	✓		
nicht zutreffend		✓	✓				
fehlend			✓			✓	
nicht zuordnenbar					✓		
unbekannt	✓		✓	✓			

Verglichen mit vorliegenden Modellpublikationen zeigt sich, dass die Prozesspunkte nicht immer übereinstimmen. Dabei fällt besonders auf, dass Projektdaten an mehr Prozesspunkten als in der Literatur erhoben wurden, so dass hier klar eine Wissenslücke geschlossen werden konnte. In Bezug auf die Geflügeldaten zeigt sich deutlich, dass Correia Carreira et al. (2023) und die Projektdaten an keinem Prozesspunkt übereinstimmen (Tabelle 13). Dies liegt speziell daran, dass im Projekt konkrete Zeitpunkte wie "vor" oder "nach" einem Prozessschritt angegeben wurden, wohingegen Correia Carreira et al. (2023) sich auf den Prozessschritt im Allgemeinen fokussieren. Dadurch gleichen sich die beiden Datengrundlagen in insgesamt fünf Prozessschritten: Brühen, Entfederung, Eviszeration, Waschen und Kühlung. Diese Prozessschritte wurden als besonders wichtig im Rahmen des Projektes identifiziert und konkret in der Basisbeprobung beprobt. Zusätzlich gibt es sowohl in den Modellen von Correia Carreira et al. (2023) als auch in den Projektdaten mindestens einen Prozesspunkt vor dem Brühen als Erstwert im Schlachthof. Im Rahmen des Projektes wurden zusätzlich noch andere Projektpunkte betrachtet, die in den Modellen nicht betrachtet wurden. Dazu zählen zum einen Untersuchungen zum Zeitpunkt der 1. Besichtigung und vor dem Kloakenbohrer. In der Literatur wurde hingegen nur die Infrastruktur zusätzlich beprobt.

Tabelle 14: Vergleich der in KontRed und in der aktuellen Model-literatur behandelten Prozesspunkte in der Schweineschlachtung

Prozesspunkt	**KontRed**					**Literatur**
	Schlachthof	**Wartestall**	**Labor**	**fehlend**	**nicht zutreffend**	**Schlachthof**
vor Berieselung	✓					
nach Berieselung	✓					
nach Betäubung	✓			✓		
Brüher						✓
Kratztisch						✓
nach Entborstung	✓			✓		
Polieren / Abflammen						✓
nach Abflammen	✓			✓		
nach Eviszeration	✓			✓		
nach Eviszeration / vor Spaltung	✓					
nach Eviszeration / vor Veterinärpodest	✓					
Entnahme Geschlinge						✓
Spaltung						✓
Ausputzen						✓
vor Kühlung	✓			✓		
Kühlung						✓
nicht zutreffend		✓	✓			
fehlend					✓	
nicht zuordnenbar				✓		
unbekannt	✓					

Beim Vergleich der Projektdaten für Schweine und dem Salmonellen-Modell von Swart et al., 2016 fällt auf, dass sich die Prozesspunkte nur in drei Fällen überschneiden bei der Entborstung, dem Abflammen/Polieren, und der Kühlung (Tabelle 14). Die Projektuntersuchungen wurden zusätzlich noch bei Berieselung (im Wartestall), Betäubung und Eviszeration durchgeführt, wohingegen die Autoren zusätzlich den Brüher, die Entnahme des Geschlinges, die Spaltung des Tierkörpers und das Ausputzen in ihrem Modell betrachteten.

2. Wichtigste Positionen des zahlungsmäßigen Nachweises

Teilprojekt "Bakteriozine"

Im Teilprojekt "Bakteriozine waren Personalausgaben für die Doktorandin die wichtigsten Positionen des zahlungsmäßigen Nachweises. Detaillierte Informationen finden sich in den Verwendungs- und Zwischennachweisen. Durch die Schwangerschaft der Doktorandin und die Corona bedingte spätere Einstellung ergab sich die Notwendigkeit einer Projektverlängerung.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Für das TiHo-IBEI waren Personalausgaben im Bereich wiss. Angestellte sowie medizinisches Informationsmanagement die wichtigste Position des zahlungsmäßigen Nachweises. Detaillierte Informationen finden sich in den Verwendungs- und Zwischennachweisen. Im Rahmen der Projektdurchführung kam es leider – zum Teil Pandemiebedingt - zu diversen

Personalwechseln, so dass unterschiedliche Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter mit den entsprechenden Aufgaben betreut werden mussten.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit

Teilprojekt "Bakteriozine"

Die geleistete Projektarbeit ermöglichte bedeutende Fortschritte in der Isolierung und Charakterisierung neuer Bakteriozine. Durch die Entwicklung von Bakterien-Screening-Verfahren und Hochdurchsatzmethoden konnten wir gezielt nach neuen Bakteriozinen suchen und deren Wirksamkeit testen. Alle geplanten Aufgaben, einschließlich der Isolierung und Identifizierung potenzieller Bakteriozinproduzenten, wurden erfolgreich abgeschlossen. Der Einsatz moderner bioinformatischer Werkzeuge und analytischer Techniken wie Long read Sequenzierung und Massenspektrometrie war entscheidend für die detaillierte Charakterisierung der isolierten Substanzen. Obwohl die Ergebnisse komplex sind und weiterführende Arbeiten erfordern, haben wir eine solide Grundlage für zukünftige Forschungen geschaffen. Unsere Projektarbeit hat somit wesentliche Erkenntnisse geliefert und die Basis für weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen gelegt.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Die statistische, epidemiologische und Datenmanagementexpertise des TiHo-IBEIs hat zum erfolgreichen Abschluss zahlreicher Tasks geführt. Die Zusammenarbeit hat zudem dazu beigetragen, die Fragestellungen unserer Projektpartner erfolgreich zu beantworten. Dies ist vor allem der integrierten Beratung und statistisch-epidemiologischen Auswertung von diversen Tasks zuzuordnen.

Die Erstellung des DataHubs ist ein wichtiger Teil der Öffentlichkeitsarbeit für das Projekt. Statt einzelner Teilergebnisse auf den Websiten der Partner finden sich in RShiny alle Informationen zu den Arbeitspaketen übersichtlich und intuitiv zusammengefasst, so dass die Ergebnisse der Verbundarbeit leicht (inter-) national zusammengestellt werden können. Damit wurde ein wesentlicher Aspekt einer Fokussierung der Kontaminationsreduktion erstellt und zukünftige wissenschaftliche wie praxisgetriebene Untersuchungen sowie eine aktualisierte Modellierung ermöglicht (siehe auch Abschnitt 4).

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Teilprojekt "Bakteriozine"

In dem Teilprojekt "Bakteriozine" wurden wichtige Voraussetzung für die Identifizierung und Anwendung von Bakteriozinen geschaffen: Verfahren zur Produktion von Überständen sowie für deren Charakterisierung wurden weiterentwickelt und optimiert. Im Projekt wurde die gesamte Prozesskette zur Identifizierung neuer Bakteriozine bis zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie etabliert und optimiert. Auch wenn in dem aktuellen Projekt keine definierten Substanzen identifiziert werden konnten, die die antimikrobielle Wirkung der Überstände vermitteln, wurden wirksame Überstände identifiziert und produziert. Diese könnten, von Bakterien getrennt, als zellfreier Überstand zur Behandlung von Schlachtkörpern, Oberflächen und Haut in Schlachthöfen verwendet werden. Nach der Identifizierung und Aufreinigung einzelner hemmender Substanzen aus diesen oder weiteren Überständen, könnte diese auch in reiner Form vielfältige Anwendungen finden. Die Ergebnisse des Projektes wurden auf Fachtagungen und Konferenzen präsentiert und werden zur Entwicklung von Methoden und der Identifizierung antimikrobieller Substanzen beitragen. Publikationen und eine Doktorarbeit werden derzeit zur Einreichung vorbereitet. Während des Projektes wurden Mittel für die Fortsetzung der Forschungsaktivitäten eingeworben. Auf der Grundlage der im Projekt erstellten Stammsammlung sollen auch weiterhin Projektmittel eingeworben werden, um die Arbeiten zur Entwicklung von Bakteriozinen als antimikrobielle Substanzen fortzuführen.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Die erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern und dem TiHo-IBEI eröffnet Möglichkeiten für eine erneute Zusammenarbeit in der Zukunft. Dadurch können die Projektpartner in ihrer Versuchsplanung unterstützt und die Datenqualität sowie die Auswertungen weiter validiert werden. Diese Auswertung können zur verbesserten Hygiene und der Geflügel- und Schweineschlachtung beitragen sowie den Verbraucherschutz verbessern.

Das Data Hub sowie unsere Website werden auch über das Projekt hinaus bestehen. So können sich unsere Projektpartner sowohl miteinander als auch mit externen Interessierten vernetzen. Diese fortlaufenden oder neuen Vernetzungen können zur Identifizierung neuer Fragestellungen und neuen Projekten führen. Besonders die Struktur des REDCap Data Hubs bietet die technische Grundlage für weitere Projekte genutzt werden zu können.

Des Weiteren wurden die Grundlagen für eine Aktualisierung der Risikobewertung gelegt, so dass die Vorbereitung für die Erstellung von Risikomodellen durch das Vorhaben gelegt wurde. Grundsätzlich hat sich nochmals gezeigt, dass die Optionen zur Kontaminationsreduktion auch weiterhin ja nach Standort verschieden sein können. Dies könnte daher dazu

führen, dass die Modelle gegebenenfalls "lokalisiert" werden müssten, was einem neuen Ansatz der Risikomodellierung entsprechen würde.

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

Teilprojekt "Bakteriozine"

Während der Durchführung des Vorhabens wurden unterschiedliche neue Bakteriozine in anderen Studien identifiziert, die jedoch den Projekterfolg nicht beeinflussen.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Während der Projektarbeit wurden die durch die DFG geförderten Arbeiten zu einem Aufbau einer Nationalen Forschungsdateninfrastruktur (NFDI) weitergeführt. Hierbei sind derzeit keinerlei Arbeiten im Bereich Veterinärmedizin oder insbesondere Lebensmittelqualität vorgesehen. Die in KontRed unabhängig entwickelte Infrastruktur fügt sich dennoch in das NFDI-Konzept ein. Daher sind auch über den eigentlichen Projektrahmen hinaus zukünftig weitere Vernetzungen zu anderen Informationsquellen möglich.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse nach Nr. 5 NABF

Teilprojekt "Bakteriozine"

Erfolgte Publikationen:

M'Rabet L, Hirnet J, Plötz M, Kittler S. Bacteriocins for One-Health: isolation, purification and characterization of antimicrobials against foodborne zoonotic pathogens. Vortrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie 2023, Lübeck 19.09.2023 (https://programme.conventus.de/dghm-2023/program/program-points/7138b01f-792f-46c1-8099-9fb78530a666)

M'Rabet L, Hirnet J, Plötz M, Kittler S. Bakteriozine für One-Health: Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung der Wirkung gegenüber durch Lebensmittel übertragene zoonotische Pathogene. Vortrag 63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen 26.-29.09.2023

M'Rabet L, Hirnet J, Peh E, Plötz M and Kittler S. Bacteriocins: isolation, purification and characterization. Posterpräsentation Zoonoses 2022 - International Symposium on Zoonoses Research, Berlin 05.10.2022

Wyink B, Gvaladze T, M'Rabet L, Hirnet J, Carstens G, Friese A, Schumnn-Muck F, Hertwig S, Kittler S, Plötz M, Rösler U, Koethe M, Langkabel N. Moderne Techniken zur Reduktion von Campylobacter-Belastungen in der Geflügelschlachtkette: Teil 2: Einsatzmöglichkeiten und Limitierungen biologischer, chemischer und technologischer Verfahren. FleischWirtschaft : von der Erzeugung bis zur Vermarktung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. 2023; 12:70–4.

Geplante Publikationen:

M'Rabet L, Hirnet J, Plötz M, Kittler S. Targeting Salmonella enterica and Campylobacter jejuni: Advances in antimicrobial interventions.

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. Med. Vet.) in Bearbeitung von Lyna M'Rabet mit dem Titel: Isolierung, Charakterisierung und Auswahl von Bakteriozinen zur Bekämpfung von Lebensmittelinfektionserregern in der Schlachtkette /Fleischproduktion/ Lebensmittelproduktion.

Teilprojekt "Biometrie und Epidemiologie"

Erfolgte Publikationen:

Beterams A, Kirse A, Kreienbrock L, Stingl K, Bandick N, Reich F. Application of hot water and cold air to reduce bacterial contamination on broiler carcasses. To appear in Frontiers

Beterams A, Püning C, Wyink B, Grosse-Kleimann J, Gölz G, Schönknecht A, Alter T, Reich F. Status quo: Levels of Campylobacter spp. and hygiene indicators in German slaughterhouses for broiler and turkey. International Journal of Food Microbiology. 2024 Apr; 414:110610.

Buder, C., Meemken, D., Fürstenberg, R., Langforth, S., Kirse, A., & Langkabel, N. (2023). Drinking pipes and nipple drinkers in pig abattoir lairage pens: a source of zoonotic pathogens as a hazard to meat safety. Microorganisms, 11(10). https://doi.org/10.3390/microorganisms11102554

Fürstenberg R, Langkabel N, Grosse-Kleimann J, Kreienbrock L, Meemken D. Agar Contact Method as a Valuable Tool to Identify Slaughter Hygiene Deficiencies along the Slaughter Process by Longitudinally Sampling Pig Skin Surfaces. Microorganisms. 2023 Oct 8; 11(10):2512.

Fürstenberg R, Meemken D, Langforth S, Grosse-Kleimann J, Kreienbrock L, Langkabel N. Comparison of the agar contact method and the wet-dry double swabbing method for determining the total viable bacterial count on pig carcass surfaces. J Consum Prot Food Saf. 2024 Mar; 19(1):41–8.

Gvaladze T, Lehnherr H, Große-Kleimann J, Hertwig S. A Bacteriophage Cocktail Reduces Five Relevant Salmonella Serotypes at Low Multiplicities of Infection and Low Temperatures. Microorganisms. 2023 Sep 12; 11(9):2298.

Tholen J, Grosse-Kleimann J, Schulze Althoff G, Kreienbrock L, Upmann M. Ausdehnung und Lokalisation diverser Kontaminationsarten auf industriell geschlachteten Schweinekörpern. FleischWirtschaft : von der Erzeugung bis zur Vermarktung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. 2024; 71–6.

Tholen J, Grosse-Kleimann J, Schulze Althoff G, Kreienbrock L, Upmann M. Type, areal extent and localization of carcass contaminations during industrial pig slaughter. Meat Science. 2024 Feb; 208:109365.

Geplante Publikationen:

Kirse A, Wyink B, von Haacke H, Langkabel N, Meemken D, et al., Alter T, Kreienbrock L. Microbiological Contamination in Pig – A General Overview on Recent Data and Documentation in Routine Slaughter.

Kirse A, Rohlf S, Winkelmann TS, Bandick N, Alter T, Kreienbrock L. KontRed – Die Reduktion der bakteriellen Belastung von Schlachtprodukten – Data Hub. Vortrag 64. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz 2024 vom 24.-27.09.2024 in Garmisch-Patenkirchen

Tholen J, Kirse A, Zimmermann M, von Haacke H, Kreienbrock L, Schulze Althoff G, Upmann M. Steam-vacuum treatment of pig carcass surfaces.

Wyink B, von Haacke H, Reich F, Beterams A, Bandick N, Albert T, Südbeck M, Alter T, Kreienbrock L, Kirse A. Microbiological Contamination in Broiler – A General Overview on Recent Data and Documentation in Routine Slaughter.

7. Literatur

Correia Carreira G, Projahn M, Langkabel N et al. Modeling of interventions for reducing external Enterobacteriaceae contamination of broiler carcasses during processing. Risk Analysis 2023; 43 (10):1933-45.

Fluck Jea. NFDI4Health – Nationale Forschungsdateninfrastruktur für personenbezogene Gesundheitsdaten. Bausteine Forschungsdatenmanagement.

Empfehlungen und Erfahrungsberichte für die Praxis von Forschungsdatenmanagerinnen und -managern. 2021:72-85.

Swart AN, Evers EG, Simons RLL et al. Modeling of Salmonella Contamination in the Pig Slaughterhouse. Risk Analysis 2016; 36 (3):498-515.